



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und Reaktorsicherheit

SCHRIFTENREIHE REAKTORSICHERHEIT UND STRAHLENSCHUTZ

**DNA-DOPPELSTRANGBRUCHREPARATUR MITTELS
ENDVERKNÜPFUNG UND DIE ENTSTEHUNG
STRAHLENINDUZIERTER CHROMOSOMENABERRATIONEN**

BMU - 2004-637



WIR STEuern UM AUF ERNEUERBARE ENERGIEN.

BMU – 2004-637

**DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels
Endverknüpfung und die Entstehung strahleninduzierter
Chromosomenaberrationen**

PD Dr. A.A. Friedl

IMPRESSUM

Dieser Band enthält einen Abschlussbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BMU übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte an der weiteren Nutzung oder Vervielfältigung des Berichts vor.

Der Bericht wurde vom Strahlenbiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München erstellt.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BMU übereinstimmen.

Herausgeber:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
Arbeitsgruppe RS I 1
Postfach 12 06 29
53048 Bonn

ISSN 1612-6386

Erscheinungsjahr: 2004

Ludwig-Maximilians-Universität München

Strahlenbiologisches Institut

Vorstand: Prof. A.M. Kellerer

DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels Endverknüpfung und die Entstehung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen

Abschlussbericht

Abschlussdatum: 30.3.2003

Auftragsnummer: St.Sch. 4154

Autorin: PD Dr. A.A. Friedl

Anmerkung:

Dieser Bericht ist vom Strahlenbiologischen Institut der Universität München im Auftrag des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit im Rahmen des Vorhabens St.Sch. 4154 erstellt worden. Die Verantwortung für den Inhalt liegt jedoch allein bei den Autoren. Der Eigentümer behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit Zustimmung des Auftraggebers zitiert, ganz oder teilweise vervielfältigt bzw. Dritten zugänglich gemacht werden.

Dieser Bericht gibt die Meinung und Auffassung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der Meinung des auftraggebenden Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit übereinstimmen.

Zusammenfassung

Der Einfluss der Zellkernarchitektur auf die Ausbildung von Austauschaberrationen durch Fehlverknüpfung wurde im Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae* durch zwei unterschiedliche methodische Ansätze untersucht. Zum einen wurden die Bruchpunkte strahleninduzierter Translokationen in rekombinationsdefizienten Hefestämmen nach elektrophoretischer Karyotypisierung kartiert. Die hierbei beobachtete Verteilung der Bruchpunkte auf den Chromosomen ist mit einem Einfluss der Zellkernarchitektur (in diesem Falle eine Rabl-ähnliche Konformation) auf die Wahrscheinlichkeit interchromosomaler Fehlverknüpfung aufgrund von *Proximity Effects* vereinbar. Zum anderen wurden Hefestämme hergestellt, die Paare von Erkennungssequenzen für eine induzierbare Endonuklease an unterschiedlichen chromosomalen Positionen tragen. Hier zeigte sich eine Fehlverknüpfungshäufigkeit von annähernd 50%, unabhängig von der Lage der Bruchorte. Mögliche Ursache für diese divergenten Ergebnisse ist ein in beiden Systemen unterschiedlicher Einfluss von Reparatur-assoziierten Chromatinbewegungen.

Abstract

The influence of nuclear architecture on the formation of exchange-type aberrations was investigated in the model organism, *Saccharomyces cerevisiae*, using two different methods. First, breakpoints of radiation-induced translocations were mapped in recombination-deficient yeast strains after electrophoretic karyotyping. The chromosomal distribution of breakpoints thus observed was found to be compatible with an important role of nuclear architecture on the probability of interchromosomal mis-rejoining. Second, yeast strains were constructed which carry, at different chromosomal positions, pairs of recognition sites for inducible endonucleases. In this system, mis-rejoining frequencies of close to 50% were obtained, irrespective of the localisation of the breaks. These divergent results may hint at a role of repair-associated chromatin migrations.

1. Übergeordnete Zielsetzung

Die Induktion von Chromosomenaberrationen ist eine zwar sehr eingehend untersuchte und für die Belange des Strahlenschutzes hinsichtlich der biologischen Dosimetrie sehr wichtige Folge ionisierender Bestrahlung von Säugerzellen, die molekularen Ursachen der Fehlverknüpfung von Chromosomenbruchstücken sind jedoch weitgehend ungeklärt. In Säugerzellen werden DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) hauptsächlich über die direkte Verknüpfung der Enden repariert, und es liegt nahe, anzunehmen, dass dieser Reparaturmechanismus (innerhalb der drei bekannten Mechanismen *End Joining*, *Single Strand Annealing* und homologe Rekombination) besonders hohes Potential zur Fehlreparatur besitzt. Im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* soll untersucht werden, welche Faktoren verantwortlich sind, ob "richtige" oder "falsche" Enden verknüpft werden.

2. Einzelzielsetzung

2.1 Generierung von Zellklonen mit strahleninduzierten Translokationen

Vorarbeiten (Friedl et al. 1998) ergaben Hinweise darauf, dass in Hefezellen, die durch gentechnische Manipulation gezwungen wurden, DSB mittels nicht-homologer Endverknüpfung zu reparieren, die Chromosomen V und VIII häufiger an der Ausbildung strahleninduzierter Aberrationen beteiligt sind, als aufgrund ihrer Länge zu erwarten wäre. Es sollen weitere Zellklone, die strahleninduzierte Aberrationen tragen, generiert werden, um diese Annahme in statistisch signifikanter Weise zu untermauern.

2.2 Kartierung von Translokationsbruchpunkten in Klonen mit strahleninduzierten Translokationen

Durch Kartierung von Translokationsbruchpunkten auf den Chromosomen V und VIII soll untersucht werden, ob diese Chromosomen sogenannte *Hotspots* tragen, die für die Überrepräsentation dieser Chromosomen in Aberrationsereignissen verantwortlich sind.

2.3 Entwicklung eines Testsystems zur gezielten Untersuchung der Aberrationsentstehung

Es sollen Hefestämme hergestellt werden, in denen es durch Einbringen von Endonuklease-Erkennungsstellen an verschiedenen Orten im Genom möglich ist, gleichzeitig zwei DSB zu induzieren und deren Reparatur bzw. Fehlreparatur zu beobachten. Die

Fehlverknüpfungsfrequenz soll dann in Abhängigkeit von den Bruchorten bestimmt werden. In diesem System soll zudem untersucht werden, inwieweit die Inaktivierung bestimmter Kandidatengen die Fehlverknüpfungsfrequenz beeinflusst.

3. Bisheriger Wissensstand und Notwendigkeit der durchgeführten Untersuchungen

Strukturelle Chromosomenaberrationen sind die Folge von fehlerhafter DSB-Reparatur. Dabei können alle er bisher bekannten Reparaturwege zur Rearrangierungen führen. Im einfachsten Falle werden die freien DNA-Enden von zwei oder mehr Bruchorten in falscher Kombination zusammengefügt. Dies entspricht dem klassischen *Breakage-and-Reunion*-Modell (Übersicht bei Savage 1996). Wie wir heute wissen, beruht diese Art von Reparatur hauptsächlich auf der sogenannten nicht-homologen Endverknüpfung (*non-homologous end joining*; NHEJ). Vermutlich ist die einzige Grundvoraussetzung für diese Art der Fehlverknüpfung, dass die beteiligten Enden irgendwann im Reparaturverlauf räumlich und zeitlich zusammentreffen. Dabei ist immer noch die seit den frühen Tagen der Strahlenbiologie (z.B. Lea 1946) diskutierte Frage ungeklärt, wie nahe sich die späteren Interaktionspartner zum Zeitpunkt der DSB-Induktion sein müssen, dass eine spätere Fehlverknüpfung überhaupt passieren kann.

Verschiedene Hinweise deuten auf einen starken Einfluss der initialen Entfernung zwischen Brüchen auf die Fehlverknüpfungswahrscheinlichkeit. Dieser Effekt wurde *Proximity Effect* genannt (Übersicht bei Savage 1996, Sachs et al. 1997). So ist zum Beispiel nach Bestrahlung das Verhältnis zwischen inter- und intrachromosomalen Austauschen kleiner als bei rein zufälligen Interaktionen erwartet würde. Diese Bevorzugung von intrachromosomalen Ereignissen beruht auf der territorialen Organisation der Chromosomen im menschlichen Zellkern, die dazu führt dass zwei Brüche auf dem selben Chromosom sich im Durchschnitt räumlich näher sind als zwei Brüche auf unterschiedlichen Chromosomen. Während das Konzept eines *Proximity Effect* weitgehend akzeptiert ist, haben verschiedene 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 Modellen sich auf physikalische Parameter konzentrierten. Informationen über biologische Parameter, wie zum Beispiel

Chromatinstruktur oder Kernarchitektur, und deren Einfluss auf die Aberrationsentstehung, werden erst in letzter Zeit verfügbar, und es bestehen noch viele offene Fragen.

Kernarchitektur:

Die biologischen Konsequenzen von Austauschaberrationen hängen davon ab wo auf den Chromosomen der Austausch erfolgte. Balanzierte Austausche zwischen Heterochromatin-Bereichen, fernab von Genen oder regulatorischen Sequenzen, verursachen vermutlich in somatischen Zellen keine Probleme, solange die dabei gebildeten Chromosomen mitotisch stabil sind. Sind jedoch Gene oder regulatorische Sequenzen an den Austauschreaktionen beteiligt, kann es zu Verlusten in der Genaktivität kommen, oder zu Regulationsverlusten, die, falls relevante Gene betroffen sind, zur Tumorgenese beitragen können. Die Kernarchitektur, das heisst die Positionierung der Chromosomen im Kern, beeinflusst aufgrund des *Proximity Effect* die Wahrscheinlichkeit, mit der gewisse Regionen an Austauschereignissen beteiligt sind.

In Säugerzellkernen nehmen die einzelnen Chromosomen eigene, recht gut abgegrenzte Territorien ein (Übersicht bei Cremer und Cremer 2001; Parada und Misteli 2002). Dabei scheint die radiale Position der Chromosomen nicht zufällig zu sein: Genreiche Chromosomen tendieren dazu, sich im Inneren des Zellkerns zu befinden, während genarme Chromosomen bevorzugt an der Peripherie liegen. Diese Anordnung ist evolutionär konserviert (Tanabe et al. 2002), was für eine funktionelle Bedeutung spricht. Innerhalb der Territorien ist eine sogenannte Polarität zu beobachten: früh-replizierende, genreiche Regionen tendieren zu einer Ausrichtung zum Kerninneren hin, während genarme Regionen sich in Richtung der Peripherie orientieren (Ferreira et al. 1997, Sadoni et al. 1999). Zusammen mit der radialen Positionierung führt die Polarität zu einer Anreicherung von genreichen DNA-Abschnitten in einem Subvolumen des Zellkerns. Verglichen mit einer Zufallspositionierung, bei welcher die wenigen kodierenden DNA-Regionen (ca. 3% der Gesamt-DNA) im Kern verstreut lägen, könnte diese Anreicherung im Kerninneren die Wahrscheinlichkeit von Tumorgenese-relevanten Interaktionen zwischen Genen deutlich erhöhen.

DNA-Reparatur:

Obige Ausführungen betrachten den Einfluss von *Proximity Effect* und Kernarchitektur nur in Bezug auf die Entfernung zwischen zwei Bruchstellen zum Zeitpunkt der DSB-Induktion.

