

Einfluss der Zellkernarchitektur auf die Entstehung interchromosomaler Austauschaberrationen in Hefe

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades für Naturwissenschaften

vorgelegt von
SABINE SCHÜSSLER
aus München

Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik

2004

Erstgutachter: PD Dr. Friedl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Eckardt-Schupp

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.04

INHALTSVERZEICHNIS

I. □ Einleitung	5
1. DNA-Doppelstrangbrüche, Doppelstrangbruchreparatur und Entstehung struktureller Chromosomenaberrationen	5
2. Topologie im Säugerzellkern	13
2.1. <i>Proximity effect</i>	13
2.2. Kernarchitektur	14
2.3. Dynamik gebrochener DSB-Enden	17
3. Modellsystem Hefe	18
3.1. Rabl-ähnliche Konformation	19
3.2. Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen in Hefe	21
4. Zielsetzung der Arbeit	22
II. Material und Methoden	24
1. Material	24
1.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel	24
1.2. Stämme	25
1.3. Plasmide	26
1.4. Oligonukleotide	27
1.5. Längen- und Konzentrationsstandards	33
1.6. Enzyme mit zugehörigen Puffern	33
1.7. Sonstige Materialien	34
1.8. Geräte	34
1.9. Computerprogramme und Datenbanken	35
1.10. Häufig verwendete Puffer und Lösungen	35
1.11. Medien	36
2. Methoden	38
2.1. Mikrobiologische Methoden	38
2.1.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	38
2.1.2. Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.1.3. Bestimmung der Plattierungseffizienz	39

2.1.4.	Kurzzeitige Expression der HO-Endonuklease	39
2.1.5.	Zellzahl-Bestimmung	40
2.2.	Standardmethoden der Molekularbiologie	40
2.2.1.	Ligation von DNA-Fragmenten	40
2.2.2.	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	41
2.2.3.	Transformation kompetenter Bakterienzellen	41
2.2.4.	Schnellisolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Mini-Präp)	41
2.2.5.	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Midi-Präp)	42
2.2.6.	Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen mit Phenol	42
2.2.7.	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	43
2.2.8.	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	43
2.2.9.	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
2.2.10.	Transfer von DNA-Molekülen auf eine Nylonmembran	44
2.2.11.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.2.12.	Reinigung von PCR-Produkten	45
2.2.13.	Sequenzanalyse	46
2.3.	Herstellung kompetenter Hefezellen und Hefetransformation	46
2.4.	UV-C-Bestrahlung von Hefezellen	47
2.5.	Detektion von Chromosomenaberrationen mittels Pulsfeld- Gelelektrophorese (PFGE)	48
2.5.1.	Isolierung chromosomaler Hefe-DNA für die PFGE	48
2.5.2.	Gelelektrophoretische Auftrennung chromosomaler DNA mittels PFGE	49
2.6.	Isolierung von DNA aus LMP-Agarosegelen mittels Agarase	50
2.7.	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Fragmenten	51
2.7.1.	Markierung eines Fragmentes mit Digoxigenin	51
2.7.2.	Hybridisierung mit einer Dig-markierten DNA-Sonde	52
2.7.3.	Immunologische Detektion Dig-markierter Hybride mittels Chemolumineszenz	53
2.7.4.	Immunologische Detektion Dig-markierter Hybride mittels Farbe	54
2.7.5.	Entfernung einer gebundenen Chemolumineszenz-detektierten Dig-Sonde	56

2.8. Nachweis spezifischer Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Fragmenten	56
2.8.1. Markierung eines Fragmentes mit Radioaktivität	56
2.8.2. Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde	57
2.8.3. Entfernung einer gebundenen radioaktiven Sonde	58
2.9. Computeranalyse von Nukleinsäuren	58
2.9.1. Bioinformatik	58
2.9.2. Moleküllängen-Bestimmung der Hefechromosomen	59
2.9.3. Statistische Auswertung	59
III. Kartierung von Bruchpunkten strahleninduzierter Translokationen in Hefe	61
1. Erhöhte Translokations-Beteiligung der Chromosomen V und VIII	61
2. Strategie und Etablierung der Kartierung von Translokations-Bruchpunkten	65
3. Kartierung der Bruchpunkte auf Chromosom V und VIII	75
4. Kartierung der Bruchpunkte auf den Partnerchromosomen von Chromosom V und VIII	81
5. Feinkartierung	84
6. Analyse der Bruchpunkt-Verteilung	86
7. Zusammenfassung der Ergebnisse	93
IV. Einfluss der Lokalisierung Endonuklease-induzierter DSB auf die Fehlverknüpfungshäufigkeit	94
1. Konstruktion der Teststämme	94
2. Analyse der Verteilung der Reparatur-Ereignisse in den Teststämmen	109
3. Zusammenfassung der Ergebnisse	113
V. Diskussion	114
VI. Zusammenfassung	124
VII. Literaturverzeichnis	127
Anhang	142

I. □ EINLEITUNG

Eine der wichtigen Auswirkungen ionisierender Strahlung in Zellen ist die Induktion von Chromosomenaberrationen (CA). Für den Menschen ist dies insofern bedeutsam, da ionisierende Strahlung zu denjenigen Noxen gehört, die exogen auf ihn einwirken. Ursprung dieser Strahlung sind einerseits natürliche Strahlungsquellen mit beispielsweise terrestrischer oder kosmischer Herkunft. Andererseits entsteht Strahlenbelastung auch durch anthropogene Quellen, vor allem in Form von Röntgenstrahlung in der medizinischen Diagnostik. Entscheidend für den Menschen ist die mögliche schädigende Wirkung auf seine Gesundheit: Chromosomenaberrationen in Säugerzellen werden mit Krebsentwicklung in Verbindung gebracht. Ein bekanntes Beispiel ist das Philadelphia-Chromosom, bei dem als Ergebnis einer Chromosomenaberration eine neue Genaktivität (*BCR-ABL*) entsteht und das bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie beobachtet wird (Balmain *et al.*, 2003). Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass Personen mit einer erhöhten Anzahl von Chromosomenaberrationen in ihren peripheren Lymphozyten ein signifikant erhöhtes Risiko zur Kanzerogenese erkennen lassen (Hagmar *et al.*, 1998; Bonassi *et al.*, 2000).

1. DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHE, DOPPELSTRANGBRUCHREPARATUR UND ENTSTEHUNG STRUKTURELLER CHROMOSOMENABERRATIONEN

Eingehend untersucht wird die clastogene Strahlungswirkung bereits seit über 75 Jahren (Muller, 1927); die retrospektive biologische Dosimetrie durch Bestimmung der Häufigkeit von Aberrationen in peripheren Lymphozyten liefert dabei einen bedeutsamen Beitrag für die Belange des Strahlenschutzes. Die molekularen Ursachen, die zur Entstehung struktureller Chromosomenaberrationen führen, sind allerdings weitgehend ungeklärt. Allgemein anerkannt ist jedoch, dass das dafür hauptsächlich verantwortliche initiale Schadensereignis der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) ist. Nachgewiesen wurde dies erstmals in folgendem Modellsystem: Nachdem in Zellen DNA-schneidende Restriktionsenzymen eingebracht

wurden, wurden Aberrationen gefunden, die vergleichbar mit dem Ergebnis einer Bestrahlung waren (Bryant, 1988). Erzeugt werden DSB – abgesehen von Bestrahlung – auch durch andere genotoxische Agenzien, wie Radiomimetika, sowie durch endogene Vorgänge. Dazu gehören beispielsweise generelle und ortsspezifische Rekombinations-Ereignisse (z.B. meiotische Rekombination, V(D)J-Rekombination) sowie Topoisomerase II-vermittelte Prozesse. Die Enden liegen dabei jedoch meist nicht, wie etwa bei exogen zugefügten DSB, frei vor, sondern sind enzymatisch fixiert. Eine weitere wichtige Ursache endogener DSB sind Replikationsstörungen, die direkt oder infolge von Prozessierung zu Brüchen führen.

Für die Zelle bedeutet ein DSB durch Zerstörung der Integrität der Chromosomen eine Bedrohung der Genomstabilität: Er kann zum Verlust genetischen Materials führen, zu Störung von Transkription und Replikation sowie zu Zellzyklusarrest und Apoptose bzw. Zelltod (van Gent *et al.*, 2001). Um dies zu vermeiden, hat sich im Laufe der Evolution eine Vielzahl von DSB-Reparaturmechanismen entwickelt. Die dabei genutzten Proteine sind in ihrer Struktur und Funktion größtenteils hoch konserviert, so dass Homologien von Bakterien über Hefe bis hin zum Menschen festzustellen sind (Kanaar *et al.*, 1998). Für das Schicksal der Zelle hat die DSB-Reparatur eine große Bedeutung: Fehler können zu schwerwiegenden Mutationen führen, wie z.B. strukturelle Chromosomenaberrationen. Diese entstehen durch Fehlverknüpfung der durch einen DSB generierten Enden. Der Ort, an dem die fehlverknüpften Chromosomenenden verbunden sind, ist als Bruchpunkt definiert.

Bisher sind drei unterschiedliche Mechanismen bekannt, die für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen zuständig sind:

- nichthomologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ)
- homologe Rekombination (HR)
- Einzelstrangverknüpfung (*single strand annealing*, SSA)

Die Bedeutung der einzelnen Mechanismen ist für verschiedene Organismen unterschiedlich. Nichthomologe Endverknüpfung, auch illegitime Rekombination (IR) genannt, scheint der bevorzugte Mechanismus in Säugerzellen zu sein (Jackson, 2002), dort wurde er auch zuerst beschrieben (Wilson *et al.*, 1982; Roth *et al.*, 1985). Nachgewiesen wurde er jedoch außer in höheren Eukaryonten auch in Bakterien (Conley *et al.*, 1986; King *et al.*, 1993) und niederen

Eukaryonten (Schiestl und Petes, 1991; Goedecke *et al.*, 1994; Mezard und Nicolas, 1994). Der Ablauf der nichthomologen Endverknüpfung, die nach klassischer Definition zur *breakage-and-reunion*-Theorie¹ gehört (Übersicht bei Savage, 1996), beschreibt die direkte Zusammenfügen freier DNA-Enden eines Bruchortes, die keine oder nur wenig Sequenzhomologie zeigen (Übersicht u.a. bei Lieber, 1999; Lewis und Resnick, 2000; Jackson, 2002). Somit kann eine durch den Bruch verloren gegangene Sequenz nicht wieder hergestellt werden. Des Weiteren werden die Bruchenden der interagierenden Partner vor Neuverknüpfung (mittels Deletion oder *fill-in*-Synthese) limitiert prozessiert. Für einen korrekten Ablauf der Endverknüpfung (siehe Abbildung 1) sind folgende Proteine notwendig, deren Rolle jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt ist: Das Ku-Heterodimer, bestehend aus KU70 und KU80 (homolog zu yKu70p und yKu80p in Hefe) (Featherstone und Jackson, 1999; Friedl, 2002), wird auch als *caretaker* der genomischen Stabilität bezeichnet, da bei Inaktivierung eine erhöhte chromosomale Instabilität zu beobachten ist (Roth und Gellert, 2000). Im Reaktionsablauf nutzt es seine Fähigkeit, sequenzunabhängig an doppelsträngige DNA-Enden zu binden. An das gebundene Ku bindet reversibel die fast 470 kDa große katalytische Untereinheit der so genannten DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs). Die mit Ku als regulatorischer Komponente entstandene DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) ist nun durch die Bindung an die DNA-Enden aktiviert. Sie hat die Fähigkeit sich selbst sowie auch verschiedene andere DNA-bindende Enzyme zu phosphorylieren. Dadurch kommt ihr neben einer Reparaturfunktion auch eine Funktion in der Signalkette in Zuge der Zellantwort auf DSB zu. Schließlich ligiert der durch das gebundene Ku stimulierte Proteinkomplex aus DNA Ligase IV und XRCC4 (homolog zum Hefe-Proteinkomplex Lig4p – Lif1p) den Bruch (Chu, 1997; Ramsden und Gellert, 1998; van Gent *et al.*, 2001; Pastink *et al.*, 2001). Wird einer der genannten Faktoren inaktiviert, so führt dies zur Strahlensensitivität sowie zu deutlichen Defekten in der DSB-Reparatur.

¹ englische, nicht übersetzbare Fachworte sind im Text kursiv geschrieben

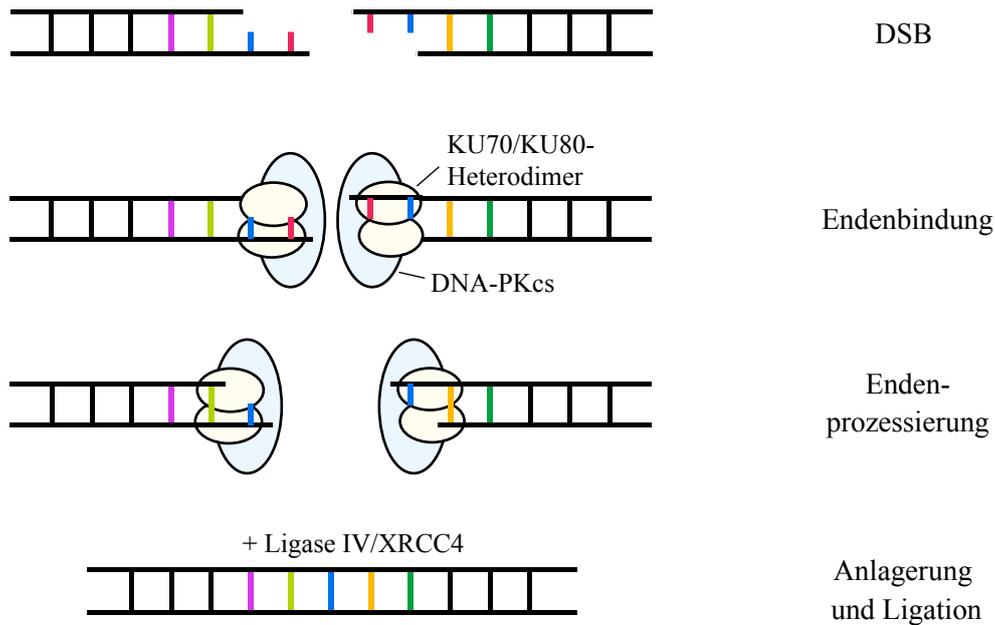


Abb. 1: DSB-Reparaturmodell der nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ) in Säugerzellen
(modifiziert nach van Gent *et al.*, 2001)

In dem NHEJ-Modell sind von den bisher bekannten Proteinfaktoren drei bezeichnet, die in Säugerzellen hauptverantwortlich für die Reaktion sind. Das ist zum einen das KU70/KU80-Heterodimer, an das der zweite Faktor, die katalytische Untereinheit einer DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs), gebunden ist. Dieser Proteinkomplex bindet sich – nach Stattfinden eines DSB – an jeweils ein Doppelstrangende. Er ist beteiligt an der Zusammenführung der DNA-Enden sowie an der Endenprozessierung; dabei können einige Nukleotide verloren gehen oder neu eingebaut werden. Mit Hilfe des Proteinkomplexes Ligase IV – XRCC4 erfolgt schließlich nach einer intermolekularen Anlagerung eine End-an-End-Ligation.

Wird ein Doppelstrangbruch mit Hilfe der homologen Rekombination repariert, so sind dafür – im Gegensatz zur NHEJ-Reparatur – ausgedehnte homologe Bereiche notwendig. Sie erlauben es den DNA-Molekülen miteinander zu rekombinieren, so dass der Bruchbereich vollkommen wiederhergestellt werden kann (konservativer Prozess) (Übersicht u.a. bei Pâques und Haber, 1999; van den Bosch *et al.*, 2002; Jackson, 2002; Symington, 2002; Prado *et al.*, 2003). Zu finden sind solche homologen Bereiche auf Schwesterchromatiden oder homologen Chromosomen. Es können jedoch auch andere übereinstimmende bzw. sehr ähnliche Genomregionen genutzt werden, wie etwa repetitive Sequenzen. Man spricht dann von ektopischer HR (Lichten und Haber, 1989). Bei Säugern scheint die HR eine untergeordnete Bedeutung zu haben (Kanaar *et al.*, 1998), wobei neuere Erkenntnisse eine Rolle bei beispielsweise Schwesterchromatid-Austausch (*sister chromatid exchange*, SCE)

(Johnson und Jasin, 2000) oder auch in der Kanzerogenese (Bishop und Schiestl, 2002) zeigen. Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dagegen ist die HR der vorwiegende – und auch gut untersuchte – Reparaturmechanismus, wobei er hinsichtlich des Ablaufes und der verwendeten Proteine mit den Säugern vergleichbar ist. Im geläufigsten Hefemodell, basierend auf Szostak *et al.*, 1983 (siehe Abbildung 2), sind die Gene *RAD50*, *51*, *52*, *54*, *55*, *57*, *XRS2* und *MRE11* unbedingt notwendig, die alle zur *RAD52*-Epistasisgruppe gehören (Pâques und Haber, 1999; Pastink *et al.*, 2001). Im Reaktionsablauf wird dabei zunächst der DSB durch exonukleolytische Degradierung unter Beteiligung des Komplexes Rad50p – Xrs2p – Mre11p zu einer Lücke mit 3'-überhängenden Einzelsträngen erweitert (Bressnan *et al.*, 1999; Pastink *et al.*, 2001). Für die restlichen Proteine, Rad51p, 52p, 54p, 55p, 57p, gibt es Hinweise, dass sie in einem Multiproteinkomplex interagieren, der an der darauf folgenden Strang-Transfer-Reaktion beteiligt ist („Rekombinosom“, Pâques und Haber, 1999). Entscheidende Rollen haben dabei die Proteine Rad51p, Rad52p und Rad54p. Rad51p fördert das Eindringen der DNA in den Donor (Namsaraev und Berg, 1997; Mazin *et al.*, 2000; Burgess 2002): Als RecA-Homolog (Shinohara *et al.*, 1992) kann es ein Nukleofilament auf Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA bilden und katalysiert ATP-abhängig den Strangaustausch. Rad52p führt zu einer Bindung der Bruchenden (Sugiyama *et al.*, 1998; Kuzminov, 2001): Es bindet ssDNA und unterstützt die Anlagerung zweier Einzelstränge. Für die HR in Hefe ist es ein essentieller Faktor, da *rad52*-Mutanten einen vollkommenen HR-Defekt sowie stark erhöhte Strahlensensitivität zeigen. Im Vergleich dazu ist bei *rad51*- und *rad54*-Mutanten ein nur weitgehender HR-Defekt (einschließlich der Strahlensensitivität) zu sehen. Rad54p ist vermutlich an der Strangentwindung beteiligt (van Komen *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 2000); es hat eine Doppelstrang-abhängige ATPase-Aktivität und fungiert wahrscheinlich als Helikase. Im weiteren Reaktionsablauf (siehe Abbildung 2) wird die DNA-Lücke mittels Neusynthese gefüllt, wobei das intakte Homolog als Matrize dient. Nach Bildung der zweiten *Holliday*-Struktur entsteht schließlich ein Intermediat, das auf zwei Arten aufgelöst werden kann: entweder mit einem nicht-reziproken oder einem reziproken Informationsaustausch, d.h. ohne oder mit *crossing over*. Durch Genkonversion, d.h. einen Informationstransfer vom Donormolekül zum Rezipienten, kann es letztlich zum Verlust genetischer Information kommen (Verlust der Heterozygotie). Auch der reziproke Austausch beinhaltet eine Genkonversion, zusätzlich kommt es aber auch zu einer Änderung der Kopplung flankierender Marker.

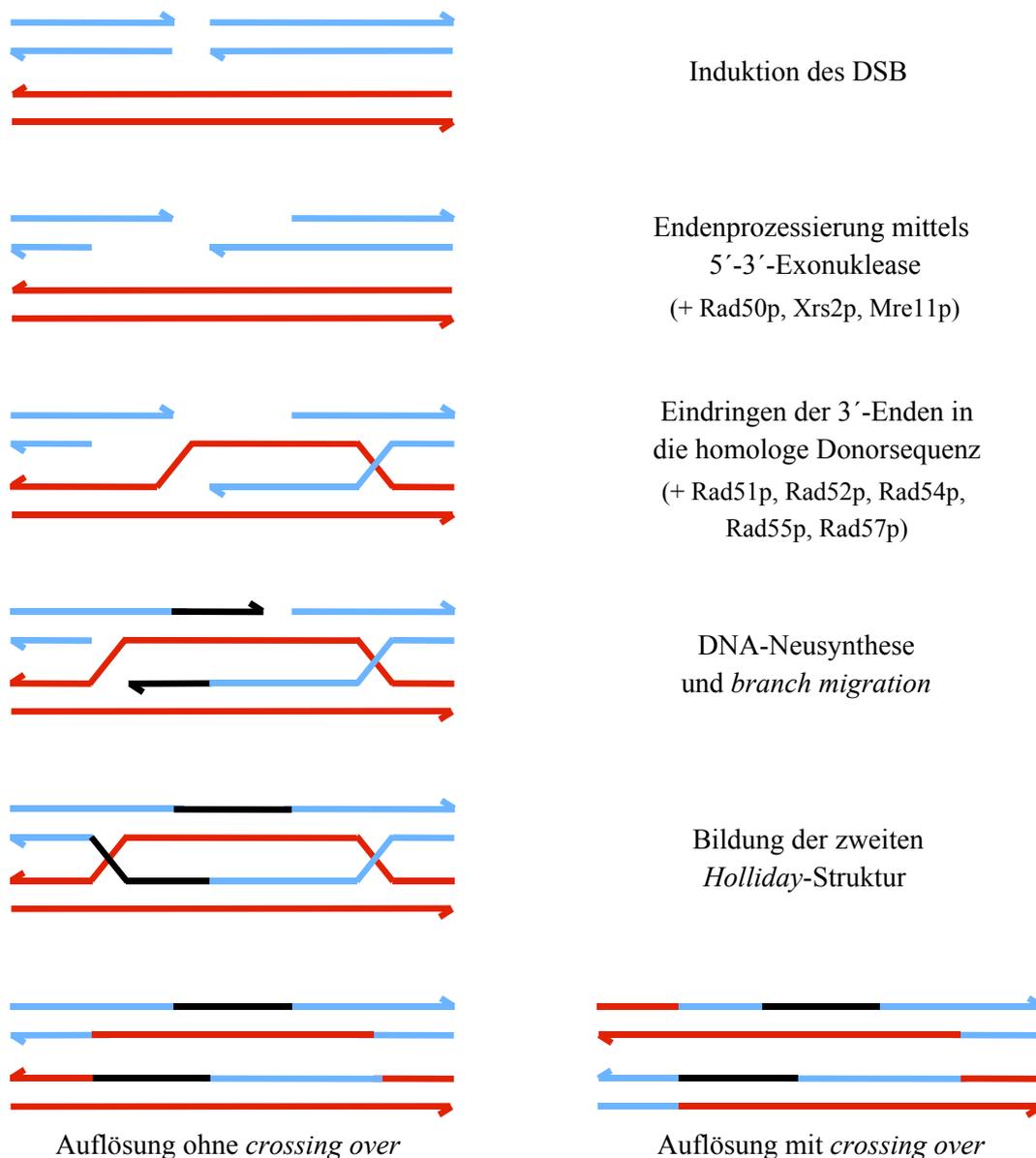


Abb. 2: DSB-Reparaturmodell der homologer Rekombination (HR) bei der Hefe *S. cerevisiae*, basierend auf Szostak *et al.*, 1983 (modifiziert nach Haber, 2000)

Nach Induktion des DSB werden die DNA-Enden mit Hilfe einer 5'-3'-Exonuklease zu 3'-überhängenden Einzelsträngen prozessiert. Dabei ist der Proteinkomplex Rad50p – Xrs2p – Mre11p (Rad: *radiation sensitive*, Xrs: *x-ray sensitive*, Mre: *meiotic recombination*) aktiv. Anschließend dringen die 3'-Enden in das intakte homologe Donormolekül ein. Bei dieser Strang-Transfer-Reaktion sind unter anderem die Proteine Rad51p, Rad52p, Rad54p, Rad55p und Rad57p beteiligt. Die Hydroxylreste an den 3'-Enden bilden die *primer* für die Polymerasen, so dass daraufhin eine Synthese der neuen Stränge an der homologen Matrice stattfinden kann. Bei der so ausgebildeten *Holliday*-Struktur (*Holliday junction*) kann der Knotenpunkt wandern (*branch migration*), dabei können ausgeprägte Genkonversionen entstehen. Nach Bildung der zweiten *Holliday*-Struktur sowie Ligation der DNA-Enden entsteht ein Intermediat, das durch Einfügen von Einzelstrangbrüchen aufgelöst wird. Dabei kommt es entweder zu einer reinen Genkonversion (Auflösung ohne *crossing over*) oder zu einer Genkonversion verbunden mit einem *crossing over*.

Bei der Einzelstrangverknüpfung handelt es sich um einen ebenfalls Homologie-abhängigen Reparaturweg, der an einem Doppelstrangbruch zwischen zwei flankierenden, in gleicher Orientierung gelegenen Sequenzwiederholungen (*direct repeats*) erfolgen kann (Übersicht u.a. bei Pâques und Haber, 1999; Pastink *et al.*, 2001). Dieser Mechanismus wurde zunächst von Lin und Mitarbeitern für Säugerzellen postuliert (Lin *et al.*, 1984; Lin *et al.*, 1990), später jedoch auch in Hefe nachgewiesen (Ozenberger und Roeder, 1991; Fishman-Lobell *et al.*, 1992; Mezard *et al.*, 1992). In einem gängigen und gut untersuchten Hefemodell (siehe Abbildung 3) wurde gezeigt, dass ausgehend von einem DSB 3'-überhängende Einzelstränge generiert werden (Sugawara *et al.*, 2000). Nach weiterer Prozessierung der Enden bis hin zur Exposition homologer Bereiche können sich anschließend einzelsträngige Sequenzen komplementär aneinander anlagern. Überhängende Enden werden endonukleolytisch abgespalten unter Verwendung des Komplexes Rad1p – Rad10p sowie der Proteine Msh2p und Msh3p (Ivanov und Haber, 1995; Sugawara *et al.*, 1997), bevor der Bruch anschließend ligiert wird. Das Ergebnis der Reparatur zeigt eine Deletion einer der beiden repetitiven Einheiten sowie des dazwischen liegenden nichthomologen Sequenzbereiches, weshalb dieser Prozess auch als nicht-konservativ bezeichnet wird. In den Ablauf der Einzelstrangverknüpfung sind noch weitere Proteine involviert, wie etwa Rad52p und Rad59p, bei deren Abwesenheit der Mechanismus auf einem drastisch reduzierten Niveau verläuft (Sugawara *et al.*, 2000; Pastink *et al.*, 2001).

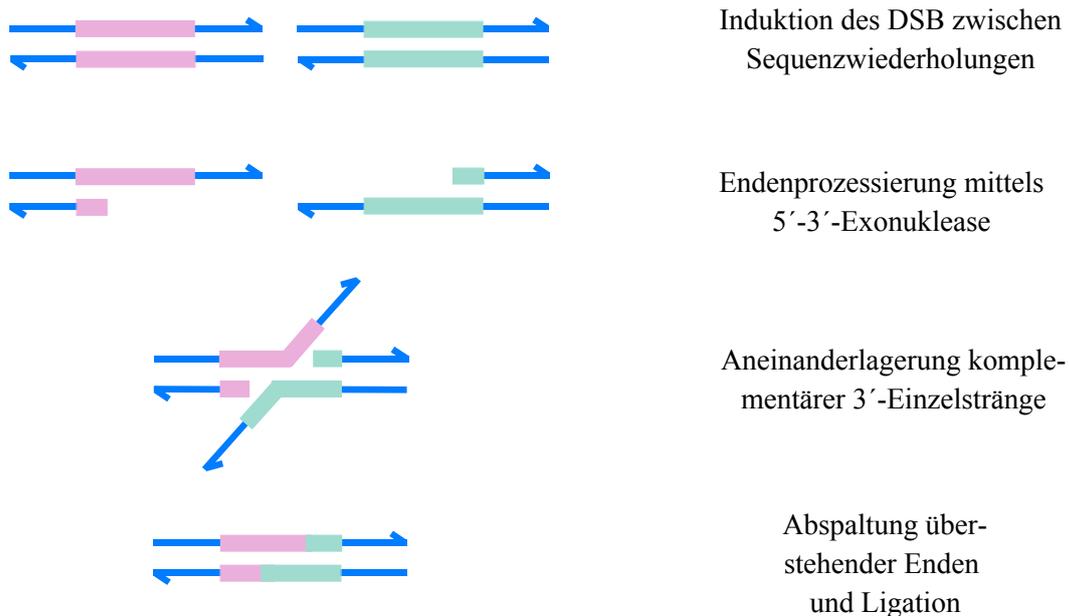


Abb. 3: DSB-Reparaturmodell der Einzelstrangverknüpfung (SSA) bei der Hefe *S. cerevisiae*
(modifiziert nach Pastink *et al.*, 2001)

Die Rekombination wird initiiert durch einen DSB, der zwischen zwei homologen Sequenzen stattfindet. Die DNA-Enden werden durch Degradation mit einer 5'-3'-Exonuklease zu 3'-überhängenden Einzelsträngen prozessiert, bis homologe Bereiche exponiert sind. Die Länge der Einzelstränge hängt damit von der Distanz zwischen den Sequenzwiederholungen ab. Die komplementären Strangteile können sich aneinander anlagern, bevor die überstehenden Enden unter zur Hilfenahme der Proteine Rad1p – Rad10p sowie Msh2p und Msh3p abgespalten werden. Bei den Proteinen Msh2p und 3p wurde allerdings beobachtet, dass sie nur zum Einsatz kommen, wenn – wie in den meisten Fällen – die Länge der aneinander gelagerten Regionen 1,2 kb nicht übersteigt. Schließlich wird nach einer DNA-Neusynthese der Bruch über Ligation geschlossen.

Alle bislang bekannten DSB-Reparaturwege können potentiell zu strukturellen Chromosomenaberrationen führen (Pfeiffer *et al.*, 2000). Bei der homologen Rekombination reicht ein DSB zur Bildung einer Translokation aus, wenn es zu einer Interaktion mit einem homologen Bereich an einer ektopischen Position und einer Auflösung des sich anschließend bildenden Rekombinations-Intermediat mittels *crossing over* kommt. Das Vorkommen von so erzeugten Translokationen gilt als eher selten, wobei sich einige Autoren mit möglichen Beispielen auseinandersetzen (Bishop und Schiestl, 2002; Kolomietz *et al.*, 2002). Im Falle der nicht-homologen Endverknüpfung liegt es dagegen nahe, von einem hohen Potential zur Fehlreparatur auszugehen. Notwendig sind dabei (wie auch bei der Einzelstrangverknüpfung) zwei oder mehr DSB, die – als einfachster Fall für eine Translokationsentstehung – in falscher Kombination zusammengesetzt werden. Die einzige Grundvoraussetzung für solch eine

Fehlverknüpfung ist vermutlich, dass die beteiligten DNA-Enden irgendwann im Reparaturverlauf sowohl zeitlich als auch räumlich zusammentreffen. Unser Wissen über die Parameter, die dieses Zusammentreffen beeinflussen, v.a. hinsichtlich der Kernarchitektur bzw. der Positionierung der Chromosomen im Zellkern, ist bis heute im Gegensatz zu dem weitgehend bekannten biochemischen Ablauf der Reparaturwege (siehe oben) sehr gering. Die mögliche Rolle topologischer Faktoren bei der Fehlverknüpfung wird allerdings seit den frühen Tagen der Strahlenbiologie diskutiert (z.B. Lea, 1946).

2. TOPOLOGIE IM SÄUGERZELLKERN

2.1. *PROXIMITY EFFECT*

Einer der topologischen Faktoren, der einen möglichen Einfluss auf die Bildung struktureller Chromosomenaberrationen hat, ist die initiale Entfernung zwischen zwei DSB. Dies wird als „*proximity effect*“ bezeichnet (Übersicht bei Savage, 1996; Sachs *et al.*, 1997). Erste Hinweise auf einen *proximity effect* zeigten sich bei der Beobachtung des Verhältnisses zwischen inter- und intrachromosomalen Translokationen nach Bestrahlung (dies entspricht in etwa der D/R-Rate für das Verhältnis *dicentric/centric ring*), das kleiner war als bei rein zufälligen Interaktionen innerhalb des Zellkerns erwartet. Aufgrund der territorialen Organisation der Chromosomen im Zellkern (siehe unter I.2.2.), sind sich zwei DSB auf demselben Chromosom im Durchschnitt näher als zwei DSB auf unterschiedlichen Chromosomen. Diese Nähe erhöht also offenbar die Wahrscheinlichkeit einer Fehlverknüpfung. Ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die Aberrationshäufigkeit nach dicht-ionisierender Bestrahlung linear mit der Dosis korreliert, während sie nach locker-ionisierender Bestrahlung mit dem Quadrat der Dosis zunimmt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die durch locker-ionisierende Strahlung erzeugten DSB räumlich eher zufällig verteilt sind und eine Fehlverknüpfung aufgrund des Bruchabstands nicht so häufig stattfindet wie bei DSB, die, erzeugt durch dicht-ionisierende Strahlung, in dichter Häufung vorkommen und so eine ausreichende Nähe für eine Fehlverknüpfung haben können (Sachs *et al.*, 2000; Rothkamm und Löbrich, 2002). Während das Konzept des *proximity effects* weitgehend akzeptiert ist, haben jedoch Versuche, die bevorzugte oder auch die maximale Interaktionsdistanz zu definieren, zu sehr

unterschiedlichen Ergebnissen geführt (Savage, 1996; Sachs *et al.*, 1997). Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die verwendeten Modelle sich hauptsächlich auf physikalische Parameter konzentrieren. Informationen über biologische Parameter, wie etwa Chromatinstruktur oder Kernarchitektur, sowie deren Rolle bei der Aberrationsentstehung, wurden erst in den letzten Jahren in größerem Umfang verfügbar (Friedl, 2003). Es ist zu erwarten, dass sie die Beantwortung vieler Fragen ermöglichen werden.

2.2. KERNARCHITEKTUR

Obwohl die Sequenz des menschlichen Genoms inzwischen bekannt ist, ist bezüglich seiner Expression noch vieles unklar. Ein wichtiger regulatorischer Faktor bei der Genexpression ist die räumliche Organisation der Chromosomen, die wir bis jetzt allerdings nur ansatzweise verstehen. Beginnend mit Grundlagenstudien Anfang der 80er Jahre (Cremer *et al.*, 1982) ist es aufgrund großer Fortschritte im mikroskopischen Bereich in den letzten Jahren jedoch gelungen, einen genaueren Einblick in die Architektur des Zellkerns zu gewinnen. Man beobachtet eine Einteilung in so genannte Chromosomenterritorien (CT), die aus einzelnen, voneinander abgegrenzten Chromosomen bestehen (Übersicht u.a. bei Chevret *et al.*, 2000; Leitch *et al.*, 2000; Cremer und Cremer, 2001; Spector, 2003). Diese Organisation höherer Ordnung ist während der ganzen Interphase weitgehend stabil (Walter *et al.*, 2003).

Hinsichtlich der Entstehung von Austauschaberrationen ist die nichtzufällige Chromosomenanordnung ein bedeutender Faktor: Die Kernarchitektur, das heißt die Positionierung der Chromosomen im Kern, beeinflusst zusammen mit dem *proximity effect* die Wahrscheinlichkeit, mit der gewisse Regionen an Austausch-Ereignissen beteiligt sind. Dementsprechend sollten Chromosomen aus benachbarten CTs bzw. deren Grenzzonen eher interagieren als weit entfernte Territorien. Dies ist bedeutsam, da die Wirkung von strukturellen Chromosomenaberrationen auf die Zellen von der Lage der Bruchorte abhängt. Balancierte Austausche zwischen Heterochromatinbereichen, bei denen weder Gene noch regulatorische Sequenzen beteiligt sind, verursachen vermutlich in somatischen Zellen keine Probleme, solange die dabei gebildeten Chromosomen mitotisch stabil sind. Sind jedoch Gene oder regulatorische Sequenzen an Austauschreaktionen beteiligt, kann es zu Verlusten in der

Genaktivität kommen, oder zu Regulationsverlusten, die, falls relevante Gene betroffen sind, zur Tumorgenese beitragen können.

Genreiche Chromosomen in Säugerzellen tendieren dazu, im Inneren des Zellkerns zu liegen, während genarme Chromosomen sich bevorzugt an der Peripherie befinden. Beobachtet wurde dies an der Verteilung der etwa gleich großen Chromosomen 19 (hohe Gendichte) und 18 (niedrige Gendichte) in Lymphozytenzellkernen (Croft *et al.*, 1999; Cremer *et al.*, 2001). Die restlichen Chromosomen zeigen in Zellkernen von Lymphozyten und Primärfibroblasten gleiche Lokalisierungs-Präferenzen (Boyle *et al.*, 2001). Weitere Studien ergaben, dass diese Art der Anordnung evolutionär konserviert ist (Tanabe *et al.*, 2002), so dass man von einer funktionellen Bedeutung ausgehen kann. Ebenfalls Einfluss auf die CT-Verteilung hat die Chromosomengröße, da große Chromosomen eher in der Peripherie und kleine Chromosomen eher im Inneren des Zellkerns lokalisiert sind (Sun *et al.*, 2000; Cremer *et al.*, 2001). Die Konsequenz dieser so genannten radialen Positionierung der Chromosomen ist, dass genarme/große CTs an der Peripherie aufgrund des Kontaktes zur Kernhülle weniger Interaktionsmöglichkeiten mit anderen CTs haben, als genreiche/kleine CTs im Kerninneren. Dies sollte Auswirkungen auf die Wahrscheinlichkeit, mit der spezifische Chromosomen in eine interchromosomale Austauschaberration involviert sind, haben. In der Literatur gibt es erste Hinweise darauf, dass die Verteilung von Bruchpunkten bei strahlungsinduzierten Translokationen nicht zufällig ist. Cornforth und Mitarbeiter zeigten in einer neueren Studie, bei der nach ionisierender Bestrahlung eine *multiplex FISH (fluorescence in situ hybridization)* durchgeführt wurde (d.h. jedes Chromosom erhält eine eigene Farbe), einen geringen aber signifikanten Anstieg von Interaktionen zwischen denjenigen Chromosomen, die bekanntermaßen präferenziell im Kerninneren lokalisiert sind (Cornforth *et al.*, 2002).

Die Positionierung spezifischer chromosomaler Regionen innerhalb eines Chromosomenterritoriums ist ein weiterer relevanter Parameter. Die Territorien weisen eine so genannte Polarität auf: Früh-replizierende, transkriptionsaktive Regionen tendieren zu einer Ausrichtung zum Kerninneren, während spät-replizierende Regionen sich in Richtung Peripherie orientieren (Ferreira *et al.*, 1997; Sadoni *et al.*, 1999). Zusammen mit der radialen Positionierung nach der Gendichte führt diese Polarität zu einer Anreicherung von genreichen DNA-Abschnitten in einer Subregion im Inneren des Zellkerns. Verglichen mit einer

Zufallspositionierung, bei der die wenigen (~ 3%) vorhandenen kodierenden DNA-Regionen des Genoms im Kern verstreut wären, könnte diese Anreicherung im Kerninnern die Wahrscheinlichkeit von Interaktionen zwischen Genen bzw. regulatorischen Sequenzen signifikant erhöhen und so Tumorgenese-relevant sein (Friedl, 2003).

Zur differenzierten Einteilung einzelner Chromosomenbereiche in einem CT wurde ein genauerer Zusammenhang zwischen CT und Genaktivität gesucht. Transkriptionsaktive Gene scheinen, abgesehen von ihrer allgemeinen Präferenz zum Kerninnern, zu einer Lokalisierung an den „Territoriumsoberflächen“ zu tendieren (Verschure *et al.*, 1999). Diese Oberflächen sind jedoch nicht mit „kugelartigen Hüllen“ gleichzusetzen. Nach Beobachtung einiger Autoren entsprechen CTs vielmehr einem Kanalnetzwerk, durchzogen von Interchromatin-Domänen (ICD-Modell, *interchromatin domain*; Cremer und Cremer, 2001): Dieses Kompartiment expandiert von den Kernporen bis zu den Bereichen zwischen den CTs und reicht schließlich mit weitreichenden Verzweigungen in die Territorien hinein. Diese große interne Oberfläche schafft ein retikuläres System, durch das Proteinkomplexen (die für Transkription, RNA-Prozessierung und andere Prozesse benötigt werden) Zugang zum Chromatin gewährt wird. Die Struktur der CTs ist also schwammartig, was bedeutet, dass eine Lokalisierung an der Oberfläche nicht unbedingt eine Kontaktmöglichkeit zu anderen CTs mit sich bringt. Im Vergleich zu genarmen oder heterochromatischen Regionen sollten jedoch trotzdem mehr genreiche Regionen in nahem Kontakt zu Regionen anderer CTs stehen, was ebenfalls Tumorgenese-relevante, interchromosomale Gen-Gen Interaktionen begünstigen könnte (Friedl, 2003).

Allgemein scheint die Festlegung der Chromosomenpositionierung im Zellkern sehr komplex. Ein Grund für die Problematik ist sicherlich, dass Positionierungs-Regeln in verschiedenen Organismen, Geweben oder Zelltypen unterschiedlich sein können (Parada und Misteli, 2002). Zudem können sich Nachbarschaftsbeziehungen zwischen CTs von einem Zellzyklus zum nächsten ändern (Walter *et al.*, 2003). Das bedeutet, dass weder die Interaktionswahrscheinlichkeit zwischen zwei beliebigen chromosomalen Positionen, noch bevorzugte Translokationspartner ohne weiteres vorhergesagt werden können. Vielmehr kann zum jetzigen Zeitpunkt nur in umgekehrter Fragestellung – also von der Aberration zurück zur Kernarchitektur – untersucht werden, ob Sequenzen, die bekanntermaßen an den Verknüpfungsstellen translozierter Chromosomen liegen, sich im Interphasekern näher sind als

bei einer Zufallspositionierung zu erwarten wäre. An den Beispielen der *BCR*- und *ABL*-Loci auf den Chromosomen 9 und 22 (die Fusion führt zu chronisch myeloischer Leukämie, CML) sowie der *PML*- und *RAR α* -Gene auf den Chromosomen 15 und 17 (die Fusion führt zu akuter Promyelozyten-Leukämie, APL) ist zu sehen, dass in beiden Fällen die Distanz der Loci in hämatopoetischen Zellen kleiner zu sein scheint, als bei rein zufälliger Positionierung zu erwarten wäre (Lukasova *et al.*, 1997; Neves *et al.*, 1999). Auch die Gene *RET* und *H4*, die auf Chromosom 10 etwa 30 Megabasen voneinander entfernt sind (die Fusion durch intrachromosomale Inversion wurde in Fällen von strahleninduzierten papillären Schilddrüsentumoren beobachtet), liegen in normalen Schilddrüsenzellen häufiger benachbart vor als in anderen Zelltypen (Nikiforova *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen suggerieren, dass die Kernarchitektur in Verbindung mit dem *proximity effect* einen starken Einfluss auf die Transformationsfrequenz haben könnte, sie weisen aber auch darauf hin, dass die Bedeutung des jeweiligen Zelltyps nicht zu unterschätzen ist.

2.3. DYNAMIK GEBROCHENER DSB-ENDEN

Die bisherigen Überlegungen galten Interaktionen zwischen DNA-Bereichen, die schon zum Zeitpunkt der Schadensinduktion benachbart sind, womit die Wahrscheinlichkeit für eine Fehlverknüpfung erhöht wird. Dies entspricht der Hypothese, dass Austauschaberrationen nur zwischen Regionen entstehen, die bereits vor der Bruchinduktion in Kontakt standen (*contact first*-Hypothese; Savage, 2000). Die andere zu untersuchende Möglichkeit ist, dass die Bruchregionen bei Schadensinduktion weiter voneinander entfernt liegen und erst anschließend in nahen Kontakt treten (*breakage first*-Hypothese; Savage, 2000). Die dabei in Frage kommenden „Beförderungsmechanismen“ sind passive Diffusion oder aktiver Transport, z.B. infolge von Reparaturprozessen. Wie weit sich in solch einem Fall Bruchenden nach einem DSB voneinander wegbewegen, ist jedoch unklar. Einen Einfluss kann die Chromatinstruktur haben, sowie die Möglichkeit, dass freie Enden im Euchromatinbereich beweglicher sind als im Heterochromatinbereich.

Von großer Wichtigkeit ist in diesem Zusammenhang die Frage nach dem Ort der Reparatur. Kommen Reparaturproteine zum DNA-Schadensort oder wird die beschädigte DNA zu einem

spezifischen Reparaturort gebracht? Hinsichtlich des häufigen Auftretens komplexer Austauschaberrationen nach Bestrahlung wurde postuliert, dass die Wahrscheinlichkeit von Interaktionen zwischen drei oder mehr Bruchstellen ohne einen aktiven Prozess, der verschiedene Enden zueinander bringt, viel zu gering sei (Savage, 1996). Bei einem Zusammentreffen verschiedener Bruchorte an einem Reparaturort, der auch als „Reparaturfabrik“ bezeichnet werden kann, sind sowohl die Interaktionsdistanzen als auch die unterschiedlichen Interaktionsmöglichkeiten erhöht. Für das Fabrikmodell spricht, dass auch andere Prozesse des DNA-Metabolismus regional konzentriert sind (z.B. Transkription; Verschure *et al.*, 1999). Ein weiterer Hinweis darauf ist die Beobachtung, dass verschiedene Reparaturproteine sich nach Bestrahlung in Form von großen Komplexen zusammenlagern, so genannte Reparaturfoci (Haaf *et al.*, 1995; Paull *et al.*, 2000; Tashiro *et al.*, 2000; Mirzoeva und Petrini, 2001). Die Anzahl einzelner Proteintypen ist in diesen Foci höher als stöchiometrisch für die Reparatur eines DSB notwendig wäre (Essers *et al.*, 2002).

Während das Ausmaß Reparatur-begleitender Mobilität der DNA-Enden im Falle der nichthomologen Endverknüpfung noch unklar ist, ist es Grundvoraussetzung einer Reparatur durch homologe Rekombination, dass die Bruchstelle und die homologe Donorsequenz in engen physischen Kontakt kommen. Dabei ist völlig unklar, wie homologe potentielle Donorsequenzen im Zellkern gesucht und gefunden werden. Findet HR zwischen Schwesterchromatiden statt, was bei deren Vorhandensein präferenziell der Fall ist, kann man aufgrund der Kohäsine von großer räumlicher Nähe ausgehen. HR kann aber auch zwischen homologen Chromosomen erfolgen, die im Zellkern nicht nahe beieinander liegen (Cremer und Cremer, 2001), oder zwischen ektopischen Bereichen (Richardson *et al.*, 1998; Inbar und Kupiec, 1999), wobei über deren Positionierung keine Aussage möglich ist. Bei Betrachtung aller genannten Möglichkeiten kann man eine genomweite Homologiesuche der DNA-Enden im Zellkern bislang nicht ausschließen.