Durch passive, ungerichtete Bewegung oder durch Transportereignisse während der Reparaturprozesse können jedoch auch Enden in räumliche Nähe gelangen, die ursprünglich weit voneinander entfernt lagen. Es ist nicht bekannt, wie weit sich die Enden *einer* Bruchstelle voneinander wegbewegen; vermutlich wird dies von der Chromatinstruktur beeinflusst und es könnte sein, dass freie Enden in Euchromatinbereichen beweglicher sind als in Heterochromatinbereichen. Von großer Wichtigkeit ist auch die Frage nach dem Ort der Reparatur. Sollte Reparatur bevorzugt an bestimmten Stellen im Kern durchgeführt werden (die man dann als "Reparaturfabriken" bezeichnen könnte), könnten Enden verschiedener Bruchorte dort zusammentreffen, wodurch sich die zulässigen Interaktionsdistanzen vergrößern würden. Für ein Fabrik-Modell spricht die Tatsache, dass auch andere Prozesse des DNA-Metabolismus regional festgelegt sind (z.B. Transkription; Verschure et al. 1999). Auch die Beobachtung, dass Reparaturproteine sich nach Bestrahlung in großen Komplexen zusammenlagern (sogenannten strahleninduzierte Reparaturfoci; Haaf et al. 1995; Tashiro et al. 2000, Paull et al. 2000, Mirzoeva et al. 2001) ist mit diesem Modell vereinbar. Schließlich wurde postuliert, dass die Wahrscheinlichkeit von Interaktionen zwischen drei oder mehr Bruchstellen ohne einen aktiven Prozess, der verschiedenen Enden zueinander bringt, viel zu niedrig sein, als dass die beobachteten Häufigkeiten komplexer Austausche nach Bestrahlung erklärt werden könnten (Savage et al. 1996).

Während das Ausmaß Reparatur-begleitender Mobilität der DNA-Enden im Falle der nicht-homologen 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. Da homologe Rekombination nicht nur zwischen Schwesterchromatiden (die nahe beieinander liegen), sondern auch zwischen homologen Chromosomen (die im Zellkern nicht benachbart liegen; Cremer und Cremer 2001) und auch zwischen ektopt gelegenen (also nicht am entsprechenden Ort auf Schwesterchromatid oder homologen Chromosom gelegenen) Regionen möglich ist (Richardson 1998, Vrieling 2001, Inbar und Kupiec 1999, Kolomietz et al. 2002), können weitreichende Migrationen der DNA-Enden im Zellkern nicht ausgeschlossen werden.

Modellsystem Hefe:

Aufgrund der Vielzahl der Faktoren, die die Interaktionswahrscheinlichkeit zweier Bruchorte beeinflussen können, sowie der Komplexität der möglichen Wechselwirkungen ist es nicht

verwunderlich, dass Rolle und Bedeutung einzelner Faktoren bisher kaum charakterisiert wurden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Kernarchitektur auf die Translokationsentstehung in einem System mit vergleichbar geringer Komplexität, nämlich Hefezellen, untersucht werden. Die Anordnung der Chromosomen der Hefe *S. cerevisiae* im Interphasezellkern ist recht gut charakterisiert (Abb. 3.1; Übersicht bei Loidl 2003): Die Chromosomen nehmen eine sogenannte Rabl-ähnliche Konformation ein, wobei alle Centromere in einer Rosettenstruktur geclustert sind (Jin et al. 2000). Das Centromercluster befindet sich für gewöhnlich nahe zur Peripherie des Zellkerns. Auch die Telomere sind geclustert, wobei die 32 (bzw. 64) Telomere der haploiden (bzw. diploiden) Zelle in 4-8 (Gotta et al. 1996) Cluster vorliegen. Diese Cluster sind an der Kernmembran verankert und liegen präferentiell am dem Centromer-Cluster gegenüberliegenden Pol. Ob immer bestimmte Telomere in einem Cluster zusammenkommen, oder ob die Zusammenstellung zufällig ist, ist noch nicht bekannt. Es ist aber anzunehmen, dass die Länge der Chromosomenarme einen Einfluss auf die Sortierung der Telomere hat, da nur wenige der Chromosomenarme lang genug sind, den gesamten Zellkern zu durchmessen (Guacci et al. 1994, Dekker et al. 2002).

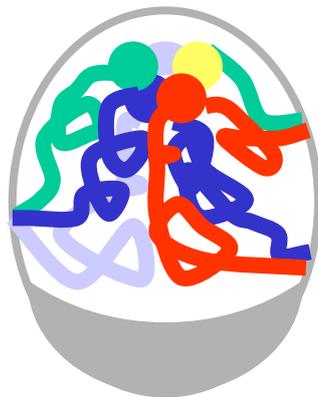


Abbildung 3.1: Modell der Zellkernarchitektur in Hefe. Die Centromere bilden eine rosettenartige Struktur nahe der Kernperipherie aus. Die Chromosomenarme weisen von den Centromeren weg, und nehmen vermutlich distinkte Territorien ein. Die Telomere von mehreren Chromosomenarmen bilden jeweils Cluster, die an der Membran adhären. Der Nukleolusorganisor (NOR) weist eine halbmond förmige Struktur auf.

Bei einer Rabl-ähnlichen Chromosomenanordnung ist die Wahrscheinlichkeit für interchromosomale Interaktionen am höchsten im Bereich der Centromere und der Telomere. Falls dies für die Ausbildung von Austauschaberrationen durch Fehlverknüpfungen der Enden nach Induktion von Brüchen eine Rolle spielt, sollten Translokationsbruchpunkte gehäuft in

Nähe der Centromere und Telomere lokalisiert sein. Im Rahmen des Vorhabens wurde diese Hypothese durch Kartierung von Translokationsbruchpunkten überprüft.

4. Voraussetzungen

Den Arbeiten zur Kartierung von Translokationsbruchpunkten nach Bestrahlung lag eine Sammlung von Klonen mit strahleninduzierten Aberrationen zugrunde, die in Friedl et al. (1998) beschrieben ist. Bei der Entwicklung des Testsystems für Endonuklease-induzierte DSB wurde der Stamm MK205 als Ausgangsstamm verwendet. Dieser wurde von Martin Kupiec, Universität Tel Aviv, entwickelt (Aylon et al. 2003).

5. Methoden

Die Methoden der elektrophoretischen Karyotypisierung, inklusive Southern-Hybridisierung, sind bei Friedl et al. (1998) beschrieben. PCR, Klonierungen und sonstige molekularbiologische Arbeiten wurden, ebenso wie mikrobiologische Arbeiten, nach Standardmethoden durchgeführt. Sämtliche Hefe-Sequenzdaten sind der Datenbank (<http://www.yeastgenome.org>) entnommen. χ^2 - und Student's t-Tests wurden mit Hilfe der online-Berechnungsprogramme *Web Chi Square Calculator* (http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web_chi.html) und Student's t-Test (http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test_NROW_form.html) durchgeführt.

6. Kartierung von Bruchpunkten strahleninduzierter Translokationen in Hefe

Hefechromosomen sind vom DNA-Gehalt 2-3 Größenordnungen kleiner als Säugerzellchromosomen und in der Metaphase weniger stark kondensiert. Man kann sie daher nicht mit klassischen zytogenetischen Methoden sichtbar machen und untersuchen (Loidl 2003). Strukturelle Chromosomenaberrationen lassen sich aber durch elektrophoretische Auftrennung intakter chromosomaler Moleküle in einer sogenannten elektrophoretischen Karyotyp (Friedl et al. 1998) nachweisen. Grundlage des Nachweises ist, dass strukturelle Aberrationen für gewöhnlich zu Änderungen der Chromosomenlängen führen, so dass sich die Anordnung der chromosomalen Banden im Gel verändert. Durch Analyse der Längenveränderungen und Chromosomenzuordnung mittels Hybridisierung mit genspezifischen Hybridisierungssonden konnten wir in früheren Arbeiten zeigen, dass in Hefe nach Bestrahlung die gleichen Aberrationstypen auftreten wie sie aus Säugerzellen bekannt sind (Friedl et al. 1998). Allerdings kann die elektrophoretische Untersuchung nicht an Einzelzellen durchgeführt werden. Vielmehr müssen betroffenen Zellen expandiert werden, damit aus einer ausreichend großen Klonpopulation (ca. 10^8 Zellen) die chromosomale DNA präpariert werden kann. Letalereignisse können daher nicht untersucht werden.

In den Vorarbeiten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in Zellen, die aufgrund genetischer Manipulation keine DSB-Reparatur durch homologe Rekombination durchführen können (*rad52* oder *rad54* Mutanten), nach Bestrahlung Austauschaberrationen relativ häufig auftreten (in knapp 10% der zufällig ausgewählten und untersuchten Hefeklone) und dass diese Aberrationen von einem funktionellen Endverknüpfungsmechanismus zur DSB-Reparatur abhängen.

Zu Beginn dieses Vorhabens stand aus Vorarbeiten eine Kollektion von 14 Klonen mit Translokationen zur Verfügung; diese Kollektion wurde dann auf 16 Klone (mit insgesamt 35 beteiligten Chromosomen) erweitert. Da das Generieren, Identifizieren und Charakterisieren von Klonen mit Translokationen extrem aufwendig ist (der verfügbaren Kollektion liegen Untersuchungen an etwa 2000 Zellklonen zugrunde), wurde keine weiteren Versuche unternommen, durch ungerichtete Analyse von Klonen bestrahlter Zellen die Kollektion zu vergrößern. Versuche, durch Einbeziehen eines Selektionsschrittes die Identifizierung interessanter Klone zu erleichtern, schlugen fehl.

Obwohl das Chromosom V nur etwa 4.6% des Hefegenoms repräsentiert, ist es unter den 35 an Translokationen beteiligten Chromosomen siebenmal vertreten. Diese Überrepräsentation ist signifikant ($p < 0.02$). Auch das Chromosom VIII, das die gleiche Länge hat wie Chromosom V, scheint mit fünf Beteiligungen auffällig oft betroffen zu sein. Diese Anhäufung ist jedoch nicht signifikant. Bisher konnten keine Erklärungen für die häufige Beteiligung dieser Chromosomen an Austauschereignissen gefunden werden. Sie unterscheiden sich zum Beispiel nicht in der Dichte essentieller Gene von anderen Chromosomen. Die häufige Beteiligung bietet aber den Vorteil, dass sich nach Kartierung von Bruchpunkten Verteilungsmuster leichter erkennen lassen, als wenn die kartierten Bruchpunkte über alle Chromosomen verstreut wären. Daher wurden im Rahmen dieses Vorhabens die Bruchpunkte auf den Chromosomen V und VIII sowie auf deren jeweiligen Partnerchromosomen kartiert. Die untersuchten Klone mit den beobachtbaren chromosomalen Veränderungen sind in Tabelle 6.1 aufgelistet.

| Klon | Veränderte Chromosomen (Länge) | neue Längen |
|-------------|---|------------------------|
| M1 (rad52) | V (575), VIII (563) | 440, 666 |
| 2 (rad52) | V (575), XIV (784) | 666, 700 |
| 12 (rad52) | V (575), IV (1522), XI (666), XIII (940) | 400, 1750 440, 1140 |
| 54 (rad52) | VIII (563), II (813) | 370, 1000 |
| 77 (rad52) | V (575), VIII (563), IV (1522) | 270, 1190, 1190 |
| S15 (rad54) | V (575), VII (1091) | 400, 1290 |
| 10 (rad54) | V (575), VIII (563) | 560, 590 |
| 36 (rad54) | V (575), VIII (563) | 290, 870 |

Tabelle 6.1: Untersuchte Klone mit Translokationen unter Beteiligung von Chromosom V und/oder VIII. Für die ursprünglichen Chromosomenlängen wurden die Ergebnisse des Hefe-Genomprojekts zugrundegelegt (www.yeastgenome.org); die Längen der Chromosomen in neuen Banden wurden mittels linearer Interpolation abgeschätzt.

6.1 Methodischer Ansatz der Bruchpunktkartierung

Für die Kartierung der Bruchpunkte gibt es zwei methodische Ansätze. Beide beruhen darauf, zu untersuchen welche der für ein Chromosom spezifische Loci auf welchem der beiden zugehörigen Chromosomenderivaten vorhanden sind. Dies kann durch Hybridisierung des Southern-Blots eines Pulsfeld-Gels geschehen, oder durch Präparation der entsprechenden chromosomalen Banden aus dem Gel und Einsetzen der so isolierten DNA als Matrize für einen PCR-Nachweis (sh. Abb. 6.1).

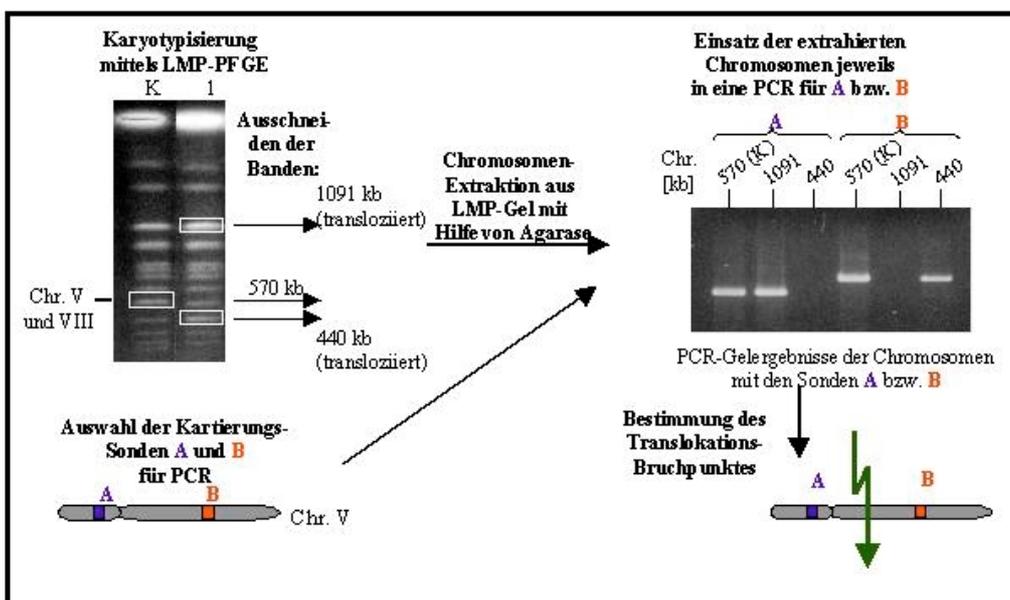
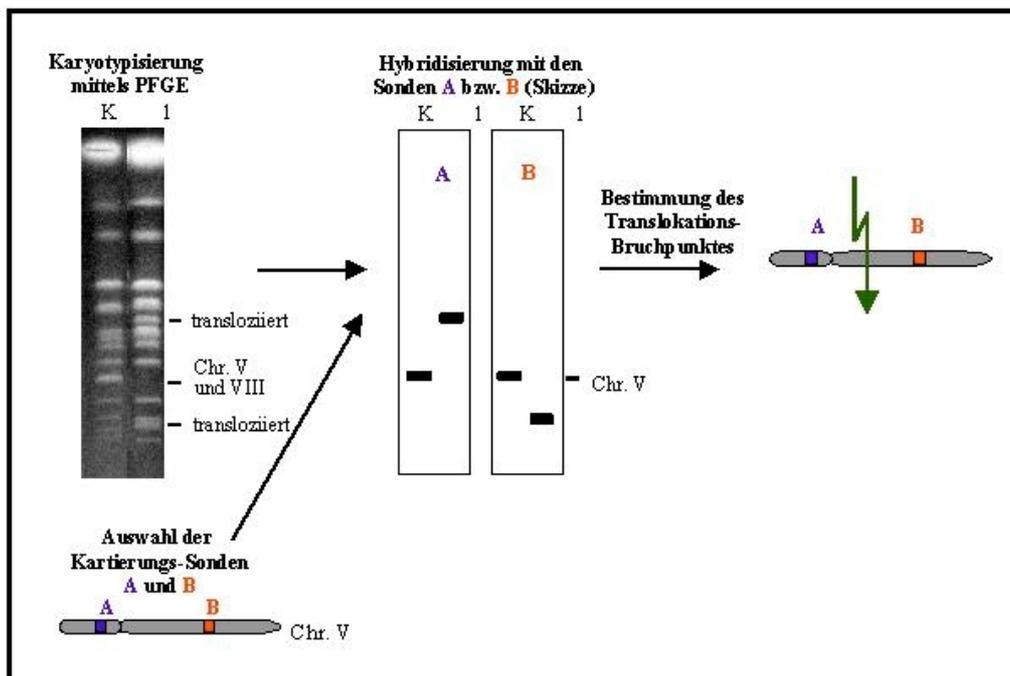


Abb. 6.1: Schema der Bruchpunktkartierung durch Southern-Hybridisierung (oberer Kasten) und durch PCR (unterer Kasten).

Für beide Methoden können die gleichen Sonden verwendet werden: Bei der Hybridisierungsmethode werden, ausgehend von spezifischen Primer-Paaren, PCR-Produkte vom parentalen Stamm gebildet, die nach der Markierung als Hybridisierungssonden eingesetzt werden. Bei der PCR-Methode wird die PCR an der extrahierten chromosomalen DNA durchgeführt. Wo möglich, wurden bei der Sondenwahl intragenische Regionen genutzt, da bei diesen von einem höheren Grad der Sequenzhomologie zwischen dem im Hefegenomprojekt sequenzierten Stamm und den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen ausgegangen werden kann. In manchen chromosomalen Abschnitten war die Sondenwahl aufgrund von repetitiven Sequenzen beschränkt. So führte z.B. die Häufung repetitiver Sequenzen im subtelomerischen Bereich dazu, dass die am meisten distal gelegenen möglichen Sonden etwa 10 kb vom Telomer entfernt lokalisieren.

6.2 Ergebnisse der Bruchpunktkartierung

Die Ergebnisse der Sondenzuweisungen sind in Tabelle 6.2 aufgeführt.

| Klon | Veränderte Chromosomen (Länge; Position des Centromers) | positiver Sondennachweis auf neuen Banden |
|--------------------|--|---|
| M1 (rad52) | V (575; C152) VIII (563; C105) | 440: MUP3(27), MRP4(99), SOD2(123); MEI4(240), SAP1(245), CAJ1 (248), YER049 (253), HIS1(265), TRP2(338), RAD24(537) 666: CIN8(39), URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), GLN3(230), SAH1(236), MEI4(240); RPN1(164), MED6(219), IRE1(260), DCD1(388), SKN7(513) |
| 2 (rad52) | V (575; C152) XIV (784; C629) | 666: CIN8(39), POL5(51); GCR2(266), FUN34(634), MAS6(662) 700: DSL1(158), URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), HIS1(265), TRP2(338), RAD24(537) |
| 12 (rad52) | V (575; C152) IV (1522; C450) XI (666; C440) XIII (940; C268) | 400: CIN8(39), URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), GLN3(230), SAH1(236); SFA1(160), LRG1(25) 1750: STL1(1508), BPL1(203); MEI4(240), SAP1(245), CAJ1(248), YER049(253), HIS1(265), TRP2(338), RAD24(537) 440: PHO84(24) 1140: FET4(913): |
| 54 (rad52) | VIII (563; C105) II (813; C238) | 370: VIII-Tel/L(11); YBR043(323) 1000: MUP3(27), MRP4(99), SOD2(123), IRE1(260), DCD1(388), SKN7(513), VIII-Tel/R(551); SEC18(398) |
| 77 (rad52) | V (575; C152) VIII (563; C105) IV (1522; C450) | 270: MUP3(27), MRP4(99), SOD2(123), IRE1(260) 2 x 1190: V-Tel/L(10), YEL072(14), CIN8(39), URA3(116), PMI40(158), FIR1(215), HIS1(265), TRP2(338), RAD24(537), YET186(562), V-Tel/R(568); HXT5(298), DCD1(388), SKN7(513); LRG1(25), STL1(1508) |
| S15 (rad54) | V (575; C152) VII (1091; C497) | 400: V-Tel/L(10), CIN8(39), PMI40(158), FIR1(215), GLN3(230), SAH1(236), MEI4(240), SAP1(245), CAJ1(248), YER049(253), HIS1(265), MOT2(293), 1290: PTP3(310), TRP2(338), RAD24(537), V-Tel/R(568) |
| 10 (rad54) | V (575; C152) VIII (563; C105) | 560: VIII-Tel/L(11), MUP3(27), SKN7(513), VIII-Tel/R(551) 590: V-Tel/L(10), YEL072(14), CIN8(39), RAD24(537), YET186(562), V-Tel/R(568) |

| | | |
|-------------------|-----------------------------------|--|
| 36 (rad54) | V (575; C152) VIII (563; C105) | 290: VIII-Tel/L(11), MUP3(27), MRP5(99), SOD2(123), RPN1(164); URA3(116), CIN8(39) 870: RAD24(537), TRP2(338), HIS1(265), FIR1(215), PMI40(158); YHR064(197), MED6(219), IRE1(260), DCD1(388), SKN7(513), VIII-Tel/R(551) |
|-------------------|-----------------------------------|--|

Tabelle 6.2: Ergebnisse des Sondennachweises über Hybridisierung oder PCR. Angegeben sind die Sondennamen und ihre Lokalisierung (in kb) auf dem Ursprungschromosom; Die Längenangaben entstammen dem Hefe-Genomprojekt (www.yeastgenome.org)

In den Klonen M1 und 12 war die Lage der Bruchpunkte auf Chromosom V infolge der Sondenzuweisung schon auf wenige kb genau festgelegt. Dies eröffnete die Möglichkeit, auch die Bruchpunkte auf den jeweiligen Partnerchromosomen genau festzulegen. Dazu wurde genomische DNA mit selten schneidenden Restriktionsenzymen verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Southern-Transfer mit Sonden aus dem Bruchbereich auf Chromosom V hybridisiert. Aufgrund der Länge des hybridisierenden Fragmentes und einer Analyse von Restriktionsschnittstellen auf den Partnerchromosomen konnte der Bereich, in dem sich die zweite Bruchstelle befinden musste, abgeschätzt und schließlich über spezifischen PCR-Nachweis bestätigt werden. Dadurch konnten die Reparaturereignisse in den Klonen M1 und 12 auf Sequenzebene untersucht werden. Abbildung 6.2 zeigt die Sequenzierungsergebnisse. Bei beiden Klonen kam es zu einer Verknüpfung an einer 2 bp-Mikrohomologieregion, ohne Sequenzverlust.

| | |
|-----------------|---|
| Klon M1: | |
| Chr. V | GATGTTTCCT TTTGTTCCAT ATCTTCCAGT TTGCCTCTAC TCATGTCCTT ACTCTTCTAA |
| Chr. VIII | AATATAAATT TATATTTCTT GCGACCATTT GTCGCTCAGA AAAGGCTCTC AAAAAACAA |
| V-VIII | GATGTTTCCT TTTGTTCCAT ATCTTCCAGT TTGCCTCAGA AAAGGCTCTC AAAAAACAA |
| VIII-V | AATATAAATT TATATTTCTT GCGACCATTT GTCGCTCTAC TCATGTCCTT ACTCTTCTAA |
| Klon 12: | |
| Chr. V | TTTTGTTTCC TGTTCGTTCC GTCCCGAAC GAAAAAATCA TAAAATAGAA GTTTCCTATC |
| Chr. IV | TAATAGATTG ACCCCAACCT TTATGACAGG CTTCCAAAGC ATCTCTCATA ATTTTGGTAT |
| V-IV | TTTTGTTTCC TGTTCGTTCC GTCCCGAAC GAAAAAAGC ATCTCTCATA ATTTTGGTAT |
| IV-V | TAATAGATTG ACCCCAACCT TTATGACAGG CTTCCAATCA TAAAATAGAA GTTTCCTATC |

Abb.:6.2: Sequenzanalyse der Translokationsbruchpunkte in den Klonen M1 und 12. Die chromosomalen Positionen der Übergänge sind: Klon M1/Chr.V: 239765; Klon M1/Chr. VIII: 133464; Klon 12/Chr. V: 238236, Klon 12/Chr. IV: 160463.