3. MODELLSYSTEM HEFE

Die Interaktionswahrscheinlichkeit zweier Bruchorte wird in einem höher entwickelten System, wie etwa Säugerzellen, durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Deshalb ist es

kaum verwunderlich, dass bei solch komplexen Wechselwirkungen Rolle und Bedeutung einzelner Faktoren bisher nur wenig charakterisiert wurden. Zur Untersuchung des Einflusses der Kernarchitektur auf die Translokationsentstehung – oder anders ausgedrückt, um der Frage nachzugehen, ob die Verteilung von Aberrationsbruchpunkten auf den Chromosomen die Anordnung bzw. Architektur von Chromosomen im Interphasekern widerspiegelt – ist ein System mit vergleichbar geringer Komplexität wünschenswert. Seine Eigenschaften sollen zum einen aus einer gut untersuchten Zellkernarchitektur während der Interphase bestehen, zum anderen soll durch Verwendung entsprechender Experimente bekannt sein, durch welchen Reparaturmechanismus eine gegebene Aberration entsteht. Um solche Untersuchungen durchzuführen, wurde in dieser Arbeit das Modellsystem der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Es ist einfach zugänglich und bietet in verschiedener Weise experimentelle Vorteile, einschließlich des Zugangs zum komplett sequenzierten Genom.

3.1. RABL-ÄHNLICHE KONFORMATION

Die Anordnung der Hefechromosomen im Interphasezellkern ist recht gut charakterisiert: Sie ähnelt der Rabl-Konformation, benannt nach Carl Rabl, der dieses Arrangement erstmals bei Salamanderlarven beobachtete (Rabl, 1885; Übersicht bei Burgess, 2002; Loidl, 2003). Die Rabl-Konformation ist bei einigen Pflanzen und Tieren zu finden und zeichnet sich durch bevorzugte Lokalisierung der Zentromere an einem Zellpol und der Telomere am gegenüberliegenden Pol aus; sie wird als Überrest der Chromosomenbewegung während der vorausgehenden Anaphase interpretiert (Dong und Jiang, 1998; Jin *et al.*, 1998; Zickler und Kleckner, 1998). Auch in Hefe (siehe Abbildung 4) bilden die Zentromere während der Interphase ein *cluster*, das in einer Art Rosettenstruktur geordnet ist und in deren Mitte als stabilisierender Faktor der *spindle pole body* (SPB) liegt (Jin *et al.*, 2000; Leitch, 2000). Dieses Zentromer-*cluster* befindet sich für gewöhnlich nahe der Kernperipherie. Die Chromosomenarme haben die Tendenz von den Zentromeren weg in Richtung entgegengesetzte Kernseite zu zeigen, wobei sie dabei möglicherweise distinkte Territorien einnehmen (Loidl, 2003). Sequenzen, die auf den Armen in ausreichender Entfernung vom Zentromer und vom Telomer lokalisiert sind, zeigen während der Interphase eine gewisse Mobilität (beobachtet wurden immerhin mehr als 0,5 μm in 3-10 sec; Heun *et al.*, 2001a und b), die

durch suprachromosomale Architektur jedoch eingeschränkt ist, so dass keine vollkommen freie Chromosomenbewegung möglich ist (Loidl, 2003). Im Gegensatz zur klassischen Rabl-Konformation sind in Hefe die Telomere ebenfalls als *cluster* angeordnet, sodass man von einer Rabl-„ähnlichen“ Konformation spricht. Die Anzahl der *cluster* der 32 (bzw. 64) Telomere der haploiden (bzw. diploiden) Zelle liegt bei etwa 3-10 (Gotta *et al.*, 1996; Tham *et al.*, 2001; Ostashevsky, 2002). Sie liegen präferenziell am gegenüberliegenden Pol der Zentromer-*cluster* und sind an der Kernmembran einschließlich den Kernporen verankert (Parada und Misteli, 2002). Die Telomer-Zusammenstellung innerhalb eines *clusters* ist unklar, sie kann zufällig sein oder aber nach bestimmtem Muster erfolgen (Loidl, 2003). Möglicherweise hat die Länge der Chromosomenarme einen Einfluss, da nur wenige Arme lang genug sind, um den gesamten Zellkern durchmessen zu können (Guacci *et al.*, 1994; Dekker *et al.*, 2002). Damit könnte sich eine Tendenz zur Ko-lokalisierung gleicher Armlängen ergeben (Loidl, 2003).

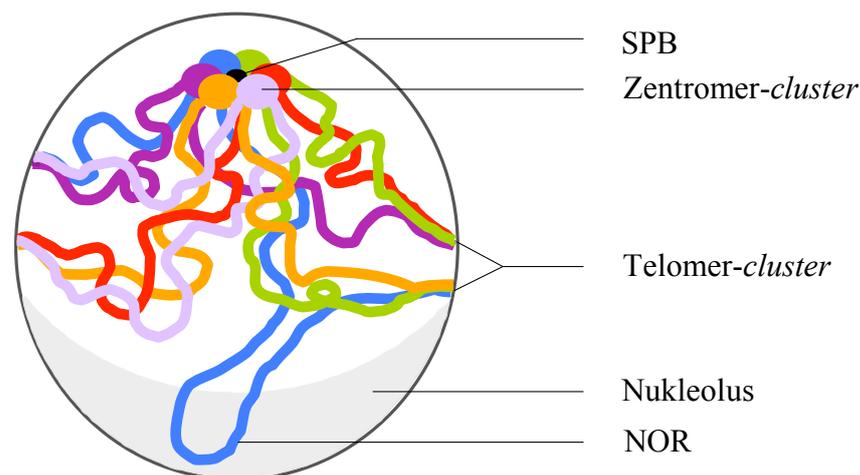


Abb. 4: Modell der Rabl-ähnlichen Chromosomenorganisation in Hefezellkernen während der Interphase (modifiziert nach Loidl, 2003)

Die Zentromere sind nahe der Kernperipherie in einer rosettenartigen Struktur als *cluster* angeordnet, stabilisiert durch den *spindle pole body* (SPB) in der Mitte der Rosette. Die Chromosomenarme weisen von den Zentromeren weg, wobei sie vermutlich distinkte Territorien einnehmen. Die Enden der Chromosomen bilden mehrere *Telomer-cluster*, die an der Kernmembran einschließlich Kernporen verankert sind. Am entgegengesetzten Pol der Zentromer-*cluster* ist der rDNA-Bereich zu finden, der als *nucleolus organizing region* (NOR) den halbmondförmigen Nukleolus organisiert. Dieser kann bis zu einem Drittel des Kernvolumens einnehmen.

Interchromosomale Interaktionen sollten vor allem in denjenigen Regionen stattfinden, in denen mehrere Chromosomen zusammenkommen, d.h. bei einer Rabl-ähnlichen Konformation in den als *cluster* angeordneten Regionen der Zentromere und Telomere. Falls die Kernarchitektur bei der Entstehung von Austauschaberrationen durch Endenfehlverknüpfung eine Rolle spielt, sollten also Translokations-Bruchpunkte gehäuft in Zentromernähe und in Telomernähe lokalisiert sein.

3.2. NACHWEIS STRUKTURELLER CHROMOSOMENABERRATIONEN IN HEFE

Möchte man Hefechromosomen sichtbar machen, ist zu beachten, dass ihr DNA-Gehalt 2-3 Größenordnungen kleiner ist als derjenige der Säugerzellchromosomen. Die Metaphase-Chromosomen sind außerdem weniger stark kondensiert, so dass sie nicht mit klassischer zytogenetischer Methodik zu detektieren sind (Loidl, 2003). Ihr Nachweis kann jedoch durch eine so genannte elektrophoretische Karyotypisierung erfolgen, bei der intakte chromosomale Moleküle elektrophoretisch mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE; siehe auch Methoden II.2.5.) aufgetrennt werden. Dafür müssen vorher die zu untersuchenden Zellen expandiert werden, um aus einer ausreichend großen Klonpopulation (ca. 10^8 Zellen) die chromosomale DNA zu präparieren. Durch elektrophoretische Karyotypisierung lassen sich auch strukturelle Chromosomenaberrationen sichtbar machen (Fasullo *et al.*, 1994; Friedl *et al.*, 1998). Grundlage des Nachweises ist, dass solche Aberrationen für gewöhnlich zu Änderungen der Chromosomenlängen führen, so dass die chromosomale Bandenanordnung im Gel verändert ist. Die Unterscheidungsgrenze liegt dabei bei etwa 10 kb; bei den längsten Chromosomen IV und XII ist die Unterscheidungsgrenze größer. Hinsichtlich der Aberrationstypen konnte durch Analyse der Längenveränderungen und Chromosomenzuordnung mittels Hybridisierung mit genspezifischen Hybridisierungssonden gezeigt werden, dass in Hefe nach Bestrahlung die gleichen zu beobachten sind wie in Säugerzellen (Friedl *et al.*, 1998). Allerdings können letale Ereignisse mit dieser Methodik nicht untersucht werden.

In den Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde von Friedl und Mitarbeitern (Friedl *et al.*, 1998) die Induktion von Austauschaberrationen bei γ -bestrahlter haploider Hefe untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst durch eine Inaktivierung der Gene *RAD52* bzw. *RAD54* genetisch manipuliert, so dass sie keine homologe Rekombination mehr durchführen konnten. Nach Bestrahlung (mit Dosen, die ca. 10-25 DSB pro Zelle induzieren) und Karyotypisierung von zufällig ausgewählten Klonen trugen relativ viele (etwa 10%) detektierbare Chromosomenaberrationen, von denen die meisten Translokationen waren. Da aufgrund der HR-Defizienz davon ausgegangen werden konnte, dass die DSB mittels nichthomologer Endverknüpfung repariert wurden, konnte geschlossen werden, dass dieser Reparaturmechanismus eine Hauptrolle bei der Entstehung strahleninduzierter struktureller Aberrationen in Hefe spielt.

Es stand aus den Vorarbeiten (Friedl *et al.*, 1998; Fellerhoff, 1999) eine Kollektion von 16 *rad52*- bzw. *rad54*-Klonen mit reziproken Translokationen zur Verfügung (mit insgesamt 35 beteiligten Chromosomen; siehe auch unter III.1., Tab. 1). Da das Generieren, Identifizieren und Charakterisieren von Klonen mit Translokationen extrem aufwendig ist (der verfügbaren Kollektion liegen Karyotypisierung und Untersuchung von etwa 2000 Zellklonen inklusive Kontrollen zugrunde), wurden keine weiteren Versuche unternommen, durch ungerichtete Analyse von Klonen bestrahlter Zellen die Kollektion zu vergrößern. Die vorhandenen 16 Klone haben allerdings eine besondere Bedeutung aufgrund der Art ihrer genetischen Manipulation: Durch den Defekt der homologen Reparatur findet die damit verbundene DNA-Mobilität, bei der sich Bruchstelle und Donorsequenz annähern, nicht statt. Das eröffnet durch eine Charakterisierung der Translokations-Bruchpunkte die Möglichkeit, einen Einblick auf den Einfluss der Zellkernarchitektur hinsichtlich der Fehlverknüpfung zu gewinnen.

4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Kartierung von Bruchpunkten strahleninduzierter Translokationen in Klonen von *Saccharomyces cerevisiae* zur Analyse der räumlichen Verteilung der Bruchpunkte; zum anderen war es die Etablierung eines Modellsystems, mit dem der Einfluss der initialen Position von DSB auf die Häufigkeit interchromosomaler

Fehlverknüpfung systematisch und effizient untersucht werden kann. Beide Ansätze sollten durch Charakterisierung der Lage bzw. der Häufigkeit von Translokations-Bruchpunkten dazu führen, einen möglichen Einfluss der Zellkernarchitektur in Hefe auf die Aberrationsentstehung sichtbar zu machen.

Die für den ersten experimentellen Ansatz aus Vorarbeiten (Friedl *et al.*, 1998; Fellerhoff, 1999) zur Verfügung stehenden Klone zeigten, dass die Chromosomen V und VIII häufiger an der Ausbildung strahleninduzierter Aberrationen beteiligt waren, als aufgrund ihrer Länge zu erwarten wäre. Um festzustellen, ob bestimmte Regionen auf diesen Chromosomen besonders anfällig auf Aberrationsentstehung sind, sollten die Bruchpunkte der Klone auf Chromosom V und VIII kartiert werden, indem die An- und Abwesenheit spezifischer Sequenzbereiche auf den aberranten chromosomalen Banden nachgewiesen wurden. Zur weiteren Untersuchung hinsichtlich der räumlichen Aufteilung der Translokations-Bruchpunkte sollte die Kartierung auf den Partnerchromosomen von V und VIII fortgeführt werden (Einteilung in Zentromer-nah, Telomer-nah oder interstitielle Regionen), um anhand des Verteilungsmusters auf die Wahrscheinlichkeit interchromosomaler Fehlverknüpfung schließen zu können. Außerdem sollten zur Analyse der Translokations-Ereignisse auf Sequenzebene einige Klone feinkartiert werden.

Im zweiten experimentellen Ansatz sollte eine Serie von Hefestämmen entwickelt werden, in denen gleichzeitig jeweils zwei DSB enzymatisch induziert werden können. Die entsprechenden Enzymschnittstellen sollten dabei an verschiedenen chromosomalen Positionen eingesetzt werden, die aufgrund ihrer Entfernung zu Zentromer und Telomer – im Falle eines Kernarchitektureinflusses – unterschiedliche Interaktionswahrscheinlichkeiten haben sollten. Nach Bruchinduktion und -reparatur sollte dann untersucht werden, wie häufig es in den einzelnen Stämmen im Zuge der Reparatur aufgrund unterschiedlicher DSB-Positionierung zu einer Fehlverknüpfung der Enden gekommen ist und somit ein Unterschied in der Translokationshäufigkeit beobachtet werden kann.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIAL

1.1. CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMITTEL

Agarose Typ I: Low EEO	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ampicillin	Merck KGaA, Darmstadt
Bacto-Agar	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Pepton	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Trypton	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Bacto-yeast-Extrakt	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Bacto-yeast nitrogen base w/o Aminosäuren und Ammoniumsulfat	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Blocking-Reagenz	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Bromphenolblau	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Chemolumineszenz-Substrat CSPD®	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega, Mannheim
[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP, spez. Aktivität 3000 Ci/mM	ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, USA
Dig-11-dUTP, alkali-labil	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ethidiumbromid	BioRad, München
5-FOA	BioTech Trade&Service GmbH, St.Leon-Roth
G418	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Galaktose	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Heringssperma	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Hexanukleotid-Mix	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
LMP-Agarose	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
Laktat 85% (w/w)	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Mineralöl	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen
N-Lauroylsarcosin	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen
NBT/BCIP- <i>Stock-Solution-Mix</i>	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Polyethylenglycol (MW 4000)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
Sorbitol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt
TWEEN 20	Merck KGaA, Darmstadt
Xylencyanol FF	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Sonstige Chemikalien wurden von Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) oder SIGMA-Aldrich GmbH (Deisenhofen) bezogen.

1.2. STÄMME

Escherichia coli-Stämme:

Stamm	Genotyp
DH5 α [™]	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1
MC1066	trpC9830 leuB600 pyrF::Tn5 lac Δ X74 strA galU galK (r ^m ⁺)

Die DH5 α [™] Zellen wurden von GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein, in Form von MAX *Efficiency DH5 α [™] Competent Cells* bezogen; die MC1066 Zellen wurden aus der Stammsammlung von A. Friedl verwendet.

Saccharomyces cerevisiae-Stämme:

Die Zellklone mit strahleninduzierten Translokationen sind Derivate der Stämme SX46A *rad52 Δ* und WS8105-1C *rad54 Δ* (beschrieben bei Siede *et al.*, 1996), die sich aufgrund der *rad52* bzw. *rad54*-Mutation als strahlensensitiv auszeichnen. Für die Entwicklung des Testsystems wurde auf den Stamm MK205 (Aylon *et al.*, 2003) zurückgegriffen, der von Professor M. Kupiec, Universität Tel Aviv, zur Verfügung gestellt wurde; die besondere Eigenschaft von MK205 ist, dass im *ADE3*-Gen das Gen für die

HO-Endonuklease unter der Kontrolle eines *GAL*-Promotors eingesetzt ist und eine HO-Schnittstelle im *URA3*-Gen enthalten ist. Für dieses System wurden außerdem der *RAD5*-Wildstamm SX46A (Siede *et al.*, 1996) und der Stamm OI21 (Kupiec, pers. Mitteilung), der *MATΔ::LEU2* enthält, verwendet.

Stamm	Genotyp
SX46A <i>rad52Δ</i>	<i>MATα rad52::TRP1 HDF ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52</i>
WS8105-1C <i>rad54Δ</i>	<i>MATα rad54Δ::kanMX HDF ade2 arg4-17 trp1-289 ura3-52</i>
MK205	<i>MATα-inc rad5-G535R ade2-1 leu2-3 112 his3-11 15 trp1-1 can1-100 ade3::GAL-HO ura3::HOcs</i>
SX46A	<i>MATαRAD HDF ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52</i>
OI21	<i>MATαΔ::LEU2 rad5-G535R trp1 his3 ura3 leu2 ade3::GAL-HO lys2::HOcs</i>

1.3. PLASMIDE

YCp50 (*yeast centromere plasmid*)

Das Plasmid YCp50 ist ein autonom replizierender Klonierungsvektor für Hefe, der aufgrund eines Zentromer-Elements nur in geringer Kopienzahl (*single copy*) vorliegt und mitotisch stabil ist. Das *URA3*-Gen dient als selektionierbarer Marker in Uracil-auxotrophen Hefestämmen. Das Plasmid ist in *E. coli* replizierbar und trägt dafür das Gen für Ampicillin-Resistenz. YCp50 wurde bei Hefetransformationen in die Positivkontrollen eingesetzt und ermöglichte eine Abschätzung der Transformationseffizienz.

YIp5 (*yeast integrating plasmid*)

Das Plasmid YIp5 ist ein Klonierungsvektor für Hefe, der nach einer Integration in ein Hefechromosom mitotisch stabil ist, d.h. nicht eigenständig replizieren kann. Als selektionierbarer Marker dient das *URA3*-Gen in Uracil-auxotrophen Hefestämmen. Das Plasmid ist in *E. coli* replizierbar und trägt die Gene für Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz. Innerhalb dieses Vorhabens wurde YIp5 zur Klonierung im Stamm MK205 verwendet.

pM151

Plasmid pM151 (Manivasakam und Schiestl, 1998) enthält das *URA3*-Gen, das als 1,1 kb langes *HindIII*-Fragment isoliert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Fragment als Hybridisierungsprobe eingesetzt.

pSM21

Plasmid pSM21 (Schild *et al.*, 1983) enthält das *TRP1*-Gen, das als *EcoRI/BglII*-Fragment ausgeschnitten werden kann. Innerhalb dieser Arbeit wurde dieses Fragment zur Klonierung des pMH1-Plasmides verwendet.

1.4. OLIGONUKLEOTIDE

Im Folgenden sind die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Diese binden an die im Namen enthaltenen Gene bzw. Regionen, aus denen die Sequenzen ausgewählt wurden.

Die Anlagerungstemperatur T_A wurde nach der modifizierten Wallace-Regel berechnet, die für Oligonukleotide mit einer Länge zwischen 17 nt und 30 nt anwendbar ist (Scheinert *et al.*, 1995):

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

m = Anzahl von (A) und (T)

n = Anzahl von (C) und (G)

Oligonukleotide zur Sondenherstellung:auf Chromosom II:

SEC18-for	5'- ACT CCC GCT TTT GGG ATT AG -3'	58°C
SEC18-rev	5'- TCG TTC ACG GGA TCT TCA TC -3'	58°C
YBR043C-for	5'- CCC AAG GTT CAC AAT CGA ATG -3'	60°C
YBR043C-rev	5'- TTT GAG CGA TAG CGC CTT TAG -3'	60°C

auf Chromosom IV:

BPL1-for	5'- TGC CGA TCT TCC TTA CGT TC -3'	58°C
BPL1-rev	5'- TAG GAA CCT CAT CTG GCT C -3'	56°C
CDC9-rev	5'- GAC CAG GAA TTC CAT TGA AAC -3'	58°C
LRG1-for	5'- TTC TGC TGG TTA TCG ATC GC -3'	58°C
LRG1-rev	5'- CCA TTG CGT TGT TTT CAA TG -3'	54°C

NRP1-for	5'- TAT CCT TGT CCA ATT GCA CC -3'	56°C
NRP1-rev	5'- CTA ATC TGG CAA ACA CTA AGC -3'	58°C
SFA1 I-for	5'- GCC GCT ACT GTT GGT AAA CC -3'	60°C
SFA1 I-rev	5'- TTG ATG CCA CCA AAA GCA GAG -3'	60°C
SFA1 II-for	5'- TTC TCA ATT TGG TGC CAC GG -3'	58°C
SFA1 II-rev	5'- CTG TGA GTG ATA AAT TCT TCG AC -3'	62°C
STL1-for	5'- GAC TTA CGG GTA AGA AGT TG -3'	56°C
STL1-rev	5'- CAC CTA TGA TCA TTG ATA ATC -3'	54°C

auf Chromosom V:

CIN8-for	5'- ATG GCC AGA AAG TAA CGT TGA -3'	58°C
CIN8-rev	5'- TGA GAT CTA CTG GAA AAA TCG -3'	56°C
ERG28 I-rev	5'- GAA TTG AAG ACT GAT ACA ATG G -3'	58°C
ERG28 II-for	5'- TCG AAA GCT CTT TCA TTT CGG -3'	58°C
FIR1-for	5'- CAA CAA ACG AGC CCA AAC AT -3'	56°C
FIR1-rev	5'- AAG TTG GCT CCT CGC TAG GTT -3'	62°C
GLN3-for	5'- GGA CGC GCA GTA AGA TAA G -3'	56°C
GLN3-rev	5'- TCG GAA GTA AAG CTG TTA GG -3'	56°C
HIS1-for	5'- TTG GTG AAC CAT CTA ACC GA -3'	56°C
HIS1-rev	5'- CAC GAC AAT TAG AAA TTT CGA -3'	54°C
MEI4 II-for	5'- GCA CAT GCA AGA ATG CAC AA -3'	56°C
MEI4 II-rev	5'- ACC TAC ATC TTC GAC ATC TCC -3'	60°C
MEI4 III-for	5'- CAT ATA TAC AAA TGG GTT GCG C -3'	60°C
MEI4 IV-rev	5'- GTT TGA CTC TCC TTC CTT AAT G -3'	60°C
MOT2-for	5'- GAT GAA TCC ACA CGT TCA AG -3'	56°C
MOT2-rev	5'- TTA ATA CCG GTG TTC CAG CG -3'	58°C
PMI40-for	5'- TCC AAC AAG CTG TTC AGG TT -3'	56°C
PMI40-rev	5'- ATT TGG TTC CAC AAA GGC TC -3'	56°C
POL5-for	5'- TGA CGA CCA ATA ACT GAT TCG -3'	58°C
POL5-rev	5'- GCT GTT CCG TGA ATC GAA TG -3'	58°C
PTP3-for	5'- TTC AGT GCT TTC CGA GAC TAG -3'	60°C
PTP3-rev	5'- TCA GAT GCT GGA ACC ATT CAG -3'	60°C
RAD24-for	5'- GAA TTT GAA CAA ACG GCC CT -3'	56°C

RAD24-rev	5'- ATT CCT GAA AGA ATG TAC CGC -3'	56°C
SAH1-for	5'- CAA GTT AAA GGT TCC TGC C -3'	54°C
SAH1-rev	5'- TGT AGT GGT CGG CCT TGA A -3'	56°C
SAP1-for	5'- CCC CTC ACT ATC ATC ATA TG -3'	56°C
SAP1-rev	5'- CAC CAT GCG AGT ATG GTT TT -3'	56°C
TRP2-for	5'- CTG ATT GGA AAA AAG GCA AA -3'	52°C
TRP2-rev	5'- GGG GAA AAA AAC AGA GAA TGC -3'	58°C
usCAJ1-for	5'- TCG AAG TGG TTC TCC TAT GG -3'	58°C
usCAJ1-rev	5'- CAG GCG TAA ACC ATT GGA AAG -3'	60°C
YEL072W-for	5'- CTT GCA ACA TCG TTA TAC TC -3'	54°C
YEL072W-rev	5'- GAT CAC ATG AAA GTC TTT GG -3'	54°C
YER049W-for	5'- AGT GTG ATT TCT GAT TCG G -3'	52°C
YER049W-rev	5'- ACG CTT CAT CTT CCT GAC C -3'	54°C
YER186C-for	5'- TGG CAT CCT GAT GGT TAC G -3'	56°C
YER186C-rev	5'- AGC CTC CTT AGT TCT GCA C -3'	56°C
V-Tel/L II-for	5'- TCG CAA TGA ACA GTA CTA GAG -3'	58°C
V-Tel/L II-rev	5'- CTA GTC CCA TTT CTG GAA GC -3'	58°C
V-Tel/R-for	5'- TTT CCC ACT GAA GAT CGC TG -3'	58°C
V-Tel/R-rev	5'- CAC CTG GAT AGT ATG GTC TG -3'	58°C

auf Chromosom VIII:

DCD1-for	5'- GGT GTG AAT GCT ACA CTA ATC -3'	58°C
DCD1-rev	5'- CGA ACT GAA AAG GAA CTT ATG -3'	56°C
HXT5-for	5'- GTA GGA TCA AAC CAG GGG AG -3'	60°C
HXT5-rev	5'- CCT TAC ACC CTA ATT TGC AC -3'	56°C
IRE1-for	5'- TGC GTC TAC TTC GAA GAA ACA -3'	58°C
IRE1-rev	5'- AAT TGA AGA CAC CCT CCA ACG -3'	60°C
MED6-for	5'- ACA CCG TTG GAT GAA TTG C -3'	54°C
MED6-rev	5'- TCT TCA CCA TGT TCA ATA TC -3'	52°C
MIP6-rev	5'- CTC CTT GCA CGC GTA CTA G -3'	58°C
MRP4-for	5'- TTT GCG AGG AAT TTC AGA CG -3'	56°C
MRP4-rev	5'- TTT CTG GCC AAG CGA TTT TG -3'	56°C
MUP3-for	5'- CGC TGC TTT TTA ATA GTG GGA -3'	58°C

MUP3-rev	5'- TTG CTT TTT CAC CCA TTC TG -3'	54°C
RPN1-for	5'- GAC TAT TGA TGA ACA ATC GC -3'	54°C
RPN1-rev	5'- CCT AAG TTT AAG AAC CCG TTG -3'	58°C
SKN7-for	5'- CCA CCA TAA ATA GCA ACG TCA -3'	58°C
SKN7-rev	5'- TCA TCC CTC GTG AAT GGT TT -3'	56°C
SOD2-for	5'- TAC CAG GAT GTT CGC GAA AA -3'	56°C
SOD2-rev	5'- TTT CTT CAG ATC TTG CCA GC -3'	56°C
SPO13-for	5'- CGG TCT CGA TTT CTA ATA ACG -3'	58°C
ts(AGA)h-for	5'- GTC AAT TGA AAT TGC AAT CCT TG -3'	60°C
YHR046C-for	5'- GAC CAT TGA TCT AGC TTC TAT C -3'	60°C
YHR046C-rev	5'- ATG GCC ATC AAC ACA GTT CC -3'	58°C
YHRCdelta6-rev	5'- CAT AAT CAA TGG ATG ATG TTA AAT TCT TAT TTT AAC -3'	
VIII-Tel/L-for	5'- AAG CAG GTG CAA GTT ACT GG -3'	58°C
VIII-Tel/L-rev	5'- CAT TCA CAG GCT GAA TAA AC -3'	54°C
VIII-Tel/R-for	5'- TGA GTT ACC TCA AAC GGA CC -3'	58°C
VIII-Tel/R-rev	5'- ACA GTA TGG TTC GCA CTT GC -3'	58°C
<u>auf Chromosom XIII:</u>		
FET4-for	5'- CAG AGT TTC TCG GGA ATC C -3'	56°C
FET4-rev	5'- GCA AAT TAG AAG GGA AAC TGC -3'	58°C
PHO84-for	5'- TGC CGC ACA AGA ACA AGA TG -3'	58°C
PHO84-rev	5'- GGG CTG GAA GAT TCA ATG TC -3'	58°C
<u>auf Chromosom XIV:</u>		
DSL1-for	5'- ATG AAG CCT GGG CAA TTG AC -3'	58°C
DSL1-rev	5'- AGC AGT GCC TCT AAT TTC G -3'	54°C
FUN34-for	5'- TAC AAC CCT CTG TGG ACA TC -3'	58°C
FUN34-rev	5'- TCT CGG AGT GCG TAA CTG C -3'	58°C
GCR2-for	5'- TGT CAT TAG TGG TGC TTC CT -3'	56°C
GCR2-rev	5'- GGA GCC TTT AGT TGA TGT ATT -3'	56°C
MAS6-for	5'- ATG TGA GTT ACC CGG CTG TT -3'	58°C
MAS6-rev	5'- TCT TGA CAC TAC ACC AGA CG -3'	58°C

Bei der Stammherstellung eingesetzte Oligonukleotide:auf Chromosom II:

LYS2 I-for	5'- CAG CGT GCA GTT TCT TAT TTC GAA G -3'	70°C
LYS2 I-rev	5'- TCT GGT AAT CCT CTA TAA CCT TCG GC -3'	74°C
LYS2 II-rev	5'- GTA CGA TCG TTC CTG TTA AC -3'	
LYS2 dist-for	5'- CCA GTC CCG TTC TTT CAC TTA TC -3'	56°C
LYS2 dist-rev	5'- CCG GTG TCA CAG GAT TTC T -3'	66°C

auf Chromosom III:

MAT1	5'- AGT CAC ATC AAG ATC GTT TAT GG -3'	64°C
MAT4	5'- CTA TGT CTG CAA ACA GTT CTT GG -3'	66°C

auf Chromosom IV:

5'-outside-fw	5'- CTT GAA TGA ACG TAT ACG CG -3'	56°C
3'-outside-rev	5'- GAA TCT CGC ATT GAT GAG GC -3'	60°C
RMD5-pUC-fw	5'- CAA AAC CAT CAG GGA GTT AGC GCA CGT TGA CTG GAC TAC GAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3'	
RMD5-pUC-rev	5'- CGG ATG GAA ATG AGT CAG AAA ATC TGG TAA CTT GAC ATC AGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA -3'	
trp1-3' fw	5'- CGT AGA ATT CGA AGA GAA TGT TCA CAG GCG -3'	
trp1-3' rev	5'- CGT AGG ATT CAC GAC TTG AGG CTG ATG GTG -3'	
trp1-5' aat	5'- CGT AAT GAC GTC TCT CAA CAC TGA GTA ATG G -3'	

auf Chromosom V:

URA3 I-for (OI9)	5'- TTT TGC GAG GCA TAT TTA TGG TGA AGG -3'	74°C
URA3 I-rev (OI10)	5'- TGT TAC TTG GTT CTG GCG AGG TAT TGG -3'	80°C

URA3 II-for	5'- CCT GAC TGA TTT TTC CAT GG -3'	56°C
<u>auf Chromosom XII:</u>		
RAD5 I-for	5'- ACG CGT CGA CAT GGC TAC CAG ACC CAC CG -3'	
RAD5 I-rev	5'- TTT GCT TGA TTT GGA GGC TG -3'	56°C
RAD5 II-for	5'- TTG GAA AAG ATT TAT AGG TG -3'	50°C
RD5-F	5'- TGA TAA ACC CAT TAT GGA AGC -3'	56°C
RD5-R	5'- AGG ACA AGA TAA AAC TAA AGA -3'	52°C
<u>auf Chromosom XIV:</u>		
PHO91-pUC-fw	5'- GGT GCT ATT GAT CAT AAC CTT CCC TCC TGA GCC AAA TGT GAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3'	
PHO91-pUC-rev	5'- CTC ATT AAT GGT ACG ATG ATC ATT GCC GCG ACG GTA TGG GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA -3'	
<u>Komplementäre HOcs-Oligonukleotide:</u>		
CSc-Bsp	5'- AGT TAG TCC GGA CAT GCG GAA TTT CAG CTT TCC GCA ACA GTA TAA ATT CCG CAA TTG CTT AGC -3'	
CSc-Mfe	5'- GCT AAG CAA TTG CGG AAT TTA TAC TGT TGC GGA AAG CTG AAA TTC CGC ATG TCC GGA CTA ACT -3'	
CSd-Bam	5'- AAT GGC GGA TCC CAT GCG GAA TTT CAG CTT TCC GCA ACA GTA TAA ATT CCG CTC GAG ATA CTG -3'	
CSd-Xho	5'- CAG TAT CTC GAG CGG AAT TTA TAC TGT TGC GGA AAG CTG AAA TTC CGC ATG GGA TCC GCC ATT -3'	
<u>auf Plasmid pMH1:</u>		
pUC-fw	5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3'	76°C
pUC-rev	5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA -3'	66°C

auf Plasmid YIp5:

YIp5-rev	5' - GAA ACC ATT ATT ATC ATG AC -3'	50°C
1240 Amp-fw	5' - TTG TTG CCG GGA AGC TAG AG -3'	60°C

Die Oligos für das Plasmidderivat von pUC19 (pMH1) sowie das Plasmid YIp5 wurden nach den entsprechenden Sequenzangaben des *online*-Kataloges der Firma New England Biolabs ausgewählt (<http://www.neb.com>).

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Martinsried) und GIBCO BRL Life Technologies (Karlsruhe) synthetisiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

1.5. LÄNGEN- UND KONZENTRATIONSSTANDARDS

<i>GeneRuler 1kb DNA Ladder</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
<i>HyperLadder I (DNA)</i>	Bioline, Luckenwalde
<i>1 kb Ladder (DNA)</i>	Promega, Mannheim
Lambda-DNA geschnitten mit <i>HindIII</i>	selbst hergestellt

1.6. ENZYME MIT ZUGEHÖRIGEN PUFFERN

Agarase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Alkalische Phosphatase, gekoppelt an Anti-Dig-Antikörper (Fab)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Klenow-Enzym	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lytikase	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Proteinase K	Merck KgaA, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Promega, Mannheim
	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth
	New England Biolabs, Schwalbach
	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
RNase A	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

1.7. SONSTIGE MATERIALIEN

<i>Blotting-Papier</i> Whatman 3MM	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Glasperlen (\varnothing 0,45-0,50 mm)	B. Braun, Melsungen
Hybridisierungsbeutel	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
Kits:	
<i>Concert High Purity Plasmid Midiprep System</i>	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
<i>Concert Rapid PCR Purification System</i>	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
<i>Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II</i>	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
<i>Dig Luminescent Detection Kit</i>	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
<i>HiSpeed Plasmid Midi Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
Kunststoffspatel	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nylonmembranen QIABRANE Nylon plus	QIAGEN GmbH, Hilden
Polaroid Black-and-White Print Film 667	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Röntgenfilme:	
Kodak BioMax Light-1	SIGMA-Aldrich GmbH, Deisenhofen
X RAY 90	Fuji-Medical-Films, Tokyo, Japan

1.8. GERÄTE

Agarosegelelektrophorese-Apparaturen:	
CHEF DR II-Gerät	BioRad, München
CHEF-Mapper	BioRad, München
Horizontale Gelelektrophoresegeräte	BioRad, München
Hybridisierungsöfen Hybaid	MWG-BIOTECH AG, Ebersberg
PCR-Thermoblöcke:	
Cyclone 96i	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Hybaid OmniGene	MWG-BIOTECH AG, Ebersberg

Thermo Cycler	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Scannergerät ScanMaker 3800	Microtek
UV-Transilluminator TM 40E	UVP, Inc., Upland, USA
UV-Bestrahlungsapparatur	Schott GmbH, Mainz
UV-Dosimeter J225	Micro Pulse Technology, Great Britain

1.9. COMPUTERPROGRAMME UND DATENBANKEN

für Abbildungen:

Adobe Illustrator 9.0.2

Adope Systems Inc.

CorelDraw 8.0

Corel Corporation Limited

PowerPoint 97

Microsoft

für Homologiesuche

<http://www.yeastgenome.org/>

für weitere Informationen zur Hefe

<http://www.proteome.com/databases/YPD/>

[YPDsearch-long.html](#)

<http://mips.gsf.de/>

für Literaturrecherche

<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>

für Moleküllängen: KaleidaGraph 3.5

Synergy Software

für Plasmiddarstellungen: Vector NTI 4.0

InformMax, Inc.

für Tabellen und Graphiken: Excel 5.0

Microsoft

für Textverarbeitung: Word für Windows 98

Microsoft

1.10. HÄUFIG VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN

Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml
6x Gelauftragspuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 30 % (v/v) Glycerin
SDS-Stammlösung	10% SDS
20x SSC	3 M Natriumchlorid 0,3 M Natriumcitrat

TAE	40 mM Tris 40 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0
5x TBE	0,445 M Tris 0,445 M Borsäure 0,01 M EDTA pH 8,0
TE pH 8,0	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0

1.11. MEDIEN

Einfríermedium für Hefezellen	1% (w/v) Bacto- <i>yeast</i> -Extrakt 2% (w/v) Bacto-Pepton 2% (w/v) Glukose 15% (v/v) Glycerin
5-FOA-Medium	2% (w/v) Glukose 1,5% (w/v) Bacto-Agar 1,7% (w/v) Bacto- <i>yeast nitrogen base</i> w/o Aminosäuren und Ammoniumsulfat 5% (w/v) Ammoniumsulfat 1,5% (w/v) Aminosäuremischung ohne Uracil 1,2% (w/v) Uracil nach Autoklavieren bei etwa 60°C 0,1% (w/v) 5-FOA zugeben
G418-Medium	1% (w/v) Bacto- <i>yeast</i> -Extrakt 2% (w/v) Bacto-Pepton 2% (w/v) Glukose 1,5% (w/v) Bacto-Agar nach Autoklavieren bei etwa 50°C 0,025% (w/v) G418 zugeben
Galaktosemedium (YPGal)	1% (w/v) Bacto- <i>yeast</i> -Extrakt 2% (w/v) Bacto-Pepton 1,5% (w/v) Bacto-Agar 1 Plätzchen NaOH pro Liter nach Autoklavieren 20 g/l Galaktose (steril filtriert) zugeben

Glycerinmedium (YPGly)	1% (w/v) Bacto- <i>yeast</i> -Extrakt 2% (w/v) Bacto-Pepton 3% (v/v) Glycerin 1,5 % (w/v) Bacto-Agar 1 Plätzchen NaOH pro Liter
Laktatmedium (Zubereitung nach http://www.bio.brandeis.edu/haberlab/jehsite/protocol.html)	37 g 85% (w/v) Laktat ad 900 ml H ₂ O dest.; mit 10 M NaOH auf pH 5,5 einstellen; dann 1% (w/v) Bacto- <i>yeast</i> -Extrakt und 2% (w/v) Bacto-Pepton zugeben; ad 1 l H ₂ O dest
LB-Medium, flüssig bei Ampicillin-Zugabe	1% (w/v) Bacto-Trypton 0,5% (w/v) Bacto- <i>yeast</i> -Extrakt 0,5% (w/v) NaCl vor Gebrauch 100 µg/ml Ampicillin (steril filtriert) zugeben
LB-Medium, fest bei Ampicillin-Zugabe	1% (w/v) Bacto-Trypton 0,5% (w/v) Bacto- <i>yeast</i> -Extrakt 0,5% (w/v) NaCl 1,5% (w/v) Bacto-Agar 1 Plätzchen NaOH pro Liter nach Autoklavieren bei etwa 50°C 100 µg/ml Ampicillin (steril filtriert) zugeben
Selektivmedium	2% (w/v) Glukose 1,5% (w/v) Bacto-Agar 1,7% (w/v) Bacto- <i>yeast nitrogen base</i> w/o Aminosäuren und Ammoniumsulfat 5% (w/v) Ammoniumsulfat 1,5% (w/v) Aminosäuremischung (Zusammen- setzung je nach Gebrauch) 1 Plätzchen NaOH pro Liter
Vollmedium (YPD) zusätzlich für festes Medium	1% (w/v) Bacto- <i>yeast</i> -Extrakt 2% (w/v) Bacto-Pepton 2% (w/v) Glukose 1,5% (w/v) Bacto-Agar 1 Plätzchen NaOH pro Liter

Zur Sterilisierung wurden alle Medien autoklaviert. Bei einigen Medien wurden Natriumhydroxid-Plätzchen zugegeben, um pH-Wert Schwankungen auszugleichen.

2. METHODEN

2.1. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

2.1.1. KULTIVIERUNG VON *ESCHERICHIA COLI*

Um Bakterien aus einer Gefrierkultur anzupflanzen, wurde mit einer sterilen Impföse etwas Material von der gefrorenen Oberfläche abgekratzt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die so entstandenen Bakterien-Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Impföse in das gewünschte Volumen LB-Medium überführt, eventuell versetzt mit dem Antibiotikum Ampicillin, und 8 bis 16 Stunden geschüttelt (350 rpm) und geerntet. Aufbewahrt wurden die mit Parafilm verschlossenen Agarplatten für kurze Zeit (bis zu 6 Wochen) bei 4°C. Für eine längere Lagerung wurde eine frisch angelegte flüssige Bakterienkultur mit 15% sterilem Glycerin bei -70°C eingefroren.

2.1.2. KULTIVIERUNG VON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Für die Anzucht von Hefezellen wurden diese mit einer sterilen Impföse von einer Gefrierkultur auf Agarplatten ausgestrichen oder als Suspension mit Hilfe steriler Glaskugeln ausplattiert. Sie wurden 2 bis 14 Tage bei 30°C auf YPD oder Selektionsmedien inkubiert. Sollte das Wachstum ausgestrichener Hefezellen auf verschiedenen Medien überprüft werden, wurden Replikas hergestellt, indem von der Masterplatte mittels autoklaviertem Samt gestempelt wurde (= grober Wachstums-Test). Die verwendeten Stämme wurden regelmäßig durch einen Markertest überprüft.

Um Hefezellen in stationärer Wachstumsphase zu erhalten (z.B. für DNA-Präparation oder Gefrierkulturen), bei der der Anteil an Zellknospung bei 5-10% liegt, wurden 1 bis 3 Hefekolonien in flüssigem Vollmedium angeimpft. Die Zellen wurden 2 bis 3 Tage unter Schütteln (300 rpm) inkubiert und anschließend geerntet.

Um Hefezellen in logarithmischer Wachstumsphase zu erhalten (z.B. für Transformationen), wurde ein Aliquot einer Übernachtskultur auf 2×10^6 Zellen/ml in flüssigem Vollmedium angesetzt und 4 Stunden geschüttelt (350 rpm). In dieser Zeit konnten die meisten Zellen 2 Teilungsschritte vollziehen und 60-70% der Zellen waren anschließend in der G₂/M- oder S-Phase.

Zur kurzfristigen Lagerung wurden die Hefezellen auf mit Parafilm verschlossenen Platten bei 4°C aufbewahrt. Für längere Aufbewahrung wurden die Hefezellen als Flüssigkultur in stationärer Wachstumsphase zusammen mit 15% sterilem Glycerin bei -70°C eingefroren.

2.1.3. BESTIMMUNG DER PLATTIERUNGSEFFIZIENZ

Zur Erstellung von Dosis-Effektkurven für den biologischen Endpunkt Überleben nach Bestrahlung bzw. nach Inkubation auf verschiedenen Selektionsmedien (= genauer Test gegenüber Stempeln) oder zur Ermittlung der Plattierungseffizienz nach Gendisruption wurde die Fähigkeit zur Bildung sichtbarer Kolonien herangezogen. Dazu wurden die zu untersuchenden Proben einschließlich einer unbehandelten Kontrolle in Flüssigmedium angeimpft und 4 Tage unter Schütteln (300 rpm) bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und eine Verdünnungsreihe hergestellt (etwa 6 Stufen), wobei in der höchsten Verdünnung in 5 µl (entspricht einem Tropfen) etwa 1 bis 10 Zellen vorhanden sein sollten. Die Verdünnungsreihe wurde auf YPD bzw. auf die zu testenden Medien aufgetropft. Nach 3 bis 4 Tagen Inkubation (30°C) erfolgte die Auswertung.

2.1.4. KURZZEITIGE EXPRESSION DER HO-ENDONUKLEASE

(modifiziert nach Haber, 2002)

Eine Impföse voll Hefezellen wurde in 8 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. Dann wurden 50 ml Laktatmedium (<http://www.bio.brandeis.edu/haberlab/jehsite/protocol.html>) oder Glycerinmedium mit einem Aliquot der Zellen auf $0,5-1 \times 10^6$ Zellen/ml beimpft und die Kultur weiter unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Bei Erreichen eines Titors von 1×10^7 Zellen/ml konnte die HO-Endonuklease durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 20% Galaktose induziert werden. Nach ca. 30 bis 60 Minuten weiterer Inkubationszeit sollte in der Regel in den meisten Zellen ein Schnitt in der HO-Erkennungssequenz erfolgt sein. Um eine Religation sowie ein erneutes Schneiden zu unterbinden, wurde die Expression der HO-Endonuklease durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 20% Glukose reprimiert oder es wurden geeignete Aliquots der Kultur auf YPD ausplattiert.

2.1.5. ZELLZAHL-BESTIMMUNG

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Die Zellen wurden mit destilliertem Wasser in 1:10-Schritten verdünnt, bis eine qualifizierbare Konzentration zum Auszählen vorlag. Der Titer (Zellzahl pro ml Suspension) ergibt sich aus der Anzahl der Zellen in den 25 Großquadraten der Thoma-Zählkammer multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Faktor 10^4 .

Da bei *S. cerevisiae* die Zellvermehrung über Knospenbildung erfolgt, musste folgendes beachtet werden:

- Zellen mit einer Knospe, deren Größe höchstens $\frac{1}{3}$ der Mutterzelle beträgt (S-Phase), wurden als eine Zelle gezählt
- bei Bestimmung der Kernäquivalente (für Isolation chromosomaler DNA) wurden Zellen, deren Knospengröße $\frac{1}{3}$ der Mutterzelle übersteigt (G₂/M-Phase), doppelt gezählt.

2.2. STANDARDMETHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE

Es wurden Standardmethoden entsprechend der allgemeinen Handhabung in der Molekularbiologie verwendet, siehe auch Referenzhandbuch Sambrook und Russell, 2001.

2.2.1. LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden wurden mit Hilfe der DNA-Ligase des T4-Phagen miteinander verknüpft. Um den Anteil an Selbstligation der DNA-Fragmente zu minimieren, wurde je nach Größe des einzuklonierenden DNA-Fragmentes ein 3-10facher molarer Überschuss dieses Fragments gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt. Der Inkubationsansatz mit insgesamt 0,1-1 µg DNA, 5 U T4-DNA-Ligase und 2 µl 10x Ligationspuffer (Promega, Mannheim) in einem Gesamtansatz von 20 µl wurde über Nacht bei etwa 14 bis 20°C inkubiert. Als Ligationskontrolle diente eine Probe, bei der das Fragment durch das entsprechende Volumen Milli-Q-Wasser ersetzt wurde.