Stellt man die Bruchpunkte auf den jeweiligen Chromosomen dar (Abb. 6.3), fällt auf, dass sie in Telomer- und Centromernähe gehäuft auftreten. Von den sieben kartierten Bruchpunkten auf Chromosom V liegen zwei in Telomernähe (d.h. distal der äußersten Sonden), von den fünf Bruchpunkten auf Chromosom VIII liegt einer in Telomernähe. Nach den Angaben des Hefe-Genomprojektes liegen die hier genutzten äußersten Sonden zwischen 7 und 12 kb von den Chromosomenenden entfernt. Dies entspricht dem Bereich, der in Lebendzellbeobachtung reduzierte Chromatinmobilität zeigt (Heun et al. 2001; Gasser 2002), wobei die Verankerung an der Kernmembran vermutliche Ursache für die reduzierte Mobilität ist. Die binomiale Wahrscheinlichkeit für eine Lokalisierung von 3 oder mehr von 12 Bruchpunkten der Chromosomen V und VIII auf der Telomerregion (die etwa 3% der Gesamt-DNA dieser Chromosomen ausmacht) liegt bei $p=0.007$, d.h. die Anhäufung von Bruchpunkten in Telomernähe ist hoch signifikant.

Ähnlich wie Regionen in Telomernähe zeigen auch Regionen in Centromernähe eine reduzierte Mobilität (Heun et al. 2001), aber es ist unklar, wie weit sich der Centromereinfluss erstreckt. Die Centromerrosette hat einen Radius von ca. $0.5\ \mu\text{m}$, dies entspricht, je nach Chromatinmodell, etwa 100-200 kb Chromatin (Dekker et al. 2002, Gasser 2002, Ostashevsky 2002). Wird Centromernähe als Abstand unter 100 kb definiert, liegen vier der Bruchpunkte von Chromosom V und drei der Bruchpunkte von Chromosom VIII in Centromernähe. Demnach befinden sich nur zwei der 12 Bruchpunkte auf diesen Chromosomen im interstitiellen Bereich (jeweils einer auf V und auf VIII). Gewichtet nach der Anzahl der Beteiligung der Chromosomen V und VIII macht der interstitielle Bereich auf diesen Chromosomen ca. 62% aus. Die binomiale Wahrscheinlichkeit für eine Lokalisierung von zwei oder weniger von 12 Bruchpunkten im interstitiellen Bereich ist demnach $p=0.0019$, das heisst Bruchpunkte sind im interstitiellen Bereich dieser Chromosomen signifikant unterrepräsentiert. Dies gilt im übrigen auch noch, wenn die übrigen, auf anderen Chromosomen kartierten Bruchpunkte berücksichtigt werden, von denen keiner in Telomer- oder Centromernähe liegt ($p=0.011$).

7. Einfluss der Lokalisierung Endonuklease-induzierter DSB auf die Fehlverknüpfungshäufigkeit

Die in Kapitel 6 beschriebenen Kartierungsexperimente deuten auf eine wichtige Rolle der Kernarchitektur für die Entstehung strahleninduzierter Austauschaberrationen hin. Eine genauere Analyse des Einflusses der Lage von DSB-Orten auf die Fehlverknüpfung durch weitere Kartierungsexperimente in Klonen mit strahleninduzierten Translokationen war wegen des großen Aufwandes für die Generierung und Charakterisierung der Translokationen nicht praktikabel. Weitergehende Untersuchungen sollen daher in einem Modellsystem durchgeführt werden, nämlich in Hefestämmen, in welchen gleichzeitig zwei DSB enzymatisch gesetzt werden. Dies ist möglich durch die Nutzung von sequenzspezifischen Endonukleasen wie der HO-Endonuklease, die eine spezifische 26 bp Sequenz (genannt *HOcs*) im Genom erkennt und dort einen Schnitt einfügt. Durch Herstellung einer Serie von Stämmen, die jeweils ein Paar solcher Erkennungsstellen an unterschiedlichen chromosomalen Positionen tragen, lässt sich systematisch untersuchen, wie die Lage der Brüche die Häufigkeit von interchromosomalen Fehlverknüpfungen beeinflusst.

Grundlage für die Stammherstellung ist der von Prof. M. Kupiec, Universität Tel Aviv, entwickelte Stamm MK205. Dieser trägt eine *HOcs* im *URA3*-Gen auf Chromosom V (36 kb entfernt vom Centromer), sowie das Gen für die HO-Endonuklease unter einem durch Galaktose induzierbaren Promoter. Durch Wachstum auf Galaktose-haltigem Medium wird die Endonuklease induziert und ein DSB an der *HOcs* gesetzt. Da die HO-Endonuklease nach Induktion auch die natürlicherweise im *MAT*-Lokus¹ vorkommende *HOcs* schneiden würde, muss diese inaktiviert werden. Im Stamm MK205 wurde die *HOcs* im *MAT*-Locus durch Mutation so verändert, dass sie nicht mehr geschnitten werden kann. Vorversuche zeigten jedoch, dass bei Vorhandensein dieser veränderten Sequenz die Plattierungseffizienz auf Galaktose-Medium gegenüber Stämmen, bei welchen der gesamte *MAT*-Lokus deletiert ist, erhöht ist, was möglicherweise auf eine Nutzung dieser Sequenz als Donor für Reparatur durch homologe Rekombination hinweist. Für den zu entwickelten Teststamm war es daher nötig, den gesamten *MAT*-Lokus zu deletieren. Durch PCR-vermittelte Transformation

¹ Der *MAT*-Lokus bestimmt den Paarungstyp (*mating type*) der Hefezellen. Es gibt zwei Paarungstypen, a und α , und die Zellen können den Paarungstyp wechseln. Dieser Wechsel wird durch den Schnitt in der *HOcs* des *MAT*-Lokus initiiert. Dann kann durch Rekombination der Bruchstelle mit sogenannten Mating-type-Kassetten, *HML* und *HMR*, die Sequenz an *MAT* von a nach α , oder umgekehrt, verändert werden; die Kassetten *HML* und *HMR* bleiben dabei unverändert. *HML* und *HMR* sind durch *Silencing* stillgelegt, das heißt, die dort vorhandene Information wird nicht exprimiert, da die Chromatinstruktur so geändert ist, dass die Gene nicht zugänglich sind

(Wach et al. 1994) wurde ein *MATΔ::LEU2*-Derivat des Stammes hergestellt. Der Originalstamm MK205 enthielt zudem, unbeabsichtigt, eine Punktmutation in dem Reparaturgen *RAD5*. Da *RAD5* regulatorisch an der Reparatur von DSB beteiligt ist, war es nötig, durch *two-step-replacement* (Rothstein 1989) die mutierte Sequenz durch eine intakte Sequenz zu ersetzen. Schließlich wurde, ebenfalls durch *two-step-replacement*, das *TRP1*-Gen komplett entfernt, damit es für spätere Schritte als Selektionsmarker zur Verfügung steht. Das somit entstandene Derivat von MK205 wurde AF2082 genannt. Es dient als Ausgangsstamm für die Insertion einer zweiten *HOcs* an ausgewählten Orten.

Um die zweite *HOcs* an verschiedenen Stellen im Genom plazieren zu können, wurde ein Konstrukt hergestellt, das als Matrize für PCR-Amplifikationen dienen kann. Das Konstrukt besteht aus dem *TRP1*-Gen, beidseits flankiert durch *HOcs*-Bereiche, im Vektor pUC19 (sh. Abb. 7.1). Zur Klonierung wurden die entsprechenden *HOcs*-Bereiche aus Oligonukleotiden so hergestellt, dass ihre Enden zu Restriktionsschnittstellen kompatibel waren. Der Vektor pUC19 wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, aufgereinigt und schließlich mit den *HOcs*-Produkten ligiert. Die Ligationsprodukte wurden so nachverdaut, dass die Enden zu einem *TRP1*-Restriktionsfragment kompatibel waren, das schließlich ebenfalls in den Vektor ligiert wurde. Das Endprodukt wurde pMH1 genannt.

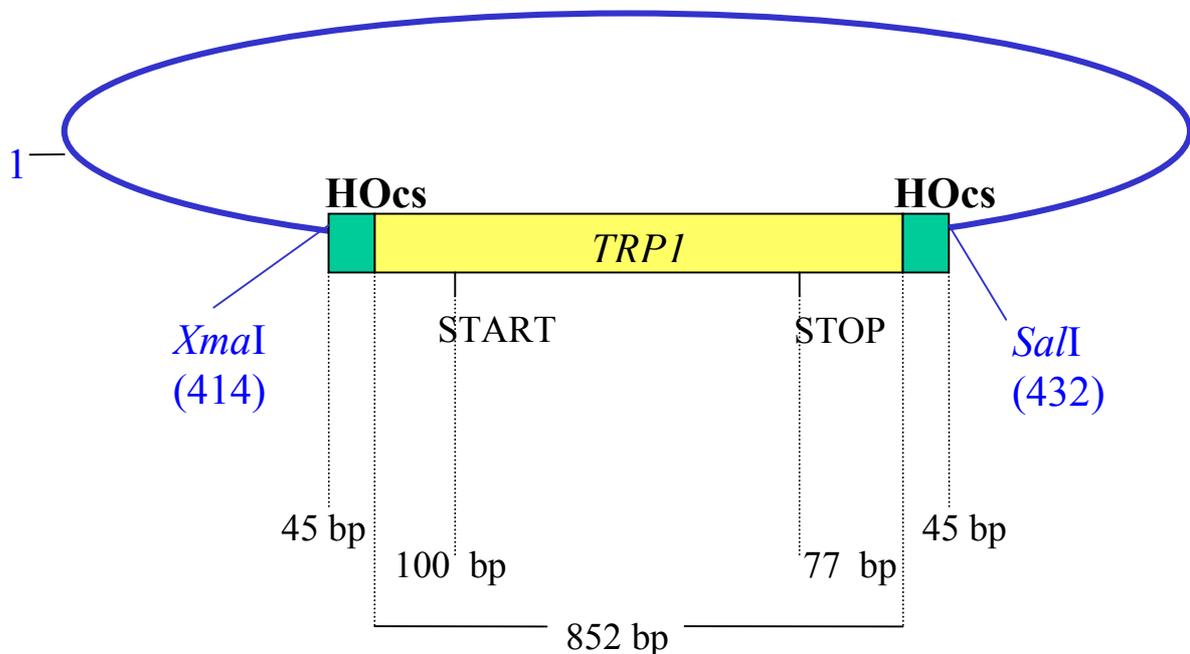
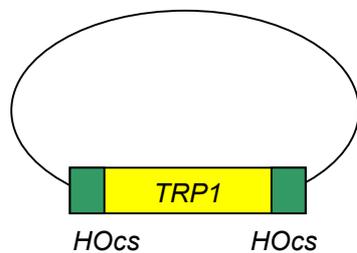


Abb. 7.1: Schema des Plasmids pMH1. Vektor pUC19 wurde in der *multiple cloning site* mit *XmaI* und *SalI* linearisiert. Die synthetischen Oligonukleotide CSc-Mfe (5'-GCT AAG CAA TTG CGG AAT TTA TAC TGT TGC GGA AAG CTG AAA TTC CGC ATG TCC GGA CTA ACT-3') und CSc-Bsp (5'-AGT TAG TCC GGA CAT GCG GAA TTT CAG CTT TCC GCA ACA GTA TAA ATT CCG CAA TTG CTT AGC-3') wurden annealt, mit *BspE1* verdaut und an das dazu kompatible *XmaI*-Ende des Vektors kloniert. Die Oligonukleotide CSc-Bam (5'-AAT GGC GGA TCC CAT GCG GAA TTT CAG CTT TCC GCA ACA GTA TAA ATT CCG

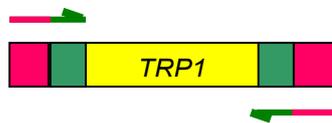
CTC GAG ATA CTG-3') und CSd-Xho (5'-CAG TAT CTC GAG CGG AAT TTA TAC TGT TGC GGA AAG CTG AAA TTC CGC ATG GGA TCC GCC ATT-3') wurden ebenfalls annealt, dann mit *XhoI* verdaut und an das *SalI*-Ende des Vektors kloniert. Das Ligationsprodukt wurde mit *MfeI* und *BamHI* nachverdaut, um kompatible Enden zur Ligation eines *EcoRI*-*BglII*-Fragmentes, das das *TRP1*-Gen enthält (aus pSM21) zu schaffen.

In drei Isolaten (a,b und c) des Vektors pMH1 wurde die korrekte Konfiguration der Schnittstellen durch Sequenzierung verifiziert. Diese Plasmide dienten dann als Matrizen für die Herstellung von PCR-Produkten, die flankierend zum *HOcs-TRP1-HOcs*-Konstrukt beidseits je ca. 40 bp Homologie zu den Zielorten im Hefegenom aufweisen (Diese Homologiebereiche sind durch die Sequenz der ca. 60 Basen langen PCR-Primer festgelegt; sh. Abb. 7.2).

a) Konstruktion der *HOcs-TRP1-HOcs* Kasette in pUC19:



b) Herstellung von PCR-Produkten mit genspezifischen Flanken:



c) Einbau ins Genom durch *one-step-replacement*

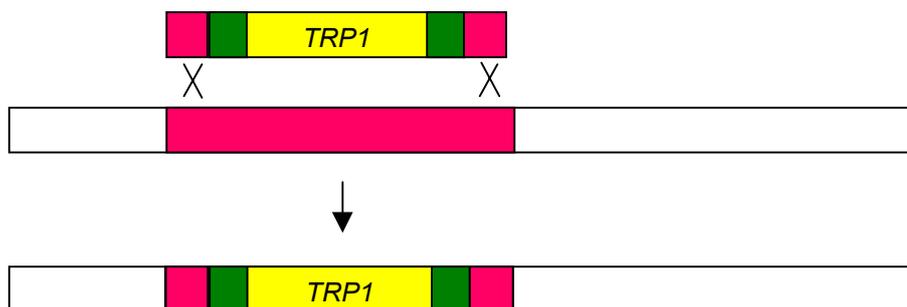


Abb. 7.2: Herstellung und Einbau des *HOcs-TRP1-HOcs*-Konstrukts. a) Plasmid pMH1 trägt das *TRP1*-Gen flankiert von zwei *HOcs*-Sequenzen. b) Durch PCR mit 60-mer Primern, die am 3'-Ende (grün) auf 20 nt komplementär zur Übergangsregion von Vektor und *HOcs*-Sequenzen sind, und am 5'-Ende auf 40 nt komplementär zur Zielregion im Hefegenom (rot), wird ein Fragment hergestellt, das nach Transformation durch *one-step replacement* in die Zielsequenz inserieren kann (c). Erfolgreicher Einbau wird durch Selektion auf *trp*-Prototrophie und mittels PCR nachgewiesen.

Nach Transformation der entsprechenden PCR-Produkte in den oben beschriebenen Ausgangsstamm AF2082 kommt es zur Insertion des *HOcs-TRP1-HOcs*-Konstruktes am gewünschten Ort. Der korrekte Einbau wird durch PCR-Nachweis nach Selektion auf *trp*-Mangelmedium verifiziert. Induktion der HO-Endonuklease führt dann zur Bruchentstehung an beiden *HOcs* dieses Konstruktes, und somit Freisetzung des *TRP1*-Gens. Ein Verlust der *TRP1*-Sequenz gilt also als Nachweis für eine erfolgte Bruchinduktion.

Die verschiedenen Zielorte für die Insertion des *HOcs-TRP1-HOcs*-Konstruktes sind in Abb. 7.3 angegeben. Im Stamm AF2082 *pho91::HOcs* liegt das Konstrukt im *PHO91*-Gen, an einer hinsichtlich Entfernung von Telomer und Centromer vergleichbaren Position wie die erste *HOcs*, die im *URA3*-Gen liegt. In den Stämmen AF2082 *ypl229::HOcs* und AF2082 *ydr018::HOcs* sind die Positionen der Schnittstellen entweder hinsichtlich Telomerentfernung oder hinsichtlich Centromerentfernung vergleichbar. In den Stämmen AF2082 *rmd5::HOcs* und AF2082 *lcb4::HOcs* schließlich wurde das Konstrukt in interstitiellen Chromosomenbereichen, fernab von Telomer und Centromer inseriert.

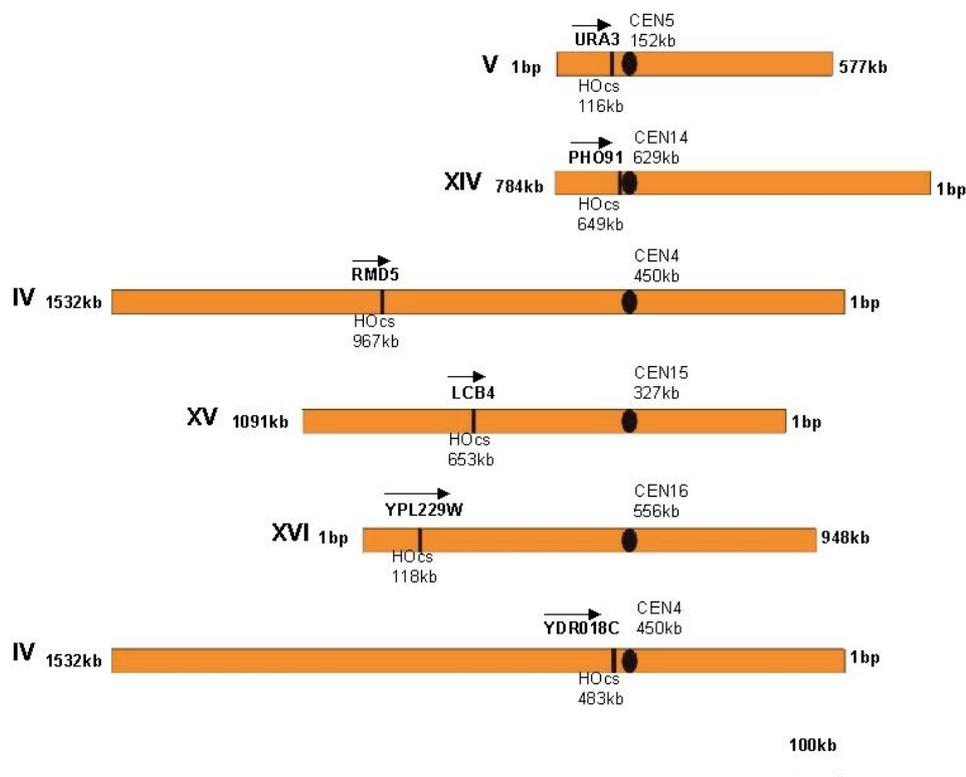


Abb 7.3: Lokalisierung der ersten *HOcs*-Region auf Chromosom V und Zielorte für die zweite *HOcs*-Region.

7.1 Reproduzierbarkeit von Plattierungseffizienz und *TRP1*-Verlust

Drei Isolate (a,b,c) des Plasmids pMH1 mit der *HOcs-TRP1-HOcs*-Konstruktion zeigten bei der Sequenzierung intakte HO-Erkennungsstellen. Diese dienten jeweils als Matrize für die Herstellung von PCR-Fragmenten mit flankierenden, den Integrationsort spezifizierenden 40 bp Bereichen (sh. vorheriger Abschnitt). Um zu testen, ob alle drei Plasmide zu gleichwertigen Ergebnissen führen, wurden zur Herstellung der Stämme AF2082 *pho91::HOcs* und AF2082 *rmd5::HOcs* jeweils drei parallele Transformationen mit den PCR-Produkten der drei Plasmide durchgeführt. Nach Selektion auf Tryptophan-Prototrophie und einem Reinigungsaustreich auf *trp*-Mangelmedium wurde der richtige Integrationsort durch PCR verifiziert. Jeweils vier Transformanten wurden weiter untersucht. Für die Plattierungsexperimente wurden die Zellen vier Tage vor Versuchsbeginn auf *trp*-Mangelmedium ausgestrichen. Durch den dadurch herrschenden Selektionsdruck wird vermieden, dass sich Zellen anreichern, die durch Rekombination zwischen den HO-Erkennungsstellen das *TRP1*-Gen verlieren und bei der späteren Auswertung die Ergebnisse verfälschen. Am Tag 1 des Plattierungsexperimentes wurde jeweils eine repräsentative Kolonie möglichst vollständig von der Agarplatte abgenommen und in Wasser resuspendiert. Aliquots passender Verdünnungen wurden auf YPD- und YPGal-Platten plattiert und die Platten wurden bei 30° inkubiert. Kolonien auf YPD-Platten wurden nach 4 Tagen gezählt, da eine weitere Inkubation keinen Einfluss auf die Koloniezahl hatte. Auf den YPGal-Platten waren gewöhnlich erst nach 6-7 Tagen erste Kolonien sichtbar; die Koloniezahl nahm dann weiter zu, bis nach 14 Tagen die Inkubation beendet wurde, um ein Austrocknen der Platten zu vermeiden.

Tabellen 7.1 und 7.2 zeigen für die einzelnen Transformanten zu AF2082 *pho91::HOcs* und AF2082 *rmd5::HOcs* die Plattierungseffizienz auf YPGal. Da diese im Bereich von 10^{-5} liegt, könnten Mutanten, die z.B. keine intakte HO-Endonuklease exprimieren und daher keine DSB erfahren, die Überlebensraten merkbar verfälschen. Daher sind sowohl für die Bestimmung der Plattierungseffizienz als auch für die spätere Untersuchung der Reparaturereignisse nur Tryptophan-auxotrophe Kolonien relevant, da bei diesen mit großer Wahrscheinlichkeit zumindest am Ort der *HOcs-TRP1-HOcs*-Integration DSB induziert wurden. Der Anteil an Kolonien, bei welchen keine DSB-Induktion erfolgte, aber aufgrund von Mutationen im *TRP1*-Gen Tryptophan-Auxotrophie auftritt, wird als verschwindend gering betrachtet, da hierfür zwei Mutationsereignisse nötig sind. Durch die Beschränkung auf

Tryptophan-auxotrophe Kolonien werden allerdings potentiell informative Ereignisse nicht betrachtet: Wie das im Rahmen dieser Arbeit mehrmals beobachtete Auftreten von Translokationsereignissen, bei welchen die *TRPI*-Sequenz an der Verknüpfungsstelle vorhanden war (aber offenbar so mutiert, dass die Zellen Tryptophan-auxotroph waren), zeigt, kommen Ereignisse, bei welchen entweder nur eine der beiden das *TRPI*-Gen flankierenden *HOcs*-Stellen geschnitten wird, oder bei welchen ein exzisiertes *TRPI*-Fragment im Zuge der Reparatur wieder inseriert wird, vermutlich recht häufig vor.