10x Ligationspuffer	300 mM Tris/HCl pH 7,8
	100 mM MgCl ₂
	100 mM DTT
	10 mM ATP
	10% (w/v) PEG

2.2.2. HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN

E. coli Bakterien der Stämme DH5 α bzw. MC1066 wurden durch CaCl₂-Behandlung für die Transformation mit zirkulärer Plasmid-DNA kompetent gemacht. Dazu wurde 1 ml Suspension einer Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium überführt und die Kultur bei 37°C 2 bis 3 Stunden bis O.D. 0,5-0,6 bei starkem Schütteln (350 rpm) inkubiert. Nach Sedimentierung der Bakterien (4000 rpm, 10 Minuten, 4°C) wurden diese in 20 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ (autoklaviert) aufgenommen und erneut abzentrifugiert (4000 rpm, 10 Minuten, 4°C). Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und in Aliquots von 200 μ l zusammen mit 15% Glycerin bei -70°C zügig eingefroren (um die Kompetenz der Zellen zu erhalten).

2.2.3. TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN

Zur Transformation mittels Hitzeschock (Lederberg und Cohen, 1994) wurden 200 μ l kompetente Bakterien (auf Eis aufgetaut) mit 10 μ l Ligationsansatz bzw. ca. 5 ng unbehandelten Vektor (= Positivkontrolle; Negativkontrolle: kein Plasmid-Zusatz) gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien zur Erhöhung der Transformations-effizienz 2 Minuten bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen, nochmals kurz auf Eis gestellt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Um den Zellen die Expression des Ampicillin-Resistenzfaktors zu ermöglichen, wurden sie eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (350 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze jeweils als Aliquots von $\frac{1}{10}$ und $\frac{9}{10}$ des Volumens auf den Selektionsplatten LB-Amp (mit 100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4. SCHNELLISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS *E. COLI* (MINI-PRÄP)

1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (8000 rpm, 1 Minute) und nach Vortexen des Pellets in frisch zubereitetem 0,4 ml STET/Lyz-Puffer aufgenommen. Der Ansatz wurde dreimal vorsichtig invertiert (Bakterienchromosomen sollen an der Zellwand bleiben), anschließend 90 Sekunden gekocht und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten). Nach Entfernung des Pellets mit autoklaviertem Zahnstocher wurde 0,5 ml Isopropanol zugegeben und durch dreimal Invertieren gemischt. Die Probe wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert (15000 rpm, 15 min) und der Überstand vollkommen

abgenommen. Nach Zugabe und sofortigem Wiederabschütten von 200 µl eiskaltem 70%igem Ethanol wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE pH 8,0 gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ansätze bei –20°C aufbewahrt.

STET/Lyz-Puffer	8% (w/v) Saccharose
	5% (v/v) Triton X-100
	50 mM EDTA pH 8,0
	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 mg/ml Lysozym

2.2.5. PRÄPARATIVE ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS *E. COLI* (MIDI-PRÄP)

Der Aufschluss der Zellen und die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe des *HiSpeed Plasmid Midi Kits*, Dezember 2001, bzw. des *Concert High Purity Plasmid Midiprep Systems* zur DNA-Isolierung nach Vorschrift des Herstellers (QIAGEN GmbH, Hilden bzw. GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ansätze bei –20°C aufbewahrt.

2.2.6. ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS HEFEZELLEN MIT PHENOL (Hoffman und Winston, 1987)

Von einer frühstationären Hefekultur wurden 6 ml durch Zentrifugation (5 Minuten, 3000 rpm, 4°C) geerntet und der Überstand vollständig abgenommen. Das Zellpellet wurde in 0,2 ml frisch angesetztem Lysepuffer aufgenommen und mit 0,2 ml PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1) sowie 0,3 g Glasperlen (Ø 0,45 cm) versetzt. Die Zellen wurden mechanisch durch 3 Minuten Vortexen aufgeschlossen, wobei die Proteine durch das PCI-Gemisch denaturiert wurden. Anschließend wurde 5 Minuten zentrifugiert (13000 rpm) und die obere wässrige Phase abgenommen und mit 0,15 ml TE pH 8,0 versetzt. Zur Nukleinsäure-Fällung wurde 1 ml 100%igem Ethanol zugegeben und erneut 2 Minuten zentrifugiert (13000 rpm). Nachdem das Pellet bei Raumtemperatur für kurze Zeit getrocknet und dann in 0,3 ml TER (TE pH 8,0 mit 50 µg/ml RNase A) gelöst worden war, wurde es 5 Minuten auf 65°C erhitzt, kurz gevortext und nochmals 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurde der Ansatz mit 100 µl 10 M Ammoniumacetat vermischt, 1 ml 100%iges Ethanol zugegeben und das DNA-Präzipitat abzentrifugiert (2 Minuten, 13000 rpm). Die DNA wurde mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet,

dann in 50 µl TE pH 8,0 (oder H₂O_{Milli-Q}) gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Bei Weiterverwendung wurde die Probe 5 Minuten zentrifugiert und die benötigte Suspension von oben abgenommen, da diese Art der DNA-Präparation nicht sehr sauber ist.

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

2.2.7. SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Zur Spaltung doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsenzyme verwendet. Die eingesetzten Enzymmengen mit den beigefügten Puffern richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Plasmid-DNA wurde zwei bis fünf Stunden, genomische DNA wurde über Nacht bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

2.2.8. GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN

Zur Charakterisierung und Sichtbarmachung wurden DNA-Fragmente in einem horizontalen nativen Agarosegel (Agarose Typ I: Low EEO) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelkonzentration betrug 0,8 bis 2%, je nach Länge der Fragmente. Als Gel- und Laufpuffer wurde 0,5x TBE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die DNA-Ansätze wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen 6x Gelauftragspuffer versetzt und bei einem Spannungsgradienten von 6-8 V/cm aufgetrennt. Es wurden entsprechende Längenstandards sowie als Konzentrationsstandard Lambda-DNA verwendet, die mit *Hind*III geschnitten worden war. Nach Beendigung der Gelelektrophorese konnte die DNA durch Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids mit Hilfe des UV-Transilluminators (Wellenlänge 302 nm) sichtbar gemacht werden und zur Dokumentation fotografiert werden.

2.2.9. ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosestücken und deren Aufreinigung wurde der *QIAquick Gel Extraction Kit*, März 2001 verwendet und nach Angaben des Herstellers (QIAGEN GmbH, Hilden) vorgegangen. Zur Aufbewahrung wurden die Ansätze bei -20°C eingefroren.

2.2.10. TRANSFER VON DNA-MOLEKÜLEN AUF EINE NYLONMEMBRAN

(modifiziert nach Southern, 1974)

Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele wurden 5 Minuten auf einem Transilluminator UV-bestrahlt (302 nm), um Einzelstrangbrüche in die hochmolekulare DNA einzuführen. Anschließend wurde das Gel 15 Minuten in 0,25 M HCl geschwenkt, dabei erfolgt eine partielle Depurinierung der DNA. Zur alkalischen Denaturierung wurde das Gel daraufhin 15 Minuten in 0,4 M NaOH geschwenkt, was zu einer Einführung von Einzelstrangbrüchen am depurinierten Zucker-Phosphat-Rückrat führt. Der Kapillartransfer erfolgte mit 0,4 M NaOH als Transferpuffer und einer Transferzeit von 24 bis 36 Stunden auf eine positiv geladene Nylonmembran (QIABRANE Nylon plus). Schließlich wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen, luftgetrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.11. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

(modifiziert nach Saiki *et al.*, 1988)

Zur Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente aus kleinen Mengen DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) eingesetzt. Für einen Reaktionsansatz von 50 µl wurden folgende Lösungen verwendet (Firma Promega GmbH, Mannheim):

- 1 µl DNA von *S. cerevisiae* (ca. 100 ng)
- 5 µl 10x PCR-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM KCl)
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl Desoxyribonukleotid-Mix aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM)
- 1 µl Vorwärts-*primer* (10-100 mM)
- 1 µl Rückwärts-*primer* (10-100 mM)
- 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 37,5 µl H₂O_{Milli-Q}

Die Zusätze wurden gemischt und nach Überschichtung des Ansatzes mit 2 Tropfen Mineralöl wurde die Kettenreaktion in einem PCR-Thermoblock gestartet. Das Programm wurde den jeweiligen Reaktionsgegebenheiten angepasst, ausgehend von folgenden Standardbedingungen:

		95°C	5 min	Gesamtdenaturierung
Amplifika- tions-Zyklus: 30x	[95°C	1 min	Denaturierung
		T _A	1 min	Anlagerung der <i>primer</i>
		72°C	Z _E	Extensionszeit
		72°C	10 min	finale Extensionszeit

T_A: Temperatur für die Anlagerung der *primer*; gewählt wurde eine Temperatur entsprechend dem *primer*, der die geringere Schmelztemperatur aufwies

Z_E: Extensionszeit, die sich nach der Produktlänge richtet, wobei für die Kettenverlängerung von 1 kb mit einer Zeit von etwa 1 Minute gerechnet wurde

Anstatt präparierter Hefe-DNA als Matrize wurden teilweise auch ganze Zellen eingesetzt. Dabei wurde ein kleiner Anteil einer frischen Hefekolonie mit Hilfe eines Zahnstochers abgenommen und in den PCR-Ansatz gemischt. Die *Taq*-DNA-Polymerase wurde erst zugegeben, nachdem der Ansatz bereits 10 Minuten bei 97°C im PCR-Thermoblock zur Zelllyse erhitzt worden war. Anschließend wurde das oben beschriebene PCR-Programm gestartet, allerdings ohne den anfänglichen Gesamtdenaturierungsschritt.

Für eine PCR deren Amplifikation mit hoher Genauigkeit (*high fidelity*) verlaufen sollte, wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Die entsprechenden Parameter wurden dem Protokoll des Herstellers (Promega GmbH, Mannheim) entnommen.

2.2.12. REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits*, März 2001, bzw. des *Concert Rapid PCR Purification Systems* aufgereinigt nach den jeweiligen Angaben des Herstellers (QIAGEN GmbH, Hilden bzw. GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ansätze bei -20°C eingefroren.

Verwendet wurde diese Aufreinigungsmethode nicht nur für PCR-Fragmente, sondern auch für Produkte anderer DNA-modifizierender Reaktionen, wie etwa der *random-prime*-Synthese, deren DNA-Längen zwischen 100 bp und 10 kb lag.

2.2.13. SEQUENZANALYSE

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente wurde von der Biotechnologiefirma MediGenomix, Martinsried durchgeführt.

2.3. HERSTELLUNG KOMPETENTER HEFEZELLEN UND HEFETRANSFORMATION

(modifiziert nach Schiestl und Gietz, 1989)

Hefezellen wurden mit Hilfe von Lithiumacetat kompetent gemacht, um anschließend eine Transformation mit Plasmid-DNA durchführen zu können. Um kompetente Zellen herzustellen, wurde eine Impföse voll Hefezellen in 8 ml YPD-Medium angeimpft und 24 Stunden bei 30°C geschüttelt (300 rpm). Dann wurde 100 ml YPD-Medium mit 2×10^6 Zellen/ml der frühstationären Kultur angeimpft und über 2 Generationszeiten (ca. 4 Stunden) bei 30°C inkubiert (300 rpm), so dass sich die Zellen anschließend in logarithmischer Wachstumsphase befanden. Die Suspension wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 5 Minuten), mit 10 ml frisch hergestelltem 1x TE + LiAc gewaschen (5000 rpm, 1 Minute) und in 1,5 ml 1x TE + LiAc resuspendiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt oder, wenn sie nicht sofort verwendet wurden, in 1x TE + LiAc zusammen mit 20% sterilem Glycerin (Endvolumen 1,5 ml) bei –70°C eingefroren.

Für die Hefetransformation wurde zunächst *carrier*-DNA, d.h. 10 µl denaturierte Heringsperma-DNA (5 mg/ml), 10 µl (bis 30 µl) Plasmid-DNA (entspricht je nach Plasmidart 0,1 µg bis 10 µg DNA) und 100 µl Zellsuspension zusammengegeben. Kontrolltransformationen waren eine Positivkontrolle (1 µg Plasmid YCp50) sowie eine Negativkontrolle (kein Plasmid-Zusatz). Nachdem die Ansätze mit 0,7 ml PEG-Lösung versetzt worden waren, wurden sie vorsichtig gemischt und 30 Minuten bei 30°C auf einem Roller inkubiert. Dann erfolgte für 15 Minuten ein Hitzeschock bei 42°C, der die Zellmembran durchlässig macht und so die Transformationseffizienz erhöht. Nach Zentrifugation (6000 rpm, 40 Sekunden) wurden die Zellen zweimal mit 500 µl sterilem Wasser gewaschen (je 6000 rpm, 30 Sekunden) und in soviel sterilem Wasser resuspendiert, wie für die Ausplattierung auf Selektionsplatten notwendig ist: Während die Negativkontrolle auf eine Platte ausplattiert wurde (Lösung in 100 µl), wurde zu den Transformationen (einschließlich Positivkontrolle)

200 µl gegeben und diese als Aliquots von $\frac{1}{10}$ und $\frac{9}{10}$ des Volumens auf Selektionsplatten ausplattiert. Eine Auswertung erfolgte nach 3 bis 4 Tagen Inkubation bei 30°C.

Wurde bei der Hefetransformation auf Kanamycin-Resistenz selektioniert, wurden die Zellen vor dem Ausplattieren in 1 ml YPD-Medium überführt, um ihnen die Expression des Kanamycin-Resistenzfaktors zu ermöglichen. Nach 3 Stunden Inkubation bei 30°C (300 rpm) wurden die Zellen entsprechend den obigen Angaben auf dem Selektionsmedium G418 ausplattiert. Nach 24 bis 36 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Platten erneut auf frische G418-Platten gestempelt (auch wenn noch keine Kolonien zu sehen waren), um den Hintergrund an Kolonien zu minimieren. Vor der Auswertung wurden die Platten einen weiteren Tag bei 30°C inkubiert.

10x TE	100 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 8,0
10x LiAc	1 M LiAc mit verd. Essigsäure auf pH 7,5 steril filtrieren
PEG 4000	40% (w/v) PEG 4000 in 1x TE + LiAc steril filtrieren

2.4. UV-C-BESTRAHLUNG VON HEFEZELLEN

Die gesamte Bestrahlung wurde im verdunkelten Labor durchgeführt, um eine Photoreparatur mittels Photolyase zu unterbinden. Die Dosisleistung der UV-C-Lampe wurde vor Versuchsbeginn geeicht. Verwendet wurden Hefezellen, die vor Bestrahlung in einer Verdünnungsreihe auf YPD-Medium aufgetropft worden waren (siehe „Bestimmung der Plattierungseffizienz“ II.2.1.3.). Sie wurden bei 1,5-2,5 J/m²/sec bestrahlt (der Plattendeckel war dabei entfernt), bis die gewünschte Dosis erreicht war. Anschließend wurden die Platten zusammen mit den unbestrahlten Kontrollen ohne Lichteinfluss 3 bis 4 Tage bei 30°C inkubiert und ausgewertet.

2.5. DETEKTION VON CHROMOSOMENABERRATIONEN MITTELS PULSFELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE)

Um Chromosomen von *S. cerevisiae* mit der Länge von 230 kb bis 2200 kb aufzutrennen, bietet sich das System der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) an. Es erlaubt großen DNA-Molekülen (bis zu 10 Mb) mit Hilfe pulsartiger Änderung des elektrischen Feldes in einem Gel zu wandern. Dafür wird die DNA intakter Hefechromosomen schonend präpariert, indem (um unnötige Scherkräfte zu vermeiden) ganze Zellen in Agarose-Blöckchen eingebettet werden. Mit diesen Blöckchen werden dann die Präparationsschritte durchgeführt, so dass die einzelnen Puffer und Enzyme nur über Diffusion wirken können. Wenn schließlich nur noch die aufgereinigte DNA in den Agarose-Blöckchen enthalten ist, werden die Blöckchen auf ein Gel geladen und die Chromosomen mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt. Da Translokationen meist zur Änderung der Chromosomenlänge führen, können diese anhand veränderter Bandenmuster detektiert werden.

2.5.1. ISOLIERUNG CHROMOSOMALER HEFE-DNA FÜR DIE PFGE (modifiziert nach Geigl und Eckardt-Schupp, 1990)

Die folgenden Angaben gelten für einen Ansatz von 5×10^8 Zellen (3 Blöckchen à 270 μ l). Es wurden Hefezellen in der stationären Wachstumsphase mittels Zentrifugation (3000 rpm, 7 Minuten, 4°C) geerntet und einmal mit sterilem Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde in 300 μ l 50 mM EDTA, pH 8 resuspendiert und mit 112 μ l frisch zubereiteter Lytikaselösung vermischt. Die erhaltene Lösung wurde mit 400 μ l 1,6%ige LMP-Agaroselösung (temperiert auf 50°C) versetzt, kurz gemischt und zügig in Gießformen (1 cm x 2 cm x 1 mm) pipettiert. Nach Erkalten der Blöckchen (4°C, 15 Minuten) wurden diese mit sterilen Kunststoffspateln in Falcon-Röhrchen überführt, das zur Sphäroblastierung der Zellen mit 2 ml Blöckchenpuffer gefüllt war, und eineinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Puffer dekantiert und durch 1 ml frisch zubereiteter Proteinase K-Lösung ersetzt. Der Proteinverdau erfolgte bei 50°C über mindestens 18 Stunden. Nach Dekantieren der Lösung wurden die Peptide sowie andere bei der PFGE störende Substanzen, wie etwa das Detergenz, durch drei bis vier mehrstündige Waschschrte mit jeweils 10 ml Waschpuffer bei 4°C entfernt. Anschließend wurden die Blöckchen in Waschpuffer bei 4°C aufbewahrt, bis sie für eine PFGE eingesetzt wurden.

Bei Beachtung von Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von DNase-Kontamination (Verwendung frisch autoklavierter Lösungen und Ethanol-gereinigter Gerätschaften wie Gießform und Kunststoffspatel sowie Tragen von Handschuhen) blieb die isolierte DNA mindestens 1 Jahr unter diesen Bedingungen stabil.

Angaben für einen Ansatz mit 5×10^8 Zellen:

Citrat-Phosphatpuffer	1 M Natriumcitrat 1 M Natriumhydrogenphosphat
SEC-Puffer	1 M Sorbitol 0,1 M EDTA 0,01 M Citrat-Phosphatpuffer mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
Lytikaselösung	100 µl SEC-Puffer 5 µl β-Mercaptoethanol 7 µl Lytikase (20 U/µl; -20°C)
LMP-Agaroselösung	1,6% LMP-Agarose in 125 mM EDTA pH 8
Blöckchenpuffer	2 ml 0,5 M EDTA pH 9 20 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 30 µl H ₂ O dest.
Proteinase K-Lösung	1 ml 0,5 M EDTA pH 9 10 mg N-lauroylsarcosin 1 mg Proteinase K (4°C)
Waschpuffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 8,0

2.5.2. GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG CHROMOSOMALER DNA MITTELS PFGE

Die Auftrennung der Hefechromosomen in der PFGE wurde mit Hilfe des *clamped homogeneous electric field* (CHEF)-Systems durchgeführt. Dabei wurde ein 0,8%iges Agarosegel (Agarose Typ I: Low EEO) verwendet, gelöst in 0,5x TBE als Gel- und Laufpuffer. Im Fall einer Isolierung hochmolekularer DNA im Anschluss an die PFGE, beispielsweise mit Hilfe von Agarase, erfolgte eine Auftrennung in einem 0,8%igem LMP-Agarosegel mit 1 x TAE als Gel- und Laufpuffer.

Um die DNA-haltigen LMP-Blöckchen aufzutragen, wurden diese mit einem sterilen Deckgläschen auf eine Länge von 0,5 cm zurechtgeschnitten, so dass eine Blöckchengröße von 1 cm x 0,5 cm x 1 mm entstand. Dies entsprach genau den Ausmaßen der Auftrags-taschen. Standard-Laufbedingungen für ein Hefekaryogramm waren 8 Stunden mit 60 Sekunden Pulsdauer, gefolgt von 14 Stunden (CHEF-Mapper-System) bzw. 15,5 Stunden (CHEF DR II-System) mit linear ansteigender Pulsdauer von 90 bis 150 Sekunden. Die Spannung betrug 6 V/cm bei einem festgelegten Winkel von 120° und einer Puffertemperatur von 14°C. Unter diesen Bedingungen wurden 14 der 16 Hefechromosomen optimal aufgetrennt, die zwei längsten Chromosomen (Chromosom IV und XII) befanden sich allerdings in oder nahe der Kompressionszone des Pulsfeldgels. Diese Moleküle zeigten den so genannten *self trapping*-Effekt (Noolandi, 1992), d.h. dass die Moleküle sich bei ihrer Wanderung durch die Agarosematrix gelegentlich in der Matrix verfangen und nur nach starker Verzögerung wieder befreien können. Nahe der Kompressionszone kann es vorkommen, dass nicht alle Moleküle an den ihrer Länge entsprechenden Ort im Gel wandern, und die Banden eine verringerte Fluoreszenzintensität aufweisen.

Sollte gezielt im Bereich einer bestimmten Chromosomenlänge aufgetrennt werden, wurden die Laufbedingungen entsprechend der Moleküllängen modifiziert.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde die DNA durch Färben über Nacht mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid detektiert und mit Hilfe des UV-Transilluminators (302 nm) sichtbar gemacht. Die lange Inkubationsdauer gewährleistet eine Sättigung aller Interkalierungsstellen für Ethidiumbromid, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur vorhandenen DNA-Menge ist. Zur Dokumentation wurde das Gel nach Anlegen eines Größenstandards fotografiert.

2.6. ISOLIERUNG VON DNA AUS LMP-AGAROSEGELEN MITTELS AGARASE

Zur Präparation einzelner Hefechromosomen wurden diese in einem 0,8%igem LMP-Gel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und die hochmolekulare DNA mit Hilfe von Agarase schonend isoliert. Agarase baut dabei Agarose, das in Tris/Acetat- oder Tris/Borat-Puffer gelöst ist, in Neoagaro-Oligosaccharide ab.

Nach PFGE wurde das LMP-Gel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid über Nacht gefärbt, die DNA auf einem UV-Transilluminators (302 nm) sichtbar gemacht und die entsprechende Bande bei langwelligem UV-Licht mit Hilfe eines sterilen Deckgläschens ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein austariertes Reaktionsgefäß überführt und sein Gewicht bestimmt. Nach Zugabe von 0,04 Volumen 25fachen Agarasepuffer zur Einstellung des pH-Optimums für die Agarase von 6,0 wurde das Gelstück 15 Minuten bei 65°C in einem Temperaturblock geschmolzen. Die Agarose sollte anschließend vollständig aufgelöst sein, da sonst nicht alle Spaltstellen für die Agarase zugänglich sind. Nach kurzer Zentrifugation wurde die klare, nicht viskose Lösung im Wasserbad auf 45°C abgekühlt. Bei Verwendung von TAE als Gelpuffer wurde pro 100 mg Agarose 1 Einheit Agarase zugegeben, diese Zugabe musste allerdings entsprechend erhöht werden, wenn die Konzentration des Agarosegels höher als 1% war. War jedoch TBE als Gelpuffer vorhanden, wurde die Agarase-Zugabe verdoppelt oder die darauf folgende Inkubationszeit verlängert. Ansonsten erfolgte die Inkubation nach vorsichtigem Mischen der Reaktion eine Stunde bei 45°C. Aufbewahrt wurde der Ansatz anschließend über kurze Zeit bei 4°C. Für längere Zeit wurde er bei -20°C gelagert, was seine Konsistenz nicht weiter beeinflusste, da die entstandene Lösung auch bei solch niedrigen Temperaturen nicht mehr gelieren konnte.

Eine weitere Reinigung sollte besonders bei hochmolekularer DNA vermieden werden, d.h. weitere Reaktionen, wie z.B. PCR, Markierungsreaktionen oder Ligationen konnten direkt mit der verdauten Agaroselösung durchgeführt werden.

2.7. NACHWEIS SPEZIFISCHER NUKLEINSÄUREN DURCH HYBRIDISIERUNG MIT DIGOXIGENIN-MARKIERTEN FRAGMENTEN

2.7.1. MARKIERUNG EINES FRAGMENTES MIT DIGOXIGENIN

(*random-prime*-Synthese modifiziert nach Feinberg und Vogelstein, 1983)

Bei dieser Markierungsmethode werden DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen denaturiert, an die unspezifische Hexanukleotid-*primer* in beliebigen (*random*) Sequenzbereichen binden können. Die Klenow-Polymerase synthetisiert, ausgehend von diesen *primern*, den komplementären Strang und baut dabei Digoxigenin (Dig) in Form von Dig-11-dUTP ein. Die Synthese erfolgte mit einer Zugabe von $\frac{1}{3}$ Dig-11-dUTP gegenüber $\frac{2}{3}$ dTTP. Als Ziel-DNA wurde ein durch PCR hergestelltes Chromosomenfragment oder ein Fragment nach

Restriktionsverdau eingesetzt. Für einen Reaktionsansatz von 20 μl wurden folgende Lösungen verwendet (Firma Roche Molecular Biochemicals, Mannheim):

- 2-3 μl DNA-Fragment (ca. 100 ng)
- 2 μl Hexanukleotide mit 10x Klenowpuffer (130 mM Kaliumphosphat, 6,5 mM MgCl_2)
- 1 μl Desoxyribonukleotid-Mix aus dATP, dCTP, dGTP (je 1 mM)
- 0,7 μl dTTP (1 mM)
- 3,3 μl Dig-11-dUTP (0,1 mM)
- 1 μl Klenow-Enzym (2 U/ μl)
- 8 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$

Ein Teil des Markierungsansatzes, bestehend aus DNA, Hexanukleotid-Mix, Desoxyribonukleotid-Mix und dTTP, wurde mit Milli-Q-Wasser auf 15,7 μl aufgefüllt und 10 Minuten gekocht. Daraufhin wurde der Ansatz schockgekühlt, um eine Reassoziationsreaktion der Einzelstränge zu verhindern. Dig-11-dUTP und Klenow-Enzym wurden zugeben und die Reaktion fünf Stunden bis über Nacht bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide sowie Hexanukleotide wurden anschließend mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits*, März 2001 (QIAGEN GmbH, Hilden) abgetrennt und das Eluat als Sonde in eine Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Aufbewahrt wurde die Dig-markierte DNA bei -20°C, unter diesen Bedingungen blieb sie mindestens ein Jahr stabil.

Die Markierungseffizienz mit Digoxigenin konnte überprüft werden, indem mehrere Verdünnungsstufen der markierten DNA auf eine Nylonmembran (QIABRANE Nylon plus) getropft, 1 Minute bei UV-Licht (302 nm) auf die Membran fixiert und einer Farb- oder Chemolumineszenz-Detektionsreaktion unterzogen wurden.

2.7.2. HYBRIDISIERUNG MIT EINER DIG-MARKIERTEN DNA-SONDE

Um spezifische Nukleinsäuren nachweisen zu können, wurde die Dig-markierte Sonde auf DNA-Moleküle, die auf eine Nylonmembran geblottet waren, hybridisiert. Die Durchführung der Hybridisierung richtete sich nach den Angaben des *Dig Luminescent Detection Kits* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim); das folgende Protokoll gilt für eine Membranfläche von 100 cm^2 .

Die Membran wurde in einem Hybridisierungsbeutel mit 30 ml Hybridisierungslösung eine Stunde bei 68°C unter Schwenken im Wasserbad vorhybridisiert. Die Dig-markierte denaturierte Sonde wurde mit 3 ml Hybridisierungslösung vermischt und nach Dekantieren

der Prä-Hybridisierungslösung in den Hybridisierungsbeutel gegeben. Der Beutel wurde blasenfrei verschweißt und in das Wasserbad gelegt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C unter Schwenken. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung aufgefangen und für eine mögliche Wiederverwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Membran wurde nach der Hybridisierung zur Entfernung von überschüssiger Sonde stringent gewaschen, zunächst zweimal 5 Minuten mit 2x SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur, gefolgt von zweimal 20 Minuten mit 0,1x SSC/0,1% SDS bei 68°C. Die Waschschrte fanden in Schalen unter Schwenken statt. Schloss sich die Detektionsreaktion nicht unmittelbar an, wurde die Membran in feuchtem Zustand in eine Folie luftdicht eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

Hybridisierungslösung	5x SSC
	0,1% (w/v) N-lauroylsarcosin
	0,02% (w/v) SDS
	1% (w/v) <i>blocking</i> -Reagenz

2.7.3. IMMUNOLOGISCHE DETEKTION DIG-MARKIERTER HYBRIDE MITTELS CHEMOLUMINESZENZ

Für die Detektion mittels Chemolumineszenz wird die Membran zunächst mit *blocking*-Reagenz behandelt, um nicht-spezifische Bindungen zwischen Antikörper und Membran zu unterbinden. Die Membran wird dann in einer Antikörperlösung mit Anti-Digoxigenin Fab-Fragmenten (*fragment antigen binding*) inkubiert, an die Alkalische Phosphatase gebunden ist. Durch Dephosphorylierung wird das dann zuzugebende Chemolumineszenz-Substrat CSPD® instabil; es zerfällt schließlich unter Lichtemission (477 nm), was auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Die Durchführung der Detektion richtete sich nach den Angaben des *Dig Luminescent Detection Kits* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim); das folgende Protokoll gilt für eine Membranfläche von 100 cm².

Nach Hybridisierung wurde die Membran kurz in Waschpuffer I gespült und anschließend 30 Minuten in 100 ml 1x *blocking*-Lösung in einer Schale geschwenkt, um freie Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Das Anti-Dig-Alkalische Phosphatase-Konjugat (4°C) wurde in 20 ml 1x *blocking*-Lösung 1 : 10000 verdünnt zu einer Endkonzentration von 75 mU/ml. Zur Lösung der Antikörper-Agglomerate wurde die Verdünnung in einem geringen Volumen vorgelöst und der Ansatz mehrmals mit einer Kanüle aufgezogen. Nach Beendigung der *blocking*-Reaktion wurde die Membran 30 Minuten in der Antikörperlösung in einer Schale

unter Schwenken inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dann zweimal je 20 Minuten mit Waschpuffer I behandelt. Zur Aktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte daraufhin eine fünfminütige Equilibrierung in Detektionspuffer. Das Chemolumineszenz-Substrat CSPD® (-20°C) wurde 1 : 100 in 2 ml Detektionspuffer verdünnt und die Membran (eingeschweißt in eine Folie) 5 Minuten in der CSPD®-Lösung inkubiert. Die Lösung wurde für eine Wiederverwendung aufgefangen und bei 4°C ohne Lichteinfluß aufbewahrt. Die Membran wurde kurz auf einem Whatman-Papier abgetropft (allerdings nicht getrocknet) und nach luftdichtem Einschweißen in eine Folie 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Enzymreaktion zu verstärken. Die Chemolumineszenz wurde durch Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht mit einer Exponierungsdauer je nach Signalstärke von 1 Stunde bis über Nacht. Aufbewahrt wurde die Membran anschließend bei 4°C.

Waschpuffer I	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,3% (v/v) Tween 20 mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
1x <i>blocking</i> -Lösung	1% (w/v) <i>blocking</i> -Reagenz gelöst in Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer	0,1 M Tris/HCl 0,1 M NaCl pH 9,5

2.7.4. IMMUNOLOGISCHE DETEKTION DIG-MARKIERTER HYBRIDE MITTELS FARBE

Die Detektion mittels Farbe ähnelt derjenigen mittels Chemolumineszenz insofern, dass hier ebenfalls eine *blocking*-Reaktion mit nachfolgender Inkubation in Anti-Digoxigenin Fab-Fragmenten, an die Alkalische Phosphatase gebunden ist, stattfindet. Anschließend werden die Farbreagenzien NBT und BCIP (entspricht X-Phosphat) zugegeben, die zu einer Reaktion mit der Alkalischen Phosphatase führen. Dabei wird das lila gefärbte Präzipitat Diformazan gebildet. Die Durchführung der Detektion richtete sich nach den Angaben des *Dig Luminescent Detection Kits* und des *Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter*

Kits II (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim); das folgende Protokoll gilt für eine Membranfläche von 100 cm².

Nach Hybridisierung wurde die Membran kurz in Waschpuffer II gespült und anschließend 30 Minuten in 100 ml 1x *blocking*-Lösung in einer Schale geschwenkt. Das Anti-Dig-Alkalische Phosphatase-Konjugat (4°C) wurde in 20 ml 1x *blocking*-Lösung 1 : 5000 verdünnt zu einer Endkonzentration von 150 mU/ml. Zur Lösung der Antikörper-Agglomerate wurde die Verdünnung in einem geringen Volumen vorgelöst und der Ansatz mehrmals mit einer Kanüle aufgezogen. Nach Beendigung der *blocking*-Reaktion wurde die Membran 30 Minuten in der Antikörperlösung in einer Schale unter Schwenken inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran danach zweimal je 15 Minuten mit Waschpuffer II behandelt. Zur Aktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte daraufhin eine fünfminütige Equilibrierung in Detektionspuffer. Der NBT/BCIP-*Stock-Solution*-Mix (-20°C) wurde 1 : 50 in 10 ml Detektionspuffer verdünnt zu einer Endkonzentration von 0,375 mg/ml NBT und 0,188 mg/ml BCIP. Anschließend wurde die Membran auf eine glatte Oberfläche gelegt und mit der Farblösung gleichmäßig beträufelt. Die Farbreaktion, die durch Dephosphorylierung von BCIP und anschließender Verbindung der beiden Farbstoffe als lila Präzipitat zu sehen war, fand im Dunklen statt. Nach kurzer Exponierungszeit von wenigen Minuten war bereits ein Reaktionsergebnis sichtbar mit einer Steigerung zu einem Farbmaximum nach maximal 16 Stunden. Die Reaktion wurde, bevor die Membran zu dunkel wurde, mit fünfminütigem Spülen in 40 ml TE-Puffer pH 8 gestoppt. Die Membran wurde im Dunklen getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Dokumentation wurde sie fotokopiert bzw. fotografiert.

Waschpuffer II (= Maleinsäurepuffer)	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
1x <i>blocking</i> -Lösung	1% (w/v) <i>blocking</i> -Reagenz gelöst in Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer	0,1 M Tris/HCl 0,1 M NaCl pH 9,5

2.7.5. ENTFERNUNG EINER GEBUNDENEN CHEMOLUMINESZENZ-DETEKTIERTEN DIG-SONDE

Vor erneuter Hybridisierung einer Membran mit einer anderen Sonde musste zunächst die Dig-markierte Sonde entfernt bzw. „gestrippt“ werden. Durchzuführen war dies lediglich bei Membranen, die einerseits alkali-labile Dig-Moleküle gebunden hatten (sensitiv bei 0,1 bis 0,5 M NaOH), und andererseits ständig feucht gehalten worden waren, so dass keine kovalente Bindung zwischen der Sonde und der membrangebundenen DNA entstehen konnte. Nach kurzem Spülen der Membran in destilliertem Wasser wurde sie zweimal 20 Minuten in 0,2 M NaOH/0,1% SDS bei 37°C gewaschen. Anschließend wurde sie gründlich mit 2x SSC gespült und, wenn sich die Hybridisierung nicht unmittelbar anschloss, in einem Hybridisierungsbeutel luftdicht eingeschweißt bei 4°C aufbewahrt.

2.8. NACHWEIS SPEZIFISCHER NUKLEINSÄUREN DURCH HYBRIDISIERUNG MIT RADIOAKTIV-MARKIERTEN FRAGMENTEN

2.8.1. MARKIERUNG EINES FRAGMENTES MIT RADIOAKTIVITÄT

(*random-prime*-Synthese modifiziert nach Feinberg und Vogelstein, 1983)

Zur radioaktiven Markierung werden DNA-Fragmente nach zufälligem Binden von Hexameren an die Ziel-DNA synthetisiert, wobei die Hexamere als *primer* für eine Synthese fungieren, bei der ein radioaktiv-markiertes Desoxyribonukleotid eingebaut wird. Als Matrizen-DNA wurde ein durch PCR hergestelltes Chromosomenfragment eingesetzt. Für einen Reaktionsansatz von 20 µl wurden folgende Lösungen verwendet (Firma Roche Molecular Biochemicals, Mannheim):

- 2 µl DNA-Fragment (ca. 100 ng)
- 2 µl Hexanukleotide mit 10x Klenowpuffer (130 mM Kaliumphosphat, 6,5 mM MgCl₂)
- 1 µl Desoxyribonukleotid-Mix aus dATP, dGTP, dTTP (je 1 mM)
- 2 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (10 µCi/µl)
- 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl)
- 12 µl H₂O_{Milli-Q}

Ein Teil des Markierungsansatzes bestehend aus DNA, Hexanukleotid-Mix und Desoxyribonukleotid-Mix wurde mit Milli-Q-Wasser auf 17 µl aufgefüllt, 10 Minuten gekocht und dann schockgekühlt. [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP und Klenow-Enzym wurden zugeben und die Reaktion

5 Stunden bis über Nacht bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide sowie Hexanukleotide wurden anschließend mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits*, März 2001 (QIAGEN GmbH, Hilden) abgetrennt. Anschließend wurde ein halber Ansatz des Eluats als Sonde in eine Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

2.8.2. HYBRIDISIERUNG MIT EINER RADIOAKTIV-MARKIERTEN DNA-SONDE

Für die Hybridisierungsreaktion wurde die Prä-Hybridisierungslösung mit extra abgefüllter Heringssperma-DNA 10 Minuten gekocht und dann zusammengegeben. Die Membran wurde mit 30 ml der Lösung in einem Roller (mit DNA-Seite nach innen) eine Stunde bei 68°C in einem Hybridisierungsofen vorhybridisiert. Die Hybridisierungslösung mit extra Heringssperma-DNA wurde 10 Minuten gekocht und vermischt. Daraufhin wurde, nach Dekantieren der Prä-Hybridisierungslösung, 15 ml der Hybridisierungslösung in den Roller gegeben. Die radioaktiv-markierte denaturierte Sonde wurde zugegeben und die Membran über Nacht bei 68°C in dem Hybridisierungsofen hybridisiert. Anschließend wurde die Membran zur Entfernung von überschüssiger Sonde stringent gewaschen, zunächst zweimal 5 bis 10 Minuten mit 2x SSC/0,5% SDS bei 68°C, gefolgt von einmal 15 Minuten mit 2x SSC/0,1% SDS bei 68°C. Zwischen den Waschschritten wurde die auf der Membran vorhandene Radioaktivität mit Hilfe eines Geiger-Müller-Zählrohrs gemessen und dementsprechend die Anzahl der noch weiter durchzuführenden Waschschrritte gewählt. Am Ende wurde die Membran 5 Minuten bei Raumtemperatur in 0,1x SSC/0,1% SDS gelegt und anschließend in feuchtem Zustand luftdicht in eine Folie eingeschweißt. Das Signal wurde sichtbar gemacht durch Exponierung mit einem Röntgenfilm bei -70°C, die, je nach Stärke, für 1 bis 5 Tage erfolgte.

Prä-Hybridisierungslösung	2x SSC 1% (w/v) SDS 0,5% (w/v) <i>blocking</i> -Reagenz 0,75 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA
Hybridisierungslösung	2x SSC 1% (w/v) SDS 0,5 % (w/v) <i>blocking</i> -Reagenz 0,5 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

2.8.3. ENTFERNUNG EINER GEBUNDENEN RADIOAKTIVEN SONDE

Vor Hybridisierung mit einer neuen Sonde wurde von der Membran die gebundene, radioaktive Sonde entfernt. Dies konnte nur bei solchen Membranen durchgeführt werden, die vorher ständig feucht gehalten worden waren.

Die Membran wurde zweimal je eine Stunde in reichlich 0,1 M NaOH/0,1% SDS bei 68°C gewaschen. Um die Entfernung der Sonde zu überprüfen, wurde die Radioaktivität auf der Membran mit Hilfe eines Geiger-Müller-Zählrohrs überprüft. Anschließend wurde sie in eine Folie luftdicht eingeschweißt und bis zur Weiterverwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.9. COMPUTERANALYSE VON NUKLEINSÄUREN

2.9.1. BIOINFORMATIK

Die komplette Datenbank des Hefegenoms (Cherry *et al.*, 1997) ist seit Fertigstellung der Sequenzierung 1994 in der *Saccharomyces Genome Database* (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>, Stanford University) zugänglich. Sie bietet verschiedene Möglichkeiten der genetischen Analyse, wie etwa Informationen über die Chromosomenkarte oder auch Homologiesuche auf DNA-Ebene (BLAST) bzw. auf Proteinebene (FASTA). Eine Anwendungsmöglichkeit von SGD war es auch PCR-*primer* zu designen, um damit anschließend die dazu ausgewählten DNA-Regionen zu amplifizieren. Eine zusätzliche Überprüfung dieser Bereiche hinsichtlich ihrer Gene und deren funktionelle Rolle im Genom erfolgte mit *Proteome, Inc: YPD Full Search* (<http://www.proteome.com/databases/YPD/YPDsearch-long.html>) sowie mit *Munich Information Center for Protein Sequences* (MIPS, <http://mips.gsf.de/>).

Bei der Festlegung der *primer* wurden folgende Eigenschaften mitberücksichtigt:

- die Länge sollte bei etwa 20 bp liegen;
- zur besseren Stabilität sollten die *primer* am 3'-Ende mit G oder C enden;
- sie sollten nicht mit sich selbst paaren;
- Vorwärts- und Rückwärts-*primer* sollten nicht miteinander paaren;
- Vorwärts- und Rückwärts-*primer* sollten aufgrund von etwa gleichem G/C-Anteil ungefähr die gleiche Schmelztemperatur haben;
- die Schmelztemperatur wurde mit Hilfe der Wallace-Regel (siehe II.1.5.) berechnet.

2.9.2. MOLEKÜLLÄNGEN-BESTIMMUNG DER HEFECHROMOSOMEN

Zur Festlegung der ursprünglichen, nicht-translozierten Chromosomenlängen sowie der Lage der Zentromerbereiche wurden, ebenso wie bei der Bestimmung der Lage der Sondenregionen, die Werte der SGD-Datenbank übernommen. Eine Ausnahme ist die Länge von Chromosom XII, bei dem aufgrund eines großen rDNA-*clusters* Variationen von bis zu 1000 kb möglich sind (Olson, 1991). Anstatt des Datenbankwertes (1078 kb) wurde für Chromosom XII eine Länge von 2200 kb nach Friedl *et al.*, 1998 übernommen.

Um die Länge der Chromosomen mit Aberrationen zu bestimmen, wurde mit Hilfe des Computerprogramms KaleidaGraph 3.5 eine Migrationskurve erstellt. Sie ist durch die Beziehung zwischen der Moleküllänge (entsprechend SGD-Länge, in kb) und der Migrationsdistanz (auf dem Gel zurückgelegte Strecke, in cm) beschrieben. Die Migrationsdistanz ist zwar ein sich je nach Gellauf verändernder Faktor, abhängig von z.B. Elektrophoresedauer, DNA- und Agarosekonzentration, was letztendlich zu einem verschieden steilen Abfall der Migrationskurve führt. Die Relation zwischen den Längen der einzelnen Moleküle bleibt aber gleich. So konnte die Migrationsdistanz derjenigen Chromosomen, die der Aberrationsbande von der Länge her am nächsten sind, abgemessen werden und in die Migrationskurve eingetragen werden. Die Moleküllänge der translozierten Bande wurde anschließend durch lineare Interpolation bestimmt. Allerdings können die ermittelten Chromosomenlängen um einige 10 kb von den tatsächlichen Längen abweichen, da einerseits die Chromosomenlängen in den hier verwendeten Stämmen wahrscheinlich nicht exakt mit der SGD-Datenbank übereinstimmen und andererseits die Migrationsdistanz nicht ganz genau festgelegt werden kann.

2.9.3. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Um festzustellen, ob sich die Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben signifikant voneinander unterscheiden, wurde der zweiseitige Student t-Test angewendet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe eines *online*-Berechnungsprogrammes unter http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test_NROW_form.html durchgeführt. Um festzustellen, ob sich zwei Stichproben in der Häufigkeit eines Ereignisses signifikant voneinander unterscheiden, wurde

der χ^2 -Test angewendet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des *online*-Berechnungsprogrammes *WEB Chi Square Calculator* unter http://www.georgetown.edu/faculty/balle/webtools/web_chi.html durchgeführt.

III. KARTIERUNG VON BRUCHPUNKTEN STRAHLENINDUZIRTER TRANSLOKATIONEN IN HEFE

1. ERHÖHTE TRANSLOKATIONS-BETEILIGUNG DER CHROMOSOMEN V UND VIII

In den Vorarbeiten waren Klone von *Saccharomyces cerevisiae* generiert worden (Friedl *et al.*, 1998; Fellerhoff, 1999), die strahleninduzierte strukturelle Chromosomenaberrationen, vor allem Translokationen tragen (siehe auch Einleitung I.3.2.). Die Hefekollektion mit reziproken Translokationen umfasst 16 Klone mit insgesamt 35 beteiligten Chromosomen (siehe Tabelle 1). Sie stammen aus zwei verschiedenen Stammhintergründen: SX46A *rad52Δ* und WS8105-1C *rad54Δ* (Siede *et al.*, 1996). Betrachtet man die Klone hinsichtlich der Beteiligung einzelner Chromosomen an Austausch-Ereignissen, ist folgendes zu beobachten: Obwohl bei Hefe die Häufigkeit von strahleninduzierten DSB pro chromosomalen Molekül direkt proportional zur entsprechenden Moleküllänge ist (Friedl *et al.*, 1993; Kraxenberger *et al.*, 1994), sind bestimmte Chromosomen häufiger an Translokationen beteiligt, als aufgrund ihrer Länge zu erwarten wäre (siehe Abbildung 5); andere Chromosomen hingegen scheinen in Translokationen deutlich unterrepräsentiert. Häufige Translokations-Beteiligung ist bei Chromosom V und VIII zu finden (mit einer ungefähr gleichen Länge von etwa 570 kb), was in der Literatur von Friedl und Mitarbeitern bereits beschrieben wurde (Friedl *et al.*, 1998). Einen vergleichbaren Trend zeigt eine neuere Untersuchung von Fellerhoff (Fellerhoff, 1999), deren Hefeklone unter gleichen Bedingungen hergestellt wurden. Abweichungen von einer gleichmäßigen, nur längenabhängigen Verteilung der Beteiligung einzelner Chromosomen an Aberrationen wurden auch nach Bestrahlung in Säugerzellen beobachtet (Knehr *et al.*, 1994 und 1996; Boei *et al.*, 1997). Dazu wurde postuliert, dass die Grundlage solcher Abweichungen in der dreidimensionalen Kernarchitektur zu finden sein könnte (siehe auch Einleitung I.2.).

Die häufige Translokations-Beteiligung von Chromosom V und VIII bietet den Vorteil, dass sich nach Kartierung von Bruchpunkten Verteilungsmuster leichter erkennen lassen, als wenn die kartierten Bruchpunkte über alle Chromosomen verstreut wären. Für die Bruchpunkt-Kartierung auf Chromosom V bzw. VIII sowie deren Partnerchromosomen wurden aus der Hefekollektion alle Klone mit reziproken Translokationen an diesen Chromosomen ausgewählt: insgesamt 8 Klone mit 19 beteiligten Chromosomen (aus Friedl *et al.*, 1998: 6 Klone; Fellerhoff, 1999: 2 Klone). Es wurde noch ein weiterer Klon ausgewählt (SXrad52/500/26), dem jedoch keine eindeutig klassifizierbare strukturelle Aberration zuzuweisen war. Die ausgesuchten Klone mit Translokationen sind in Tabelle 1 durch Fettdruck hervorgehoben.

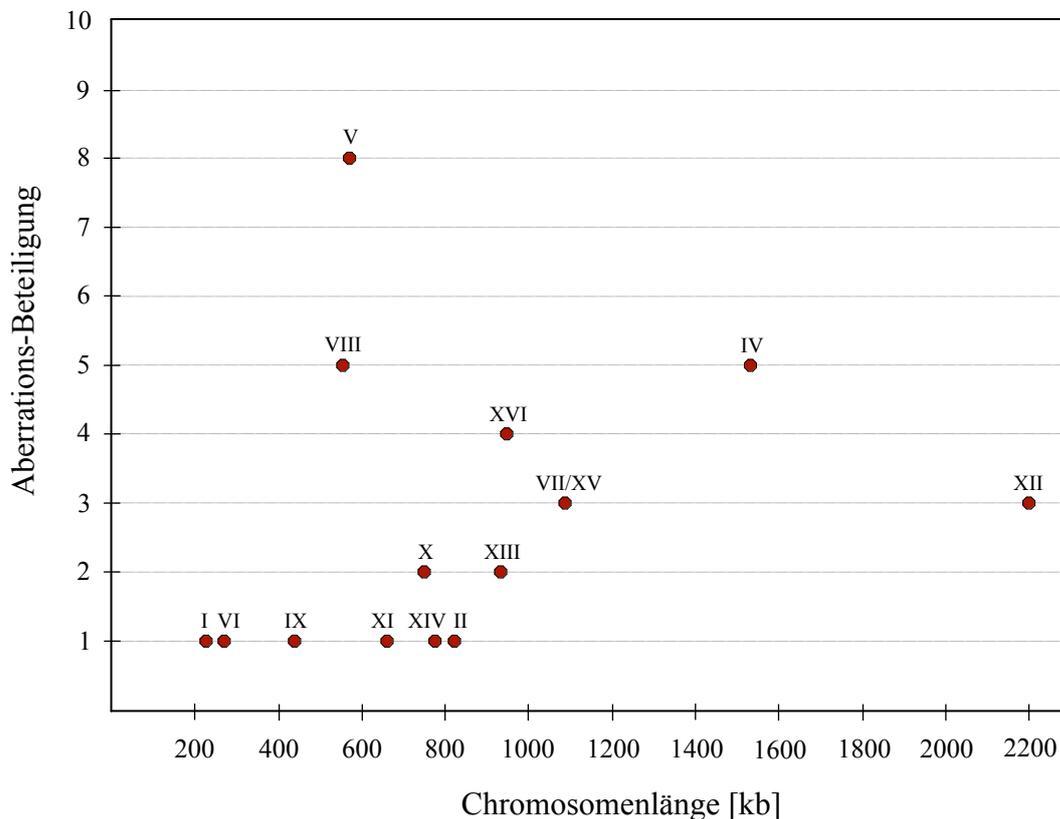


Abb. 5: Häufigkeit der Aberrations-Beteiligung von einzelnen Chromosomen der insgesamt 17 zur Verfügung stehenden Klone

Ausgangspunkt sind die in Tabelle 1 angegebenen Klone. Es ist zu erkennen, wie oft einzelne Chromosomen (bezeichnet mit römischen Zahlen und positioniert entsprechend ihrer Länge in kb) der 17 Klone von strukturellen Aberrationen betroffen sind. Die Gesamtzahl der Beteiligungen liegt dabei bei 38. Die Wahrscheinlichkeit der Involvierung einzelner Chromosomen in Aberrationen scheint keine Relation zu ihrer Länge zu haben, ansonsten wäre eine kontinuierlich ansteigende Aberrations-Beteiligung entsprechend der an Größe zunehmenden Chromosomenlänge zu beobachten. Bei diesen Klone ist jedoch sowohl eine Unter- als auch Überrepräsentierung der Aberrations-Beteiligungen bestimmter Chromosomen zu sehen, wie etwa die erhöhte Beteiligung von Chromosom V und VIII.

Klon	Veränderte Chromosomen (Länge in [kb])	Neue Banden [kb]
	durch Translokationen	
SXrad52/100/M3	VI (270), XVI (948)	590, 650 ^a
SXrad52/200/M1	VIII (563), V (575)	440, 666
SXrad52/350/21	X (745), XIII (924)	630, 1030
SXrad52/500/1	XVI (948), XII (2200)	1180, 2000 ^a
SXrad52/500/2	V (575), XIV (784)	666, 700
SXrad52/500/12	V (575), XI (666), XIII (940), IV (1522)	400, 440, 1140, 1750
SXrad52/500/54	VIII (563), II (813)	370, 1000
SXrad52/500/61	IV (1522), XII (2200)	1900, 1900 ^a
SXrad52/500/77	VIII (563), V (575), IV (1522)	270, 1190, 1190
WSrad54/200/10	VIII (563), V (575)	560, 590
WSrad54/500/S15	V (575), VII (1091)	400, 1290
WSrad54/500/S26	XVI (948), VII (1091)	1110, 1110 ^b
WSrad54/500/19	X (745), XVI (948)	620, 1135 ^a
WSrad54/500/35	VII (1091), IV (1522)	940, 1700
WSrad54/500/36	VIII (563), V (575)	290, 870
WSrad54/500/77	IX (440), IV (1522)	1050, 1050 ^b
	durch andere Aberrationen	
SXrad52/500/26	I (230), V (575), XII (2200)	440, 1091

Tab. 1: Klone mit strukturellen Chromosomenaberrationen

Die Klone (mit jeweiliger Angabe der Mutation und der Bestrahlungsdosis in Gray) zeigen strukturelle Aberrationen, die – abgesehen von dem letzten Klon SXrad52/500/26 – als reziproke Translokationen klassifiziert werden. Die durch Fettdruck hervorgehobenen acht Klone wurden für die Kartierung verwendet. Die Tabelle zeigt die ursprünglichen Chromosomenlängen (zweite Spalte), die dem Ergebnis des Hefegenom-Projekts aus der *Saccharomyces Genome Database* (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>) entsprechen. Die Längen der neuen Chromosomenbanden (dritte Spalte) wurden mittels Moleküllängen-Bestimmung abgeschätzt (siehe Methoden II.2.9.2.: lineare Interpolation), abgesehen von den speziell Bezeichneten, die aus Friedl *et al.*, 1998 („a“) und Fellerhoff, 1999 („b“) übernommen wurden.

Tabelle 1 zeigt, dass Chromosom V unter den insgesamt 35 an reziproken Translokationen beteiligten Chromosomen siebenmal vertreten ist, Chromosom VIII ist fünfmal vertreten. Um abzuschätzen, ob diese Bruchpunkt-Häufung signifikant ist, wurden die binomialen Wahrscheinlichkeiten der Häufungen berechnet. Der Längenanteil von Chromosom V bzw. VIII (jeweils auf 570 kb gerundet) am Gesamtgenom beträgt jeweils nur etwa 4,6% des Genoms. Damit ist die Wahrscheinlichkeit für einen Treffer auf einem Chromosom der Länge 570 kb $p = 0,046$. Der entsprechende q -Wert (oder $1 - p$ -Wert) beträgt 0,954. Die Binomialverteilung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$P(n, k) = \binom{n}{k} * p^k * q^{n-k}$$

Am Beispiel von Chromosom V ergibt dies die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis (Bruchpunkt auf Chromosom V), das bei einmaligem Versuch mit Wahrscheinlichkeit p eintritt, bei n Versuchen (35 Bruchpunkte) k -mal auftritt. Für Chromosom V ($k \geq 7$) beträgt die Wahrscheinlichkeit $P = 0,00089$, für Chromosom VIII ($k \geq 5$) beträgt sie $P = 0,02044$. Da jedoch die jeweilige Häufung nicht nur auf einem 570 kb-Stück stattfinden kann, sondern auf jedem vorhandenen 570 kb-Stück, müssen die Ergebnisse mit $1 : 0,0456$ multipliziert werden. Damit liegt die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen von sieben oder mehr von 35 Bruchereignissen in einem Intervall dieser relativen Länge bei $P = 0,0195$, die Bruchpunkte auf V sind also signifikant überrepräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit für fünf oder mehr Bruchpunkte beträgt dann $P = 0,4482$, d.h. die Bruchpunkt-Häufung auf Chromosom VIII kann nicht als signifikant angesehen werden. Ähnliche Schlussfolgerungen konnten aus Computersimulationen gezogen werden (Kellerer, pers. Mitteilung).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach möglichen Ursachen für eine häufige Beteiligung einzelner Chromosomen an Austausch-Ereignissen. Eine mögliche Erklärung kann die auf den Chromosomen vorhandene unterschiedliche Dichte essentieller Gene sein. Bei einem Schaden in solchen Genen, beispielsweise infolge einer Translokation, kommt es zum Zelltod, so dass eine Untersuchung der Klone mittels elektrophoretischer Karyotypisierung nicht mehr möglich ist. Entsprechend der MIPS-Datenbank (<http://mips.gsf.de/>) liegt die Gesamtzahl der Gene, deren Inaktivierung letal ist, bei 1016. Bei einer Hefegenomlänge

von etwa 12000 kb ergibt sich damit eine durchschnittliche molekulare Länge pro essentiellen Gen von etwa 12 kb. Auf den Chromosomen V und VIII liegt diese Länge bei 18,5 kb und 13,7 kb, d.h. dort sind weniger essentielle Gene zu finden als im Durchschnitt. Allerdings waren in der vorhandenen Kollektion bei Chromosom I und III, die im Vergleich zum restlichen Genom die geringste Dichte essentieller Gene haben, überhaupt keine Austauschaberrationen zu finden. Für Chromosom V und VIII bedeutet dies, dass die vom Durchschnitt abweichende Anzahl essentieller Gene vermutlich nicht ursächlich für eine erhöhte Translokations-Beteiligung ist.

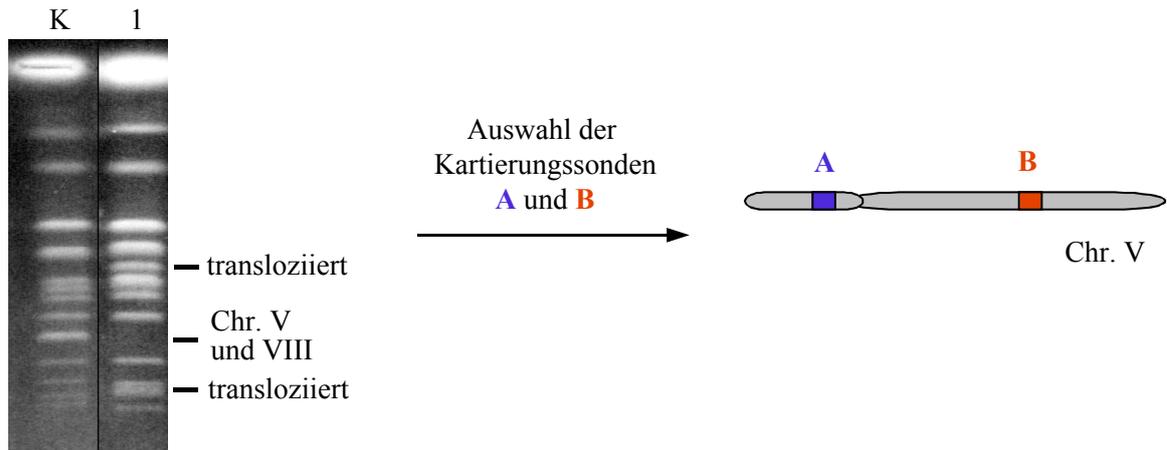
Weitere mögliche Erklärungen für die Überrepräsentierung der Chromosomen V (signifikant) und VIII (nicht signifikant) wurden bisher nicht gefunden. Die erhöhte Translokations-Beteiligung ist jedoch der Grund, warum die Klone in diesem Vorhaben für eine Bruchpunkt-Kartierung verwendet werden: Die Untersuchung der räumlichen Bruchpunkt-Verteilung bei diesen etwa gleich langen Chromosomen lässt es zu, Verteilungsmuster zu erkennen mit der Möglichkeit, auf einen potentiellen Einfluss der Zellkernarchitektur auf dieses Muster zu schließen.

2. STRATEGIE UND ETABLIERUNG DER KARTIERUNG VON TRANSLOKATIONS-BRUCHPUNKTEN

Zur Kartierung der Translokations-Bruchpunkte wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet, die jeweils auf einer Auftrennung der Chromosomen in einem Pulsfeldgel beruhen. Bei der ersten Methode erfolgt anschließend eine Southern-Hybridisierung mit Locus-spezifischen Sonden. Bei der anderen Methode werden aberrante Banden isoliert und dann in eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Beide Methoden zielen darauf ab, die An- bzw. Abwesenheit spezifischer Sequenzbereiche (im nachfolgenden Sonden genannt) auf den aberranten chromosomalen Banden nachzuweisen.

Die Methode der Bruchpunkt-Kartierung mittels Hybridisierung ist in Abbildung 6 schematisch gezeigt. Zu Beginn des Experimentes wurden die Klone durch Auftrennung der Hefechromosomen im Pulsfeldgel karyotypisiert, um die translozierten Chromosomen

Karyotypisierung der
Klone mittels PFGE



Herstellung der
Sonden mittels
PCR und Markierung

Sonden
A B

Southern-Hybridisierung
der Sonden auf das
PFGE-Karyogramm

Hybridisierungs-Ergebnisse der
Klone mit den Sonden A bzw. B

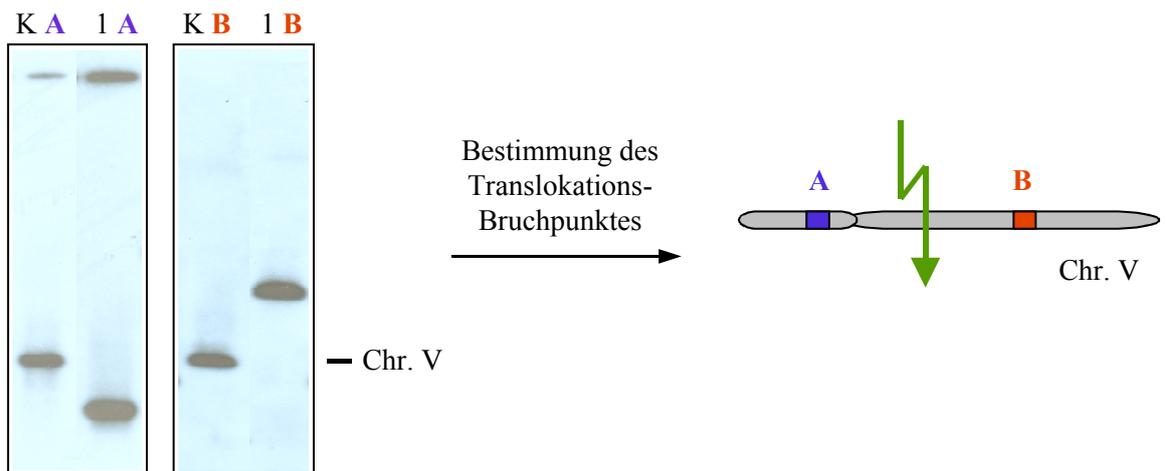


Abb. 6: Schema zur Bruchpunkt-Bestimmung mittels Hybridisierung Locus-spezifischer Sonden auf ein Karyogramm; Beispiel: Chromosom V

Am Beispiel von zwei Klonen ist eine Karyotypisierung mittels Hybridisierung gezeigt (Kontrollklon: K; Klon mit Translokation: 1). Um den Translokations-Bruchpunkt auf Chromosom V von Klon 1 zu bestimmen, wurden die Kartierungs-sonden (A und B) ausgewählt und mittels PCR und Markierung hergestellt. Nachdem das Pulsfeldgel mittels Southern-Blot auf eine Nylonmembran geblottet war, wurde die Membran mit jeweils einer Sonde pro Reaktion hybridisiert. Anhand der Signale auf den Radiographien konnte die Lokalisierung der Sonden auf den aberranten Chromosomen überprüft werden. Wenn, wie in diesem Beispiel, zwei Sonden auf unterschiedlichen Banden lokalisieren, muss der Bruchpunkt zwischen den Sondenbereichen liegen.

sichtbar zu machen. Um deren Translokations-Bruchpunkte zu kartieren, mussten spezifische Sondenbereiche ausgewählt werden. Nach Sondenherstellung mit PCR und Markierung erfolgte eine Southern-Hybridisierung auf das PFGE-Karyogramm, um das Vorhandensein der Sondenbereiche auf den aberranten Chromosomen nachzuprüfen. Die Sonden wurden mittels Digoxigenin oder mittels Radioaktivität markiert. Hauptsächlich wurde Digoxigenin verwendet, da, abgesehen von dem Vorteil der fehlenden Strahlungsaktivität, die Proben in einem Zeitraum von etwa einem Jahr mehrmals verwendet werden konnten. Da jedoch bei dieser Methode – im Gegensatz zur radioaktiven – die Effizienz der Waschschriffe nicht während des Experimentes überprüft werden kann, kann es zu schwer interpretierbaren Ergebnissen kommen. In diesem Fall, der allerdings nur selten vorkam, musste die Hybridisierung wiederholt werden.

Die Kartierung der Bruchpunkte mittels Hybridisierung ist eine zwar sichere, aber doch sehr aufwändige Methodik. Sie ist außerdem nicht besonders effektiv, da die Ergebnismenge für eine Hybridisierung sich nach der Anzahl der aufgetragenen Proben in der PFGE richtete (= max. 10 Klone). Aus diesem Grund wurde versucht, eine effizientere Methode zu entwickeln, die einen hohen Probendurchsatz erlaubt. Hierfür wurde ein Weg gewählt, der über die Isolierung der translozierten Chromosomen nach elektrophoretischer Auftrennung führt (siehe Abbildung 7). Die Hefechromosomen wurden dafür mittels PFGE in einem LMP-Agarosegel aufgetrennt. LMP-Agarose war notwendig, um den Abbau der Agarose durch Agarase und somit eine schonende Isolierung der genomischen DNA zu ermöglichen, nachdem die zu untersuchenden Banden ausgeschnitten wurden. Die so präparierte chromosomale DNA wurde in PCR-Reaktionen eingesetzt, um das Vorhandensein spezifischer Sequenzabschnitte (Kartierungssonden) zu testen. Da der PCR-Nachweis vieler Loci gleichzeitig erfolgen kann, konnte so eine erhebliche Menge an Resultaten pro Versuchsansatz erzielt werden.

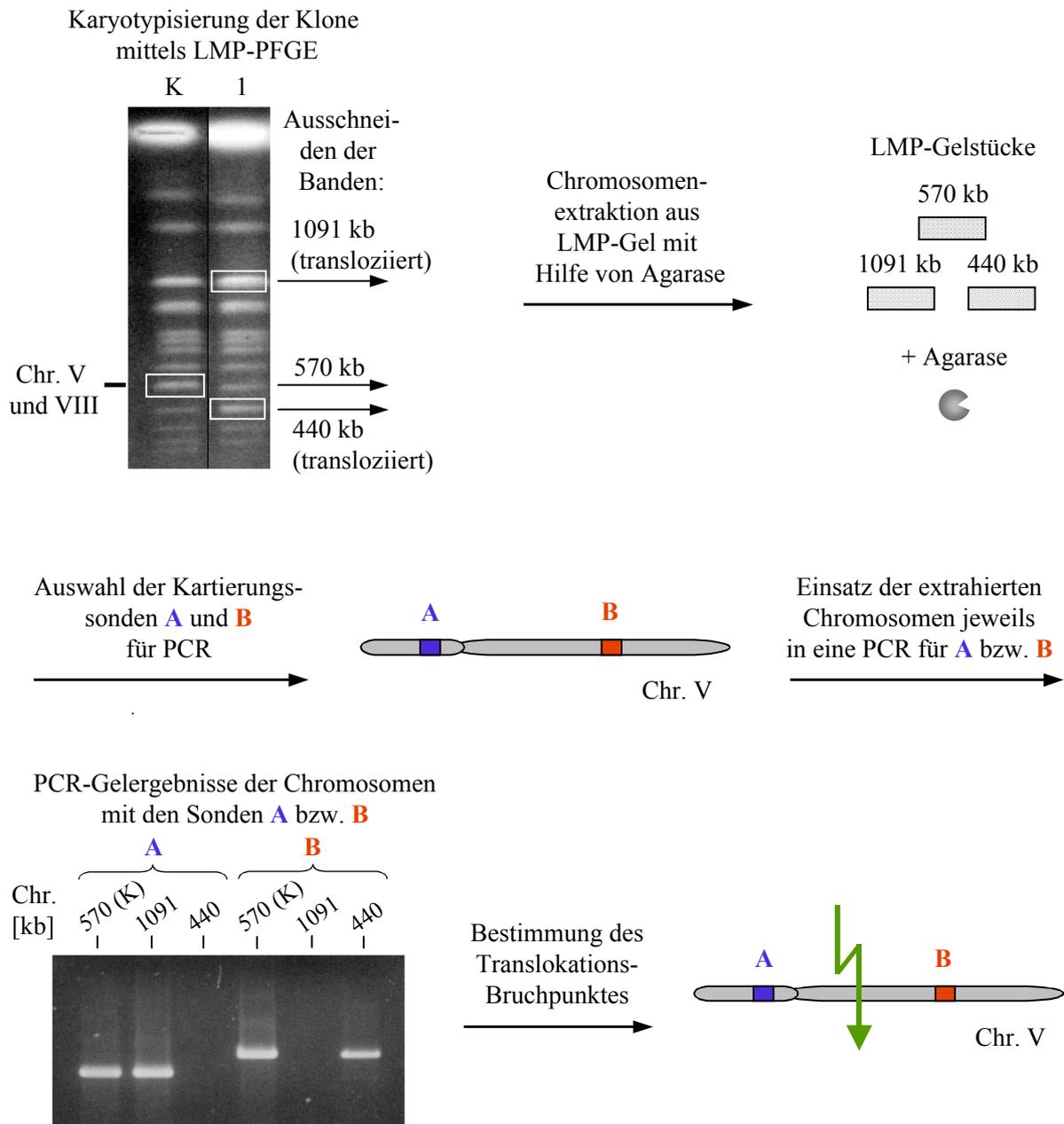


Abb. 7: Schema zur Bruchpunkt-Bestimmung mittels Isolierung aberranter Banden mit anschließendem PCR-Nachweis Locus-spezifischer Sonden; Beispiel: Chromosom V

Zur Isolierung der aberranten Banden wurden die Chromosomen in einem Pulsfeldgel aufgetrennt, hier gezeigt an zwei Klonen (Kontrollklon: K; Klon mit Translokation: 1). Anschließend wurden die zu untersuchenden Banden ausgeschnitten, in diesem Fall eine Kontrollbande mit 570 kb und zwei Banden mit transloziierten Chromosomen mit einer Länge von 1091 kb und 440 kb. Die genomische DNA wurde jeweils durch Agaraseverdau präpariert. Zur Bestimmung der Bruchpunkte auf dem aberranten Chromosom V von Klon 1 wurden Kartierungssonden (A und B) ausgewählt. Um das Vorhandensein der Sondenbereiche nachzuprüfen, wurde die chromosomale DNA in PCR-Reaktionen zur Sondenherstellung, hier A bzw. B, eingesetzt. Unter idealen Bedingungen kommt es nur zur Amplifikation, wenn der gewählte Bereich auf dem als Matrize verwendeten Chromosom lokalisiert ist.

Da es bei der Elektrophorese und beim Ausschneiden der Banden aus dem Gel zur Verschleppung von kontaminierenden DNA-Molekülen kommen kann, ist die PCR-Methode fehleranfällig, wie es als Beispiel in Abbildung 8 zu sehen ist. Um die Amplifizierung falscher Moleküle zu minimieren, wurde beim Ausschneiden jeder Bande ein eigenes Deckglas bzw. eigenes Skalpell verwendet. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen ließen sich jedoch PCR-Artefakte nicht immer vermeiden; bei den wenigen uneindeutigen Fällen wurden die PCR-Ergebnisse mit der Hybridisierungsmethode verifiziert. Letztendlich zeichnete sich die *high-throughput*-Methode jedoch nach ihrer Etablierung nicht nur durch die Quantität der Ergebnisse aus, sondern auch durch ihre Qualität.

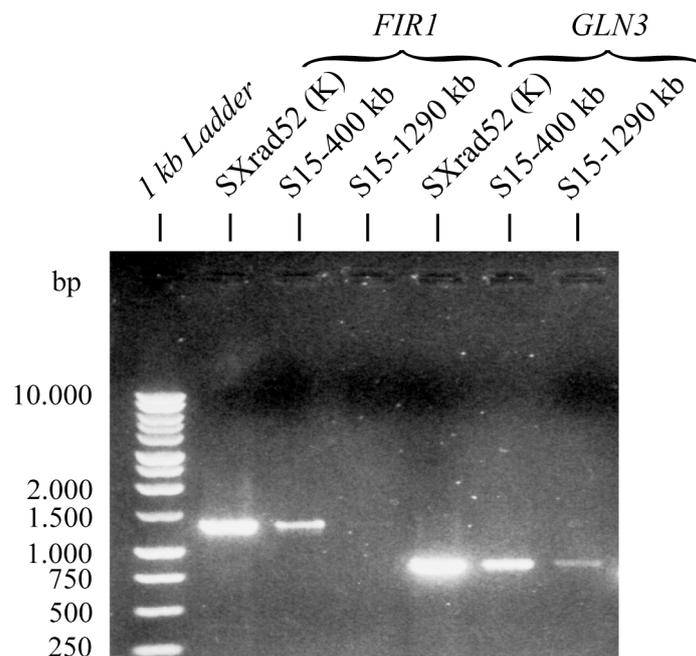


Abb. 8: Etablierung der *high-throughput*-Kartierung

Auf dem Gel sind Amplifikate zu sehen, die dem Nachweis der beiden Sonden *FIR1* und *GLN3* dienen. Neben dem Längenstandard (*1 kb Ladder*) sind pro Sonde drei Proben aufgetragen: Jeweils eine Reaktion mit chromosomaler DNA aus dem Kontrollstamm (SXrad52), gefolgt von den beiden Reaktionen mit den aberranten Chromosomen (Längen 400 kb und 1290 kb) des Klons WSrad54/500 Nr. S15. Auf der Kontrollspur ist die erwartete Länge der Amplifikate sichtbar, für *FIR1* 1330 bp und für *GLN3* 880 bp. Die weiteren Banden zeigen einen eindeutigen Sondennachweis auf der 400 kb Bande für *FIR1*. Für *GLN3* allerdings ist ein zweifach positives - wenn auch unterschiedlich starkes - PCR-Ergebnis erkennbar, d.h. hier ist durch eine Verschleppung von kontaminierenden DNA-Molekülen kein endgültiges Ergebnis ableitbar.

Bei denjenigen Klonen, deren translozierte Chromosomen ähnlich lang sind und somit auf dem Karyogramm nahe beieinander liegen, war diese Art der Bruchpunkt-Kartierung natürlich nicht möglich. Ein Beispiel dafür ist der Klon WSrad54/200/10 mit einer Länge der translozierten Chromosomen von 560 kb und 590 kb. Auch durch Veränderung der Laufbedingungen in der PFGE konnte hier keine ausreichende Entfernung zwischen diesen Chromosomen erreicht werden, so dass die Hybridisierungsmethode angewendet werden musste.

Ein wesentlicher Faktor bei der Bruchpunkt-Kartierung ist die Sondenwahl. Für beide Methoden konnten die gleichen Sonden verwendet werden: Für die Hybridisierungsmethode wurden die Sonden mittels PCR an genomischer DNA des parentalen Stammes hergestellt, und die gleichen PCR-*primer* wurden für den PCR-Nachweis von Loci auf aberranten Chromosomen verwendet. Um eine Amplifizierbarkeit unter Standardbedingungen zu ermöglichen, wurden Sondenlängen im Bereich von 500 bp – 1600 bp gewählt.

Bei der Kartierung wurden zuerst die Bruchpunkte in einzelnen größeren Chromosomenabschnitten eingegrenzt, indem für diese Grobkartierung eine begrenzte Anzahl an Sonden regelmäßig über die Chromosomen verteilt wurde. Als Grundlage der Auswahl geeigneter Sequenzen diente die in der Datenbank *Saccharomyces Genome Database* (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>) abgelegte Sequenz des Hefegenoms. Der im Rahmen des Hefegenom-Projektes (Cherry *et al.*, 1997) sequenzierte Stamm SC228c ist mit den hier verwendeten Stämmen nicht eng verwandt. Um einen möglichst hohen Grad an Konserviertheit und somit Bindung der PCR-*primer* zu gewährleisten, wurden als Sonden deshalb intragenische Bereiche gewählt. Mit Hilfe von BLAST-Analysen in der SGD-Datenbank sowie ergänzend durch Homologiesuche in *Proteome, Inc: YPD Full Search* (<http://www.proteome.com/databases/YPD/YPDsearch-long.html>) bzw. in MIPS (<http://mips.gsf.de>) wurde sichergestellt, dass ausgewählte Sonden und *primer*-Bindestellen im Genom einmalig vorhanden waren.

Nach der Grobkartierung der Bruchpunkte auf einzelne Chromosomenabschnitte sollten diese durch eine Kartierung mit höherer Ausflösung genauer lokalisiert bzw. voneinander getrennt

werden. Die Lage der Sonden richtete sich dabei nach den Bruchpunkten, so dass die für den Bruch in Frage kommenden DNA-Regionen immer enger eingegrenzt wurden. Da hierfür nicht immer intragenisch gelegene Sonden nutzbar waren, mussten zusätzlich intergenische DNA-Bereiche verwendet werden. Aufgrund von Sequenz-Divergenzen und damit einhergehendem Ausfall von PCR-Amplifikationen, sowie aufgrund von Häufungen repetitiver Sequenzen wie tRNA, Ty oder ähnlichem, war die Wahl geeigneter Sonden in manchen Bereichen stark beschränkt. Ein Beispiel hierfür ist der in Abbildung 9 gezeigte Abschnitt auf Chromosom V zwischen den Längenkoordinaten von 246 kb bis 254 kb. Hier sollten zwei Bruchpunkte der Klone SXrad52/200/M1 und SXrad52/500/12 genauer lokalisiert werden.

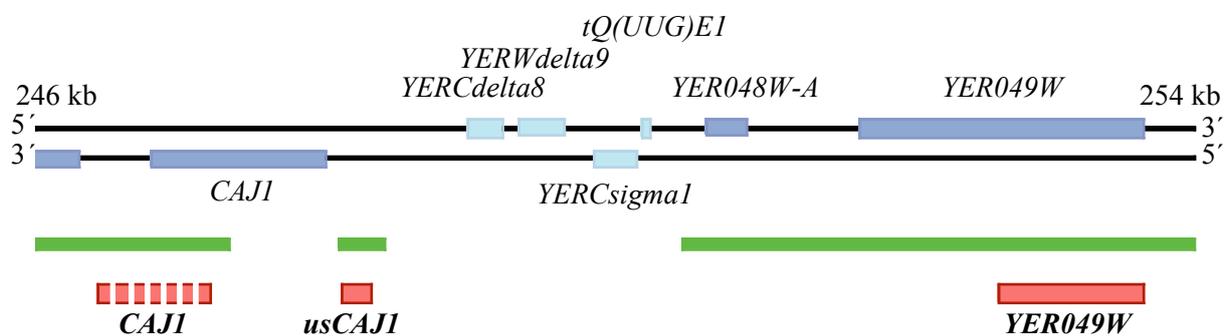


Abb. 9: Ausschnitt aus Chromosom V von 246 kb bis 254 kb

Zur Lokalisierung der Bruchpunkte der Klone SXrad52/200/M1 und SXrad52/500/12, die bis dahin auf einen Bereich zwischen den Koordinaten 236 kb (*SAHI*) und 265 kb (*HIS1*) eingegrenzt waren, sollten weitere Sonden bestimmt werden. Anhand der maßstabsgetreu gezeigten physikalischen Chromosomenkarte (offene Leserahmen dunkelblau; repetitive Elemente hellblau) sowie dem Ergebnis der BLAST-Analyse wurde sichtbar, dass die Auswahl begrenzt ist: Repetitive Elemente wie Ty (*YERCdelta8*, *YERWdelta9*, *YERCsigma1*) und tRNA [*tQ(UUG)E1*] zeigen eine Vielzahl an gleichen bzw. ähnlichen Sequenzen im Hefegenom. Einzigartig vorhandene Bereiche (grün bezeichnet) sind nur in Gen- (*CAJI*, *YER048W-A*, *YER049W*) bzw. Gen-nahen Regionen vorhanden. Dort wurden zunächst als Sonden die Bereiche *CAJI* und *YER049W* (rot) bestimmt. Die PCR-Amplifikation von *CAJI* schlug allerdings fehl, was vermutlich an Sequenzunterschieden des im intergenischen Bereich liegenden Hin-primers im Vergleich zur Datenbank lag. Alternativ wurde die Sonde *usCAJI* ausgewählt, die, obwohl sie vollkommen im intergenischen Bereich liegt, amplifiziert werden konnte.

Als schwierig erwies sich auch die Sondenfestlegung in der Telomer-nahen Region. Grund dafür sind repetitive Sequenzen, die, auch im evolutorischen Sinne, hoch konserviert sind (Pryde *et al.*, 1997). Diese spezielle und für die Stabilität wichtige Struktur am Chromosomenende erfüllt verschiedene Aufgaben: Abgesehen von der Bedeutung in der dreidimensionalen Zellkernarchitektur, schützen Telomere die DNA vor exonukleolytischer Degradation. Außerdem verhindern sie eine Chromosomenverknüpfung, die zu instabilen dizentrischen Chromosomen führen würde (Gasser, 2000; Übersicht bei Zakian, 1996; McEachern, 2000). Der Aufbau dieser telomerischen und subtelomerischen Struktur ist bei *S. cerevisiae* sehr gut charakterisiert und in Abbildung 10 schematisch gezeigt: Der eigentliche Telomerbereich besteht aus etwa 300 bp langen Tandem-Wiederholungen mit der Basenfolge $TG_{(1-3)_n}$ (Pryde und Louis, 1997; Shore 2001; Loidl, 2003). Der anschließende subtelomerische Bereich enthält null bis vier hoch konservierte Y'-Elemente, von denen es 2 Klassen gibt: 5,4 kb kurz (Y'-S) bzw. 6,7 kb lang (Y'-L). Y'-Elemente enthalten eine ARS (*autonomously replicating sequence*)-Sequenz und einen oder zwei überlappende ORFs (*open reading frame*) (Pryde und Louis, 1997). Nach dem X-Y'-Übergang, auf dem einige kurze Sequenzwiederholungen vorkommen, folgt das X-Element in einer Länge von 0,4 bis 3,7 kb. Es ist, abgesehen von dem 473 kb langen Kernstück, geringer konserviert (Pryde und Louis, 1999). Abgeschlossen wird die subtelomerische Region mit einem 2 bis 30 kb langen Homologieblock.

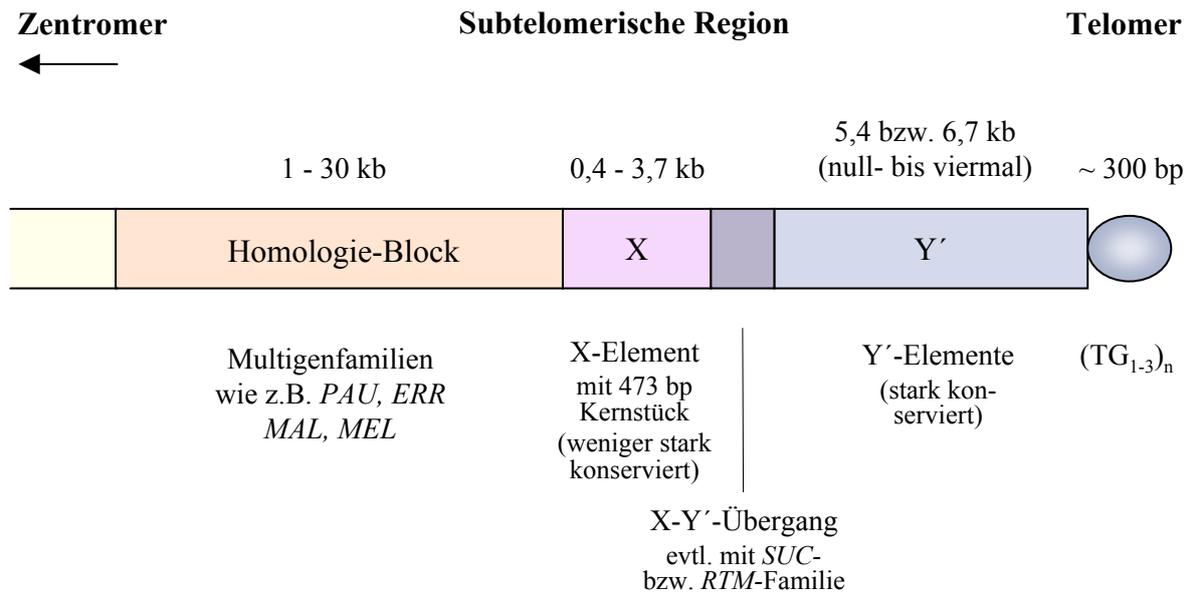


Abb. 10: Schematischer Aufbau eines Telomers mit angrenzendem subtelomerischen Bereich von *S. cerevisiae* (modifiziert nach Pryde und Louis, 1997)

Das Chromosomenende von Hefe besteht aus mehreren mosaikartig angeordneten repetitiven Sequenzen, die hoch konserviert sind. Die in den meisten Fällen zu findende Struktur sieht folgendermaßen aus: Das Telomer enthält $TG_{(1-3)}_n$ -Sequenzwiederholungen (Länge etwa 300 bp), gefolgt von null bis vier Kopien der hoch konservierten Y'-Elemente (Länge jeweils 5,4 kb bzw. 6,7 kb). Der X-Y'-Übergang enthält unter anderem mehrere kurze variable Sequenzwiederholungen wie z.B. STR-A bis -D (*subtelomeric replicating element*) oder auch Mitglieder aus der *SUC*- oder *RTM*-Familie. Das anschließende X-Element (Länge 0,4 bis 3,7 kb) ist weniger konserviert, bis auf das 473 bp-lange Kernstück mit einer ARS (*autonomously replicating sequence*)-Sequenz. Weitere Bereiche im X-Element sind multipel aufgebaut. Richtung Zentromer folgt schließlich ein Homologieblock (Länge 2 bis 30 kb), der sowohl transposable Elemente (*transposon yeast 5*, Ty5) als auch verschiedene Multigenfamilien, wie z.B. *PAU*, *ERR*, *MAL* und *MEL* enthält.

Der Homologieblock enthält transposable Elemente (Ty5) und vor allem unterschiedliche Multigenfamilien (Pryde *et al.*, 1997; Pryde und Louis, 1997). In dieser Region ähneln sich jeweils mehrere der 32 Chromosomenenden stark, außerdem wird vermutet, dass es durch Rekombinations-Ereignisse immer wieder zu Sequenz-Homogenisierung zwischen einzelnen Chromosomenenden kommt. Dies macht es schwierig, einmalige Sequenzabschnitte für Sonden im Telomer-nahen Bereich zu finden. Neben einer BLAST-Analyse kann dies im SGD auch unter *Pairwise Chromosome Similarity View* (http://www.yeastgenome.org/SSV/viewer_start.shtml) geprüft werden, das die Untersuchung der Ähnlichkeit zwischen zwei Hefechromosomen erlaubt. Die Schwierigkeiten bei der Sondenwahl sind in Abbildung 11 verdeutlicht, hier an einem Beispiel des linken Telomers auf Chromosom VIII. Zu sehen ist das Ergebnis einer BLAST-Analyse dieser telomerischen und subtelomerischen Region.

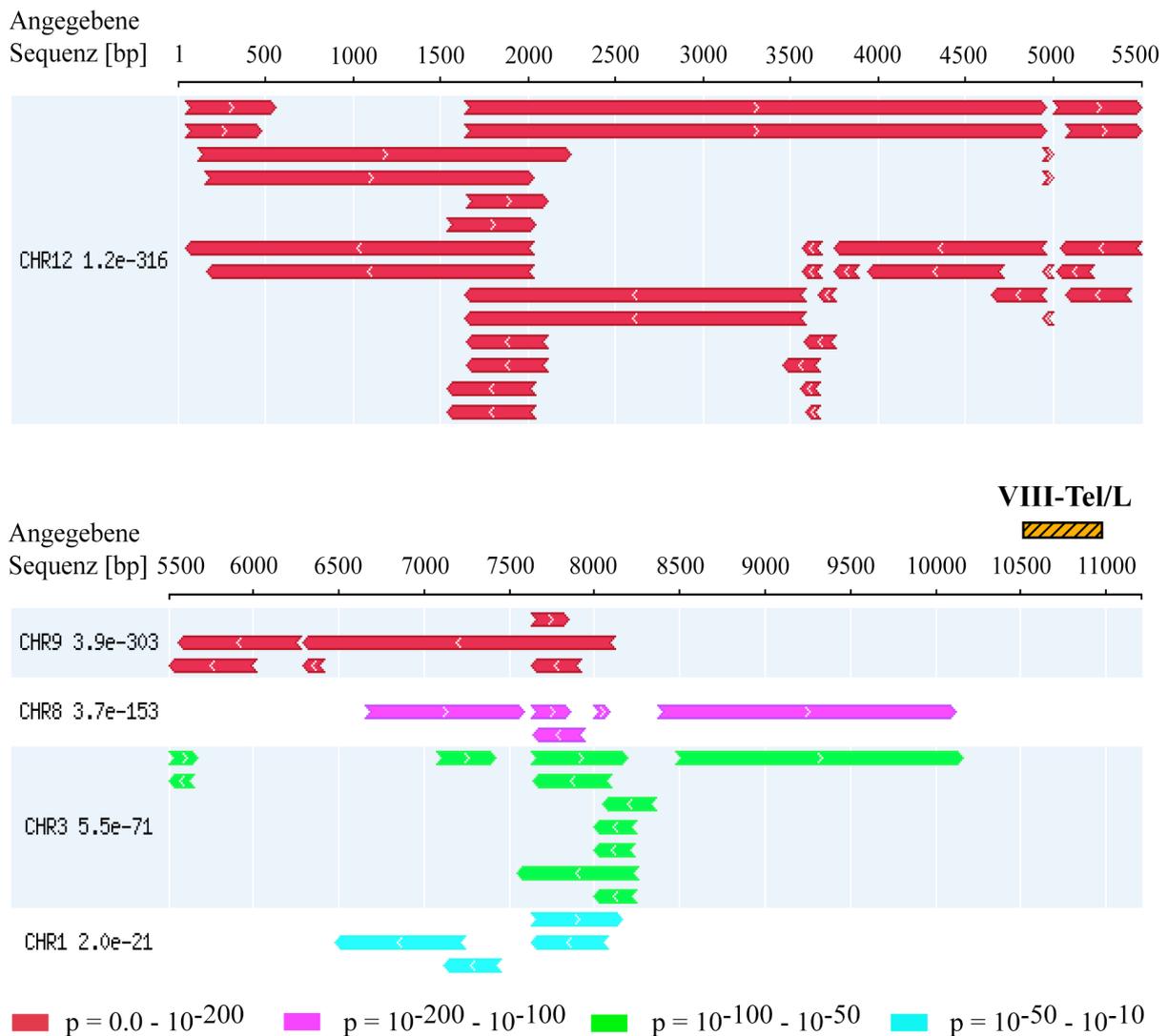


Abb. 11: BLAST-Ergebnis der linken telomerischen und subtelomerischen Region von Chromosom VIII (von 1 bp bis 11200 bp)

(modif. nach <http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/nph-blast2sgd/>)

Zur Bestimmung von Sonden am Telomer, in diesem Fall von Chr. VIII, wurde von diesem DNA-Bereich eine BLAST-Analyse durchgeführt. Als Resultat, ausgewertet nach den Standardparametern im SGD, wurde der eingegebenen (dem Telomer entsprechenden) Sequenz ein Vielzahl von Sequenzen zugewiesen, die Übereinstimmungen zeigen; diese werden auch als *HSP* (*high-scoring segment pair*) bezeichnet. Geordnet sind die Sequenzen nach dem p (*probability*)-Wert: Er zeigt die Wahrscheinlichkeit an, dass bei einem paarweisen Sequenzvergleich zwischen angegebener und zugewiesener Sequenz zufällig eine Übereinstimmung gefunden wird. Sequenzen mit großer Ähnlichkeit sind graphisch in dem BLAST-Ergebnis als Balken dargestellt, das gesamte BLAST-Ergebnis zeigt jedoch immerhin 317 *HSP*'s an (zur Aufschlüsselung wurden zwei Analysen durchgeführt: 1 bp – 5500 bp mit 228 *HSP*'s und 5500 bp – 11200 bp mit 89 *HSP*'s). Ein Teil der *HSP*'s sind konservierte Sequenzen ($p = 0$), was darauf schließen lässt, dass weder an diesem noch an anderen Telomeren einzigartige Bereiche gefunden werden können. Bei Telomer VIII wurde als Sonde *VIII-Tel/L* bei 10503 bp – 10998 bp ausgewählt.

Bezüglich der Chromosomenlänge gibt es zwischen Datenbank und eigenen Stämmen allerdings Unterschiede. Das liegt zum einen an den Datenbankwerten, die durch die schwere Sequenzierbarkeit von repetitiven Sequenzen nicht vollkommen verlässlich sind. Zum anderen liegt es an stammspezifisch abweichender Anzahl und Verteilung der repetitiven Elemente im Telomer-nahen Bereich. Längenunterschiede können aber auch durch Veränderungen in den übrigen chromosomalen Regionen vorkommen, z.B. durch verschiedene transposable Elemente. Letztendlich sind die Unterschiede allerdings nur gering, so dass in dieser Arbeit als Längengrößen (wichtig für statistische Auswertung, III.6.) die Datenbankwerte übernommen wurden. Als möglichst distale Telomersonden wurden schließlich vier Regionen festgelegt, die zwischen 7 kb und 12 kb vom Ende der Chromosomen entfernt liegen.

Im Folgenden sind die Sonden der Chromosomen V und VIII zusammengefasst. Sie sind entsprechend ihrer Lage mit Positionsangabe (in kb) nach der SGD-Datenbank wiedergegeben.