Wie die Daten in den Tabellen 7.1 und 7.2 zeigen, besteht keine Korrelation zwischen der Plattierungseffizienz auf YPGal und dem Titer der ausplattierten Suspension. Es ist also weder ein Einfluss der Größe der auszuplattierenden Kolonie, noch ein Einfluss der Dichte der plattierten Zellen auf die Plattierungseffizienz ersichtlich. Bei einigen Transformanten wird eine stark verringerte Plattierungseffizienz auf YPGal beobachtet (z.B. Transformanten a10 und b6 in Tabelle 7.1). Ursachen hierfür könnten Mutationen im Galaktosestoffwechsel oder Inaktivierung des für die DSB-Reparatur nötigen Apparates sein. Falls eine solche Veränderung während der Koloniebildung vor dem Plattierungsexperiment stattfindet, könnten in geringem Umfang noch „normale“ Zellen vorhanden sein. Ein solches Ereignis fand offenbar in dem in Tabelle 7.1 gezeigten Experiment mit Transformante a10 statt: in einem separaten Experiment mit einer anderen Einzelkolonie verhielt sich diese Transformante nämlich normal (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Transformanten, bei welchen weniger als zwei Trp^- Kolonien nach Plattierung auf YPGal auftraten, nicht berücksichtigt. Abgesehen von solchen Ausreißern hat die Wahl des Plasmids innerhalb eines Stammes keinen signifikanten Einfluss auf Plattierungseffizienz und Anteil an trp^- Kolonien (t-Test).

Tabelle 7.1: Plattierungseffizienzen und Anteil trp⁻-auxotropher Kolonien im Stamm AF2082 pho91::HOcs nach Transformation mit PCR-Fragmenten von den Plasmiden pMH1 a, b und c.

| Plasmid | Transformante # | Titer YPD (x 10 ⁷) | PE YPGal (x 10 ⁻⁵) | Anteil trp ⁻ | PE YPGal x Anteil trp ⁻ (x 10 ⁻⁵) |
|----------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|--|
| a | 3 | 1.0 | 6.2 | 0.67 | 4.1 |
| | 6 | 0.1 | 4.8 | 0.33 | 1.6 |
| | 9 | 1.8 | 2.4 | 0.61 | 1.5 |
| | 10 | 1.3 | 0 | 0 | 0 |
| b | 1 | 1.3 | 3.1 | 0.46 | 1.4 |
| | 2 | 0.9 | 2.5 | 0.56 | 1.4 |
| | 4 | 1.6 | 1.5 | 0.72 | 1.1 |
| | 6 | 1.4 | 0.3 | 0.14 | 0.04 |
| c | 1 | 0.2 | 3.5 | 0.29 | 1.0 |
| | 3 | 0.2 | 0.8 | 0.67 | 0.5 |
| | 4 | 0.6 | 1.0 | 0.58 | 0.6 |
| | 5 | 1.4 | 2.6 | 0.63 | 1.6 |
| | MW ± SD^a | | 2.8 ± 1.7 | 0.55 ± 0.15 | 1.5 ± 1.0 |

^a Das arithmetische Mittel, MW, wurde ohne Berücksichtigung der Transformanten a10 und b6 gebildet, da bei diesen weniger als 2 trp⁻ Kolonien auftraten.

Tabelle 7.2: Plattierungseffizienzen und Anteil trp⁻-auxotropher Kolonien im Stamm AF2082 rmd5::HOcs nach Transformation mit PCR-Fragmenten von den Plasmiden pMH1 a, b und c.

| Plasmid | Transformante # | Titer YPD (x 10 ⁷) | PE YPGal (x 10 ⁻⁵) | Anteil trp ⁻ | PE YPGal x Anteil trp ⁻ (x 10 ⁻⁵) |
|----------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|--|
| a | 2 | 0.6 | 3.4 | 0.51 | 1.7 |
| | 3 | 0.7 | 1.4 | 0.60 | 0.8 |
| | 4 | 0.7 | 1.6 | 0.58 | 1.0 |
| | 5 | 1.1 | 1.5 | 0.35 | 0.5 |
| b | 1 | 0.5 | 1.3 | 0.52 | 0.7 |
| | 2 | 0.9 | 0.7 | 0.33 | 0.2 |
| | 7 | 1.1 | 1.9 | 0.26 | 0.5 |
| | 9 | 1.3 | 1.2 | 0.31 | 0.4 |
| c | 5 | 0.3 | 0.3 | 0 | 0 |
| | 6 | 1.0 | 0.5 | 0.44 | 0.2 |
| | 7 | 0.1 | 1.1 | 0.67 | 0.7 |
| | 9 | 1.0 | 0.4 | 0.14 | 0.06 |
| | MW ± SD^a | | 1.5 ± 0.8 | 0.46 ± 0.14 | 0.7 ± 0.4 |

^a Das arithmetische Mittel, MW, wurde ohne Berücksichtigung der Transformanten c5 und c9 gebildet, da bei diesen weniger als 2 trp⁻ Kolonien auftraten.

7.2 Analyse der Verteilung der Reparaturereignisse in AF2082 *pho91::HOcs* und AF2082 *rmd5::HOcs*

Alle auf YPGal erschienenen und Tryptophan-auxotrophen Kolonien des Stammes AF2082 *pho91::HOcs* wurden mittels PCR hinsichtlich des zugrundeliegenden Reparaturereignisses weiter untersucht. Dazu wurden einige Zellen aus den Kolonien mittels steriler Zahnstocher direkt in den PCR-Ansatz überführt. In dieser Etablierungsphase wurden grundsätzlich jeweils vier PCR-Reaktionen mit allen möglichen Primerkombinationen durchgeführt (Schema sh. Abb. 7.4).

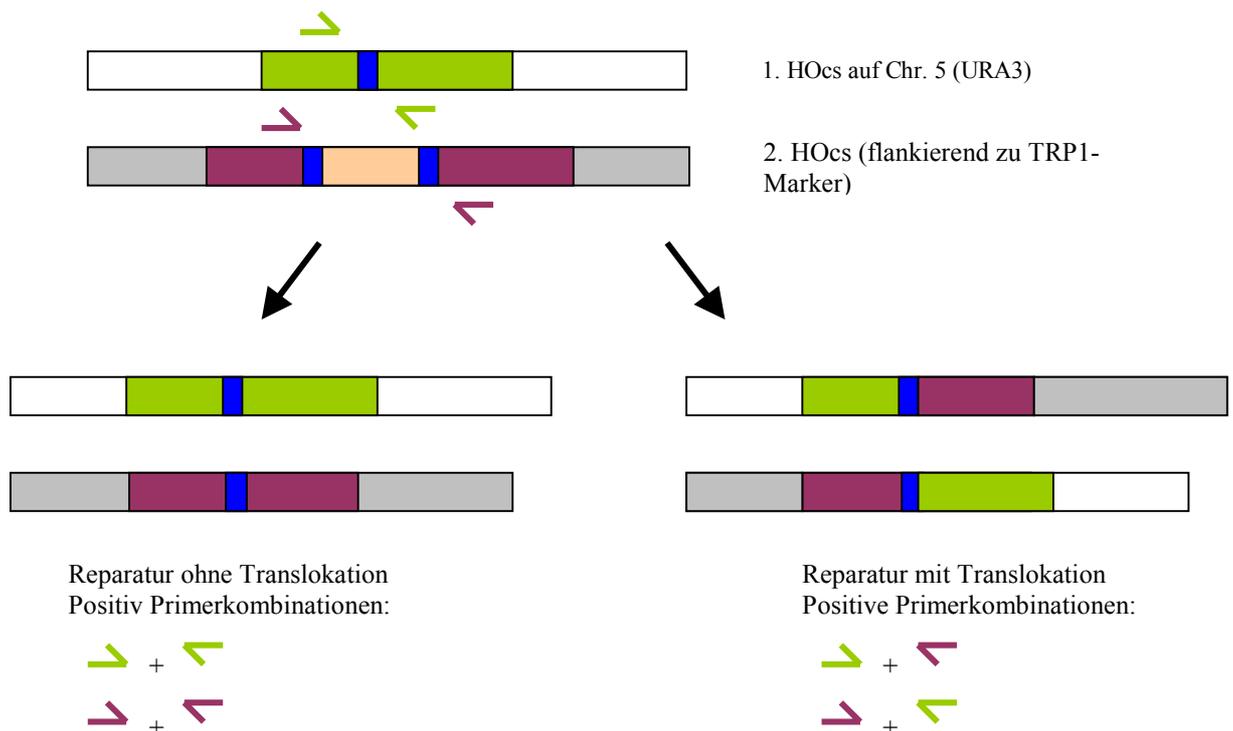


Abb. 7.4: Schema für Translokationsnachweis durch PCR. Bei eindeutigem Nachweis ergeben jeweils zwei korrespondierende Primerkombinationen ein positives Ergebnis.

Von 146 Kolonien ergaben 88 auf Anhieb eindeutige Ergebnisse (d.h. in beiden korrespondierenden Reaktionen war ein PCR-Produkt nachweisbar), bei 16 weiteren ergab sich nach Wiederholung der PCR ein eindeutiges Ergebnis. Somit ist das Reparaturereignis nur für ca. 71% der Kolonien durch die PCR-Reaktionen eindeutig aufklärbar (Tabelle 7.3). Bei den restlichen Kolonien ergab sich auch nach Wiederholungs-PCR nur ein oder gar kein PCR-Produkt. Da diese Wiederholungs-Ansätze zu einem erheblichen Kostenanstieg führten, musste entschieden werden, ob sie im Rahmen dieses Projektes generell bei negativen PCR-Ergebnissen durchgeführt werden sollen. In 145 Wiederholungsversuchen von negativen

PCR-Reaktionen kam es nur in 19 Fällen (=13%) zu einer positiven Reaktion, eine Rate die den großen Aufwand kaum gerechtfertigt. In späteren Experimenten wurde daher auf Wiederholungsreaktionen verzichtet, zumal bei den anderen Stämmen präparierte genomische DNA und nicht, wie im Stamm AF2082 *pho91::HOcs*, ganze Zellen als Matrize eingesetzt wurden. Beim Einsatz ganzer Zellen ist die Ausfallrate erfahrungsgemäß höher als beim Einsatz präparierter DNA.

Tabelle 7.3 zeigt die Zuordnung der Reparaturereignisse zu den Klassen „zwei korrespondierende Produkte“, „ein Produkt“, „kein Produkt“ für die einzelnen Transformanten im Stamm AF2082 *pho91::HOcs*. Auch wenn hier Transformanten von Plasmid-Isolat c einen signifikant geringeren Anteil eindeutiger PCR-Ergebnisse zeigen als Transformanten der anderen Isolate (χ^2 -Test, $p \leq 0.05$), ist dies im Stamm AF2082 *rmd5::HOcs* nicht der Fall (Tabelle 7.4), so dass nicht von einem systematischen Einfluss des verwendeten Plasmids ausgegangen wird.