Chromosom V:

V-Tel/L(10), YEL072W(14), CIN8(39), POL5(51), URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), GLN3(230), SAH1(236), MEI4(240), SAP1(245), usCAJ1(248), YER049W(253), HIS1(265), MOT2(293), PTP3(310), TRP2(338), RAD24(537), YER186C(562), V-Tel/R(568)

Chromosom VIII:

VIII-Tel/L(11), MUP3(27), MRP4(99), SOD2(123), RPN1(164), YHR046C(197), MED6(219), IRE1(260), HXT5(298), DCD1(388), SKN7(513), VIII-Tel/R(551)

3. KARTIERUNG DER BRUCHPUNKTE AUF CHROMOSOM V UND VIII

Um zunächst zu klären, ob auf Chromosom V oder VIII *hot spots* zu finden sind, wurden die oben genannten Sonden zur Kartierung der Translokations-Bruchpunkte eingesetzt. Dazu werden beispielhaft Versuchsergebnisse der beiden oben beschriebenen Methoden (siehe III.2.) gezeigt. Zu Beginn der Kartierung wurden die Chromosomen jeweils in einem Pulsfeldgel aufgetrennt, zu sehen in Abbildung 12. Anschließend wurde bei der ersten Methode das PFGE-Karyogramm hybridisiert, siehe ebenfalls Abbildung 12. Dafür wurde in diesem Fall die radioaktiv markierte Sonde *HIS1* verwendet, die bei 265 kb auf Chromosom V liegt.

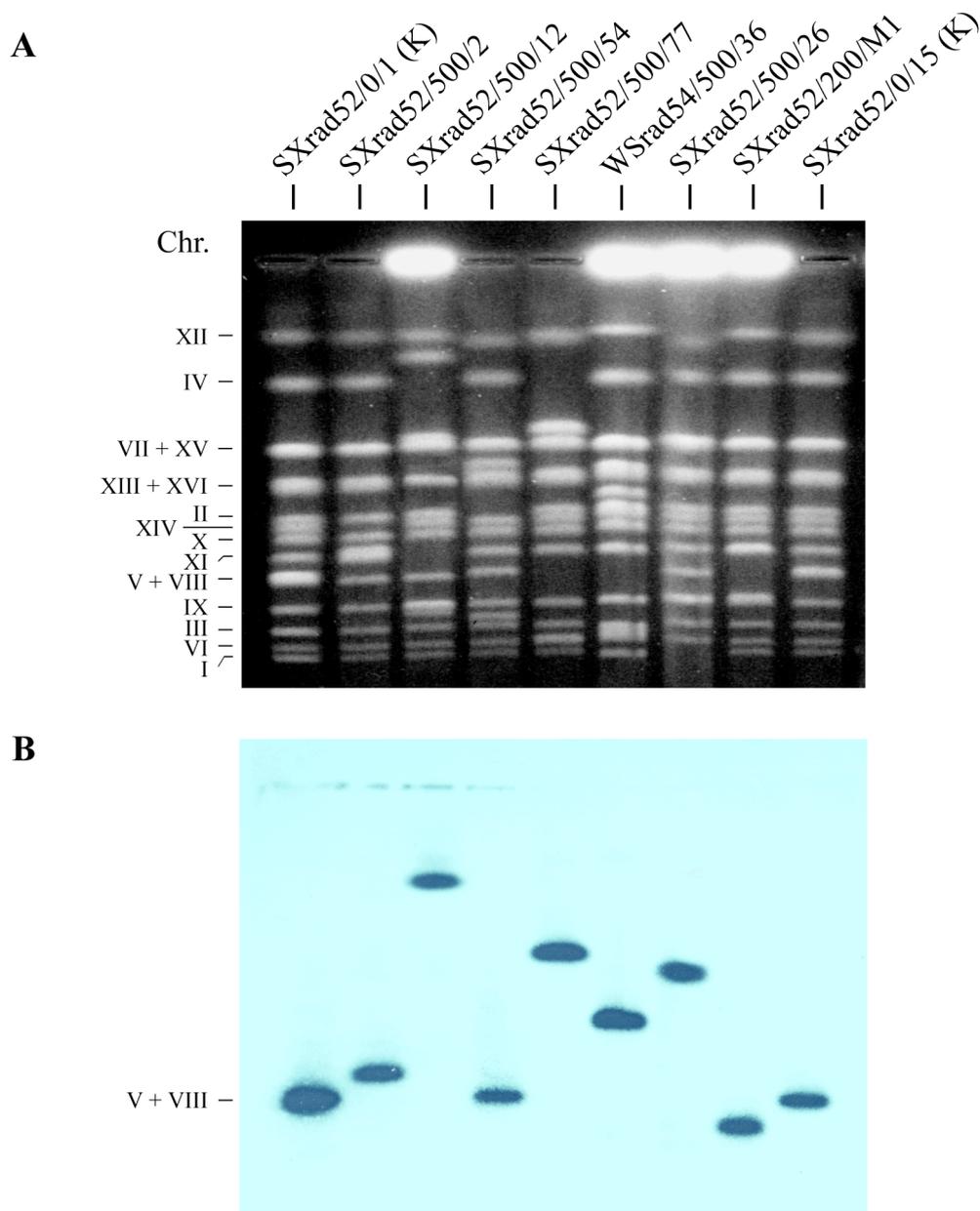


Abb. 12: Karyotypisierte Hefeklone auf einem Pulsfeldgel mit radioaktiv-markierter Hybridisierung des PFGE-Blotes

Unter **A** ist ein Hefekaryogramm zu sehen (links bezeichnet: Chromosomennummern I bis XVI), das durch elektrophoretische Auftrennung der Chromosomen in einem Pulsfeldgel entstand. Aufgetragen ist auf der linken und rechten Spur genomische DNA aus unbestrahlten Zellen (K für Kontrollspuren der Klone SXrad52/0 Nr. 1 und Nr. 15), die eine Doppelbande der zu untersuchenden Chromosomen V und VIII zeigen. Auf den restlichen Spuren ist DNA von bestrahlten Zellen aufgetragen, nach einer Dosis von 500 Gy (Klone SXrad52/500 Nr. 2, 12, 54, 77, 26 sowie WSrad54/500/36) und nach 200 Gy (Klon SXrad52/200/M1). Diese Klone tragen Translokationen mit Chromosom V bzw. VIII. Unter **B** ist eine radioaktiv-markierte Hybridisierung gezeigt. Verwendet wurde eine aus Gel A geblottete Membran zusammen mit der Sonde *HIS1* (bei 265 kb auf Chromosom V). Im Ergebnis kann anhand der Signale diese Sonde lokalisiert werden: Während sie bei den Kontrollklonen (Spuren siehe A) an Chromosom V bindet, ist sie bei Klonen mit Translokation an V auf unterschiedlichen aberranten Banden zu finden.

Die Sondenmarkierung erfolgte, wie erwähnt, in den meisten Fällen mittels Digoxigenin. Ein Beispiel für eine Dig-markierte Hybridisierung ist in Abbildung 13 zu sehen, mit der Sonde *SOD2*, die bei 123 kb auf dem Chromosom VIII liegt. Bei einem Vergleich zur radioaktiven Markierung (Abbildung 12) ist zu erkennen, dass die Ergebnisse qualitativ vergleichbar sind.

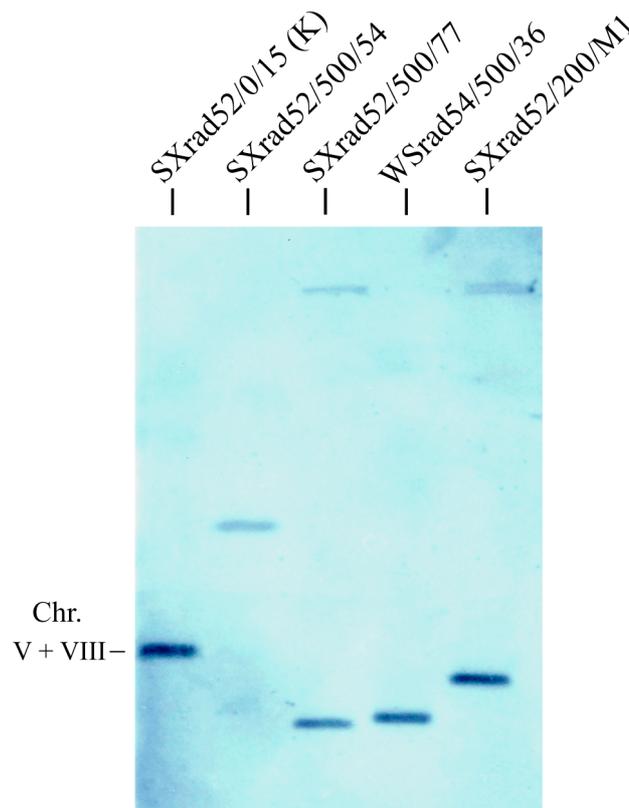


Abb. 13: Digoxigenin-markierte Hybridisierung eines PFGE-Blotes

Bei der hier gezeigten Hybridisierung eines Pulsfeldgel-Blotes wurde die Digoxigenin-markierte Sonde *SOD2* eingesetzt (bei 123 kb auf Chromosom VIII). Das Signal auf Spur 1 (Kontrollwert Klon SXrad52/0/15) lokalisiert die Sonde auf Chromosom VIII. Die Spuren der restlichen Klone, die nach einer Bestrahlung mit 500 Gy (Klone SXrad52/500 Nr. 54 und Nr. 77 sowie WSrad54/500/36) bzw. 200 Gy (Klon SXrad52/200/M1) aufgetragen wurden und im Karyogramm Translokationen mit Chromosom VIII zeigen, lassen Signale an unterschiedlichen aberranten Banden erkennen.

Ein Beispiel der zweiten verwendeten Kartierungsmethode, d.h. der mittels Isolierung aberranter Banden und mit anschließendem PCR-Nachweis, ist in Abbildung 14 zu sehen. Hier ist einerseits die erwähnte Quantität zu erkennen mit einem Probendurchsatz in diesem Fall von 6 Sonden pro Klon; zum anderen ist mit den eindeutigen PCR-Amplifizierungsbanden die Qualität dieser *high-throughput*-Methode sichtbar.

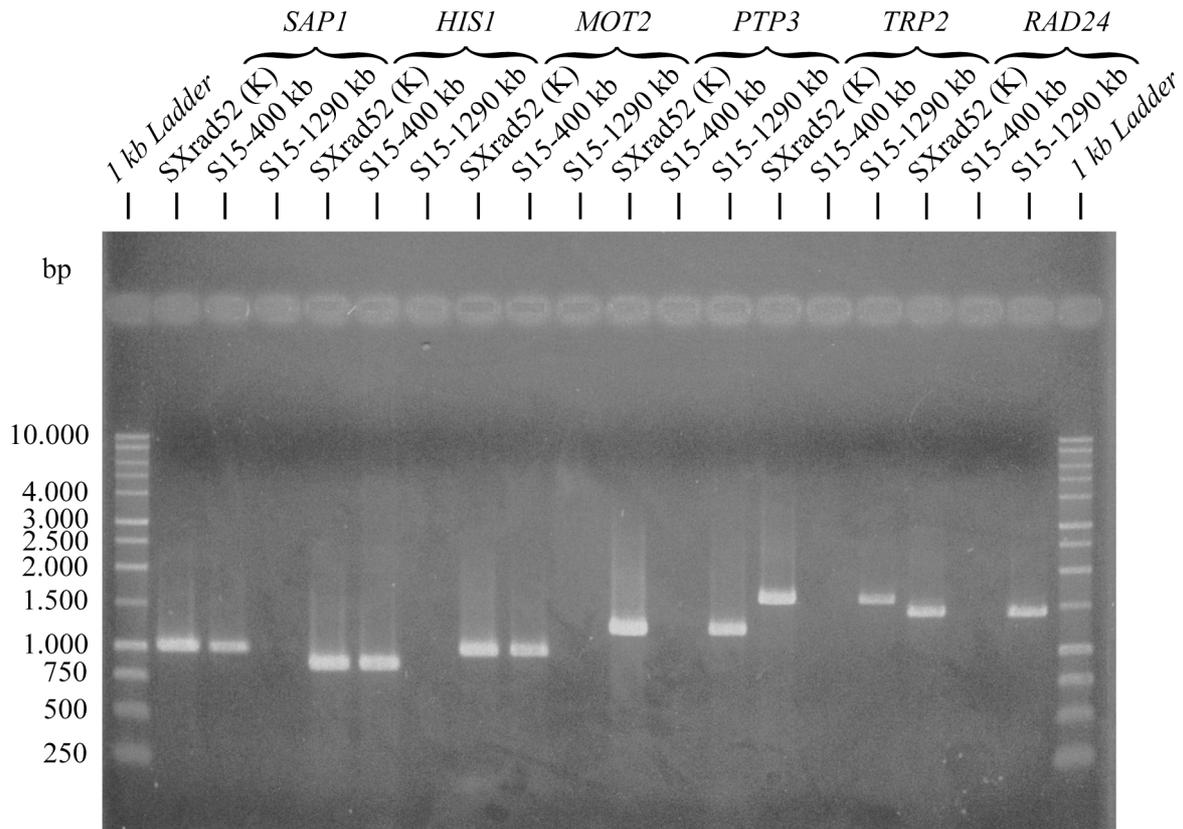


Abb. 14: Sondennachweis mittels PCR von isolierten aberranten Banden

Gezeigt sind sechs Sonden auf Chromosom V (*SAP1*, *HIS1*, *MOT2*, *PTP3*, *TRP2* und *RAD24*), die mittels PCR auf aberranten Banden des Klones WSrad54/500 Nr. S15 nachgewiesen wurden. Dafür sind auf dem Gel links und rechts ein DNA-Standard (*1 kb Ladder*) mit Längenbezeichnung aufgetragen sowie jeweils drei Proben pro Sonde: eine Reaktion mit chromosomaler DNA aus dem Kontrollstamm (SXrad52), gefolgt von den beiden Reaktionen mit den aberranten Chromosomen (Längen 400 kb und 1290 kb). Der PCR-Nachweis ist jeweils eindeutig mit einer Amplifikatlänge von 1015 bp für *SAP1*, 880 bp für *HIS1*, 1000 bp für *MOT2*, 1210 bp für *PTP3*, 1570 bp für *TRP2* und 1425 bp für *RAD24*. Anhand des Ergebnisses, das positiv für 400 kb von Sonde eins bis drei und für 1290 kb von Sonde vier bis sechs ist, kann bei diesem Klon der Translokations-Bruchpunkt für Chromosom V auf den Bereich zwischen Sonde drei (*MOT2*) und vier (*PTP3*) festgelegt werden.

Fasst man die Kartierungen aller Bruchpunkte zusammen, kann man feststellen, ob sich auf den Chromosomen V und VIII übereinstimmende Bruchpunkten bzw. *hot spots* für Translokationsausbildung befinden. Um das Ergebnis übersichtlich darzustellen, ist die Kartierung der Klone in Abbildung 15 gezeigt. Zu sehen ist ein Schema von Chromosom V und VIII. Farbig zu erkennen sind die ermittelten Bruchpunkte bzw. Bruchbereiche, der (in gleicher Farbe) dazugeschriebenen Klone. Diese Intervalle werden von den verwendeten Sonden eingeschlossen.

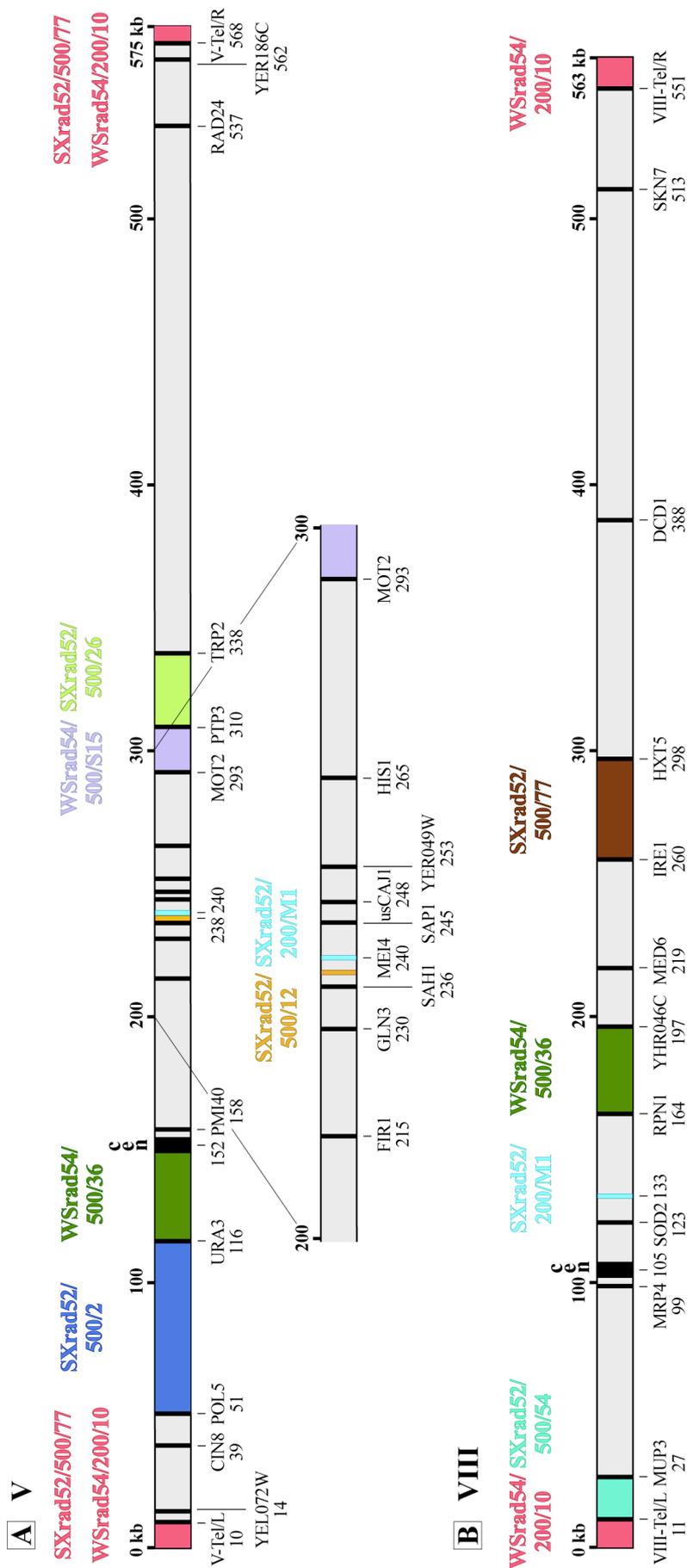


Abb. 15: Zusammenfassung der Kartierung von Translokations-Bruchpunkten verschiedener Klone auf Chromosom V und VIII

Schematisch dargestellt sind maßstabstreu die physikalischen Karten von A Chromosom V und B Chromosom VIII. Deren Länge (575 kb und 563 kb) sowie der Bereich der Zentromere (152 kb und 105 kb) entsprechen den Angaben der SGD-Datenbank. Die zur Kartierung der Translokations-Bruchpunkte verwendeten Sonden sind als vertikale Striche eingezeichnet mit der Angabe der jeweiligen Position (in kb; ebenfalls nach SGD). Die einzelnen Bezeichnungen der Klone sind farblich dargestellt und zwar jeweils über ihrem zugehörigen, durch die Sonden ermittelten Bruchbereich. Zudem sind die durch Feinkartierung (siehe III.5.) ermittelten Bruchpunkte eingezeichnet: Klon SXrad52/500/12 (Chr. V: 238 kb) und SXrad52/200/M1 (Chr. V: 240 kb; Chr. VIII: 133 kb). Zur optischen Vereinfachung sind Bruchbereiche der Klone, bei denen Translokationen zwischen V und VIII als Partnerchromosomen stattgefunden haben, auf beiden Chromosomen in gleicher Farbe dargestellt (Ausnahme Klon SXrad52/500/77: bei A Chr. V in roter Farbe und bei B Chr. VIII in brauner Farbe). Zur besseren Sondendifferenzierung bei Chromosom V ist eine Vergrößerung zwischen 200 kb und 300 kb zu sehen; weitere Auswertung siehe Text.

Chromosom V wurde mit 20 Kartierungs-Loci untersucht, Chromosom VIII mit 12 Kartierungs-Loci. Damit konnten fast alle Bruchpunkte der Klone jeweils auf einen Bereich festgelegt werden (siehe Abbildung 15): Auf Chromosom V die Bereiche 51 kb – 116 kb für SXrad52/500/2 (dunkelblau), 116 kb – 152 kb für WSrad54/500/36 (dunkelgrün), 293 kb – 310 kb für WSrad54/500/S15 (violett) und 310 kb – 338 kb für SXrad52/500/26 (hellgrün); auf Chromosom VIII die Bereiche 11 kb – 27 kb für SXrad52/500/54 (türkis), 164 kb – 197 kb für WSrad54/500/36 (dunkelgrün) und 260 kb – 298 kb für SXrad52/500/77 (braun).

Die drei Bruchpunkte bei den Klonen SXrad52/500/77 und WSrad54/200/10 auf Chromosom V sowie WSrad54/200/10 auf Chromosom VIII (jeweils rot bezeichnet) konnten nicht eindeutig lokalisiert werden. Bei diesen Kartierungen wurde beobachtet, dass sich immer nur eines der beiden aberranten Chromosomen als positiv ergab. Der Translokations-Bruchpunkt muss deshalb distal der hier verwendeten Sonden (*V-Tel/L* oder *R* bzw. *VIII-Tel/L* oder *R*) zu finden sein, d.h. jeweils in einer der beiden telomerischen bzw. subtelomerischen Regionen (auf Chromosom V für SXrad52/500/77 und WSrad54/200/10 bei 0 kb – 10 kb bzw. 568 kb – 575 kb sowie auf Chromosom VIII für WSrad54/200/10 bei 0 kb – 11 kb bzw. 551 kb – 563 kb). Da weiter distal gelegene Sonden, wie unter III.2. beschrieben, nicht ausgewählt werden konnten, war eine genauere Festlegung der Bruchpunkte nicht möglich. Eine Bruchpunkt-Bestimmung mit höchster Auflösung fand bei den Klonen SXrad52/500/12 und SXrad52/200/M1 statt. Diese Kartierung, für die auf Chromosom V mehrere Sonden notwendig waren (siehe Abbildung 15, A: Vergrößerung 200 kb – 300 kb), ergab, dass dort beide Brüche innerhalb eines kleinen Bereiches liegen. Um den genauen Bruchort bzw., wie in diesem Fall, seine Differenzierung von etwa 2 kb festzustellen, war eine Feinkartierung notwendig, die in III.5. näher beschrieben wird.

Die Ergebnisse der Bruchpunkt-Kartierung zeigen, dass weder auf Chromosom V noch auf Chromosom VIII *hot spots* zu finden sind, obwohl zwei der Bruchpunkte (auf Chromosom V SXrad52/500/12 bei 238 kb und SXrad52/200/M1 bei 240 kb) nahe beieinander liegen. Es ist deshalb nicht darauf zu schließen, dass bestimmte Regionen auf diesen Chromosomen besonders anfällig auf Aberrationsentstehung sind. Allerdings sind die Daten mit einer Anhäufung von Bruchpunkten in Zentromer- und Telomernähe gut vereinbar.

4. KARTIERUNG DER BRUCHPUNKTE AUF DEN PARTNERCHROMOSOMEN VON CHROMOSOM V UND VIII

Um die räumliche Verteilung der Translokations-Bruchpunkte weiter zu untersuchen, wurde die Kartierung der bislang nicht betrachteten Partner von Chromosom V bzw. VIII fortgeführt. Die bisher verwendete Strategie der Grob- und Feinkartierung konnte dabei simplifiziert werden: Nachdem der Bruchpunkt eines Partner bekannt war, erfolgte die Sondenauswahl für den anderen Bruchpunkt mit Hilfe einer Längenschätzung. Dabei waren folgende Faktoren ausschlaggebend: Die Längen, die nach dem Bruch des bekannten Translokationspartners V bzw. VIII entstehen, die Längen der aberranten Partner sowie schließlich die Tatsache, dass im Rahmen einer nicht-letalen Aberration für jedes Chromosom ein Zentromer notwendig ist. Damit war es bei zwei Klonen möglich, den Bruchbereich mit lediglich zwei Sonden – ausgewählt nach der unter III.2. beschriebenen Methode – zu bestimmen: bei den Klonen SXrad52/500/2 (Bruchpunkt-Kartierung auf Chromosom XIV) und SXrad52/500/54 (Bruchpunkt-Kartierung auf Chromosom II). Bei weiteren 2 Klonen war die Bruchpunkt-Bestimmung etwas schwieriger, da mehr als 2 Chromosomen an den Translokationen beteiligt sind. Bei Klon SXrad52/500/12 finden Translokationen zwischen Chromosom IV, V, XI und XIII statt, bei Klon SXrad52/500/77 zwischen IV, V und VIII. Hier musste mittels endständiger Sonden zunächst geklärt werden, welche Chromosomen miteinander rekombinieren, um dann anschließend eine Längenschätzung durchzuführen.

Im Folgenden sind die Sonden der Partnerchromosomen von V und VIII wiedergegeben. Die zusätzlich angegebene Position (in kb) entspricht der SGD-Datenbank:

Chromosom II:

YBR043C(323), SEC18(398)

Chromosom IV:

LRG1(25), SFA1(160), BPL1(203), STL1(1508)

Chromosom XIII:

PHO84(24), FET4(913)

Chromosom XIV:

DSL1(158), *GCR2(266)*, *FUN34(634)*, *MAS6(662)*

Experimentell erfolgte die Bruchpunkt-Bestimmung mit Hilfe der beiden unter III.2. beschriebenen Methodiken. Eine Übersicht über die Ergebnisse aller Kartierungen ist in Tabelle 2 zu finden, Chromosom V und VIII mit eingeschlossen. Neben den einzelnen Klonen sind die jeweiligen Chromosomen finden, die eine Aberration zeigen. Rechts sind die zur Kartierung verwendeten Sonden zu sehen, zugeordnet zu den jeweils detektierten aberranten Bande. Was die Farbe der Sonde betrifft, so stimmt sie mit dem Ursprungschromosom überein, von dem sie amplifiziert wurde. Die Bestimmung eines Translokations-Bruchpunktes erfolgte folgendermaßen: Er ist in dem Übergangsbereich zu finden, der sich zwischen den auf verschiedenen Banden lokalisierten Sonden befindet. Beispielsweise liegt der Bruchpunkt von Chromosom VIII bei Klon SXrad52/200/M1 im Bereich zwischen *SOD2* (bei 123 kb, lokalisiert auf Bande 440 kb) und *RPNI* (bei 164 kb, lokalisiert auf Bande 666 kb).

Tab. 2: Übersicht über die Kartierungsergebnisse

Zu den einzelnen Klonen sind die Chromosomen mit Aberrationen zugeordnet (erste und zweite Spalte), die in ihrer Länge (in kb) sowie in der Lage des Zentromers (in kb) der SGD entsprechen. Die Länge der neu gebildeten aberranten Banden (dritte Spalte), die im Karyogramm sichtbar gemacht werden können, wurden mittels Moleküllängen-Bestimmung abgeschätzt (siehe Methoden II.2.9.2.: lineare Interpolation). In der rechten Spalte sind die positiv nachgewiesenen Sonden zu finden, angegeben jeweils mit Lokalisierung (in kb, entsprechend SGD). Farblich stimmen die Sonden mit dem Ursprungschromosom überein, von dem sie amplifiziert wurden.

Klon	Aberrationen (mit Chr.-Länge [kb] und Zentromer [kb])	Aber- rante Banden [kb]	Sonden (mit Lokalisierung [kb])
SXrad52/200/M1	VIII (563; C105) V (575; C152)	440: 666:	<i>MEI4(240), SAPI(245), usCAJ1(248), YER049W(253), HIS1(265), TRP2(338), RAD24(537); MUP3(27), MRP4(99), SOD2(123)</i> <i>CIN8(39), URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), GLN3(230), SAH1(236), MEI4(240); RPN1(164), MED6(219), IRE1(260), DCD1(388), SKN7(513)</i>
WSrad54/500/36	VIII (563; C105) V (575; C152)	290: 870:	<i>CIN8(39), URA3(116); VIII-Tel/L(11), MUP3(27), MRP4(99), SOD2(123), RPN1(164)</i> <i>PMI40(158), FIR1(215), HIS1(265), TRP2(338), RAD24(537); YHR046C(197), MED6(219), IRE1(260), DCD1(388), SKN7(513), VIII-Tel/R(551)</i>
WSrad54/200/10	VIII (563; C105) V (575; C152)	560: 590:	<i>VIII-Tel/L(11), MUP3(27), SKN7(513), VIII-Tel/R(551)</i> <i>V-Tel/L(10), YEL072W(14), CIN8(39), RAD24(537), YER186C(562), V-Tel/R(568)</i>
SXrad52/500/77	VIII (563; C105) V (575; C152) IV (1522; C450)	270: 2x 1190:	<i>MUP3(27), MRP4(99), SOD2(123), IRE1(260)</i> <i>V-Tel/L(10), YEL072W(14), CIN8(39), URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), HIS1(265), TRP2(338), RAD24(537), YER186C(562), V-Tel/R(568); HXT5(298), DCD1(388), SKN7(513); LRG1(25), STL1(1508)</i>
SXrad52/500/54	VIII (563; C105) II (813; C238)	370: 1000:	<i>VIII-Tel/L(11); YBR043C(323)</i> <i>MUP3(27), MRP4(99), SOD2(123), IRE1(260), DCD1(388), SKN7(513), VIII-Tel/R(551); SEC18(398)</i>
SXrad52/500/2	V (575; C152) XIV (784; C629)	666: 700:	<i>CIN8(39), POL5(51); GCR2(266), FUN34(634), MAS6(662)</i> <i>URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), HIS1(265), TRP2(338), RAD24(537); DSL1(158)</i>
SXrad52/500/12	V (575; C152) XI (666; C440) XIII (924; C268) IV (1522; C450)	400: 440: 1140: 1750:	<i>CIN8(39), URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), GLN3(230), SAH1(236); LRG1(25), SFA1(160)</i> <i>PHO84(24)</i> <i>FET4(913)</i> <i>MEI4(240), SAPI(245), usCAJ1(248), YER049W(253), HIS1(265), TRP2(338), RAD24(537); BPL1(203), STL1(1508)</i>
WSrad54/500/S15	V (575; C152) VII (1091; C497)	400: 1290:	<i>V-Tel/L(10), CIN8(39), PMI40(158), FIR1(215), GLN3(230), SAH1(236), MEI4(240), SAPI(245), usCAJ1(248), YER049W(253), HIS1(265), MOT2(293)</i> <i>PTP3(310), TRP2(338), RAD24(537), V-Tel/R(568)</i>
SXrad52/500/26	I (230; C151) V (575; C152) XII (2200; C151)	440: 1091:	<i>TRP2(338), RAD24(537)</i> <i>CIN8(39), URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), HIS1(265), MOT2(293), PTP3(310)</i>

5. FEINKARTIERUNG

Zwei der untersuchten Klone, SXrad52/200/M1 und SXrad52/500/12, zeigten Bruchpunkte, die sich innerhalb eines kleinen Bereiches auf Chromosom V befinden. Zur Unterscheidung wurde, wie bereits unter III.3. erwähnt, ihre Lage bis auf wenige kb genau festgelegt. Dies eröffnete die Möglichkeit, die Kartierung weiter aufzulösen, so dass die Translokations-Ereignisse auf Sequenzebene charakterisiert werden konnten. Dafür wurden sowohl die Bruchpunkte auf Chromosom V als auch die auf den Partnerchromosomen feinkartiert.

Methodisch wurde dafür zunächst die genomische DNA mit selten schneidenden Restriktionsenzymen verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Southern-Blot wurde eine Hybridisierung durchgeführt mit Sonden aus dem Bruchbereich des Chromosoms V. Mithilfe der Länge der Sondenbereiche sowie einer Analyse von Restriktionsschnittstellen auf den Partnerchromosomen war es möglich den Bereich abzuschätzen, an dem die zweite Bruchstelle zu finden sein sollte. Bestätigt wurden die Bruchorte anschließend über spezifische PCR-Nachweise. Schließlich wurden die Bruchpunkt-Bereiche in einer Größenordnung von etwa 400 bp sequenziert.

Die Analyse der Bruchpunkt-Sequenzen sowie der Vergleich zu den sequenzierten Kontrollstamm-Daten SXrad52 (siehe Sequenzausschnitt, Abbildung 16) zeigte, dass im Klon M1 Chromosom V am Beginn des Genes *MEI4* und Chromosom VIII zwischen zwei Ty-Elementen *YHRCdelta5* und *YHRCdelta6* (in einem sich nicht wiederholenden Bereich) gebrochen ist. In Klon 12 ist Chromosom V zwischen *ERG28* und *MEI4* und Chromosom IV am Ende von *SFAI* gebrochen. Sequenzbesonderheiten waren in den genannten Bereichen nicht festzustellen. Weitere Untersuchungen der Translokations-Ereignisse ergaben, dass bei beiden Klonen die Fehlverknüpfungen offenbar jeweils durch 2 bp-Mikrohologien erleichtert wurden. Für die translozierten Klone heißt dies, dass im Zuge der Bestrahlung und der anschließenden Reparatur keine Basen verloren gegangen sind. Schließlich wurden die Sequenzen mit der SGD-Datenbank verglichen mit dem Ergebnis einer vollkommenen Daten-Übereinstimmung. Auch an weniger konservierten Bereichen, wie etwa den Ty-Elementen, weist dies auf eine gute Übereinstimmung der Sequenzen des verwendeten Kontrollstammes SXrad52 und des Datenbankstammes SC228c hin.

Bruchpunkte Klon M1, Chr. V-VIII und Chr. VIII-V:

K V **ATGTTTCCCTT** **TTGTTCCATA** **TCTTCCAGTT** **TGCCCTACT** **CATGTCCTTA** **CTCTTCTAAA** **.....**
Chr. V-VIII **ATGTTTCCCTT** **TTGTTCCATA** **TCTTCCAGTT** **TGCCCTCAGAA** **AAGGCTCTCA** **AAAAAACAAAC** **ACTACCCCTTT**
K VIII **.....** **ATATTCTCTG** **CGACCAATTG** **TCCGTCAGAA** **AAGGCTCTCA** **AAAAAACAAAC** **ACTACCCCTTT**

K VIII **ATATAAAATTT** **ATATTTCCCTG** **CGACCAATTG** **TCCGTCAGAA** **AAGGCTCTCA** **AAAAAACAAAC** **.....**
Chr. VIII-V **ATATAAAATTT** **ATATTTCCCTG** **CGACCAATTG** **TCCGTCAGAA** **AAGGCTCTCA** **CTCTTCTAAA** **AGATTATTTA**
K V **.....** **TTGTTCCATA** **TCTTCCAGTT** **TGCCCTACT** **CATGTCCTTA** **CTCTTCTAAA** **AGATTATTTA**

Bruchpunkte Klon 12, Chr. V-IV und Chr. IV-V (IV jeweils revers/komplementär):

K V **TTTGTTCCTT** **GTTTCGTTCCG** **TCCCCGAACG** **AAAAATCAT** **AAAAATAGAAG** **TTTCCCTATCG** **.....**
Chr. V-IV **TTTGTTCCTT** **GTTTCGTTCCG** **TCCCCGAACG** **AAAAAAGCA** **TCTCTCATAA** **TTTTTGGTATT** **ACCAGTACAG**
K IV **.....** **CCCCAACCTT** **TATGACAGGC** **TTCCAAAGCA** **TCTCTCATAA** **TTTTTGGTATT** **ACCAGTACAG**

K IV **AATAGATTGA** **CCCCAACCTT** **TATGACAGGC** **TTCCAAAGCA** **TCTCTCATAA** **TTTTTGGTATT** **.....**
Chr. IV-V **AATAGATTGA** **CCCCAACCTT** **TATGACAGGC** **TTCCAAATCAT** **AAAAATAGAAG** **TTTCCCTATCG** **GTAATACCGT**
K V **.....** **GTTTCGTTCCG** **TCCCCGAACG** **AAAAATCAT** **AAAAATAGAAG** **TTTTCCCTATCG** **GTAATACCGT**

Abb. 16: Sequenzanalyse der Bruchpunkte in den Klonen SXrad52/200/M1 und SXrad52/500/12

Zu sehen sind der Datenbank entsprechende Sequenzausschnitte an den Bruchpunkten der Klone SXrad52/200 Nr. M1 und SXrad52/500 Nr. 12. Ober- und unterhalb der translozierten Chromosomensequenzen ist als Vergleich jeweils ein sequenzierter Kontrollstamm dargestellt („K“ für Kontrollstamm SXrad52): Rote und blaue Bereiche geben Sequenzübereinstimmung wieder, wobei auf dem translozierten Chromosom die Bruchpunkt-Sequenz am Farbübergang als grün bezeichnet ist. Sie zeigt folgende Basenpaar-Verschmelzung an: jeweils „TC“ bei dem Klon M1 und jeweils „AA“ bei dem Klon 12. Die chromosomalen Positionen der Bruchpunkte sind bei Klon M1/Chr. V 293 765 bp, Klon M1/Chr. VIII 133 465 bp, Klon 12/Chr. V 238 236 bp und Klon 12/Chr. IV 160 363 bp.

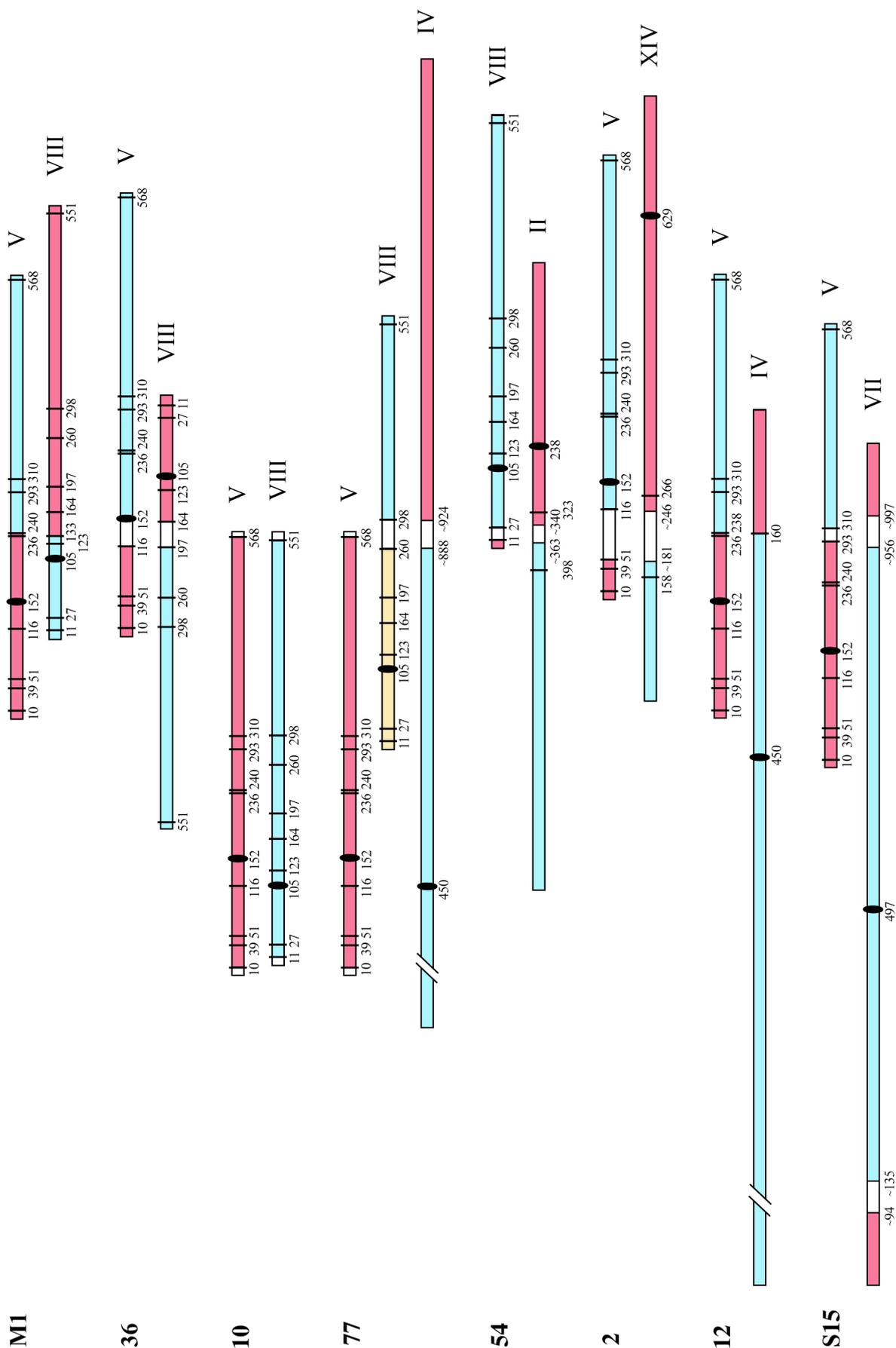
6. ANALYSE DER BRUCHPUNKT-VERTEILUNG

Zur Analyse der räumlichen Verteilung der Translokations-Bruchpunkte wurden die Kartierungsergebnisse der Translokationspartner verglichen, um zu zeigen, ob ein Einfluss einer Zellkernarchitektur auf die Lage der Translokationsbildung möglich ist. Dazu wird zunächst eine bildliche Zusammenfassung der Bruchpunkt-Lokalisationen einzelner Translokationspartner in Abbildung 17 gezeigt (für diese Untersuchung ist der Klon SXrad52/500/26 ausgenommen, dessen Aberration, wie bereits unter III.1. beschrieben, nicht als reziproke Translokation klassifiziert werden konnte). Zu erkennen sind die Bruchpunkte an den Farbübergängen (rot, blau, gelb) bzw. an den weißen Bruchbereichen.

Der Vergleich der Translokationspartner in Abbildung 17 zeigt folgendes: Bei Klon M1 befinden sich die Bruchpunkte bei beiden Partnern in der Nähe des Zentromers mit einer Entfernung von 88 kb auf Chromosom V und 28 kb auf Chromosom VIII (zur Angabe der Zentromerentfernungen siehe auch Tabelle 3). Ebenfalls Zentromer-nah liegen die beiden Bruchpunkte bei Klon 36, mit einer Entfernung von 0 kb – 36 kb auf Chromosom V und 59 kb – 92 kb auf Chromosom VIII. Bei Klon 10 sind die Bruchpunkte beider Translokationspartner im Telomerbereich zu finden. Da sie außerhalb der distalen Sonden (Entfernung zu den Chromosomenenden zwischen 7 kb und 12 kb) in nicht-einzigartigen Bereichen liegen, ist es nicht möglich, sie auf ein Chromosomenende festzulegen (siehe auch III.2.). Klon 77 zeigt Translokationen zwischen drei Chromosomen mit Interaktionen zwischen V und VIII

Abb. 17: Räumliche Verteilung der Translokations-Bruchpunkte

Zu sehen sind die Translokationspartner der Hefeklone Nr. M1, 36, 10, 77, 54, 2, 12 und S15. Die Chromosomen sind maßstabsgetreu in physikalischer Größe gezeichnet (Ausnahme: Verkürzung der Länge von Chromosom IV bei den Klonen Nr. 77 und 12). Die vertikalen Striche geben eine Auswahl von Kartierungs sonden an (Positionsangaben in kb, entsprechend SGD), wobei zusätzlich die über Feinkartierung (siehe III.5.) ermittelten Bruchpunkte auf den Klonen M1 (240 kb und 133 kb) und 12 (238 kb und 160 kb) dargestellt sind. Die mit ungenauen Angaben bezeichneten Lokalisierungen („~“) wurden mittels Längenschätzung ermittelt. Farbübergänge (rot, blau, gelb) zeigen den Bruchpunkt an, wobei diejenigen Fragmente, die farblich übereinstimmen, zu aberranten Chromosomen zusammengefügt wurden; man beachte, dass in Klon 77 drei Chromosomen involviert waren. Die weißen Bereiche beschreiben Bruchpunkt-Intervalle, die nicht exakt kartiert sind. Sie sind in der Zeichnung übereinander dargestellt, um die unterschiedliche Entfernung zwischen Zentromer (wiedergegeben als schwarze ovale Punkte – in kb, entsprechend SGD) und Bruchpunkt zu verdeutlichen; weitere Auswertung siehe Text.



(in Abbildung 17: Kombination Telomerbereich – gelber Bereich), V und IV sowie VIII und IV. Bei Chromosom V liegt der Bruchpunkt wiederum distal der gewählten Telomersonden. Falls hier der Chromosomenbruch auf V am kurzen Arm stattfand, wäre der Abstand zwischen Zentromer und Bruchpunkt auf den Chromosomen V und VIII vergleichbar (142 kb – 193 kb). Die Lage des Bruchpunkts von Chromosom IV konnte nicht bestimmt werden, da zwei der aberranten Chromosomen ähnliche Längen aufweisen. Aufgrund des Längenerhaltes kann eine Zentromerentfernung von etwa 450 kb geschätzt werden, d.h. der Bruchpunkt befindet sich in der interstitiellen Region. Bei den Klonen Nr. 54, 2 und 12 sind jeweils Translokationen zwischen Zentromer-nahen und interstitiellen Regionen zu beobachten (wobei bei Klon 54 der Bruchpunkt auf Chromosom II tendenziell ebenfalls in Richtung Zentromer-nahem Bereich liegt). Bei Klon S15 wurden schließlich zwei Bruchpunkte in der interstitiellen Region bestimmt: Mittels Kartierung auf Chromosom V mit einer Zentromerentfernung von 141 kb – 158 kb und mittels Längenschätzung auf Chromosom VII mit einer Zentromerentfernung von etwa 380 kb (kurzer Arm) bzw. etwa 480 kb (langer Arm). Auf experimentelle Bestimmung dieses Bruchpunktes wurde aufgrund der Lokalisierung in der interstitiellen Region verzichtet.

Klon	Entfernung Bruchpunkt zum Zentromer Partner 1 [kb]	Entfernung Bruchpunkt zum Zentromer Partner 2 [kb]	Entfernung des einen Partners minus des anderen [kb]	Lokali- sierung Partner	
				1	2
SXrad52/200/M1	88 (V, langer Arm)	28 (VIII, langer Arm)	60	Zen	Zen
WSrad54/500/36	0 – 36 (V, kurzer Arm)	59 – 92 (VIII, langer Arm)	23 – 92	Zen	Zen
WSrad54/200/10	142 – 152 oder 416 – 423 (V, kurzer oder langer Arm)	94 – 105 oder 446 – 458 (VIII, kurzer oder langer Arm)	23 – 58 oder 294 – 329	Telo	Telo
SXrad52/500/77	142 – 152 oder 416 – 423 (V, kurzer oder langer Arm)	155 – 193 (VIII, langer Arm)	3 – 51 oder 223 – 268	Telo	Int

Klon	Entfernung Bruchpunkt zum Zentromer Partner 1 [kb]	Entfernung Bruchpunkt zum Zentromer Partner 2 [kb]	Entfernung des einen Partners minus des anderen [kb]	Lokali- sierung Partner	
				1	2
SXrad52/500/77	416 – 423 oder 142 – 152 (V, langer oder kurzer Arm)	438 – 474 (IV, langer Arm)	15 – 58 oder 286 – 332	Telo	Int
SXrad52/500/54	78 – 94 (VIII, kurzer Arm)	102 – 125 (II, langer Arm)	8 – 47	Zen	Int
SXrad52/500/2	36 – 101 (V, kurzer Arm)	383 – 448 (XIV, langer Arm)	282 – 204	Zen	Int
SXrad52/500/12	86 (V, langer Arm)	290 (IV, kurzer Arm)	204	Zen	Int
WSrad54/500/S15	141 – 158 (V, langer Arm)	362 – 403 oder 459 – 500 (VII, kurzer oder langer Arm)	204 – 262 oder 301 – 359	Int	Int

Tab. 3: Entfernung zwischen Bruchpunkt und Zentromer

Angegeben sind die einzelnen Klone mit jeweils der Entfernung zwischen Bruchpunkt und Zentromer des einen Translokationspartners (Nr. 1) und des anderen Translokationspartners (Nr. 2; in kb). Außerdem ist wiedergegeben, wie groß der Unterschied der Zentromerentfernung der beiden Bruchpunkte ist („Entfernung des einen Partners minus des anderen [kb]“). Rechts ist die Lokalisierung der einzelnen Translokationspartner auf dem Chromosom zu finden, dabei steht „Zen“ für Zentromerbereich, „Tel“ für Telomerbereich und „Int“ für die dazwischen liegende interstitielle Region. Für die Definition der entsprechenden Bereiche siehe Text.

Die Daten weisen auf eine bevorzugte Lokalisierung der Bruchpunkte im Zentromer- und Telomerbereich hin, wobei die Anhäufung der Translokations-Bruchpunkte im Telomerbereich möglicherweise sogar unterschätzt wird, da bei subtelomerischen Rekombinationen auch Längenveränderungen in einem kleinen, nicht detektierbaren Bereich vorstellbar sind. Dieses ungleiche Verteilungsmuster der Translokationsentstehung deutet auf einen möglichen Einfluss der Zellkernarchitektur hin, die in Hefe auch als Rabl-Konformation bekannt ist (siehe auch Einleitung I.3.1.): In diesem Modell sind die Chromosomen im Zentromer- und im Telomerbereich als *cluster* angeordnet in einem Zeitraum, der sich über die ganze

Interphase erstreckt (Übersicht bei Burgess, 2002; Loidl, 2003). Dabei ist durch die strukturelle Chromosomennähe anzunehmen, dass sowohl im Zentromer- als auch im Telomerbereich Interaktionen zwischen unterschiedlichen Chromosomen wahrscheinlicher sind als außerhalb dieser Bereiche. Es stellt sich die Frage, wie weit sich die Bereiche interchromosomaler Nähe erstrecken. Wie FISH (*fluorescence in situ hybridization*) Experimente (Guacci *et al.*, 1994, 1997; Jin *et al.*, 1998, 2000) und die sub-nukleäre Lokalisierung von Zentromerkomponenten, wie etwa dem Protein Ndc10 (Goh und Kilmartin, 1993), zeigen, hat die Zentromerroschette einen Radius von ca. 0,5 μm . Dies entspricht, je nach angenommenen Chromatinmodell, etwa 100-200 kb Chromatin (Dekker *et al.*, 2002; Gasser, 2002; Ostashevsky, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde als Zentromernähe ein Abstand von 100 kb definiert, dieser fester Wert ist v.a. für die statistische Auswertung von Bedeutung (siehe unten). Diese Festlegung auf einen Abstand von ≤ 100 kb ist eher stringent, wie der Vergleich mit zwei Arbeiten zur Chromosomenorganisation in Hefe zeigt: In der ersten Arbeit wurde die ortsspezifische Rekombination mit Hilfe des Cre/*loxP*-Systems untersucht, bei dem die relative Wahrscheinlichkeit einer Kollision von Locus-Paaren im Kern gemessen wurde (Burgess und Kleckner, 1999); zum anderen wurde die ektopische interchromosomale Assoziation in Bezug auf die relative Distanz zu den Zentromeren analysiert, mit Hilfe von *in vivo* Fluoreszenzmarkierung durch GFP (*green fluorescent protein*) (Aragón-Alcaide und Strunnikov, 2000). Bei beiden Experimenten wurden Effekte von Zentromernähe noch bei maximaler Entfernung von 142 kb (Burgess und Kleckner) bzw. 190 kb (Aragón-Alcaide und Strunnikov) festgestellt. Die Ergebnisse beider Untersuchungen zeigen, dass Zentromer-*cluster* die Interaktion zwischen denjenigen Regionen fördern, die in der Nähe der Zentromere liegen. Die als *cluster* angeordneten Telomere, die in der nukleären Peripherie zu finden sind, wurden ebenfalls mittels FISH sowie GFP-Markierung von Sir3p, Sir4p und Rap1p nachgewiesen (Laroche *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde der Telomernah definierte Bereich als bis zu 12 kb vom Chromosomenende entfernt definiert, was gegenüber Lebendzellbeobachtung ebenfalls als eher stringent anzusehen ist: Diese Bereiche zeigen reduzierte Mobilität, die noch im Abstand von 15 kb vom Chromosomenende gemessen wurde (Heun *et al.*, 2001a).

Die hier erzielten Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass *cluster* im Zentromerbereich (max. bis 100 kb vom Zentromer entfernt) und Telomerbereich (zwischen Chromosomenende

und 7 kb bis 12 kb) die Wahrscheinlichkeit für interchromosomale Interaktionen in diesen Bereichen erhöhen. Interaktionen können aber auch zwischen den Bereichen stattfinden: Bei Klon 54 rekombiniert ein Zentromerbereich, der gleichzeitig durch die Kürze des Arms Telomer-assoziiert ist, mit einem anderen Zentromer-nahen Bereich. Der Interaktionsmechanismus zwischen Telomer-assoziiertes DNA schließt also Interaktionen mit den übrigen Regionen nicht aus.

Zur weiteren Auswertung wurde die Signifikanz der beobachteten Häufungen untersucht. Dabei wurde zum einen die Lokalisation der Bruchpunkte auf Chromosom V und VIII ausgewertet, zum anderen die Lokalisation aller untersuchten Bruchpunkte, zusammengefasst in Tabelle 4 (bis auf Klon SXrad52/500/26, siehe III.1.).

	Anzahl im Zentromerbereich	Anzahl im Telomerbereich	Anzahl in der interstitiellen Region
Chromosom V	4	2	1
Chromosom VIII	3	1	1
Chromosom II			1
Chromosom IV			2
Chromosom VII			1
Chromosom XIV			1

Tab. 4: Zusammenfassung der Bruchpunkt-Lokalisationen

Für die Bruchpunkt-Lokalisation auf Chromosom V und VIII wurde zunächst die Häufung im Telomerbereich (zwischen Chromosomenende und 7 kb bis 12 kb) untersucht, ausgehend von folgender Frage: Wie ist die binomiale Wahrscheinlichkeit, dass drei oder mehr der insgesamt zwölf vorhandenen Bruchpunkte im Telomerbereich liegen? Bei der Berechnung musste der Beitrag der beiden nicht exakt gleich langen Chromosomen gewichtet werden unter der Verwendung der Anzahl der Bruchpunkte (V: 7, VIII: 5), der Telomerlängen (V: 17 kb;

VIII: 23 kb) sowie der Chromosomenlängen (V: 575 kb, VIII: 563 kb). Die daraus sich ergebende Wahrscheinlichkeit für einen Treffer im Telomerbereich ist $p = 0,0342$. Der q -Wert (oder $1 - p$ -Wert), der die Wahrscheinlichkeit für einen Treffer im Nicht-Telomerbereich wiedergibt, beträgt 0,9658. Die binomiale Wahrscheinlichkeit der Häufung von drei oder mehr Bruchpunkten im Telomerbereich von V und VIII (Formel siehe III.1.) ist $P = 0,007$, die Häufung ist also als signifikant anzusehen.

Der zweite Punkt bei der Betrachtung von Chromosom V und VIII war die Klärung der Lokalisationshäufigkeit im Zentromerbereich. Aufgrund der Häufung im Telomerbereich konnte diese nicht direkt untersucht werden. Es war aber möglich, die Häufigkeit in der interstitiellen Region zu berechnen [definiert als Chromosomenregion ohne Zentromerbereich (200 kb) und Telomerbereiche (zwischen 17 kb und 23 kb)], ausgehend von folgender Frage: Wie ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei oder weniger Bruchpunkte der zwölf Bruchpunkte in der interstitiellen Region liegen? Nach zusätzlicher Wichtung von Chromosom V und VIII unter Verwendung der Anzahl der Bruchpunkte (V: 7, VIII: 5), der Längen interstitieller Regionen (V: 357 kb; VIII: 346 kb) sowie der Chromosomenlängen von V und VIII ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit für einen Treffer auf der interstitiellen Region von 0,6183 (p -Wert). Auf den nicht-interstitiellen Regionen beträgt der Wert 0,3817 (q -Wert). Die binomiale Wahrscheinlichkeit für zwei oder weniger Bruchpunkte in der interstitiellen Region liegt bei $P = 0,0019$, d.h. die Bruchpunkte auf Chromosom V und VIII sind in dieser Region signifikant unterrepräsentiert.

Schließlich wurde die Lokalisation aller betroffenen Bruchpunkte ausgewertet. Untersucht wurde hier die Häufigkeit in der interstitiellen Region. Dazu war folgende Frage zu beantworten: Wie ist die Wahrscheinlichkeit, dass sieben oder weniger Bruchpunkte der insgesamt 17 vorhandenen Bruchpunkte in der interstitiellen Region liegen? Entsprechend der zusätzlichen Wichtung der betroffenen Chromosomen unter der Verwendung der Anzahl der Bruchpunkte (17), der Summe der betroffenen interstitiellen Längen (4017 kb) sowie der Summe der betroffenen Chromosomenlängen (5348 kb) ist die Wahrscheinlichkeit eines Treffers auf der interstitiellen Region 0,7032 (p -Wert); die eines Treffers auf der nicht-interstitiellen Region ist 0,2968 (q -Wert). Die Wahrscheinlichkeit für sieben oder weniger Bruchpunkte in der interstitiellen Region ergibt $P = 0,011$, d.h. die Bruchpunkte in dieser

Region sind auch auf dem gesamten untersuchten Chromosomensatz signifikant unterrepräsentiert.

7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Zusammenfassend ist festzustellen, dass von den 17 kartierten Bruchpunkten sieben Zentromer-nah, drei Telomer-nah und sieben in der interstitiellen Region liegen. Als Zentromer-nah wurde ein Bereich von bis zu 100 kb Entfernung bis zum Zentromer definiert (siehe III.6.), diese Regionen (sie machen etwa 35% der Gesamt-DNA dieser Chromosomen aus) zeigen eine reduzierte Mobilität (Heun *et al.*, 2001a). Telomernähe schließt einen Bereich zwischen Chromosomenende und den distal lokalisierten Sonden von 7 kb bis 12 kb (entsprechend der SGD-Datenbank) ein. In Lebendzellbeobachtung zeigen diese Bereiche (sie machen etwa 3% der Gesamt-DNA von V bzw. VIII aus) ebenfalls reduzierte Mobilität (Heun *et al.*, 2001a; Gasser, 2002); die Ursache ist vermutlich eine Verankerung an der Kernmembran. Die Anhäufung von Bruchpunkten im Telomerbereich ist bei Betrachtung von Chromosom V und VIII (insgesamt 12 Bruchpunkte) hoch signifikant ($p = 0,007$), die Bruchpunkte dieser Chromosomen in der interstitiellen Region sind signifikant unterrepräsentiert ($p = 0,0019$). Bezieht man bei der Berechnung die Partnerchromosomen mit ein (insgesamt 17 Bruchpunkte), so gilt die signifikante Unterrepräsentierung der Bruchpunkte in der interstitiellen Region immer noch ($p = 0,011$). Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass die Wahrscheinlichkeit für interchromosomale Interaktionen von Regionen am Zentromer und Telomer erhöht ist und somit eine Translokationsentstehung erleichtert ist.

IV. EINFLUSS DER LOKALISIERUNG ENDONUKLEASE-INDUZIERTER DSB AUF DIE FEHLVERKNÜPFUNGSHÄUFIGKEIT

Die in Kapitel III gezeigten Kartierungsexperimente gaben einen deutlichen Hinweis auf eine wichtige Rolle der Kernarchitektur für die Entstehung strahleninduzierter Austauschaberrationen. Da der Aufwand für die Generierung und Charakterisierung der Translokationen sehr groß ist, sind detailliertere Untersuchungen mit größerem Stichprobenumfang in diesem experimentellen System nicht möglich. Für weitergehende Untersuchungen sollte daher ein Modellsystem entwickelt werden, in welchem gleichzeitig zwei DSB enzymatisch gesetzt werden. Durch Variation der Lage dieser DSB sollte der Einfluss der Kernarchitektur auf Fehlreparatur systematisch untersucht werden.

1. KONSTRUKTION DER TESTSTÄMME

Eine gezielte DSB-Induktion wird durch die Nutzung von sequenzspezifischen Endonukleasen wie der HO-Endonuklease möglich. Diese erkennt eine spezifische 24 bp lange Sequenz im Genom, die *HOcs* (*cleavage site*), und setzt dort einen Schnitt. Natürlicherweise befindet sich eine *HOcs* im *MAT* (*mating type*)-Locus auf Chromosom III, wo durch den eingeführten Schnitt der Paarungstypwechsel (*mating type switch*)² eingeleitet wird (Übersicht bei Haber, 1998). Inaktiviert man diese natürliche *HO*-Schnittstelle, so kann die

² Hefe kann den Paarungstyp zwischen **a** und α wechseln, initiiert durch einen HO-Endonuklease-schnitt im *MAT*-Locus, der den Paarungstyp determiniert. Anschließend kann durch Rekombination der Bruchstelle die *MAT*-Sequenz von **a** nach α , bzw. umgekehrt, verändert werden, wobei dabei als Donor eine der beiden nicht-exprimierten, heterochromatischen *mating-type*-Kassetten (*HML α* oder *HMRa*) fungiert. Obwohl auch *HML α* oder *HMRa* eine HO-Erkennungsstelle enthalten, wird hier beim *mating type switch* nicht geschnitten, da diese Regionen durch eine besondere Nukleosomenverpackung nicht zugänglich sind (Weiss und Simpson, 1998)

Erkennungssequenz an beliebiger anderer Stelle des Genoms integriert werden und zur DSB-Induktion genutzt werden.

Voraussetzung ist, dass die HO-Endonuklease unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors vorliegt. Als Grundlage für die Stammherstellung stand der von Prof. M. Kupiec, Tel Aviv, generierte haploide Hefestamm MK205 zur Verfügung (Aylon *et al.*, 2003). Dieser trägt eine *HOcs* im *URA3*-Gen auf Chromosom V, das 36 kb vom Zentromer und 116 kb vom Telomer entfernt liegt. Die natürliche *HOcs* im *MAT*-Locus ist in diesem Stamm durch Punktmutationen so verändert, dass sie nicht mehr geschnitten werden kann (*MAT-inc*, *inconvertible*). Im *ADE3*-Locus trägt der Stamm das Gen für die HO-Endonuklease unter der Kontrolle eines durch Galaktose induzierbaren Promotors. Durch Wachstum auf galaktosehaltigem Medium wird die Endonuklease induziert, die anschließend an der *HOcs* einen DSB setzt. Dieser Bruch kann nur durch nichthomologe Endverknüpfung repariert werden, da im Genom kein weiteres *URA3*-Gen vorhanden ist, das als Donor für homologe Rekombination dienen könnte. Für den hier geplanten Einsatz mussten folgende Veränderungen im Stamm MK205 eingeführt werden:

- eine Korrektur der – unbeabsichtigterweise – mutierten *rad5*-Sequenz, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, da *RAD5* regulatorisch an der Reparatur von DSB beteiligt ist (Ahne *et al.*, 1997)
- eine komplette Deletion des *TRP1*-Locus, damit dieser als Selektionsmarker bei der Einführung der zweiten *HOcs*-Kassette zur Verfügung stehen konnte
- eine Deletion des gesamten *MAT*-Locus, um eine mögliche Nutzung der *MAT-inc*-Sequenz als Donor für Reparatur durch homologe Rekombination zu unterbinden.

Die Wiederherstellung der funktionellen Sequenz des punktmultierten *rad5*-Gens geschah mittels *two-step-gene-replacement* (Rothstein, 1989). Der erste Schritt dabei war die Integrierung eines Hefevektors mit trunkiertem *rad5*-Leserahmen in das punktmultierte *rad5*-Gen des Stammes, so dass nun zwei nicht-funktionelle Genkopien vorlagen. Zur Herstellung des Vektors wurde das YIp5-Plasmid (*yeast integrating plasmid*) verwendet, das als selektionierbaren Marker das *URA3*-Gen trägt. Zunächst wurde das YIp5-Plasmid an zwei einmaligen Restriktionsschnittstellen (*EcoRI*, *SalI*) geschnitten. Ligiert wurde es mit einem

über PCR hergestellten (*primer*: RAD5 I-for, RAD5 I-rev), entsprechend geschnittenen *rad5*-Fragment, das beidseits um etwa 500 bp trunkiert war (siehe Abbildung 18). Anschließend wurde der Vektor linearisiert (*HpaI*). Nach Transformation in MK205 integrierte YIp5-*rad5tr.* mit Hilfe homologer Rekombination in das punktmutierte *rad5*-Gen auf Hefechromosom XII. Methodisch bestätigt wurde dies mit Hilfe von Stempeltests, PCR (*primer*: RAD5 II-for, YIp5-rev) und UV-C-Bestrahlungstests.

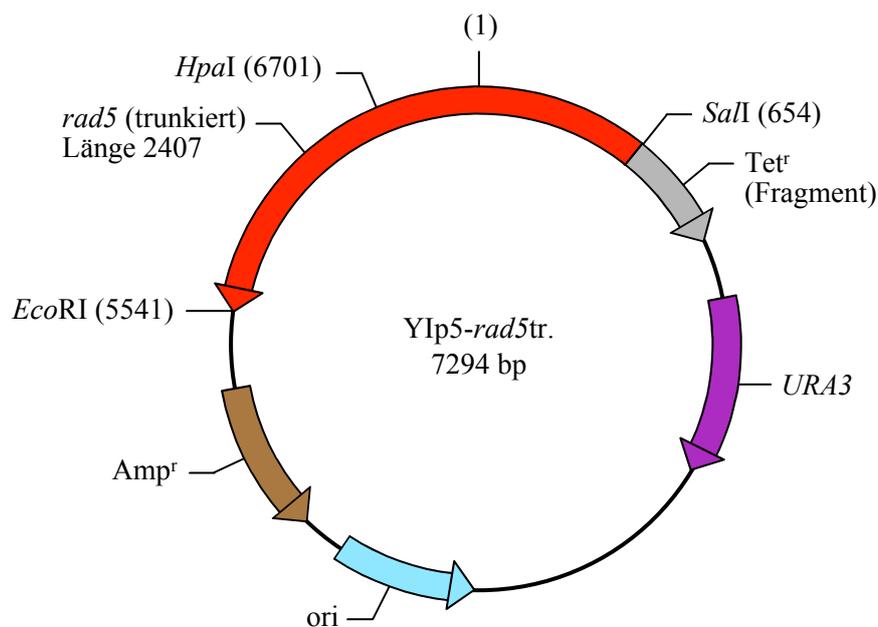
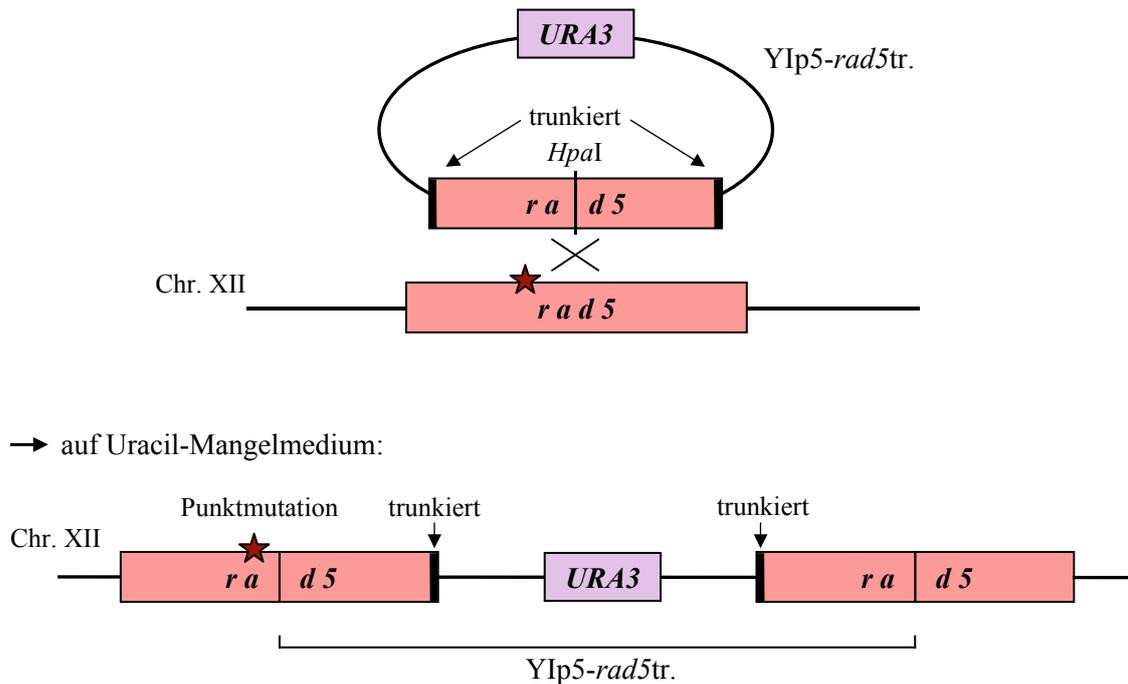


Abb. 18: Hefevektor YIp5-*rad5tr.*

Schematisch dargestellt ist der Hefevektor YIp5-*rad5tr.* (Positionsangaben in bp), für dessen Klonierung das YIp5-Plasmid (*yeast integrating plasmid*) verwendet wurde mit dem *URA3*-Locus als selektionierbaren Marker (Angaben entsprechen dem Katalog der Firma New England Biolabs, 1994, <http://www.neb.com>). YIp5 ist in Hefe nicht eigenständig replizierbar, sondern erst nach Integration in ein Hefechromosom mitotisch stabil; es ist jedoch in *E. coli* replizierbar. Für die Klonierung wurde YIp5 mit nicht zusammenpassenden, einmaligen Restriktionsschnittstellen an nicht essentiellen (bzw. nicht *URA3*-) Stellen geschnitten (*EcoRI*, *SalI*), die zudem zu einer Verkürzung des *rad5*-Leserahmens auf beiden Seiten führten. Hergestellt wurde der *rad5*-Leserahmen (rot) über PCR mit den *primern* RAD5 I-for und RAD5 I-rev und dem *RAD5*-Wildtypstamm SX46A (Siede *et al.*, 1996) als Matrize (die gesamte *RAD5*-Länge beträgt 3510 bp, entsprechend SGD, <http://www.yeastgenome.org/>). Nach Ligation wurde der YIp5-*rad5tr.*-Vektor mit einem in der Mitte des *rad5*-Leserahmens einmalig schneidenden Restriktionsenzym linearisiert (*HpaI*) und in MK205 transformiert.

Im zweiten Schritt sollte durch spontane *direct-repeat-recombination* zwischen den beiden *rad5*-Kopien ein funktionelles *RAD5*-Gen generiert werden (siehe Abbildung 19). Je nachdem, wo die homologe Rekombination stattfindet, gibt es zwei mögliche Ergebnisse: Bei Rekombination stromaufwärts der Punktmutation entsteht ein *RAD5*-Wildtyp-Gen oder an der Punktmutation bzw. stromabwärts entsteht wieder ein *rad5*-Gen mit Punktmutation. Der Unterschied konnte mit spezifischem Restriktionsverdau (McDonald *et al.*, 1997) verifiziert werden. Dafür wurde mittels PCR ein *rad5*-Abschnitt im Bereich der Punktmutation amplifiziert (*primer*: RD5-F, RD5-R), der bei Einsatz eines spezifischen Restriktionsenzym (*MnII*) nur bei Vorhandensein der Punktmutation geschnitten werden konnte. Zudem wurde zur Verifizierung eine UV-C-Bestrahlung angewendet, die eine höhere UV-Resistenz von *RAD5*-Klonen gegenüber punktmutierten *rad5*-Klonen zeigte (mittels Plattierungseffizienz-Bestimmung wurde beobachtet, dass bei 40 J/m² 10 bis 20% und bei 80 J/m² 5 bis 10% mehr *RAD5*-Klone als punktmutierte *rad5*-Klone überlebten).

1. Integrierung des Vektors YIp5-*rad5*tr. in das punktmutierte *rad5*-Gen von MK205



2. Generierung des *RAD5*-Gens mittels *direct-repeat-recombination*

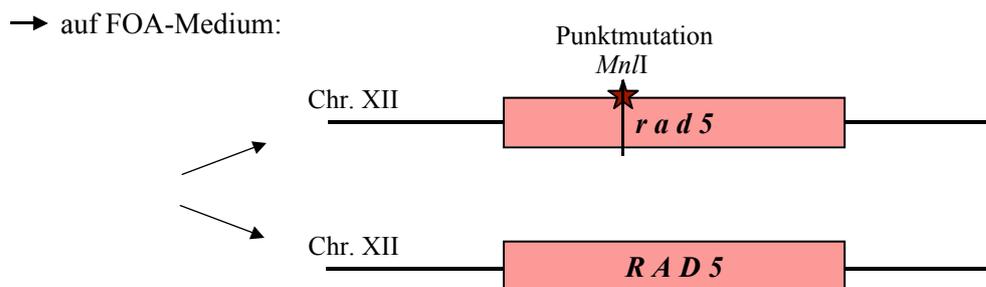


Abb. 19: Schema der Herstellung der funktionellen *RAD5*-Sequenz mittels *two-step-gene-replacement*

Der erste Schritt der Strategie beinhaltete die Integrierung des Hefevektors YIp5-*rad5*tr. in das *rad5*-Gen von MK205, das an der Position 1605 bp eine Punktmutation trägt (Angaben entsprechend SGD). Nach Linearisierung des Vektors (*HpaI*) und Hefetransformation erfolgte die Integrierung mittels homologer Rekombination, die durch den Schnitt im mittleren *rad5*-Bereich erleichtert wurde. Selektiert werden konnten die Klone aufgrund des Plasmidmarkers Uracil. Im zweiten Schritt des *two-step-gene-replacement* ist eine Generierung des funktionellen *RAD5*-Gens mittels *direct-repeat-recombination* zu sehen (Rekombination stromaufwärts der Punktmutation). Als weiteres Ergebnis war auch die Verkürzung auf das punktmutierte *rad5*-Gen möglich (Rekombination an der Punktmutation oder stromabwärts). Die Klone wurden auf FOA selektioniert, ein für Uracil-prototrophe Zellen letales Medium. Eine Verifizierung der *RAD5*-Wildtypklone erfolgte durch spezifischen Restriktionsverdau (*MnII*-Schnitt an der Punktmutation) sowie UV-Resistenz.

Um den *TRP1*-Locus als Selektionsmarker bei der Einführung der zweiten *HOcs*-Kassette verwenden zu können, musste er zunächst aus dem Stamm komplett deletiert werden. Dafür wurde nach Gewinnen Tryptophan-prototropher Revertanten des ursprünglichen *trp1-289* Allels das *TRP1*-Gen ebenfalls mittels *two-step-gene-replacement* entfernt. Schritt eins dabei war die Herstellung eines Hefevektors, der sowohl die 5'-Region (Stromaufwärts-Bereich) als auch die 3'-Region (Stromabwärts-Bereich) des *TRP1*-Locus trägt. Dies geschah in zwei Klonierungsschritten: Zuerst wurden im YIp5-Plasmid zwei einmalige Restriktionsenzym-schnitte (*EcoRI*, *BamHI*) gesetzt. Die Schnittstellen wurden mit einer über PCR hergestellten (*primer*: *trp1-3' fw*, *trp1-3' rev*) und dementsprechend verdauten 3'-Region des *TRP1*-Lokus ligiert. Anschließend wurde der Vektor stromaufwärts des eingesetzten Bereiches ein zweites Mal mit zwei einmaligen Restriktionsenzymen geschnitten (*AatII*, *EcoRI*). Die darauf folgende Ligation fand mit einer über PCR hergestellten (*primer*: *trp1-5' aat*, *trp1-3' rev*) und ebenfalls entsprechend geschnittenen 5'-Region des *TRP1*-Lokus statt, so dass der resultierende Vektor YIp5-*trp 5'-3'Δ* (siehe Abbildung 20) aufeinander folgend die 5'- und die 3'-Region des *TRP1*-Genes enthält. Dieser Vektor wurde durch einen Schnitt (*NheI*) im stromabwärts liegenden Bereich des *TRP1*-Locus linearisiert. Nach Transformation in den Stamm wurde er mittels homologer Rekombination in den Stromabwärts-Bereich des *TRP1*-Genes auf Hefechromosom IV integriert. Zur methodischen Bestätigung erfolgte PCR (*primer*: 1240 Amp-fw, 3'-outside-rev).

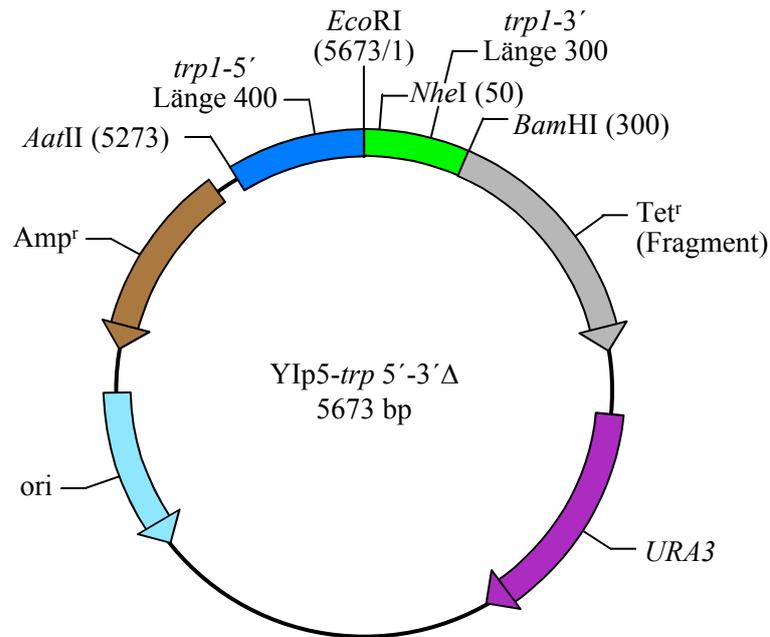
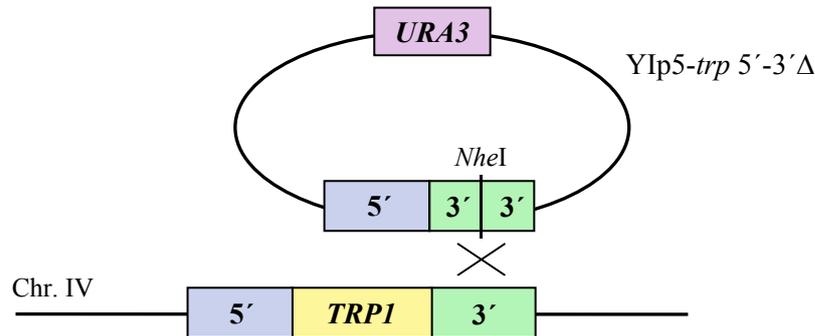


Abb. 20: Hefevektor YIp5-*trp* 5'-3'Δ

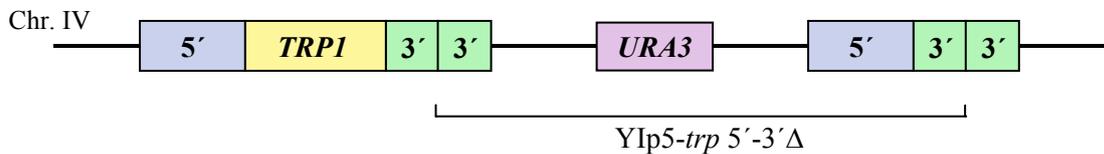
Schematisch dargestellt ist der Hefevektor YIp5-*trp* 5'-3'Δ (Positionsangaben in bp). Für die Klonierung wurde YIp5 (Angaben entsprechen dem Katalog der Firma New England Biolabs, 1994, <http://www.neb.com>) im ersten Schritt mit zwei Restriktionsenzymen verdaut (*Eco*RI, *Bam*HI). Der deletierte Bereich wurde durch die mittels PCR hergestellte (*primer*: *trp*1-3' fw, *trp*1-3' rev) und entsprechend geschnittene 3'-Region des *TRP*1-Lokus (grün) ersetzt. Stromaufwärts davon erfolgte im zweiten Klonierungsschritt nach einem erneuten Vektorverdau (*Aat*II, *Eco*RI) eine Ligation mit der mittels PCR hergestellten (*primer*: *trp*1-5' aat, *trp*1-3' rev) und entsprechend geschnittenen 5'-Region des *TRP*1-Lokus (dunkelblau). Die resultierende Gesamtlänge von *trp* 5'-3'Δ beträgt 700 bp (entsprechend SGD). Der YIp5-*trp* 5'-3'Δ-Vektor wurde mit einem Schnitt (*Nhe*I) im 3'-Bereich des *TRP*1-Gens linearisiert und in den Stamm transformiert.

Der zweite Schritt des *two-step-gene-replacement* beinhaltetete eine Generierung von Rekombinanten, deren *TRP*1-Gen aufgrund von *direct-repeat-recombination* zwischen den beiden 5'-Regionen komplett deletiert war (siehe Abbildung 21). Da als zweites mögliches Rekombinationsergebnis der gesamte *TRP*1-Bereich wiederhergestellt werden konnte, musste die Komplettdelation mit PCR (*primer*: 5'-outside-fw, 3'-outside-rev) sowie durch einen Wachstumstest auf Tryptophan-Mangelmedium verifiziert werden.

1. Integrierung des Vektors YIp5-*trp* 5'-3' Δ in den stromabwärts liegenden *TRP1*-Genbereich des Stammes



→ auf Uracil-Mangelmedium:



2. Deletion des *TRP1*-Genes mittels *direct-repeat-recombination*

→ auf FOA-Medium:

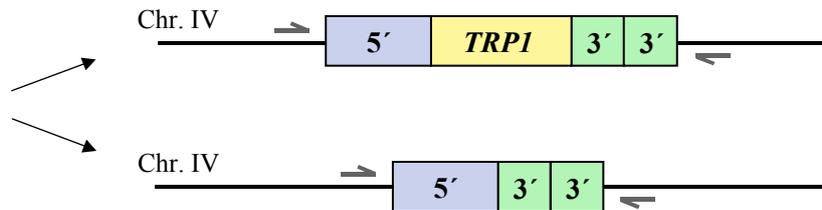


Abb. 21: Schema der Deletion der kompletten *TRP1*-Sequenz mittels *two-step-gene-replacement*

Im ersten Schritt der Klonierungsstrategie wurde der Hefevektor YIp5-*trp* 5'-3' Δ im stromabwärts gelegenen Bereich (grün) linearisiert (*NheI*) und nach Hefetransformation mit Hilfe homologer Rekombination in den Stromabwärts-Bereich des *TRP1*-Gens auf Chromosom IV (grün) integriert. Selektioniert werden konnten die generierten Klone aufgrund des Uracil-Markers auf dem Plasmid. Der zweite Schritt des *two-step-gene-replacement* zeigt die komplette Deletion des *TRP1*-Genes (Länge 674 bp, entsprechend SGD) mittels *direct-repeat-recombination* bei einer Rekombination zwischen den beiden 5'-Regionen (blau). Auch möglich war eine Rekombination zwischen den beiden 3'-Regionen (grün), die zu einer Wiederherstellung des gesamten *TRP1*-Bereiches führte. Der *URA3*-Genverlust wurde mit Hilfe von FOA-Medium selektioniert. Die Deletion des *TRP1*-Genes wurde mit PCR (*primer*: 5'-outside-fw, 3'-outside-rev) sowie Wachstumstest auf Tryptophan-Mangelmedium verifiziert.

Für die Nutzung der HO-Endonuklease zur Generierung ortsspezifischer DSB muss der *MAT*-Locus inaktiviert sein (*MAT-inc*). Vorversuche zeigten jedoch, dass die Plattierungseffizienz auf Galaktosemedium bei Stämmen mit der *MAT-inc*-Sequenz gegenüber Stämmen, bei welchen der gesamte *MAT*-Locus deletiert war, erhöht war. Dies könnte auf eine Nutzung der *MAT-inc*-Sequenz als Donor für die Reparatur durch homologe Rekombination hinweisen. Für den zu entwickelten Teststamm war es daher notwendig, den gesamten *MAT*-Locus zu deletieren. Diese Region wurde durch *LEU2* ersetzt (*MATΔ::LEU2*), wobei das hierfür nötige Konstrukt durch PCR (*primer*: MAT1, MAT4) gewonnen wurde (Wach *et al.*, 1994). Die Matrize für das PCR-Fragment stammt aus dem Stamm OI21 (Kupiec, pers. Mitteilung), der *MATΔ::LEU2* enthält. Schließlich wurde das somit entstandene Stammderivat von MK205 AF2082 genannt. Es diente als Ausgangsstamm für die Insertion einer zweiten *HOcs* an ausgewählten Orten.

In einem System mit zwei *HOcs*-Sequenzen können bei Plattierung der Zellen auf Galaktosemedium fehlerfrei religierte Schnittstellen erneut geschnitten werden, da die HO-Endonuklease andauernd exprimiert wird. Eine Koloniebildung auf Galaktosemedium ist also nur möglich, wenn die *HOcs*-Regionen bei der Reparatur durch Insertionen oder Deletionen so verändert werden, dass kein Schnitt mehr möglich ist. So wurde z.B. beobachtet, dass die 4 bp-überhängenden Enden des HO-Schnittes (5'-AACCA-3') nicht degradiert, sondern versetzt zusammengelagert werden (z.B. nur über die jeweils letzte Base), wobei durch das Auffüllen der Lücken Insertionen von 2 bzw. 3 bp (+CA bzw. +ACA) entstehen; alternativ können durch Endenprozessierung Deletionen von wenigen Basenpaaren bis zu einigen Kilobasenpaaren entstehen, wobei an der Verknüpfungsstelle meist Mikrohomologien von 1 bis 7 bp bestehen (Kramer *et al.*, 1994; Moore und Haber, 1996). Anders als die perfekte Religation überhängender, komplementärer Enden, sind NHEJ-Prozesse, bei denen Insertionen oder Deletionen entstehen, in Hefe selten. Nur 0,1% der HO-induzierten DSB werden auf diese Weise repariert, wobei über 80% der veränderten Schnittstellen durch *misalignment* und Auffüllen der Lücken entstehen (Pâques und Haber, 1999). Die Art der Reparatur-Ereignisse (also Insertionen oder Deletionen) und auch die Effizienz der NHEJ-Reparatur sind Zellzyklus-abhängig (Moore und Haber, 1996). In Vorversuchen wurden bei den hier gewählten Versuchsbedingungen dementsprechend sehr geringe Plattierungseffizienzen (PE) beobachtet (im Bereich von 10^{-5}) mit Kolonien, die spät aufgetreten sind

(Auswertung in einem Zeitraum von bis zu 14 Tagen). Bei diesen geringen Effizienzen könnten Klone mit mutierter, nicht schneidbarer *HOcs* oder defekter HO-Endonuklease die Überlebensrate merklich verfälschen. Daher war bei der Platzierung einer zweiten *HOcs* im Genom ein „Sicherungssystem“ notwendig, mit dessen Hilfe die Einbeziehung solcher Klone in die Häufigkeitsauswertung minimiert werden sollte. Eine solche Sicherung kann durch das Nutzen einer *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette eingeführt werden. Der Einbau dieser Kassette führt zur Tryptophan-Prototrophie, so dass das *TRP1*-Gen zunächst als Marker für die erfolgreiche Insertion verwendet werden kann. Nach Induktion der HO-Endonuklease wird an beiden *HOcs*-Erkennungsstellen geschnitten, d.h. in der Kassette werden flankierend zum *TRP1*-Gen zwei DSB gesetzt und der *TRP1*-Marker freigesetzt. Nach Reparatur bleibt an dieser Stelle lediglich eine einfache *HOcs*-Sequenz bestehen. Tryptophan-Auxotrophie gilt also, nach Wachstum auf Galaktose, als Nachweis für eine erfolgte Bruchinduktion und nur Tryptophan-auxotrophe Kolonien sind für die Bestimmung der für die Auswertung verwendeten PE, mit deren Hilfe die Reparatur-Ereignisse analysiert werden, relevant. Natürlich gehen durch die Beschränkung auf Tryptophan-auxotrophe Kolonien potentiell informative Ereignisse verloren. Möglich ist beispielsweise, dass entweder nur eine der beiden das *TRP1*-Gen flankierenden *HOcs*-Stellen geschnitten wird, oder aber dass ein ausgeschnittenes *TRP1*-Gen im Zuge der Reparatur wieder inseriert wird.

Die Integrierung der zweiten *HOcs* in das Genom des Stammderivates AF2082 sollte folgendermaßen erfolgen: Zunächst sollte ein Hefepiasmid generiert werden, in das die *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette eingesetzt ist. Mit dem Plasmid als Matrize sollte diese Kassette anschließend mittels PCR amplifiziert werden. Mit Hilfe genspezifischer Flanken des PCR-Fragmentes kann nach einer Hefetransformation mittels *one-step-replacement* die *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette am homologen Bereich eingebaut werden, so dass es sich letztendlich an der vorher ausgewählten Zielregion befindet.

Plasmid pMH1 ist ein Derivat des Vektors pUC19, in dessen MCS (*multiple cloning site*) das beidseits von *HOcs*-Bereichen flankierte *TRP1*-Gen inkloniert wurde (siehe Abbildung 22). Für die Generierung wurden die beiden *HOcs*-Bereiche, die durch Zusammenlagerung komplementärer Oligonukleotide (CSc-Bsp und CSc-Mfe bzw. CSd-Bam und CSd-Xho) hergestellt worden waren, so verdaut, dass ihre Enden zu bestimmten

Restriktionsschnittstellen kompatibel waren. Mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurde dann der Vektor pUC19 verdaut, aufgereinigt und schließlich mit den *HOcs*-Produkten ligiert. Die Ligationsprodukte wurden so nachverdaut, dass die Enden zu dem *TRP1*-Restriktionsfragment kompatibel waren, das schließlich ebenfalls in den Vektor ligiert wurde.

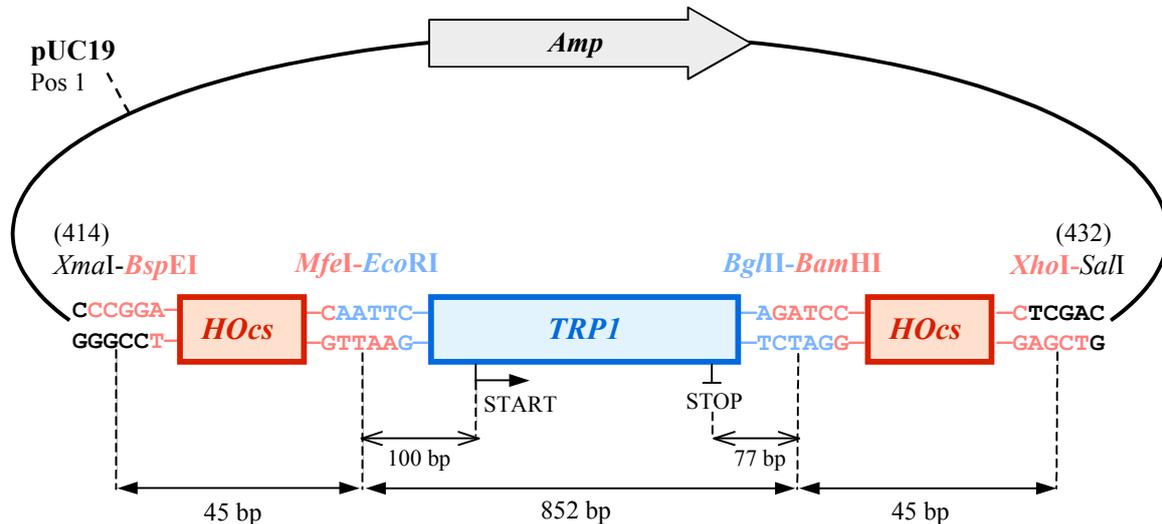


Abb. 22: Schema des Plasmids pMH1

Der Vektor pUC19 wurde in der MCS mit *XmaI* und *SalI* linearisiert. Die komplementären, synthetischen Oligonukleotide CSc-Bsp und CSc-Mfe wurden gepaart und mit *BspEI* und *MfeI* verdaut. Analog wurden die Oligonukleotide CSc-Bam und CSc-Xho gepaart und mit *BamHI* und *XhoI* verdaut. Anschließend wurde der Vektor mit den *HOcs*-Bereichen ligiert. Das Ligationsprodukt wurde mit *MfeI* und *BamHI* nachverdaut, um kompatible Enden zur Ligation eines *EcoRI/BglII*-Fragmentes, das das *TRP1*-Gen enthält (aus pSM21), zu schaffen. Nach Transformation des ligierten Plasmids in den Tryptophan-auxotrophen *E. coli*-Stamm MC1066 mit anschließender Selektion auf ampicillinhaltigem Tryptophan-Mangelmedium wurde das Plasmid reisoliert und mit Restriktionsanalyse charakterisiert.

Die Amplifikation der *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette mit genspezifischen Flanken wurde in zwei Schritten durchgeführt (siehe Abbildung 23): Da die repetitiven *HOcs*-Elemente zu Amplifikations-Artefakten führten, wurde zunächst lediglich die *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette generiert. Dazu wurden, mit dem Plasmid pMH1 als Matrize, die Fragmente mit pUC19-sequenzspezifischen, Kassetten-flankierenden *primern* (pUC-fw, pUC-rev) amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Bande der richtigen Länge eluiert. Die gereinigten PCR-Produkte dienten wiederum als Matrize für die Herstellung von PCR-Produkten, die beidseits der Kassette je eine etwa 40 bp lange Homologie zu den jeweils gewählten Zielorten

im Hefegenom aufwiesen (diese Homologiebereiche sind durch die Sequenz der ca. 60 bp langen PCR-*primer* festgelegt). Auch in dieser PCR-Reaktion traten – wenn auch in geringerem Maße als ohne diese Vorab-Reaktion – Artefakte auf, so dass nach Auftrennung im Agarosegel die richtige Bandenlänge eluiert wurde. Die gereinigten Fragmente wurden schließlich in den Stamm AF2082 transformiert und das *HOcs-TRP1-HOcs*-Konstrukt wurde mittels *one-step-replacement* in die gewünschte Zielregion eingebaut. Nach Selektion auf Tryptophan-Prototrophie wurde der korrekte Einbau mittels PCR nachgewiesen.