Tabelle 7.3: Klassen von Reparaturereignissen in einzelnen Transformanten zum Stamm AF2082 *pho91::HOcs*

| Plasmid | Transformante | # <i>trp</i> ⁻ | 2 Produkte | 1 Produkt | kein Produkt |
|----------------------|---------------|---------------------------|------------|-----------|--------------|
| a^a | 3 | 18 | 13 (0.72) | 5 (0.28) | 0 |
| | 6 | 6 | 6 (1.0) | 0 | 0 |
| | 9 | 11 | 10 (0.91) | 1 (0.09) | 0 |
| | 10 | 2 | 2 (1.0) | 0 | 0 |
| a^b | 3 | 8 | 6 (0.75) | 2 (0.25) | 0 |
| | 6 | 3 | 3 (1.0) | 0 | 0 |
| | 9 | 11 | 9 (0.82) | 1 (0.09) | 1 (0.09) |
| | 10 | 0 | - | - | - |
| b | 1 | 12 | 9 (0.75) | 2 (0.17) | 1 (0.08) |
| | 2 | 19 | 15 (0.79) | 3 (0.16) | 1 (0.05) |
| | 4 | 21 | 13 (0.62) | 7 (0.33) | 1 (0.05) |
| | 6 | 1 | 1 (1.0) | 0 | 0 |
| c | 1 | 5 | 3 (0.60) | 2 (0.40) | 0 |
| | 3 | 2 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) |
| | 4 | 7 | 4 (0.57) | 3 (0.43) | 0 |
| | 5 | 20 | 10 (0.50) | 8 (0.40) | 2 (0.10) |
| Total | | 146 | 104 (0.71) | 35 (0.24) | 7 (0.05) |

^{a,b} von Transformanten a3, a6, a9, a10 wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

Tabelle 7.4: Klassen von Reparaturereignissen in einzelnen Transformanten zum Stamm AF2082 rmd5::HOcs

| Plasmid | Transformante | # trp ⁻ | 2 Produkte | 1 Produkt | kein Produkt |
|--------------|---------------|--------------------|------------|-----------|--------------|
| a | 2 | 19 | 9 (0.47) | 6 (0.32) | 4 (0.21) |
| | 3 | 12 | 8 (0.67) | 3 (0.25) | 1 (0.08) |
| | 4 | 14 | 7 (0.50) | 5 (0.36) | 2 (0.14) |
| | 50 | 12 | 7 (0.58) | 5 (0.42) | - |
| b | 1 | 13 | 8 (0.62) | 4 (0.31) | 1 (0.07) |
| | 2 | 4 | 2 (0.50) | 2 (0.50) | - |
| | 7 | 11 | 10 (0.91) | 1 (0.09) | - |
| | 9 | 10 | 9 (0.90) | 1 (0.10) | - |
| c | 5 | - | - | - | - |
| | 6 | 4 | 3 (0.75) | 1 (0.25) | - |
| | 7 | 4 | 4 (1.0) | - | - |
| | 9 | 1 | 1 (1.0) | - | - |
| Total | | 104 | 68 (0.65) | 28 (0.27) | 8 (0.08) |

Für das Auftreten von nur einem oder keinem PCR-Produkt gibt es mehrere mögliche Erklärungen: Geht die Verknüpfung mit größeren Deletionen einher, können die zum Nachweis nötigen Primerbindestellen verloren gehen. Werden im Zuge der Verknüpfung freie DNA-Abschnitte inseriert, könnte der Abstand zwischen den Primerbindestellen für den PCR-Nachweis zu groß sein. Alternativ könnten, falls es weitere Bruchorte im Genom gibt, Verknüpfungen mit anderen DNA-Enden auftreten. Letztere Möglichkeit lässt sich durch elektrophoretische Karyotypisierung nachweisen (vgl. Abschnitt 6).

14 Klone aus AF2082 *pho91::HOcs*, bei welchen die PCR-Analyse ein eindeutiges Ergebnis ergab, wurden elektrophoretisch untersucht. Dabei verhielten sich die Banden der Chromosomen V und XIV durchwegs wie erwartet, und auch die Größen der translozierten Chromosomen stimmten mit den Erwartungen überein. Überraschenderweise fehlte allerdings in den Karyotypen von zweien dieser Klone die Bande von Chromosom III. Dieses Chromosom trägt gewöhnlich drei HO-Erkennungsstellen: eine im *MAT*-Locus, die in den hier verwendeten Stämmen deletiert ist, und jeweils eine weitere in den stillgelegten (*silenced*) Informationsdonor-Kassetten *HML* und *HMR* (sh. Abb. 7.5). Aufgrund des *Silencing* sind die HO-Erkennungsstellen in *HML* und *HMR* normalerweise nicht für die Endonuklease zugänglich (Weiss und Simpson 1998). Das Fehlen einer Bande für Chromosom III in Abwesenheit weiterer chromosomaler Veränderungen deutet jedoch auf eine Zirkularisierung dieses Chromosoms durch Verknüpfen zwischen *HML* und *HMR* hin, ein Ereignis, das auch nach Bestrahlung recht häufig beobachtet wird (Friedl et al. 1998). Dieser Zirkularisierung ging wahrscheinlich ein DSB in einer oder beiden HO-Erkennungsstellen voraus, d.h. unter

den hier herrschenden experimentellen Bedingungen (Stammhintergrund und/oder Überexpression der Endonuklease) muss damit gerechnet werden, dass auch Brüche auf Chromosom III auftreten und in die Reparaturprozesse einbezogen werden.

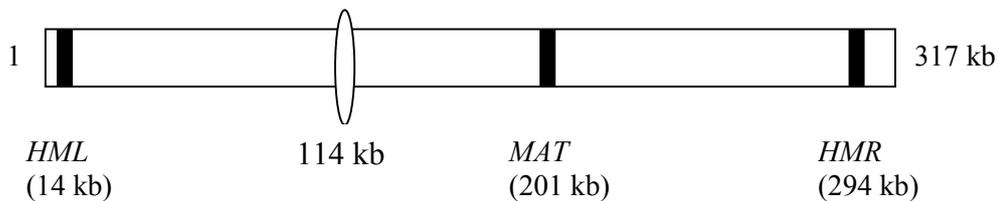


Abb. 7.5: Anordnung natürlicher HOcs-Sequenzen auf Chromosom III. Die HOcs im *MAT*-Locus fehlt bei Stamm AF2082 und seinen Derivaten. Die HOcs-Sequenzen in *HML* und *HMR* unterliegen dem *Silencing*.

In der Tat zeigten bei der elektrophoretischen Analyse von sechs Klonen mit uneindeutigem PCR-Ergebnis vier eine Beteiligung von Chromosom III in den Verknüpfungsereignissen (sh. Abb. 7.6). Bei zwei weiteren war offenbar Chromosom IV an Verknüpfungsereignissen beteiligt, obwohl dieses keine HO-Erkennungsstellen trägt, und bei einem fand eine komplexe Rearrangierung statt, die nicht weiter untersucht wurde. Das Vorkommen von unbeabsichtigten Endonuklease-induzierten Brüchen auf Chromosom III sowie von spontanen Brüchen auf anderen Chromosomen führt natürlich zu einer drastischen Zunahme in der Komplexität möglicher Reparaturereignisse. All diese Ereignisse detailliert zu analysieren war aufgrund der Zeitvorgaben nicht möglich; die weiteren Untersuchungen konzentrieren sich daher auf die Analyse derjenigen Ereignisse, die bei der PCR-Analyse ein eindeutiges Ergebnis ergaben.

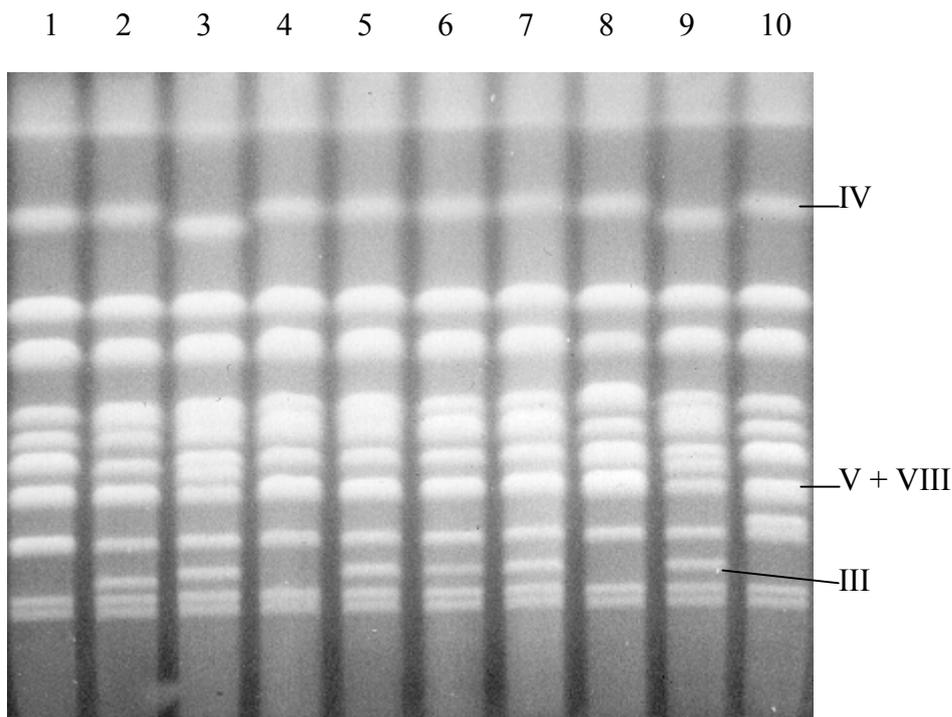


Abb.:7.6: Elektrophoretischer Karyotyp von Klonen des Stammes AF2082 *pho91::HOcs* nach Plattierung auf Galaktose und Selektion auf *trp*-Auxotrophie. Bei sechs Klonen mit uneindeutigem PCR-Ergebnis (Spuren 1-3 und 8-10) fehlt dreimal die Bande von Chromosom III; einmal ist eine Verkürzung zu beobachten (Spur 2). Auch bei Klonen mit eindeutigem PCR-Ergebnis (Spur 4, 6, 7: mit Translokation; Spur 5 ohne Translokation) sind gelegentlich Beteiligungen von Chromosom III evident. In den Spuren 3 und 9 kam es zudem zu einer Beteiligung von Chromosom IV.

7.3 Vergleich der Reparaturereignisse in allen Stämmen

Im Stamm AF2082 *pho91::HOcs* liegen die HO-Erkennungsstellen auf den Chromosomen V und XIV hinsichtlich Entfernung zu Centromer und Telomer an einer vergleichbaren Position (sh. Abb. 7.3). Im Stamm AF2082 *rmd5::HOcs* hingegen wurde das *TRP1*-Gen mit den flankierenden HO-Erkennungsstellen auf dem langen Arm von Chromosom IV in einer Entfernung von 517 kb zum Centromer und 565 kb zum Telomer inseriert. Tabelle 7.5 zeigt eine Gegenüberstellung der Plattierungseffizienzen und Reparaturereignisse in beiden Stämmen, nachdem die Einzelergebnisse gepoolt wurden.

Tabelle 7.5:

| Stamm | pho91::HOcs | rmd5::HOcs |
|--------------------------------|---|--------------------------------|
| PE auf YPGal | $(2.8 \pm 1.7) \times 10^{-5}$ ^a | $(1.5 \pm 0.8) \times 10^{-5}$ |
| gepickte Kolonien | 271 ^b | 250 |
| davon trp⁻ | 156 (0.58) | 104 (0.42) |
| analysiert in PCR | 146 | 104 |
| eindeutig in PCR | 104 (0.71) | 68 (0.65) |
| davon mit Translokation | 49 (0.47) | 22 (0.32) |
| uneindeutig in PCR | 42 (0.29) | 36 (0.35) |
| 1 Produkt | 35 (0.83) | 28 (0.78) |
| kein Produkt | 7 (0.17) | 8 (0.22) |

^a MW-Berechnung ohne das zweite Experiment mit Transformanten a3, a6, a9 und a10, da unterschiedliche Inkubationsdauer.