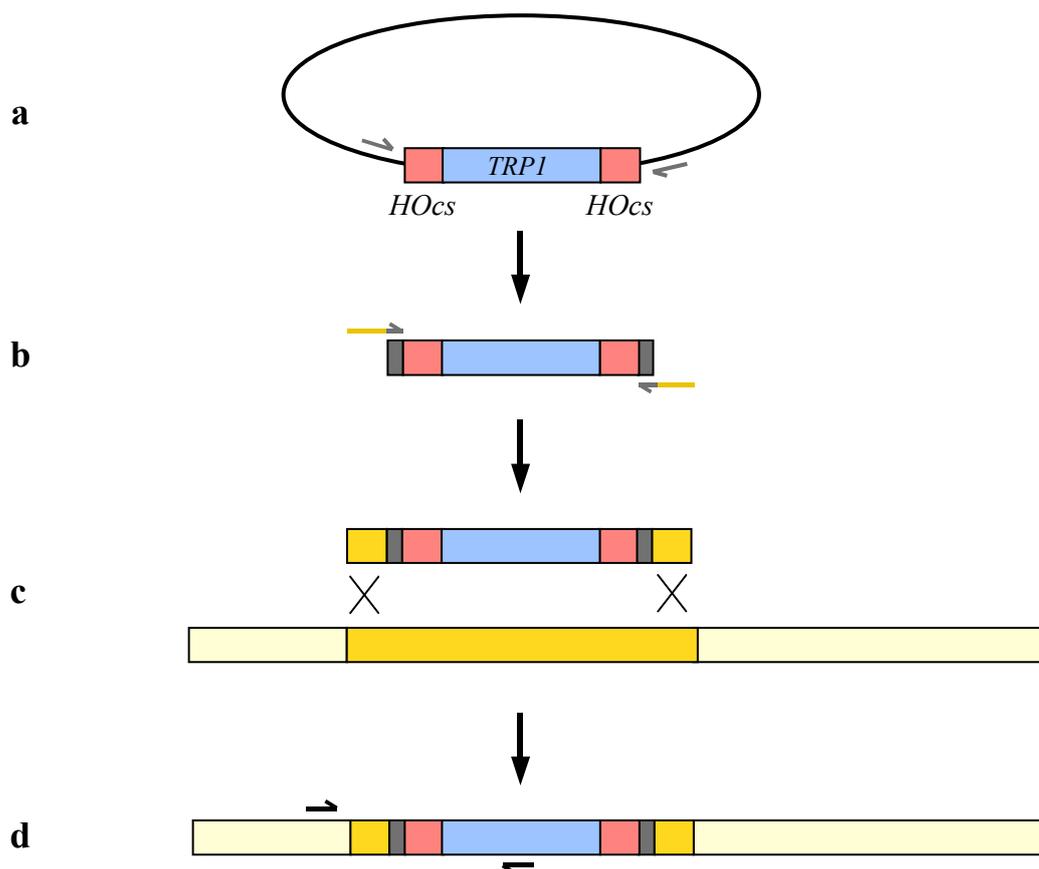


Abb. 23: Herstellung und Einbau der *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette

a) Das Plasmid pMH1 dient als Matrize für die Amplifikation der *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette. Die PCR erfolgt mit pUC19-sequenzspezifischen, Kassetten-flankierenden *primern*. **b)** Durch PCR mit 60-mer *primern*, die am 3'-Ende (grau) 20 nt komplementär zur pUC19-Vektorsequenz und am 5'-Ende (gelb) 40 nt komplementär zur ausgewählten Zielsequenz im Hefegenom sind, wird ein Fragment mit genspezifischen Flanken hergestellt. **c)** Nach Transformation in den Hefestamm kann das PCR-Fragment über homologe Bereiche in die gewünschte Zielregion inserieren. **d)** Der erfolgreiche Einbau wird nach Selektion auf Tryptophan-Mangelmedium mittels PCR nachgewiesen. (In weiteren Abbildungen ist die gesamte Farbgebung beibehalten.)

Die beiden flankierenden *HOcs*-Sequenzen liegen in gleicher Orientierung vor, da die Verknüpfung auf diese Weise stark begünstigt ist: Die erzeugten Enden (3'-überhängend in einer Länge von 4 bp, -AACCA) mit einer Halbwertszeit von über einer Stunde sind relativ lange stabil (Frank-Vaillant und Marcand, 2002) und die Religation kompatibler Enden in Hefe ist sehr effizient (Pâques und Haber, 1999). Außerdem wurden nicht nur die beiden *HOcs* der inserierten Kassetten in gleicher Orientierung ausgerichtet werden, sondern auch die Insertionsorte so gewählt, dass bei Fehlverknüpfung kompatibler Enden mitotisch stabile Chromosomen entstehen. Nach Endenprozessierung wäre auch eine Verknüpfung nicht-kompatibler Enden möglich, sie würde jedoch zu di- und azentrischen Chromosomen führen. Solche Letalereignisse sind mit dem hier gewählten experimentellen Ansatz nicht erfassbar, sie stellen aber unbegünstigte, wahrscheinlich seltenere Ereignisse dar.

Die Zielorte im Genom für die zweite *HOcs*-Sequenz wurden in intragenischen Bereichen gesucht, da dort von einem höheren Grad der Sequenzhomologie zwischen dem hier verwendeten Stamm AF2082 und dem im Hefegenom-Projekt (Cherry *et al.*, 1997) sequenzierten Stamm SC228c (nach dessen Sequenz die 40 nt-Anhänge der 60mer *primer* ausgewählt wurden) ausgegangen werden kann. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Zielregion war die Sicherstellung der Reparatur mittels NHEJ, so dass Zielgene ausgewählt wurden, die einmalig im Genom vorhanden sind, so dass homologe Rekombination nicht eingeleitet wird. Zudem wurden Gene ausgesucht, die nicht-essentiell sind, da sie bei dem gewählten experimentellen Ansatz zerstört werden. Außerdem wurden die zur Insertion genutzten Homologiebereiche innerhalb der Zielgene so gewählt, dass die Kassetteninsertion in Leserichtung und -rahmen des entsprechenden Gens erfolgt, um Komplikationen bei der Expression des *TRP1*-Gens sowie Störungen der Chromatinstruktur zu vermeiden. Die Benennung der erzeugten Stämme richtete sich schließlich nach dem Gen, in das die Kasette eingesetzt wurde.

In Abbildung 24 sind zum einen die Lage der ersten *HOcs* im Ausgangsstamm AF2082 (oberstes Chromosom) und zum anderen die verschiedenen Zielregionen für die Insertion der zweiten *HOcs*, die mittels Integrierung der *HOcs-TRP1-HOcs*-Kasette erfolgte (restliche Chromosomen), gezeigt. Für die Auswahl des Bereiches, in dem die Kasette für die zweite *HOcs* liegen sollte, ist die räumliche Beziehung zur ersten *HOcs* ausschlaggebend, die sich im *URA3*-Gen auf Chromosom V, 36 kb vom Zentromer und 116 kb vom Telomer entfernt,

befindet. Werden Stämme erzeugt, die jeweils unterschiedliche räumliche Beziehung zwischen den Erkennungssequenzen haben, kann nach Induktion der HO-Endonuklease sowie anschließender Reparatur beobachtet werden, inwieweit Unterschiede in der Translokationshäufigkeit einzelner Stämme vorhanden sind. Bei einem Einfluss der Kernarchitektur auf die Translokationshäufigkeit würde man erwarten, dass v.a. der initiale Ort der DSB eine Rolle hinsichtlich der Anzahl der Fehlverknüpfungen spielt. Dies sollte hier geprüft werden.

Zwei der fünf gezeigten Stämme (Abbildung 24) sollten den Einfluss der Kernarchitektur am deutlichsten zeigen: AF2082 *pho91::HOcs* und AF2082 *rmd5::HOcs*. Im Stamm AF2082 *pho91::HOcs* sind die beiden Positionen der *HOcs* vergleichbar, da die Kasette für die zweite *HOcs* 20 kb vom Zentromer und 135 kb vom Telomer entfernt liegt. Nachdem die *HOcs*-tragenden Chromosomenarme etwa gleich lang sind, ist es möglich, dass ihre Telomere in einem *cluster* zusammenkommen. In diesem Stamm wird daher – bei einem Einfluss der Kernarchitektur – das Maximum an Fehlverknüpfungen erwartet. Im Stamm AF2082 *rmd5::HOcs* liegt dagegen die Kasette für die zweite *HOcs* fernab vom Zentromer (517 kb) und Telomer (565 kb) in der interstitiellen Region. Im Falle eines Kernarchitektureinflusses wird deshalb eine geringere Rate an Fehlverknüpfungen erwartet.

In den weiteren Stämmen sollen bei AF2082 *ypl229w::HOcs* und AF2082 *ydr018c::HOcs* die Schnittstellen an Positionen inseriert werden, die nur hinsichtlich Telomerentfernung oder nur hinsichtlich Zentromerentfernung mit der ersten *HOcs* vergleichbar sind (AF2082 *ypl229w::HOcs*: 438 kb vom Zentromer und 118 kb vom Telomer entfernt; AF2082 *ydr018c::HOcs*: 33 kb vom Zentromer und 1049 kb vom Telomer entfernt). Da die Chromosomenarme, die die Kassetten für die zweite *HOcs* tragen, wesentlich länger sind als der *HOcs*-tragende Arm von Chromosom V, ist es eher unwahrscheinlich, dass die Telomere in einem *cluster* zusammenkommen. Im Falle eines Kernarchitektureinflusses wird die Rate an Fehlverknüpfungen, zumindest im Stamm AF2082 *ypl229w::HOcs*, wahrscheinlich geringer sein als im Stamm AF2082 *pho91::HOcs*. In dem Stamm AF2082 *lcb4::HOcs* soll die Kasette für die zweite *HOcs* in der interstitiellen Region eingesetzt werden (326 kb vom Zentromer und 327 kb vom Telomer entfernt). Ähnlich dem Stamm AF2082 *rmd5::HOcs* (mit ebenfalls einer *HOcs*-Stelle in der interstitiellen Region) wird hier bei Einfluss der Kernarchitektur eine geringe Rate an Fehlverknüpfungen erwartet.

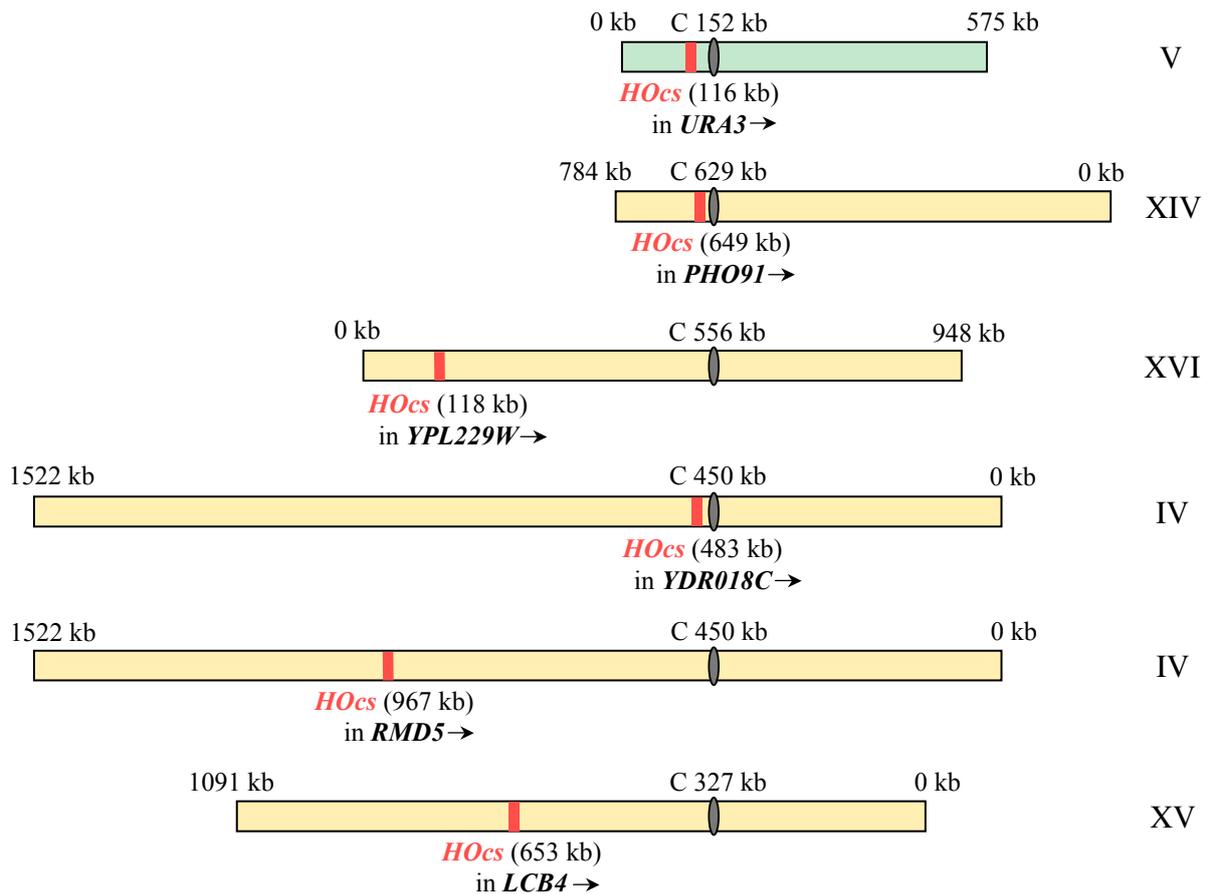


Abb. 24: Übersicht über die Lokalisierung der *HOcs*-Schnittstellen

Die Länge der Chromosomen ist maßstabsgetreu in physikalischer Größe dargestellt. Das oberste Chromosom (grün) zeigt die Lage der ersten *HOcs*-Erkennungssequenz (rot) im Ausgangsstamm AF2082, das im *URA3*-Gen eingesetzt ist. Die weiteren Chromosomen (gelb) zeigen die Zielregionen für die zweite *HOcs* (rot), die inseriert wird durch die *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette. Die Lage der Kassette ist entweder hinsichtlich der Zentromer- und/oder Telomerentfernung in vergleichbarer Position wie die erste *HOcs*, oder sie befindet sich in der interstitiellen Region. Dargestellt sind die Chromosomen entsprechend der Leserichtung des Gens, in das die Kassette inseriert wurde, und somit in Richtung der *HOcs*-Orientierung. Außerdem sind einige Gene invertiert wiedergegeben, da die Zielgene nicht alle auf dem Watson-Strang codiert sind. Die Lage der Zentromere („C“) ist durch ovale Punkte bezeichnet, die zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Entfernung zwischen Zentromer und *HOcs* übereinander dargestellt sind.

Stammherstellung, Tests und Charakterisierung der Reparatur-Ereignisse wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Hertle, 2003) durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden kurz zusammengefasst. Zudem wurde die Reproduzierbarkeit der Stämme getestet. Dabei wurden, nach korrekter Integration der *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette, Plattierungseffizienz-Experimente durchgeführt, um die Fähigkeit der Bildung makroskopisch sichtbarer Kolonien nach Induktion der HO-Endonuklease zu untersuchen.

2. ANALYSE DER VERTEILUNG DER REPARATUR-EREIGNISSE IN DEN TESTSTÄMMEN

Um die Reparatur-Ereignisse untersuchen zu können, wurde in den Teststämmen die HO-Endonuklease induziert, um nach Erzeugung der DSB die Häufigkeit der im Zuge der NHEJ-Reparatur zustande gekommenen Verknüpfungen/Fehlverknüpfungen der Chromosomenenden zu bestimmen. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurde zur Selektion eine Vorkultur auf Tryptophan-Mangelmedium angelegt, um zu vermeiden, dass das *TRP1*-Gen durch Rekombination zwischen den flankierenden *HOcs* verloren geht und die Ergebnisse verfälschen würde. Daraufhin wurde jeweils eine repräsentative Einzelkolonie vollständig von der Agarplatte abgenommen und in Wasser resuspendiert. Ein geeignet verdünntes Aliquot der Suspension wurde auf YPD ausplattiert, der unverdünnte Suspensionsrest wurde auf YPGal ausplattiert. Nach einer viertägigen Inkubation bei 30°C auf YPD wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien ausgezählt. Die Koloniebildung auf YPGal dauerte länger, die Auszählung erfolgte erst nach 7, 9 und 14 Tagen (bei längerer Inkubationszeit wären die Platten ausgetrocknet). Anschließend konnte die PE auf Galaktosemedium berechnet werden: Koloniezahl auf YPGal / Koloniezahl auf YPD (unter Berücksichtigung der ausplattierten Menge und des Verdünnungsfaktors). Zudem wurden die YPGal-Kolonien auf Tryptophan-Auxotrophie untersucht, indem die Kolonien (oder eine repräsentativer Anteil) gepickt wurden, auf eine YPD-Platte ausgestrichen und – nach Inkubation – auf Tryptophan-Mangelmedium gestempelt wurden. Nach erneuter Inkubation konnte der für die Auswertung verwendete PE-Wert berechnet werden: PE auf Galaktosemedium x Koloniezahl auf Tryptophan-Mangelmedium. Für den weiteren Versuchsverlauf wurden lediglich Tryptophan-auxotrophe Klone verwendet, die im nächsten Schritt mittels PCR hinsichtlich des zugrunde liegenden Reparatur-Ereignisses untersucht wurden. Wie Abbildung 25 zeigt, erwartet man grundsätzlich alle vier möglichen PCR-Reaktionen. Der Nachweis galt nur dann als eindeutig, wenn jeweils die beiden korrespondierenden *primer*-Kombinationen ein Produkt ergaben.

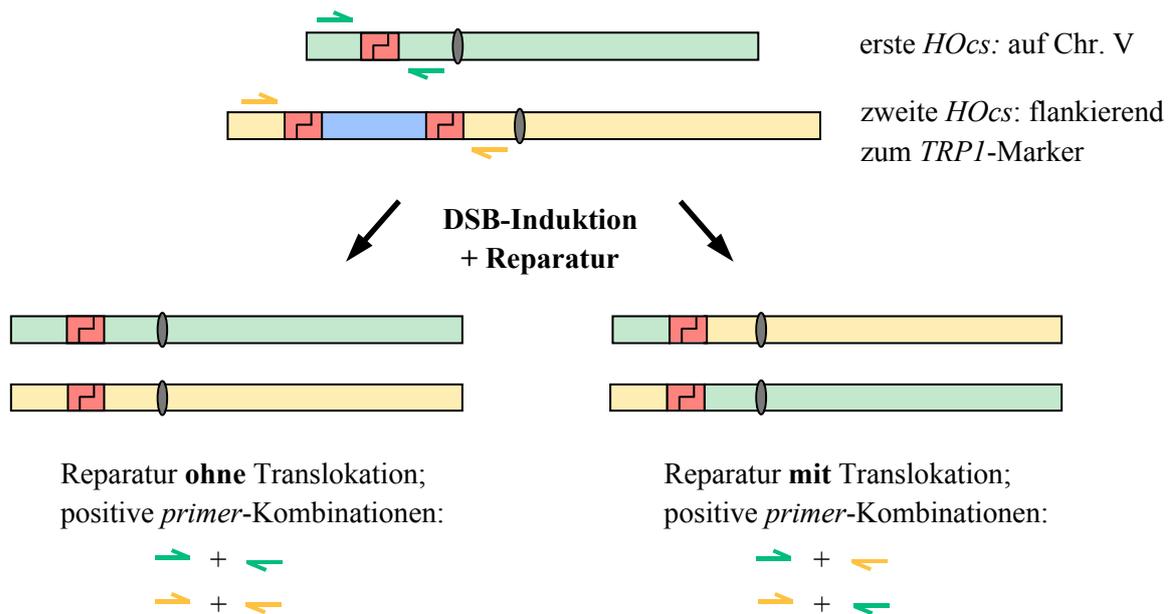


Abb. 25: Schema für den Translokationsnachweis durch PCR

Nach DSB-Induktion sowie Reparatur von Stämmen, die zwei *HOcs* in unterschiedlichen Genombereichen tragen, sind zwei Ergebnisse möglich: Ein Produkt ohne Translokation oder ein Produkt mit Translokation. Als Nachweis erfolgt eine PCR, die dann eindeutig ist, wenn jeweils zwei korrespondierende *primer*-Kombinationen ein positives Resultat ergeben (d.h. entweder die beiden PCR-Reaktionen für das Produkt „ohne Translokation“ oder für das „mit Translokation“).

In der PCR-Analyse wurde allerdings sichtbar, dass ein unerwartet hoher Anteil der Ergebnisse (etwa 30%) sich als nicht eindeutig erwies. Bei diesen wurde kein oder nur ein nachweisbares PCR-Produkt gefunden, statt der erwarteten zwei korrespondierenden PCR-Ergebnisse. Dafür gibt es mehrere Erklärungen: Geht die Verknüpfung mit größeren Deletionen einher, können die zum Nachweis nötigen *primer*-Bindestellen verloren gehen. Werden bei der Verknüpfung dagegen freie DNA-Abschnitte inseriert, könnte der Abstand zwischen den *primer*-Bindestellen für den PCR-Nachweis zu groß sein. Alternativ könnten auch, falls es noch weitere Brüche im Genom gibt, Verknüpfungen mit anderen DNA-Enden auftreten. Letztere Möglichkeit lässt sich durch elektrophoretische Karyotypisierung nachweisen (vgl. Einleitung I.3.2).

Tatsächlich zeigte es sich bei der Karyotypisierung eindeutiger PCR-Ergebnisse, dass oft die Bande des Chromosoms III fehlte. Dies deutet, unter der Voraussetzung, dass die Größe der erwarteten (einschließlich translozierten) Chromosomen keine Veränderung zeigt, auf eine Zirkularisierung dieses Chromosoms hin. Chromosom III trägt unter gewöhnlichen

Umständen drei (gleichgerichtete) *HO*-Erkennungsstellen: eine im *MAT*-Locus, die in den hier verwendeten Stämmen deletiert ist, sowie jeweils eine weitere in den stillgelegten (*silenced*) Informationsdonor-Kassetten *HML α* (*haploid mating*) und *HMRa*. Aufgrund des *silencing* sind die *HO*-Erkennungsstellen in *HML α* und *HMRa* normalerweise nicht für die Endonuklease zugänglich (Weiss und Simpson, 1998). Die Zirkularisierung von Chromosom III findet jedoch vermutlich durch ein Verknüpfen von *HML α* und *HMRa* statt, ein Ereignis, das auch nach Bestrahlung recht häufig beobachtet wird (Friedl *et al.*, 1998). Der Zirkularisierung ging wahrscheinlich ein DSB an beiden *HO*-Erkennungsstellen voraus, d.h. unter diesen experimentellen Bedingungen (Stammhintergrund und/oder Überexpression der Endonuklease) muss damit gerechnet werden, dass unerwarteterweise Brüche auf Chromosom III auftreten (an einer oder beiden *HOcs*) und in die Reparaturprozesse einbezogen werden. Tatsächlich wurden bei der elektrophoretischen Analyse uneindeutiger PCR-Ergebnisse häufig Interaktionen der *HOcs*-tragenden Chromosomen mit Chromosom III gezeigt. Weiterhin wurde beobachtet, dass an den Verknüpfungsereignissen auch Chromosomen beteiligt sein können, die keine *HO*-Erkennungsstelle tragen, beispielsweise Chromosom IV. Solche Beteiligungen waren wahrscheinlich auf spontane Brüche zurückzuführen. Das Vorkommen von unbeabsichtigten Endonuklease-induzierten Brüchen auf Chromosom III sowie von Brüchen auf anderen Chromosomen führt natürlich zu einer drastischen Zunahme in der Komplexität möglicher Reparatur-Ereignisse. Aufgrund dieser Vielschichtigkeit konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Analyse derjenigen Ereignisse, die bei der PCR-Analyse ein eindeutiges Ergebnis ergaben.

Zur Analyse der Translokations-Ereignisse wurden zunächst die Stämme AF2082 *pho91::HOcs* und AF2082 *rmd5::HOcs* ausgewertet, die bei einem Einfluss der initialen DSB-Position auf die Aberrationsentstehung das Maximum und Minimum an Fehlverknüpfungshäufigkeit zeigen sollten. Im Stamm AF2082 *pho91::HOcs*, der die *HO*-Erkennungsstellen bezüglich der Entfernung zu Zentromer und Telomer an vergleichbaren Positionen trägt, lag die Translokationshäufigkeit bei 47% (siehe Abbildung 26). Dieser Wert ist erstaunlich nahe der maximal erzielbaren Translokationsrate von 50%, die man bei zufälliger Wahl der Verknüpfungspartner erwarten würde. Außerdem sind bei der berechneten Translokationsrate nur diejenigen translozierten Chromosomen miteinbezogen, die nach der Verknüpfung 3'-überhängender kompatibler Enden mitotisch stabil sind, nicht jedoch die

(unbegünstigte) Verknüpfung nicht-kompatibler Enden zu di- und azentrischen Chromosomen, die als Letalereignisse im dem verwendeten System nicht zu erfassen sind. Daher wird die Translokationsrate als eher noch zu gering angenommen. In dem Stamm AF2082 *rmd5::HOcs*, bei dem die Kasette für die zweite *HOcs* interstitiell auf einem langen Chromosomenarm inseriert wurde, kam es bei 32% der Reparatur-Ereignisse zu Translokationen (siehe Abbildung 26). Der Vergleich der Translokationsraten zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,10$; χ^2 -Test).

Auch die drei übrigen Stämme zeigten vergleichbare Translokationshäufigkeiten (siehe Abbildung 26), und ein Vergleich der Unterschiede der Translokationshäufigkeiten aller 5 Stämme erwies sich als nicht signifikant (χ^2 -Test). Es konnte also mit dem hier entwickelten Testsystem kein Einfluss der Kernarchitektur auf die Fehlverknüpfungshäufigkeit nachgewiesen werden.

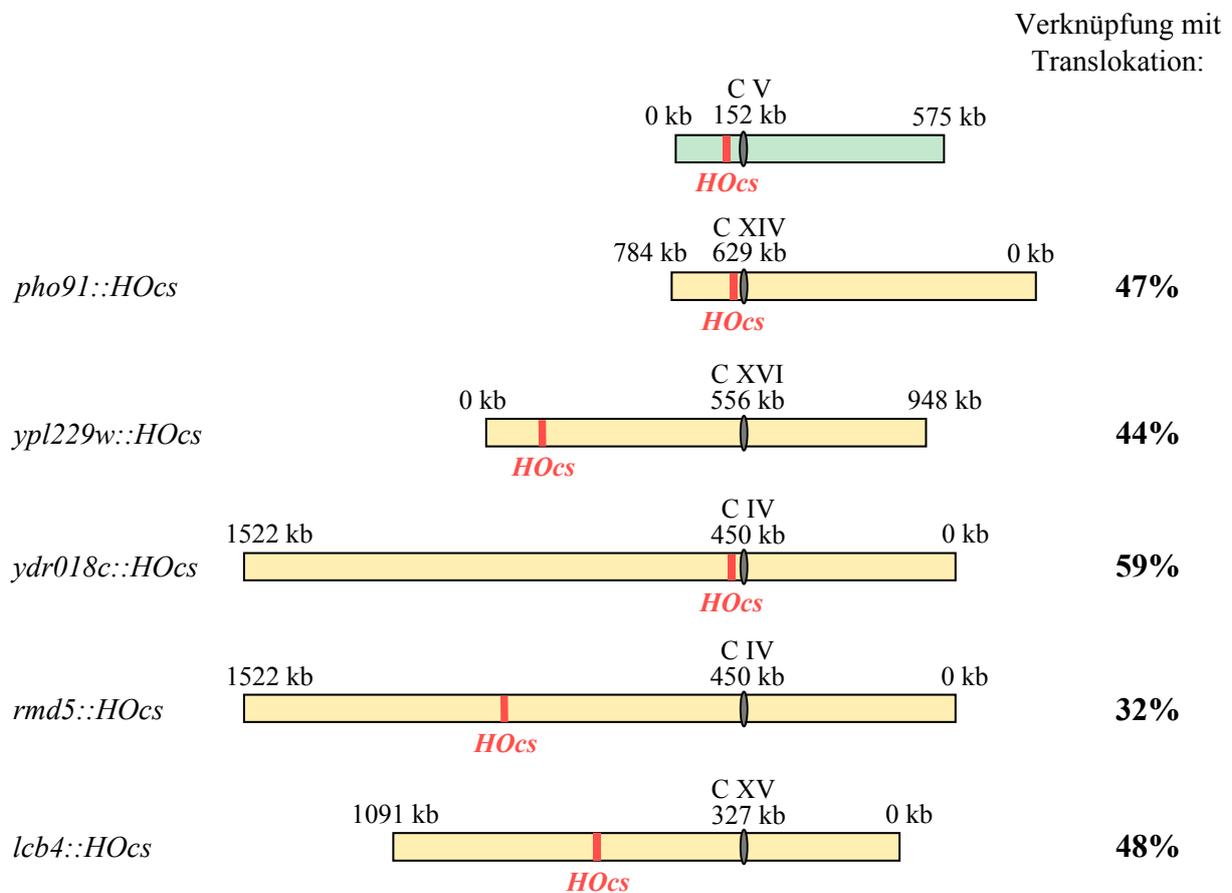


Abb. 26: Zusammenfassung der Translokations-Ereignisse aller Stämme

Zu den Stämmen (vgl. auch Abb. 24) sind jeweils die Translokationshäufigkeiten PCR-eindeutiger Ergebnisse nach HO-Endonuklease-Induktion sowie Reparatur zugeordnet (Grundstamm: AF2082).

3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Es wurde ein Modellsystem in Hefe entwickelt, das Paare von Erkennungssequenzen (*HOcs*) für eine induzierbare HO-Endonuklease trägt. Entscheidend war dabei die Inserierung der *HOcs*-Sequenzen an unterschiedlichen chromosomalen Positionen, was nach Erzeugung der DSB eine systematische Untersuchung der Entstehungswahrscheinlichkeit von Translokationen ermöglicht. Fünf Stämme wurden für die Generierung ausgewählt und nach Konstruktion und Induktion der HO-Endonuklease wurden die entsprechenden Reparaturereignisse untersucht. Bei Vorliegen eindeutiger PCR-Ergebnisse ergaben sich Translokationshäufigkeiten von 32 – 59%, die sich zwischen den einzelnen Stämmen nicht signifikant unterscheiden. Die Translokationshäufigkeit liegt bei den Stämmen nahe der maximal zu erwartenden 50%, was auf einen hohen Grad an Zufälligkeit bei der Endenverknüpfung hinweist. Bei dem hier gewählten experimentellen Ansatz ist also kein Einfluss der relativen Position der Bruchorte auf die Wahrscheinlichkeit einer Fehlverknüpfung der Enden erkennbar. Auffällig war die hohe Zahl an Ereignissen, die nicht zu eindeutigen PCR-Ergebnissen führte. Als Ursache konnte eine Beteiligung spontaner DSB bzw. von Brüchen in den stillgelegten *HML/HMR*-Regionen ausgemacht werden.

V. DISKUSSION

Alle bislang untersuchten DSB-Reparaturwege können potentiell zu strukturellen Chromosomenaberrationen führen (Pfeiffer *et al.*, 2000). Der einfachste Fall hierbei ist die falsche Verknüpfung von zwei oder mehr freien DNA-Enden mittels NHEJ (*breakage-and-reunion-Modell*). Die einzige Grundvoraussetzung für eine solche Fehlverknüpfung ist vermutlich, dass die Enden während des Reparaturprozesses irgendwann zeitlich und räumlich aufeinander treffen, wobei bis heute jedoch unklar ist, wie nahe sich die späteren Interaktionspartner zum Zeitpunkt der DSB-Induktion für die Entstehung einer Fehlverknüpfung sein müssen. Entscheidend ist dabei die Frage, ob die Reparatur bevorzugt mehr oder weniger vor Ort stattfindet, oder an bestimmten Stellen im Kern, die auch als „Reparaturfabriken“ bezeichnet werden können. Bei einer Reparatur direkt am Schadensort liegt nahe, dass die Wahrscheinlichkeit einer Fehlverknüpfung stark durch den initialen Abstand der DSB beeinflusst wird (*proximity effect*), während in „Reparaturfabriken“ DNA-Enden von verschiedenen Bruchorten zusammentreffen können, so dass hier die zulässige Interaktionsdistanz vergrößert sein sollte. Obwohl Fragen nach der maximalen Interaktionsdistanz schon seit den frühen Tagen der Strahlenbiologie diskutiert werden (z.B. Lea, 1946), ist bis heute wenig über den Einfluss topologischer Faktoren auf die Entstehung von Austauschaberrationen bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen der Einfluss der Zellkernarchitektur auf die Ausbildung interchromosomaler Austauschaberrationen untersucht. Hefe bietet sich als Modellsystem an, da in diesem Organismus die Kernarchitektur gut charakterisiert ist: Die Chromosomen nehmen während der Interphase eine Rabl-ähnliche Konfiguration ein (nach Rabl, 1885), bei der alle Zentromere in der Nähe der Zellkernperipherie in einer Rosettenstruktur gebündelt sind und die Telomere, vorliegend in mehreren *clustern*, präferenziell am gegenüberliegenden Pol an der Kernmembran verankert sind (siehe auch Einleitung I.3.1.). Aufgrund dieser Anordnung sollte die Wahrscheinlichkeit interchromosomaler Interaktionen im Bereich der Zentromere und Telomere am höchsten sein.

Für den ersten der beiden Ansätze stand aus Vorarbeiten (Friedl *et al.*, 1998; Fellerhoff, 1999) eine Kollektion von 16 Klonen von Rekombinations-defizienten Hefestämmen (*rad52*- bzw. *rad54*-Mutanten) zur Verfügung, die nach Bestrahlung strukturelle Chromosomenaberrationen zeigten (mit insgesamt 35 beteiligten Chromosomen). In dieser Kollektion ist eine erhöhte Aberrations-Beteiligung von Chromosom V und VIII zu finden. Um die Translokations-Bruchpunkte hinsichtlich ihrer räumlichen Anordnung zu untersuchen, wurden die Bruchpunkte auf den Chromosomen V und VIII sowie deren Partnerchromosomen kartiert. Insgesamt wurde eine signifikante Unterrepräsentierung von Bruchpunkten in interstitiellen Chromosomenabschnitten beobachtet, also fernab von Zentromer und Telomer, so dass hier auf einen Einfluss der Zellkernarchitektur auf die Aberrationsentstehung zu schließen ist. Im zweiten experimentellen Ansatz wurden in Rekombinations-kompetenter Hefe ortsspezifisch gleichzeitig zwei DSB induziert. Dafür wurden, ausgehend von einem Grundstamm mit einer ersten Erkennungsstelle für die HO-Endonuklease, *HOcs* (auf Chromosom V liegend), Stämme konstruiert, in die eine zweite Erkennungsstelle (als *HOcs-TRP1-HOcs*-Kassette) an unterschiedlichen räumlichen Positionen inseriert wurde. Nach Induktion der Endonukleaseaktivität konnten sich nur dann Kolonien bilden, wenn bei der Bruchreparatur Veränderungen der Erkennungssequenzen eingeführt wurden, die ein erneutes Schneiden unmöglich machen. Die nachfolgende Charakterisierung der Reparatur-Ereignisse in den Kolonien zeigte, dass, unabhängig von der chromosomalen Position der Bruchstelle, intra- und intermolekulare Endenverknüpfung etwa gleich häufig vorkommen. Ein Einfluss der Kernarchitektur auf die Aberrationsentstehung konnte somit mit diesem Ansatz nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse der beiden Ansätze sind also auf den ersten Blick widersprüchlich.

Hinsichtlich des erkennbaren Einflusses der Zellkernarchitektur auf die Verteilung der Translokations-Bruchpunkte nach Bestrahlung ähneln die Ergebnisse denjenigen von Burgess und Kleckner (1999). Mittels *Cre/loxP*-Rekombination zeigten diese Autoren, dass die Wahrscheinlichkeit der Kollision zwischen zwei genomischen Bereichen von der relativen Entfernung zum jeweiligen Zentromer abhängt. Das heißt, wenn zwei Bereiche etwa gleich weit vom Zentromer entfernt liegen, haben sie eine höhere Kollisionswahrscheinlichkeit, als wenn sie eine unterschiedliche Zentromerdistanz aufweisen (untersucht wurden Chromosomenbereiche im Abstand von bis zu 142 kb zum Zentromer). Einen ähnlichen Einfluss der

Zentromerdistanz auf die räumliche Assoziation zeigten Aragón-Alcaide und Strunnikov (2000). Sie analysierten ektopische interchromosomale Interaktionen zwischen repetitiven Sequenzen unter Verwendung von *in vivo* Fluoreszenzmarkierung mit dem Ergebnis, dass diese in der Nähe des Zentromers gefördert werden (untersucht wurden Bereiche mit einer Zentromerentfernung von 15 kb, 35 kb, 190 kb und 800 kb).

Hinsichtlich des Fehlens eines deutlichen Einflusses der Kernarchitektur im Falle der Endonuklease-induzierten Brüche ähneln die Ergebnisse jedoch denjenigen von Haber und Leung (1996). Diese Autoren haben, ebenfalls unter Verwendung des HO-Systems, Hefestämme konstruiert, in welchen zwei HO-induzierte DSB entweder intra- oder intermolekular durch Einzelstrangverknüpfung repariert werden können. Im Gegensatz zum hier vorgestellten System setzt dieses System voraus, dass zwischen den potentiellen Partnern längere homologe Bereiche vorhanden sind. Getestet wurden verschiedene Konstellationen von Bruchorten, bei denen eine *HOcs*-Sequenz jeweils Zentromer-nah an der gleichen Stelle lag (auf Chr. III etwa 35 kb vom Zentromer entfernt), die zweite *HOcs* sich allerdings in ihrer Chromosomenposition je nach Stamm unterschied (auf Chr. V bei 35 kb sowie auf Chr. XI bei 11, 115 und 215 kb). Nach HO-Induktion lag die Translokationsrate bei geringerer Zentromerentfernung (35, 11, 115 kb) zwischen 55% und 60% (die Bevorzugung der interchromosomalen Interaktion erklärt sich in der Kinetik des Freisetzens potentiell komplementärer Einzelstrangbereiche), bei größerer Entfernung (215 kb) war sie etwas reduziert auf 43%. Die Autoren schlossen aus ihren Daten, dass es keine ausgeprägte Territorialstruktur der Chromosomen in Hefe gibt und die gebrochenen Enden das gesamte Genom uneingeschränkt nach homologen Partnern absuchen können. Die Diskrepanz zu Beobachtungen früherer Studien, in denen spontane mitotische Rekombination bevorzugt intrachromosomal erfolgte (Lichten und Haber, 1989; Jinks-Robertson *et al.*, 1993), erklärten sie unter anderem durch die Möglichkeit, dass gebrochene Enden zu speziellen Reparaturstellen im Kern gebracht werden können, an denen SSA stattfinden kann.

Um die widersprüchlichen Ergebnisse erklären zu können, ist es notwendig, die methodischen Unterschiede der beiden Ansätze gegenüberzustellen. Ein Faktor ist die Art und Weise, wie die Aberrationen jeweils erzeugt wurden: Im zuerst beschriebenen System der Bruchpunkt-Kartierung in strahleninduzierten Translokationen wurde die Hefe γ -bestrahlt und somit

Strangbrüche induziert. Dabei sind die Orte der DSB zufällig im Genom verteilt, ohne dass die Stelle vorher festzulegen ist. Die Häufigkeit der DSB pro chromosomalem Molekül ist direkt proportional zur entsprechenden Moleküllänge (Friedl *et al.*, 1993; Kraxenberger *et al.*, 1994). Wenn bei der Reparatur der DSB eine Endenfehlverknüpfung stattfindet, kommt es zu einer Austauschaberration. Nachdem die Aberrationen in diesem Ansatz ungerichtet erzeugt werden, ist die „Ausbeute“ an Translokationen nicht besonders hoch und die Identifizierung von Klonen mit Translokation ist arbeitsintensiv (der Identifizierung der hier verwendeten translozierten Klone lag in Vorarbeiten eine Karyotypisierung und Untersuchung von immerhin 2000 Klonen zugrunde). Großer Vorteil dieser sehr aufwändigen Methode zur Generierung von Translokationen ist jedoch, dass die Untersuchungsergebnisse sozusagen „unverfälscht“ sind, d.h. ohne den möglichen Einfluss einer Veränderung, die die Generierung und/oder Identifizierung von Translokationen erleichtert. Im zweiten beschriebenen System der Endonuklease-induzierten Brüche wurden die Aberrationen gerichtet erzeugt, was zu einem wesentlichen Anstieg der Wahrscheinlichkeit der Translokationsbildung führt. Ort und Anzahl der DSB konnten hier gezielt ausgewählt werden, indem an der zu brechenden Stelle eine *HOcs*-Erkennungssequenz eingefügt wurde und durch Induktion des sequenzspezifischen Enzyms HO-Endonuklease ein Bruch gesetzt wurde. Die freien HO-Enden, die bei Verknüpfung zu Austauschaberrationen führen können, sind mit einer Halbwertszeit von über einer Stunde relativ stabil (Frank-Vaillant und Marcand, 2002). Die Frage ist, ob die verschiedene Art und Weise der Erzeugung der Aberrationen einen Einfluss auf die Unterschiedlichkeit der Versuchsergebnisse hat. Die Voraussetzung für Fehlvknüpfungen ist jeweils physikalische Nähe der interagierenden Bruchorte. Vor ihrer Verknüpfung können die Bruchorte allerdings unterschiedliche Enden aufweisen, was sich z.B. auf die Dauer des Reparaturvorganges auswirken kann: Möglicherweise müssen die mit γ -Strahlung gebrochenen Enden vor Ligation erst prozessiert werden, während die genau aufeinander passenden HO-Enden sich ohne Veränderung verbinden können. Es ist nicht auszuschließen, dass sich aufgrund von Unterschieden in den endenbindenden Proteinen Unterschiede im Verhalten der Bruchenden ergeben.

Dies betrifft auch die Art der Reparatur, mit dessen Hilfe die DSB religiert werden. In beiden Systemen muss letztendlich die Reparatur über nichthomologe Endverknüpfung erfolgen, für die, im Gegensatz zu homologer Reparatur bzw. Einstrangverknüpfung, keine umfassenden

Homologien zwischen den gebrochenen Enden und daher auch keine genomweite Homologiesuche erforderlich sind. Die Limitierung auf Reparatur über NHEJ ist allerdings durch verschiedene Ursachen bedingt: Im ersten System wurden die Gene *RAD52* bzw. *RAD54* inaktiviert, so dass keine HR bzw. SSA stattfinden kann (siehe auch Einleitung I.1. und I.3.2.). Im zweiten System wurden die Zielgene, in die *HOcs* eingesetzt wurde, als einmalige Chromosomenbereiche ausgewählt, um ebenfalls eine mögliche HR zu verhindern. Damit kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass initial Homologiesuch-Bewegungen stattfinden. Allerdings argumentieren Frank-Vaillant und Marcand (2002) anhand ihrer Experimente für HO-induzierte DSB, dass unprozessierte komplementäre Enden in Hefe – unabhängig von der Möglichkeit einer HR-Reparatur – durch NHEJ verknüpft werden und nur 5'-prozessierte Enden für die HR „übrig gelassen“ werden. Andererseits beobachten Lisby und Mitarbeiter (2001) *RAD52*-Akkumulationen auch an HO-induzierten DSB (siehe unten).

Über das Ausmaß von DNA-Bewegungen im Zuge von Homologiesuche ist bislang nichts bekannt. Bezüglich sonstiger Bewegungen von DNA-Enden ist entweder eine ungerichtete Chromatinbewegung vorstellbar, bei der sich die Reparaturpartner zufällig irgendwo im Zellkern treffen, oder aber ein gezielter Transport zu einer Art „Reparaturfabrik“, an dem möglicherweise über den weiteren Reparaturweg entschieden wird. Die Beweglichkeit von ungeschädigten Chromosomenregionen wurde in mikroskopischen Lebendzellbeobachtungen untersucht. Marshall und Mitarbeiter beobachteten in Hefe diffuse Bewegungen GFP-markierter Chromatinbereiche mit einem eingeschränkten Radius von 0,3 μm , die am besten durch Brown'sche Molekularbewegungen erklärt werden können (Marshall *et al.*, 1997). Sie waren unabhängig von einem aktiven Metabolismus und die Einschränkung des Bewegungsradius war wohl auf Mikrotubuli zurückzuführen. Die Autoren schlugen daraufhin ein Modell vor, das Chromosomen in eine immobile Superstruktur mit Domänen mit begrenzten Bewegungsmöglichkeiten unterteilt, wobei sich die Bewegungsradien zweier chromosomaler Loci für eine Interaktion überlappen müssen. Gemessen am Zellkerndurchmesser von nur ungefähr 2 μm in haploider Hefe (Heun *et al.*, 2001a) sind Radien von 0,3 μm zwar relativ groß, allerdings wurde hier die Bewegung eines Zentromer-nahen Bereiches ermittelt, der aufgrund der Rabl-ähnlichen Zellkernarchitektur ohnehin eine geringe Beweglichkeit zeigen sollte. Tatsächlich konnte Heun und Mitarbeiter eine wesentlich größere Mobilität

GFP-markierter Chromatinbereiche in Hefezellen der G1-Phase ausmachen (Heun *et al.*, 2001a und b). Im interstitiellen Chromosomenbereich wurde eine Bewegungsschnelligkeit von über 0,5 μm in 3-10 sec beobachtet, die ATP-abhängig und Mikrotubuli-unabhängig war. Dies entspricht bereits der Hälfte des Kernradius und einer Distanz von etwa 100 kb gefalteten Chromatin (Gasser, 2002). Im Gegensatz dazu zeigten Telomer- und Zentromer-nahe Bereiche einen reduzierten Bewegungsraum – entsprechend der Arbeit von Marshall und Mitarbeitern. Diese Reduzierung ist wohl auf die Anheftung der Telomere an der Kernmembran und der Zentromere an den *spindle pole body* zurückzuführen, die in der Rabl-ähnlichen Struktur zu finden ist. Die Daten führten die Autoren zu dem Schluss, dass die Chromatinbewegungen zur Regulation makromolekularer Interaktionen beitragen.

In einer neueren Arbeit gelang es Lisby und Mitarbeitern, in Hefe die Mobilität der Bruchenden zweier gleichzeitig induzierter DSB *in vivo* mittels Fluoreszenzmarkierung zu beobachten (Lisby *et al.*, 2003). Für die DSB-Induktion wurden auf nichthomologen Chromosomen die beiden verschiedenen Endonukleaseschnittstellen *HOcs* und *I-SceIcs* eingesetzt, und es wurde jeweils ein flankierender Bereich der DSB mit einer Spektralvariante von GFP (YFP und RFP) markiert, so dass die DSB-Positionen (bzw. je ein Bruchende) im Zellkern durch zwei verschiedenfarbige Foci gekennzeichnet sind. Nach simultaner Bruchinduktion konnte bei einer Zentromer-nahen Lage von beiden Brüchen bei 48% der Zellen eine Ko-lokalisierung der Enden beobachtet werden, lag ein Bruch Zentromer-nah und der andere Telomer-nah war die Häufigkeit der Ko-lokalisierung etwas reduziert auf 38%. Gleichzeitig ko-lokalisieren die Bruchenden fast immer mit einem *Rad52*-Focus, und zwar unabhängig davon, ob auch eine DSB-Reparatur durch HR möglich gewesen wäre (also in haploiden und in diploiden Zellen). Eine Bildung von zwei *Rad52*-Foci, bei denen der eine mit den *HOcs*-Bruchenden und der andere mit den *I-SceIcs*-Bruchenden ko-lokalisierte, war nach Bruchinduktion bei nur etwa 11 % der Zellen zu finden. Auch nach Erzeugung einer hohen Anzahl an DSB durch γ -Strahlung (ca. 80) beobachteten die Autoren, dass sich nur ein bzw. zwei *Rad52*-Foci pro Zelle bildeten. Diese Daten lassen sich mit der Annahme erklären, dass die *Rad52*-Foci „Reparaturzentren“ darstellen, die jeweils für die Reparatur einer Vielzahl von Brüchen zuständig sind.

Es liegt nahe, dass in diesen „Reparaturfabriken“ über das weitere „Schicksal“ der Bruchenden entschieden wird. Bei einer Reparatur von zwei (oder mehr) DSB wären innerhalb einer einzigen „Fabrik“ Fehlverknüpfungen der Enden von 50% anzunehmen, wie sie im zweiten System der Endonuklease-induzierten Brüche beobachtet wurden. Erst bei der Existenz von zwei oder mehr „Fabriken“ wäre maßgeblich entscheidend, zu welcher – unter Umständen näher liegenden – „Fabrik“ die Bruchenden rekrutiert werden, so dass auf diese Weise ein Einfluss der Kernarchitektur möglicherweise in verdeckter Form zum Tragen kommen kann.

Da auch die Enden von DSB, die nicht durch HR repariert werden können, mit *Rad52*-Foci ko-lokalisieren, könnte ein Fehlen von *RAD52* (und anderen HR-Faktoren) möglicherweise die Ausbildung von „Reparaturfabriken“ oder den Transport zu diesen beeinträchtigen. Dies könnte erklären, warum im System der strahleninduzierten Translokationen in *rad52*- bzw. *rad54*-Mutanten ein Einfluss der Kernarchitektur zu beobachten war. Um diese Hypothese zu testen, müssten die Untersuchungen zu den Endonuklease-induzierten DSB in *rad52/rad54*-Mutanten wiederholt werden, wozu in den konstruierten HO-Stämmen der entsprechende Locus entfernt werden müsste. In ähnlicher Weise kann in diesem Zusammenhang der von Burgess und Kleckner (1999) mittels *Cre/loxP*-Rekombination gezeigte Einfluss des Zentromerabstandes auf die Wahrscheinlichkeit intermolekularer Kollisionen dadurch erklärt werden, dass die Intermediate der *Cre/loxP*-Rekombination nie als freie Enden und damit als zu reparierende DSB erkannt werden.

ÜBERTRAGBARKEIT DER DATEN AUF DAS SÄUGERZELLSYSTEM

Im Zellkern der Hefe ist eine hohe Beweglichkeit interstitieller Chromatinbereiche zu beobachten (Heun *et al.*, 2001a und b), außerdem ist nach einer DSB-Induktion eine hohe Mobilität der Chromosomenenden zu finden. Dies korreliert mit der Organisation von Hefechromosomen, bei welcher offenbar die 30 nm-Fiber die höchste Organisationsstufe darstellt (Ostashevsky, 1998; Ostashevsky, 2002). Die 30 nm-Fiber könnte das Kernvolumen – zwischen den Anheftungspunkten an Zentromer und Telomer – mehr oder weniger „lose“ durchspannen (Ostashevsky, 2002). Im Gegensatz dazu sind bei Säugerzellen die

Chromosomen strukturell höher organisiert, z.B. durch Schleifen/*loops* der 30 nm-Fiber (Ostashevsky, 1998), und sie nehmen distinkte Territorien ein (Übersicht u.a. bei Chevret *et al.*, 2000; Leitch *et al.*, 2000; Cremer und Cremer, 2001; Parada und Misteli, 2002; Spector, 2003). Eine hohe Mobilität größerer Chromatinbereiche konnte in Säugerzellen bislang nicht beobachtet werden (Shelby *et al.*, 1996; Abney *et al.*, 1997; Zink *et al.*, 1998; Chubb *et al.*, 2002; Lucas und Cervantes, 2002); auch die Lokalisierung der Chromosomenterritorien (CT) bleibt während der Interphase mit einem Bewegungsradius von etwa 0,5-1 μm relativ stabil (Walter *et al.*, 2003). Innerhalb dieses Radius könnte in haploider Hefe der ganze Zellkern durchquert werden, aber im Kernvolumen einer Säugerzelle kommt er einer Immobilität gleich. Aufgrund der CT-Organisation und -Immobilität lässt sich bezüglich der Verbindung gebrochener DNA-Enden annehmen, dass die Möglichkeit einer interchromosomalen Fehlverknüpfung – falls keine weitreichende Mobilität gebrochener Enden möglich ist – auf diejenigen DSB begrenzt ist, die an oder nahe einer Grenzzone liegen (die durch die umhüllenden Oberflächen von zwei oder mehr benachbarten CTs gebildet wird) und in der nichthomologe Endverknüpfung stattfinden kann. Die Wahrscheinlichkeit einer Translokation würde also vor allem von den Nachbarschaftsbeziehungen bzw. den Oberflächenarealen der CTs in der Interphase abhängen und wäre bei nicht-benachbarten CTs reduziert (Übersicht bei Cremer *et al.*, 1996).

Von der Hefe bis hin zu Säugerzellen scheint die Rekrutierung von zuvor diffus im Zellkern verteilten Rekombinations- und *checkpoint*-Proteinen in sub-nukleäre Foci als Antwort auf DNA-Schäden evolutionär konserviert zu sein (Liu *et al.*, 1999; Essers *et al.*, 2002). Die Frage ist daher, ob die Reparaturproteine in Säugerzellen ebenfalls als „Fabrik“ organisiert sein könnten, wie es für Hefe von Lisby und Mitarbeiter (2003) postuliert wurde (analog beispielsweise zu den „Replikationsfabriken“ in Säugerzellen; Leonhardt *et al.*, 2000), oder ob sich die beobachteten Foci am Schadensort selbst bilden. Eine der ersten messbaren Antworten der Säugerzelle auf DSB-Induktion ist die Markierung der Bruchregion durch Phosphorylierung des Histons H2AX zum so genannten γ -H2AX (Rogakou *et al.*, 1999; Paull *et al.*, 2000). Die γ -H2AX-Foci können nach Bestrahlung innerhalb weniger Minuten mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Nach einer sorgfältigen Bestimmung der Foci sowie der Korrelation mit Daten aus DSB-Messung mittels PFGE zeigte sich, dass die Anzahl der γ -H2AX-Foci kurz nach Bestrahlung mit der Anzahl erwarteter DSB sehr gut

korreliert (Rothkamm und Löbrich, 2003). Zusätzlich wurde beobachtet, dass verschiedene Proteinfoci mit den γ -H2AX-Foci ko-lokalisieren, wie etwa das Protein 53BP1 (Schultz *et al.*, 2000) oder die Reparaturproteine Rad51 und Rad52 (z.B. Rogakou *et al.*, 1999; Paull *et al.*, 2000). Dies würde eher für ein vor-Ort-assembly der Reparaturproteine am beschädigten Chromatin sprechen. Da die Sichtbarmachung der γ -H2AX-Foci mittels Antikörper aber an fixierten Zellen erfolgen muss, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in dem Zeitraum bis zur Focusdetektion nicht schon mehrere kleine „Foci“ zu dem später beobachteten verschmolzen sind, wie man es im Falle eines Zusammenführens mehrerer gebrochener Regionen in einer „Reparaturfabrik“ erwarten würde. Auch die Untersuchung von Aten und Mitarbeiter (Aten *et al.*, 2004) deutet auf eine mögliche Bildung von „Fabriken“ hin: Nach Erzeugung von linearen DSB-tracks mit Hilfe von α -Strahlen beobachteten sie nach 15 min (ansteigend bis über 60 min) eine Kongregation von γ -H2AX-Foci in kleine cluster, verschmolzen hauptsächlich in der G₁-Phase.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus Säuger- und Hefezellen sollte berücksichtigt werden, dass die Messungen bislang bei unterschiedlicher Schadensdichte erfolgten. Lisby und Mitarbeiter beobachteten eine geringe Anzahl von RAD52-Foci nach einer γ -Bestrahlung von Hefe mit Dosen, die etwa 80 DSB pro Zellkern induzieren, und schlossen daher auf deren Funktion als „Reparaturfabrik“. Würde man in Säugerzellen die gleiche Anzahl an DSB induzieren, wäre die Schadensdichte aufgrund der verschiedenen Zellkernvolumina ($11 \mu\text{m}^3$ in Hefe, mindestens $100 \mu\text{m}^3$ in Säugerzellen; Ostashevsky, 1998) mindestens zehnmal geringer. Genaue Foci-Messungen in Säugerzellexperimenten erfolgten aber meist nur mit Dosen von etwa einem Gy. Dies entspricht etwa 35 DSB pro Säugerzellkern, das heißt, dass pro $3 \mu\text{m}^3$ nur ein DSB vorliegt – eine Schadensdichte, die mit vier DSB pro Hefezellkern korreliert und bei der in Hefe lediglich eine „Reparaturfabrik“ beobachtet werden konnte (Lisby *et al.*, 2003). Unter der Annahme, dass eine „Reparaturfabrik“ für ein bestimmtes Einzugsgebiet zuständig ist, ist möglicherweise die Schadensdichte bei den „Foci-Messungen“ in Säugerzellen nicht ausreichend, um Hinweise auf „Reparaturfabriken“ zu finden.

Eine Möglichkeit zur Klärung dieser Frage wäre, wenn ähnliche Experimente wie sie von Lisby und Mitarbeiter (2003) in Hefe erfolgten, in Säugerzellen durchgeführt würden. Als ersten Schritt in diese Richtung kann man die Studie von Richardson und Jasin (2000)

ansetzen, die zwei I-SceI-Schnittstellen (deren Lokalisation allerdings nicht fluoreszenzmarkiert wurde) ins Genom von embryonalen Mausstammzellen einsetzen. Sie stellten fest, dass es nach Bruchinduktion auf zwei verschiedenen Chromosomen häufig zu reziproken Translokations-Ereignissen kommt, was impliziert, dass sich die gebrochenen Enden in einer „Reparaturfabrik“ getroffen haben könnten.

Dennoch bleibt bei allen Überlegungen zu beachten, dass man in Säugierzellen – im Vergleich zur Hefe – aufgrund des wesentlich größeren Kernvolumens und Genomumfangs auch mit einer wesentlich größeren maximalen Anzahl an „Reparaturfabriken“ rechnen könnte. Folglich wäre dabei für die Wahrscheinlichkeit einer Endenfehlverknüpfung von entscheidender Bedeutung, zu *welcher* „Fabrik“ die gebrochenen Enden rekrutiert werden und ob dabei die räumlich nächstgelegene aufgesucht wird. Das Konzept von „Reparaturfabriken“ mit bestimmten Einzugsbereichen würde also in Säugierzellen in keinem direkten Widerspruch zu einem Einfluss der Kernarchitektur auf die Aberrationsentstehung stehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entstehung struktureller Chromosomenaberrationen in somatischen Zellen ist von besonderem biologischem Interesse, da Aberrationen mit Tumorgenese in Verbindung gebracht werden. Wie wir heute wissen, sind strukturelle Chromosomenaberrationen die Folge fehlerhafter Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur, wobei im einfachsten Fall die Enden von zwei (oder mehr) Bruchstellen durch so genannte nichthomologe Endverknüpfung in falscher Kombination verknüpft werden. Bis heute ist jedoch unklar, inwieweit die Kernarchitektur – das heißt die Positionierung der Chromosomen im Zellkern – die Wahrscheinlichkeit einer Aberrationsentstehung beeinflusst.

Um Hinweise über den Einfluss der Kernarchitektur auf die Entstehung von Austauschaberrationen zu gewinnen, bietet es sich an, Untersuchungen in einem Modellorganismus mit vergleichbar geringer Komplexität durchzuführen. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist dazu sehr geeignet, da die Kernarchitektur in diesem Organismus recht gut charakterisiert ist. Die Interphasechromosomen der Hefe nehmen eine Rabl-ähnliche Konfiguration ein, bei der alle Zentromere in der Nähe der Zellkernperipherie in einer Rosettenstruktur als *cluster* angeordnet sind, und die in mehreren *clustern* vorliegenden Telomere präferentiell am gegenüberliegenden Pol an der Kernmembran verankert sind. Die Wahrscheinlichkeit interchromosomaler Interaktionen sollte daher im Bereich der Zentromere und Telomere am höchsten sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Zellkernarchitektur auf die Aberrationsentstehung in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen in Hefe untersucht. Im ersten Ansatz wurde eine Kartierung von Translokations-Bruchpunkten durchgeführt, um anhand des Verteilungsmusters Aussagen über die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Austauschaberrationen machen zu können. Dazu stand aus Vorarbeiten eine Kollektion von 16 Klonen Rekombinations-defizienter Hefestämme (*rad52*- bzw. *rad54*-Mutanten) zur Verfügung, die strahleninduzierte strukturelle Chromosomenaberrationen tragen (mit insgesamt 35 beteiligten Chromosomen). Die Chromosomen V und VIII waren bei diesen Klonen an der Ausbildung

strahleninduzierter Aberrationen häufiger beteiligt, als aufgrund ihrer Länge zu erwarten war, ohne dass hierfür ein Grund ausgemacht werden konnte. Die Bruchpunkte auf den Chromosomen V und VIII, sowie ihren jeweiligen Translokationspartnern, wurden mit Hilfe zwei verschiedener Methoden kartiert, die jeweils auf den Nachweis der An- und Abwesenheit spezifischer Sequenzbereiche (Sonden) auf den aberranten chromosomalen Banden abzielten. Dabei zeigte sich, dass von den insgesamt 17 kartierten Bruchpunkten sieben Zentromer-nah (bis zu 100 kb vom Zentromer entfernt), drei Telomer-nah (bis zu 12 kb vom Telomer entfernt) und sieben in der interstitiellen Region liegen. Bruchpunkte in der interstitiellen Region zeigten sich also signifikant unterrepräsentiert, so dass hier auf einen Einfluss der Zellkernarchitektur auf die Aberrationsentstehung zu schließen ist.

Im zweiten experimentellen Ansatz wurde ein Modellsystem in Hefe entwickelt, mit dem sich der Einfluss der initialen Position von DSB auf die Entstehungswahrscheinlichkeit interchromosomaler Fehlverknüpfung systematisch untersuchen lässt. Dazu wurde eine Serie von Hefestämmen hergestellt, in denen gleichzeitig jeweils zwei DSB enzymatisch mittels HO-Endonuklease induziert werden können. Die entsprechenden Enzymschnittstellen (*HOcs*) wurden dabei an verschiedenen chromosomalen Positionen eingesetzt, die aufgrund ihrer Entfernung zu Zentromer und/oder Telomer im Falle eines Kernarchitektureinflusses unterschiedliche Interaktionswahrscheinlichkeiten haben sollten. Nach DSB-Induktion sowie Reparatur wurde mittels PCR-Analyse untersucht, wie häufig es in den einzelnen Stämmen im Zuge der Reparatur zu einer Fehlverknüpfung der Enden gekommen war. Dabei konnte gezeigt werden, dass die intra- und intermolekulare Verknüpfung bei der Reparatur in allen getesteten Bruchort-Konstellationen etwa gleich häufig war, d.h. es wurde kein Einfluss der Kernarchitektur auf die Aberrationsentstehung festgestellt. Dieses Ergebnis passt gut zu Befunden einer neueren Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass sich nach Induktion multipler DSB nur wenige *RAD52*-Foci im Zellkern bilden, die als Reparaturzentren/„-fabriken“ erklärt werden. Entsprechend diesem Modell können damit auch initial weiter voneinander entfernte DSB zu Austauschaberrationen führen, da die jeweiligen Enden in den wenigen „Fabriken“ zusammentreffen können. Als Ursache für die in beiden Systemen erzielten unterschiedlichen Ergebnisse könnten also entweder die unterschiedlichen genetischen Hintergründe (Rekombinations-defizient im Vergleich zu

Rekombinations-profizient) oder die unterschiedliche Struktur der Bruchenden (strahlen-induziert im Vergleich zu Endonuklease-induziert) in Betracht kommen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abney J.R., Cutler B., Fillbacj M.L., Axelrod D., Scalettar B.A. (1997): Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implications for nuclear structure; *Journal of Cell Biology*, 137: 1459-1468
- Ahne F., Jha B., Eckardt-Schupp F. (1997): The RAD5 gene product is involved in the avoidance of non-homologous end-joining of DNA double strand breaks in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *Nucleic Acids Research*, 25(4): 743-749
- Aragón-Alcaide L. and Strunnikov A.V. (2000): Functional dissection of *in vivo* interchromosome association in *Saccharomyces cerevisiae*; *Nature Cell Biology*, 2: 812-818
- Aten J.A., Stap J. Krawczyk P.M., van Oven C.H., Hoebe R.A., Essers J., Kanaar R. (2004): Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains; *Science*, 303: 92-95
- Aylon Y., Liefshitz B., Bitan-Banin G., Kupiec M. (2003): Molecular dissection of mitotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *Molecular and Cellular Biology*, 23: 1403-1427
- Balmain A., Gray J., Ponder B. (2003): The genetics and genomics of cancer; *Nature Genetics*, 33: 238-244
- Bishop A.J.R. and Schiestl R.H. (2002): Homologous recombination and its role in carcinogenesis; *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2(2): 75-85
- Boei J.J., Vermeulen S., Natarajan A.T. (1997): Differential involvement of chromosomes 1 und 4 in the formation of chromosomal aberration in human lymphocytes after X-irradiation; *International Journal of Radiation Biology*, 72: 139-145
- Bonassi S., Hagmar L., Stromberg U., Montagud A.H., Tinnerberg H., Forni A., Heikkila P., Wanders S., Wilhardt P., Hansteen I.-L., Knudson L.E., Norppa H. (2000): Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens; *Cancer Research*, 60: 1619-1625

- van den Bosch M., Lohman P.H., Pastink A. (2002): DNA double-strand break repair by homologous recombination; *Biological Chemistry* 383(6): 873-892
- Boyle S., Gilchrist S., Bridger J.M., Mahy N.L., Ellis J.A., Bickmore W.A. (2001): The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells; *Human Molecular Genetics*, 10: 211-219
- Bressnan D.A., Baxter B.K., Petrini J.H.J. (1999): The Mre11 – Rad50 – Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*; *Molecular and Cellular Biology*, 19: 7681-7687
- Bryant P.E. (1988): Use of restriction endonucleases to study relationships between DNA double-strand breaks, chromosomal aberrations and other end-points in mammalian cells; *International Journal of Radiation Biology*, 54(6): 869-890
- Burgess S.M. (2002): Homologous chromosome associations and nuclear order in meiotic and mitotically dividing cells of budding yeast; *Advances in Genetics*, 46: 49-90
- Burgess S.M. and Kleckner N. (1999): Collisions between yeast chromosomal loci *in vivo* are governed by three layers of organization; *Genes & Development*, 13: 1871-1883
- Cherry J.M., Ball C., Weng S., Juvik G., Schmidt R., Adler C., Dunn B., Dwight S., Riles L., Mortimer R.K., Botstein D. (1997): Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*; *Nature*, 387(6632 Suppl): 67-73
- Chevret E., Volpi E.V., Sheer D. (2000): Mini review: form and function in the human interphase chromosome; *Cytogenetics and Cell Genetics*, 90(1-2): 13-21
- Chu G. (1997): Double strand break repair; *Journal of Biological Chemistry*, 272(39): 24097-24100
- Chubb J.R., Boyle S., Perry P., Bickmore W.A. (2002): Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells; *Current Biology*, 19: 439-445
- Conley E.C., Saunders V.A., Saunders J.R. (1986): Deletion and rearrangement of plasmid DNA during transformation of *Escherichia coli* with linear plasmid molecules; *Nucleic Acids Research*, 14(22): 8905-8917

-
- Cornforth M.N., Greulich-Bode K.M., Loucas B.D., Arsuaga J., Vázquez M., Sachs R.K., Brückner M., Molls M., Hahnfeldt P., Hlatky L., Brenner D.J. (2002): Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells; *Journal of Cell Biology*, 159(2): 237-244
- Cremer T. and Cremer C. (2001): Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells; *Nature Reviews Genetics*, 2: 292-301
- Cremer T., Cremer C., Baumann H., Luedtke E.-K., Sperling K., Teuber V., Zorn C. (1982): Rabl's model of interphase chromosome arrangement tested in chinese hamster cells by premature chromatin condensation and laser UV microbeam analysis; *Human Genetics*, 60: 46-56
- Cremer M., von Hase J., Volm T., Brero A., Kreth G., Walter J., Fischer C., Solovei I., Cremer C., Cremer T. (2001): Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells; *Chromosome Research*, 9: 541-567
- Cremer C., Münkler Ch., Granzow M., Jauch A., Dietzel S., Eils R., Guan X.-Y., Meltzer P.S., Trent J.M., Langowski J., Cremer T. (1996): Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations; *Mutation Research*, 366: 97-116
- Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W.A. (1999): Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus; *Journal of Cell Biology*, 145: 1119-1131
- Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. (2002): Capturing chromosome conformation; *Science*, 295: 1306-1311
- Dong F.G. and Jiang J.M. (1998): Non-Rabl patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells; *Chromosome Research*, 6: 551-558
- Essers J., Houtsmuller A.B., van Veelen L., Paulusma C., Nigg A.L., Pastink A., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H.J., Kanaar R. (2002): Nuclear dynamics of *RAD52* group homologous recombination proteins in response to DNA damage; *EMBO Journal*, 21(8): 2030-2037
- Fasullo M., Dave P., Rothstein R. (1994): DNA-damaging agents stimulate the formation of directed reciprocal translocations in *Saccharomyces cerevisiae*; *Mutation Research*, 314: 121-133

- Featherstone C. and Jackson S.P. (1999): Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions; *Mutation Research*, 434(1): 3-15
- Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity; *Analytical Biochemistry*, 132: 6-13
- Fellerhoff B. (1999): Die Rolle des HDF1-Gens für die Stabilität des Hefegenoms; Dissertation
- Ferreira J., Paoletta G., Ramos C., Lamond A.I. (1997): Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories; *Journal of Cell Biology*, 139: 1597-1610
- Fishman-Lobell J., Rudin N., Haber J.E. (1992): Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated; *Molecular and Cellular Biology*, 12(3): 1292-1303
- Frank-Vaillant M. and Marcand S. (2002): Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination; *Molecular Cell*, 10: 1189-1199
- Friedl A.A. (2002): Ku and the stability of the genome; *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2(2): 61-65
- Friedl A.A. (2003): Topological factors in radiation biology; Aus: Kiefer J.: Radiation research – science for the future; Springer Verlag
- Friedl A.A., Beisker W., Hahn K., Eckardt-Schupp F., Kellerer A.M. (1993): Application of pulsed field gel electrophoresis to determine γ -ray-induced double-strand breaks in yeast chromosomal molecules; *International Journal of Radiation Biology*, 63: 173-181
- Friedl A.A., Kiechle M., Fellerhoff B., Eckardt-Schupp F. (1998): Radiation-induced chromosome aberrations in *Saccharomyces cerevisiae*: influence of DNA repair pathways; *Genetics*, 148: 975-988
- Gasser S.M. (2000): A sense of the end; *Science*, 288: 1377-1379
- Gasser S.M. (2002): Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei; *Science*, 296: 1412-1416

-
- Geigl E.M. and Eckardt-Schupp F. (1990): Chromosome-specific identification and quantification of S1 nuclease-sensitive sites in yeast chromatin by pulsed field gel electrophoresis; *Molecular Microbiology*, 4: 801-810
- van Gent D.C., Hoeijmakers J.H.J, Kanaar R. (2001): Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection; *Nature*, 2: 196-206
- Goedecke W., Pfeiffer P., Vielmetter W. (1994): Nonhomologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe* efficiently eliminates DNA double-strand-breaks from haploid sequences; *Nucleic Acids Research*, 22(11): 2094-2101
- Goh P.Y. and Kilmartin J.V. (1993): *NDC10*: A gene involved in chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*; *Journal of Cell Biology* 121: 503-512
- Gotta M., Laroche T., Formenton A., Maillet L., Scherthan H., Gasser S.M. (1996): The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*; *Journal of Cell Biology*, 134: 1349-1363
- Guacci V., Hogan E., Koshland D. (1994): Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast; *Journal of Cell Biology* 125: 517-530
- Guacci V., Hogan E., Koshland D. (1997): Centromere position in budding yeast: evidence for anaphase A; *Molecular Biology of the Cell*, 8: 957-972
- Haaf T., Golub E.I., Reddy G., Radding C.M., Ward D.C. (1995): Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes; *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 92: 2298-2302
- Haber J.E. (1998): Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*; *Annual Review of Genetics*, 32: 561-599
- Haber J.E. (2002): Uses and abuses of HO endonuclease; *Methods of Enzymology*, 350: 141-164
- Haber J.E. and Leung W.Y. (1996): Lack of chromosomal territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends; *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 93: 13949-13954

- Hagmar L., Bonassi S. Stromberg U., Brøgger A., Knudsen L.E., Norppa H., Reuterwall C. (1998): Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH); *Cancer Research*, 58(18): 4117-4121
- Hertle M. (2003): Untersuchung des Einflusses der Kernarchitektur in Hefe auf die Entstehung von Austauschaberrationen; Diplomarbeit
- Heun P., Laroche T., Shimada K., Furrer P., Gasser, S.M. (2001a): Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus; *Science*, 294: 2181-2186
- Heun P., Taddei A., Gasser S.M. (2001b): From snapshots to moving pictures: new perspectives on nuclear organization; *Trends in Cell Biology*, 11: 519-525
- Hoffman C.S. and Winston F. (1997): A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*; *Gene*, 57: 267-272
- Inbar O. and Kupiec M. (1999): Homology search and choice of homologous partner during mitotic recombination; *Molecular and Cellular Biology*, 19: 4134-4142
- Ivanov E.L. and Haber J.E. (1995): RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*; *Molecular and Cellular Biology*, 15: 2245-2251
- Jackson S.P. (2002): Sensing and repairing DNA double-strand breaks; *Carcinogenesis*, 23: 687-696
- Jin Q.-W., Fuchs J., Loidl J. (2000): Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization; *Journal of Cell Science*, 113: 1903-1912
- Jin Q.-W., Trelles-Sticken E., Scherthan H. Loidl J. (1998): Yeast nuclei display prominent centromere clustering that is reduced in nondividing cells and in meiotic prophase; *Journal of Cell Biology*, 141: 21-29
- Jinks-Robertson S., Michelitch M., Ramcharan S. (1993): Substrate length requirements for efficient mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*; *Molecular and Cellular Biology*, 13: 3937-3950

-
- Johnson R.D. and Jasin M. (2000): Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells; *EMBO Journal*, 19(13): 3398-3407
- Kanaar R., Hoeijmakers J.H.J, van Gent D.C. (1998): Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair; *Cell Biology*, 8: 483-489
- King J.S., Valcarcel E.R., Rufer J.T., Phillips J.W., Morgan W.F. (1993): Noncomplementary DNA double-strand-break rejoining in bacterial and human cells; *Nucleic Acids Research*, 21(5): 1055-1059
- Knehr S., Zitzelsberger H., Braselmann H., Bauchinger M. (1994): Analysis for DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations in various triple combinations of human chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization; *International Journal of Radiation Biology*, 65(6): 683-690
- Knehr S., Zitzelsberger H., Braselmann H., Nahrstedt U., Bauchinger M. (1996): Chromosome analysis by fluorescence *in situ* hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations; *International Journal of Radiation Biology*, 70(4): 385-392
- Kolomietz E., Meyn M.S., Pandita A., Squire J.A. (2002): The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal alterations in tumors; *Genes Chrom. Cancer*, 35: 97-112
- van Komen S., Petukhova G., Sigurdsson S., Stratton S., Sung P. (2000): Superhelicity-driven homologous DNA pairing by yeast recombination factors Rad51 and Rad54; *Molecular Cell*, 6: 563-572
- Kramer K.M., Brock J.A., Bloom K., Moore J.K., Haber J.E. (1994): Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar *RAD52*-independent, nonhomologous recombination events; *Molecular and Cellular Biology*, 14: 1293-1301
- Kraxenberger A., Friedl A.A., Kellerer A.M. (1994): Computer simulation of pulsed-field gel runs allows the quantitation of radiation-induced double-strand breaks in yeast; *Electrophoresis*, 15: 128-136
- Kuzminov A. (2001): DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination; *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 98(15): 8461-8468

- Laroche T, Martin S.G., Tsai-Pflugfelder M, Gasser S.M. (2000): The dynamics of yeast telomeres and silencing proteins through the cell cycle; *Journal of Structural Biology*, 129: 159-174
- Lea D.E. (1946): *Action of radiation on living cells*; Cambridge University Press: 416 pp.
- Lederberg E.M. and Cohen S.N. (1974): Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid; *Journal of Bacteriology*, 119: 1072-1074
- Leitch A.R. (2000): Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells; *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1): 138-152
- Leonhardt H., Rahn H.-P., Weinzierl P., Sporbert A., Cremer T., Zink D., Cardoso M.C. (2000): Dynamics of DNA replication factories in living cells; *Journal of Cell Biology*, 149: 271-279
- Lewis L.K. and Resnick M.A. (2000), Tying up loose ends: non-homologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*; *Mutation Research*, 451(1-2): 71-89
- Lichten M. and Haber J.E. (1989): Position effects in ectopic and allelic mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*; *Genetics*, 123: 261-268
- Lieber M.R. (1999): The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes; *Genes Cells*, 4(2): 77-85
- Lin F.L., Sperle K., Sternberg N. (1984): Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process; *Molecular and Cellular Biology*, 4(6): 1020-1034
- Lin F.L., Sperle K., Sternberg N. (1990): Intermolecular recombination between DNAs introduced into mouse L cells is mediated by a nonconservative pathway that leads to crossover products; *Molecular and Cellular Biology*, 10(1): 103-112
- Lisby M., Mortensen U.H., Rothstein R. (2003): Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre; *Nature Cell Biology*, 5(6): 572-577
- Lisby M., Rothstein R., Mortensen U.H. (2001): Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase; *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 98: 8276-8282

-
- Liu Y., Li M., Lee E.Y., Maizels N. (1999): Localization and dynamic relocalization of mammalian RAD52 during the cell cycle and in response to DNA damage; *Current Biology*, 9(17): 975-978
- Loidl J. (2003): Chromosomes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *International Review of Cytology*, 222: 141-196
- Lucas J.N. and Cervantes E. (2002): Significant large-scale chromosome territory movement occurs as a result of mitosis, but not during interphase; *International Journal of Radiation Biology*, 78: 449-455
- Lukasova E., Kozubek S., Kozubek M., Kjeronska J., Ryznar L., Horakova J., Krahulcova E., Horneck G. (1997): Localization and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia; *Human Genetics*, 100: 525-535
- Manivasakam P. and Schiestl R.H. (1998): Nonhomologous end joining during restriction enzyme-mediated DNA integration in *Saccharomyces cerevisiae*; *Molecular and Cellular Biology*, 18: 1736-1745
- Marshall W.F., Straight A., Marko J.F., Swedlow J., Dernburg A., Belmont A., Murray A.W., Agard D.A., Sedat J.W. (1997): Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells; *Current Biology*, 7: 930-939
- Mazin A.V., Zaitseva E., Sung P., Kowalczykowski S.C. (2000): Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing; *EMBO Journal*, 19: 1148-1156
- McDonald J.P., Levine A.S., Woodgate R. (1997): The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD30* gene, a homologue of *Escherichia coli* *dinB* and *umuC*, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism; *Genetics*, 147: 1557-1568
- McEachern, M.J., Krauskopf A., Blackburn E.H. (2000): Telomeres and their control; *Annual Reviews of Genetics*, 34: 331-358
- Mezard C. and Nicolas A. (1994): Homologous, homeologous, and illegitimate repair of double-strand breaks during transformation of a wild-type strain and a *rad52* mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*; *Molecular Cell Biology*, 14(2): 1278-1292

- Mezard C., Pompon D., Nicolas A. (1992): Recombination between similar but not identical DNA sequences during yeast transformation occurs within short stretches of identity; *Cell*, 70(4): 659-670
- Mirzoeva O.K and Petrini J.H. (2001): DNA damage-dependent nuclear dynamics of the mre11 complex; *Molecular and Cellular Biology*, 21: 281-288
- Moore J.K. and Haber J.E. (1996): Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*; *Molecular and Cellular Biology*, 16: 2164-2173
- Muller H.J. (1927): Artificial transmutation of the gene; *Science*, 66: 84-87
- Namsaraev E. and Berg P. (1997): Characterisation of strand exchange activity of yeast Rad51 protein; *Molecular and Cellular Biology*, 17: 5459-5369
- Neves H., Ramos C., da Silva M.G., Parreira A., Parreira L. (1999): The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RAR α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of haematopoietic differentiation; *Blood*, 93: 1197-1207
- Nikiforova M.N., Stringer J.R., Blough R., Medvedovic M., Fagin J.A., Nikiforova Y.E. (2000): Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells; *Science*, 290: 138-141
- Noolandi J. (1992): Polymer dynamics in electrophoresis of DNA; *Annual Review of Physical Chemistry*, 43: 237-256
- Olson M.V. (1991): Genome structure and organisation in *Saccharomyces cerevisiae*; Aus: Broach J.R., Pringle J.R., Jones E.W.: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*; CSHL Press: 1-39
- Ostashevsky J. (1998): A polymer model for the structural organization of chromatin loops and minibands in interphase chromosomes; *Molecular Biology of the Cell*, 9: 3031-3040
- Ostashevsky J. (2002): A polymer model for large-scale chromatin organization in lower eukaryotes; *Molecular Biology of the Cell*, 13: 2157-2169
- Ozenberger B.A. and Roeder G.S. (1991): A unique pathway of double-strand break repair operates in tandemly repeated genes; *Molecular and Cellular Biology*, 11(3): 1222-1231

-
- Pâques F. and Haber J.E. (1999): Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*; *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2): 349-404
- Parada L.A. and Misteli T. (2002): Chromosome positioning in the interphase nucleus; *Trends in Cell Biology*, 12(9): 425-432
- Pastink A., Eeken J.C.J, Lohman P.H.M. (2001): Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks; *Mutation Research*, 480-481: 37-50
- Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kichgessner C.U., Gellert M., Bonner W.M. (2000): A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage; *Current Biology*, 10: 886-895
- Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. (2000): Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations; *Mutagenesis*, 15: 289-302
- Prado F., Cortés-Ledesma F., Huertas P., Aguilera A. (2003): Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*; *Current Genetics*, 42: 185-198
- Pryde F.E., Gorham H.C., Louis E.J. (1997): Chromosome ends: all the same under their caps; *Current Opinion in Genetics & Development*, 7: 822-828
- Pryde F.E. and Louis E.J. (1997): *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. A Review; *Biochemistry (Mosc.)*, 62(11): 1232-1241
- Pryde F.E. and Louis E.J. (1999): Limitations of silencing at native yeast telomeres; *EMBO-Journal*, 18(9): 2538-2550
- Rabl C. (1885): Über Zelltheilung; *Morphologisches Jahrbuch*, 10: 214-330
- Ramsden D.A. and Gellert M (1998): Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks; *EMBO Journal*, 17(2): 609-614
- Richardson C. and Jasin M. (2000): Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks; *Nature*, 105: 697-700

- Richardson C., Moynahan M.E., Jasin M. (1998): Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations; *Genes and Development*, 12: 3831-3842
- Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. (1999): Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*; *Journal of Cell Biology*, 146: 905-915
- Roth D.B. and Gellert M. (2000): New guardians of the genome; *Nature*, 404: 823-835
- Roth D.B., Porter T.N., Wilson J.H. (1985): Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells; *Molecular and Cellular Biology*, 5(10): 2599-22607
- Rothkamm K. and Löbrich M. (2002): Misrepair for radiation-induced DNA double-strand breaks and its relevance for tumorigenesis and cancer treatment; *International Journal of Oncology*, 21(2): 433-440
- Rothkamm K. and Löbrich M. (2003): Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses; *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 100: 5057-5062
- Rothstein R. (1989): Targeting, disruption, replacement and allelic rescue: integrative DNA transformation in yeast; *Methods in Enzymology*, 194: 281-301
- Sachs R.K., Chen A.M., Brenner D.J. (1997): Review: Proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionising radiation; *International Journal of Radiation Biology*, 71: 1-19
- Sachs R.K., Hlatky L.R., Trask B.J. (2000): Radiation-induced chromosome aberration; *Trends in Genetics*, 16(4): 143-146
- Sadoni N., Langer S., Fauth C., Bernardi G., Cremer T., Turner B.A., Zink D. (1999): Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments; *Journal of Cell Biology*, 146: 1211-1226
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase; *Science*, 239: 487-491

-
- Sambrook J. and Russell D.W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual – third edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Savage J.R.K. (1996): Insight into sites; *Mutation Research*, 366: 81-95
- Savage J.R.K. (2000): Proximity matters; *Science*, 290: 62-63
- Scheinert P., Behrens B., Kahle B. (1995): Optimierung von DNA-Amplifikations-Protokollen; *Biospektrum*, 5: 53-63
- Schiestl R.H. and Gietz R.D. (1989): High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier; *Current Genetics*, 16(5-6): 339-346
- Schiestl R.H. and Petes T.D. (1991): Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*; *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 88(17): 7585-7589
- Schild D., Konforti B., Perez C., Gish W., Mortimer R. (1983): Isolation and characterization of yeast repair genes. Cloning of the *RAD52* gene; *Current Genetics*, 7: 85-92
- Schultz L.B., Chehab N.H., Malikzay A., Halazonetis T.D. (2000): p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks; *Journal of Cell Biology*, 151(7): 1381-1390
- Shelby R.D., Hahn K.M., Sullivan K.F. (1996): Dynamic elastic behaviour of α -satellite DNA domains visualized *in situ* in living human cells; *Journal of Cell Biology*, 135: 545-557
- Shinohara A., Ogawa H., Ogawa T. (1992): Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein; *Cell*, 69: 457-470
- Shore, D. (2001): Telomeric chromatin: replicating and wrapping up chromosome ends; *Current Opinion in Genetics & Development*, 11: 189-198
- Siede W., Friedl A.A., Dianova I., Eckardt-Schupp F., Friedberg E.C. (1996): The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination; *Genetics*, 142: 91-102
- Southern E.M. (1974): An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose; *Analytical Biochemistry*, 62: 317-318

- Spector D.L. (2003): The dynamics of chromosome organization and gene regulation; Annual Review of Biochemistry, 72: 573-608
- Sugawara N., Ira G., Haber J.E. (2000): DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair; Molecular and Cellular Biology, 20(14): 5300-5309
- Sugawara N., Pâques F., Colaiacovo M., Haber J.E. (1997): Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination; Proceedings of National Academy of Sciences USA, 94: 9214-9219
- Sugiyama T., New J.H., Kowalczykowski S.C. (1998): DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single stranded DNA; Proceedings of National Academy of Sciences USA, 95: 6049-6054
- Sun H.B., Shen J., Yokota H. (2000): Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei; Biophysical Journal, 79: 184-190
- Sung P., Trujillo K.M., Van Komen S. (2000): Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*; Mutation Research, 451: 257-275
- Symington L.S. (2002): Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair; Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(4): 630-670
- Szostak J.W., Orr-Weaver, Rothstein R.J., Stahl F.W. (1983): The double-strand-break repair model for recombination; Cell, 33: 25-35
- Tanabe H., Habermann F.A., Solovei I., Cremer M., Cremer T. (2002): Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications; Mutation Research, 504: 37-45
- Tashiro S., Walter J., Shinohara A., Kamada N., Cremer T. (2000): Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in post-replicative chromatin; Journal of Cell Biology, 150: 283-291
- Tham W.-H., Wyithe J.S.B., Ferrigno P.K., Silver P.A., Zaikan V.A. (2001): Localization of yeast telomeres to the nuclear periphery is separable from transcriptional repression and telomere stability functions; Molecular Cell, 8: 189-199

-
- Verschure P.J., van der Kraan I., Manders E.M.M., van Driel R. (1999): Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories; *Journal of Cell Biology*, 147(1): 13-24
- Wach A., Brachat A., Pöhlmann R., Philippsen P. (1994): New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*; *Yeast*, 10: 1793-1808
- Walter J., Schmerelleh L., Cremer M., Tashiro S., Cremer T. (2003): Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages; *Journal of Cell Biology*, 160: 685-697
- Weiss K. and Simpson R.T. (1998): High-resolution structural analysis of chromatin at specific loci: *Saccharomyces cerevisiae* silent mating type locus HML α ; *Molecular and Cellular Biology*, 18: 5392-5403
- Wilson J.H., Berget P.B., Pipas J.M. (1982): Somatic cells efficiently join unrelated DNA segments end-to-end; *Molecular Cell Biology*, 2(10): 1258-1269
- Zakian V.A. (1996): Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres; *Annual Reviews of Genetics*, 30: 141-172
- Zickler D. and Kleckner N. (1998): The leptotene-zygotene transition of meiosis; *Annual Review of Genetics*, 32: 619-697
- Zink D., Cremer T., Saffrich R., Fischer R., Trendelenburg M.F., Ansorge W., Stelzer E.H. (1998): Structure and dynamics of human interphase chromosome territories *in vivo*; *Human Genetics*, 102: 241-251

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ **ANHANG**

ABKÜRZUNGEN

A	Ampère
<i>ADE</i>	Adenin
APL	akute Promyelozyten-Leukämie
<i>ARG</i>	Arginin
ARS	<i>autonomously replicating sequence</i>
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CA	Chromosomenaberration
CHEF	<i>clamped homogeneous electric field</i>
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Becquerel)
CML	chronisch myeloische Leukämie
CSPD®	Disodium 3-(4-Methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan}-4-yl)phenylphosphat
CT	Chromosomenterritorien
DAS	stromabwärts gelegene aktivierende Sequenz (= <i>downstream activating sequence</i>)
Dig	Digoxigenin
Dig-11-dUTP	Digoxigenin-11-Desoxyuridintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase
DNase	Desoxyribonuklease
D/R	<i>dicentric/centric ring</i>
ds	stromabwärts der DNA-Sequenz (= <i>downstream</i>)
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Ethidiumbromid

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i>
5-FOA	<i>5-fluoroorotic acid</i>
for/fw	Vorwärts- <i>primer</i>
g	Gramm
GFP	<i>green-fluorescent protein</i>
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
<i>HDF</i>	<i>high affinity DNA-binding factor</i>
<i>HIS</i>	Histidin
<i>HML/HMR</i>	<i>haploid mating left/right</i>
<i>HOcs</i>	<i>HO-endonuklease cleavage site</i>
HR	homologe Rekombination
<i>HSP</i>	<i>high-scoring segment pairs</i>
<i>inc</i>	<i>inconvertible</i>
IR	illegitime Rekombination
kan	Kanamyzin
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
<i>LEU</i>	Leucin
LiAc	Lithium Acetat
LMP	<i>low melting point</i>
log	logarithmisch
m	Meter
μ	micro-
m	milli-
M	Molar
<i>MAT</i>	<i>mating type</i>
mb	Megabasenpaare
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

min	Minute
MW	Molekulargewicht
n	nano-
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblue-Tetrazoliumsalz
NHEJ	nichthomologe Endverknüpfung (= <i>non-homologous end-joining</i>)
NOR	<i>nucleolus organizing region</i>
nt	Nukleotide
O.D.	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Phosphor
p-Wert	Wahrscheinlichkeits (= <i>probability</i>)-Wert
p.a.	pro analysi
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (= <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Plattierungseffizienz
PEG	Polyethylenglycol
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
rev	Rückwärts- <i>primer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCE	Schwesterchromatid-Austausch (= <i>sister chromatid exchange</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat/Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
SEC	Sorbitol/EDTA/Citratphosphat
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
SPB	<i>spindle pole body</i>
ss	Einzelstrang
SSA	Einzelstrangverknüpfung (= <i>single strand annealing</i>)

SSB	DNA-Einzelstrangbruch
SSC	<i>standard saline citrat</i>
stat.	stationär
STR	<i>subtelomeric replicating element</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/HCl/EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
<i>TRP</i>	Tryptophan
Ty	<i>transposon yeast</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UAS	stromaufwärts gelegene aktivierende Sequenz (= <i>upstream activating sequence</i>)
ÜK	Übernachtskultur
us	stromaufwärts der DNA-Sequenz (= <i>upstream</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VM	Vollmedium
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
YIP	<i>yeast integrating plasmid</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	Hefe-Vollmedium (<i>yeast</i> -Extrakt/Pepton/Dextrose)
YPGal	Galaktosemedium
YPGly	Glyzerinmedium
% (v/v)	Volumen- zu Volumenprozent
% (w/v)	Gewichts- zu Volumenprozent
°	Grad
Δ	deletiert

Nukleinsäure-Kode:

<i>A/ADE</i>	Adenin	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
C	Cytosin	dCTP	Desoxycytosintriphosphat
G	Guanin	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
T	Thymin	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>U/URA</i>	Uracil	dUTP	Desoxyuridintriphosphat
N	Nukleotid	dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat

LEBENS LAUF

Name:	Schüssler, Sabine Mathilde
Geburtsdatum:	24.12.1969
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung:	
1976 bis 1980	Grundschule
1980 bis 1989	Neusprachliches Gymnasium mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
Akademischer Werdegang:	
1989 bis 1995	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München Hauptfach Genetik, Nebenfächer Humangenetik und Anthropologie, Biochemie, Pharmakologie und Toxikologie
1994 bis 1995	Diplomandin bei Prof. Dr. Dr. Hofschneider, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
1995	Abschluss als Diplom-Biologin
2000 bis 2003	Doktorandin bei PD Dr. Friedl, Strahlenbiologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gebührt Frau PD Dr. Anna Friedl, die mir als „Doktormutter“ die Möglichkeit zur Promotion eröffnete. Ihre äußerst engagierte Betreuung und ihr Ideenreichtum machten die Arbeit in dieser Form erst möglich. Meinen tiefen Respekt verdient vor allem ihre jederzeitige Bereitschaft, auf all meine Fragen und Vorschläge geduldig einzugehen.

Großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp an der GSF, Institut für Strahlenbiologie, für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe zu arbeiten und an den Seminaren teilzunehmen. Die Diskussionen halfen mir stets weiter.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kellerer für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen, und für sein Interesse an ihrem Fortgang.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Kupiec, Universität Tel Aviv, für die zur Verfügung gestellten Stämme.

Bei den Arbeitskollegen möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken, besonders jedoch bei den Damen des „Mittagsseminars“ Susanne, Reinhild und Marie. Danke für die schöne Zeit und den Spaß, den wir hatten!

Auch bedanken möchte ich mich bei Dr. Michael Alt und Frau Dr. Schlüter, die mich im Laufe meiner Ausbildung sehr unterstützten.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die es mir möglich gemacht haben, diese Arbeit überhaupt durchzuführen und vor allem bei Stefan, ohne den ich mir die letzten Jahre gar nicht hätte vorstellen können (– und danke für's Ausdrucken).