^b Bei der Analyse der Kolonien wurde das Wiederholungsexperiment berücksichtigt.

Die Plattierungseffizienz beider Stämme auf YPGal ist signifikant unterschiedlich ($p \leq 0.05$; t-Test), und auch der Anteil Tryptophan-auxotropher Kolonien unter den gepickten Kolonien unterscheidet sich hochsignifikant ($p \leq 0.001$; χ^2 -Test)

Bei vergleichbarer chromosomaler Position beider Bruchorte (Stamm AF2082 pho91::HOcs) kam es bei 49/104 (=47.1%) der eindeutigen Reparaturereignisse im Zuge der DSB-Reparatur zu einer Fehlverknüpfung, und somit zu einer Translokation. Dieser Wert ist erstaunlich nahe der maximal erzielbaren 50% Fehlverknüpfung, die man erwarten würde, wenn die Wahl der Verknüpfungspartner völlig zufällig wäre. Im Stamm AF2082 rmd5::HOcs, d.h. bei unterschiedlicher chromosomaler Position, wurde bei 22/68 (= 32.4%) der Reparaturereignisse eine Translokation beobachtet. Im χ^2 -Test ist dieser Unterschied gerade nicht signifikant ($p \leq 0.10$). Zur weitergehenden Analyse wurde daher ein weiterer Stamm untersucht (AF2082 lcb4::HOcs), der das *HOcs-TRP1-HOcs*-Konstrukt an einer interstitiellen Position trägt, sowie je ein Stamm mit ähnlicher Entfernung des Konstrukts zu Telomer (AF2082 ypl229::HOcs) bzw. Centromer (AF2082 ydr018::HOcs) wie es für den Bruchort auf Chromosom V gilt. Untersucht wurden hier je vier Transformanten nach Herstellung des zu integrierenden Fragmentes mit Plasmid a als Matrize. Tabelle 7.6 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 7.6

| Stamm | lcb4::HOcs | ypl229::HOcs | ydr018::HOcs |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| PE auf YPGal | $(11.9 \pm 1.9) \times 10^{-5}$ | $(7.15 \pm 0.1) \times 10^{-5}$ | $(10.1 \pm 5.4) \times 10^{-5}$ |
| gepickte Kolonien | 224 | 104 | 225 |
| davon trp⁻ | 152 (0.69) | 80 (0.77) | 177 (0.79) |
| analysiert in PCR | 133 | 48 | 48 |
| eindeutig in PCR | 104 (0.78) | 36 (0.75) | 27 (0.56) |
| davon mit Translokation | 50 (0.48) | 16 (0.44) | 16 (0.59) |
| uneindeutig in PCR | 29 (0.22) | 12 ^a (0.25) | 21 ^b (0.44) |
| 1 Produkt | 26 (0.90) | 9 (0.75) | 16 (0.76) |
| kein Produkt | 3 (0.10) | 0 | 4 (0.19) |

^a drei der 12 Kolonien zeigten widersprüchliche PCR-Ergebnisse und sind nicht aufgeführt

^b eine der 21 Kolonien zeigte widersprüchliche PCR-Ergebnisse und ist nicht aufgeführt.

Die Plattierungseffizienz auf YPGal ist bei diesen drei Stämmen signifikant höher ($p \leq 0.002$) als bei den zuvor untersuchten Stämmen. Da zwischen den Plattierungsexperimenten mit den Stämmen AF2082 *pho91::HOcs* und AF2082 *rmd5::HOcs* einerseits, und den Stämmen AF2082 *lcb4::HOcs*, *ypl229::HOcs* und *ydr018::HOcs* andererseits einige Monate lagen, war eine mögliche Erklärung für den großen Unterschied, dass sich experimentelle Bedingungen wie Luftfeuchte (möglicher kritischer Faktor wegen der Austrocknungsgefahr bei der langen Inkubation), Temperaturkonstanz oder Medienzusammensetzung zwischen beiden Experimentserien verändert haben könnten. Dies wurde ausgeschlossen, da ein Wiederholungsexperiment mit dem Stamm AF2082 *rmd5::HOcs* zum späteren Zeitpunkt ähnliche Plattierungseffizienzen ergab wie schon bei der ersten Experimentserie.

Hinsichtlich des Anteils *trp*-auxotropher unter den gepickten Kolonien unterscheiden sich die einzelnen Stämme untereinander ebenfalls signifikant ($p \leq 0.001$; χ^2 -Test). Da keine Korrelation mit der Plattierungseffizienz feststellbar ist, wird davon ausgegangen, dass die Zugänglichkeit für die HO-Endonuklease und somit die Schneidbarkeit bei den einzelnen Stämmen nicht deutlich unterschiedlich ist.

Hinsichtlich des Anteils an Reparaturereignissen mit Translokation unter den eindeutig nachvollziehbaren Ereignissen lassen sich beim Vergleich der fünf Stämme insgesamt keine signifikanten Unterschiede ausmachen. Insbesondere kann die zuvor beobachtete Tendenz einer geringeren Translokationsrate bei Lage des zweiten Bruchorts an einer interstitellen Position nicht bestätigt werden. Bei dem hier gewählten experimentellen Ansatz ist also kein

Einfluss der relativen Position der Bruchorte auf die Wahrscheinlichkeit einer Fehlverknüpfung der Enden erkennbar.

8. Diskussion:

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen der Einfluss der Zellkernarchitektur in Hefe auf die Ausbildung von interchromosomalen Austauschaberrationen untersucht. Im ersten Fall wurden frühstationäre, rekombinationsdefiziente Zellen mit ionisierender Strahlung bestrahlt (mit Dosen, die ca. 10-25 DSB pro Zelle induzieren) und dann ausplattiert. Klone aus überlebenden Zellen wurden durch elektrophoretische Karyotypisierung auf das Vorhandensein von Translokationen geprüft. In einem Teil dieser Klone wurden schließlich die Translokationsbruchpunkte kartiert. Dabei wurde eine signifikante Unterrepräsentierung von Bruchpunkten in interstitiellen Chromosomenabschnitten, d.h. fernab von Centromer oder Telomer, beobachtet. Im zweiten Fall wurden, in rekombinationskompetenten Zellen, Paare von Erkennungsstellen für die ortsspezifische HO-Endonuklease an unterschiedlichen chromosomalen Positionen inseriert. Nach konstitutiver Induktion der Endonuklease-Aktivität können sich nur dann Kolonien bilden, wenn bei der Bruchreparatur Veränderungen der Erkennungssequenzen eingeführt werden, die ein erneutes Schneiden unmöglich machen. Die Reparaturereignisse in den Kolonien wurden dann charakterisiert. Es zeigte sich, dass Reparatur durch intramolekulare Verknüpfung und Reparatur durch intermolekulare Verknüpfung etwa gleich häufig und unabhängig von der chromosomalen Position der Bruchstellen ist. Die Ergebnisse der beiden Methoden sind also auf den ersten Blick widersprüchlich.

Hinsichtlich des erkennbaren Einflusses der Zellkernarchitektur auf die Verteilung der Translokationsbruchpunkte 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 Centromer abhängt, d.h. wenn zwei Bereiche etwa gleich weit vom Centromer entfernt liegen, haben sie eine höhere Kollisionswahrscheinlichkeit als wenn sie unterschiedliche Centromerdistanz aufweisen. Einen ähnlichen Einfluss der Centromerdistanz auf die räumliche Assoziation zeigten Aragon-Alcaide und Strunnikov (2000) nach in vivo Fluoreszenzmarkierung.

Hinsichtlich des Fehlens eines deutlichen Einflusses der Kernarchitektur ähneln die Ergebnisse im Falle der Endonuklease-induzierten Brüche jedoch denjenigen von Haber und Leung (1996). Diese Autoren haben, ebenfalls unter Verwendung des HO-Systems, Stämme konstruiert, in welchen zwei HO-induzierte DSB entweder intra- oder intermolekular durch *Single Strand Annealing* (SSA) repariert werden können. Im Gegensatz zu unserem System setzt das SSA-System voraus, dass es zwischen den potentiellen Partnern längere homologe Bereiche gibt. Es wurden vier Konstellationen von Bruchorten getestet, wobei ein Bruchort immer etwa 50 kb vom Centromer des Chromosoms III lag. Bei chromosomalen Entfernungen des zweiten Bruchortes zwischen 13 und 115 kb lag die Häufigkeit interchromosomaler Verknüpfung zwischen 55% und 60% (die Bevorzugung der interchromosomalen Interaktion erklärt sich mit der Kinetik des Freisetzens potentiell komplementärer Einzelstrangbereiche); bei einer Entfernung von 216 kb war die Häufigkeit moderat reduziert, auf 43%. Die Autoren schlossen aus ihren Daten, dass es keine ausgeprägte Territorialstruktur der Chromosomen in Hefe gibt.

Eine große Beweglichkeit fluoreszenzmarkierter Chromosomenregionen konnte durch mikroskopische Lebendzellbeobachtung bestätigt werden (Heun et al. 2001, Gasser 2002): Interstitielle Chromosomenbereiche können schnelle Bewegungen von $>0.5 \mu\text{m}$ in 10 sec durchführen, das entspricht etwa der Hälfte des Kernradius. Im Gegensatz dazu zeigten ein telomernaher und ein centromernaher Bereich (Abstand je ca. 15 kb) bei der Lebendzellbeobachtung einen reduzierten Bewegungsraum, vermutlich wegen der Anheftung der Telomere an die Kernmembran und der Centromere an den *Spindle Pole Body*. Gasser und Mitarbeiter erlangten eine Fluoreszenzmarkierung bestimmter Regionen durch Einbau eines größeren Abschnittes von lac-Repressor-Bindesequenzen. Durch Expression eines GFP-markierten lac-Repressorproteins kann dieser Bereich indirekt markiert werden. Mit ähnlichen Methoden gelang es kürzlich Lisby et al. (2003), die nähere Umgebung zweier unterschiedlicher Endonuklease-Erkennungsstellen (HO und I-SceI) mit unterschiedlichen Spektralvarianten von GFP zu markieren. Sind die beiden Bruchorte centromernah gelegen, beobachten sie nach Bruchinduktion eine Ko-lokalisierung in 48% der Zellen, liegt einer centromernah und der zweite telomernah, beträgt die Ko-lokalisierungshäufigkeit 38%. Interessanterweise liefern diese Autoren auch eine mögliche Erklärung für die hohe Ko-lokalisierungshäufigkeit von gebrochenen Regionen: Sie beobachten nämlich, dass auch nach Induktion einer hohen Zahl an DSB nur wenige Rad52-Proteinfoci auftreten, und dass zwei

markierte DSB-Orte häufig mit demselben Rad52-Focus ko-lokalisieren. Diese Daten lassen sich mit der Annahme einer kleinen Zahl von "Reparaturfabriken" in der Zelle erklären, die jeweils für mehrere Brüche verantwortlich sind. Ein solcher Effekt verschleiert natürlich mögliche Einflüsse einer initialen Entfernung zwischen den Bruchorten.

Ein unerwartetes Ergebnis der Studie von Lisby und Mitarbeitern ist, dass die Endonuklease-induzierten DSB mit Rad52-Foci ko-lokalisieren, obwohl die Brüche nicht durch homologe Rekombination reparierbar sind. Dies könnte bedeuten, dass Einflüsse der initialen DSB-Lokalisierung und damit der Kernarchitektur nur sichtbar werden, wenn die Brüche nicht zu "Reparaturfabriken" migrieren/transportiert werden, sei es, weil die Bruchkonformation dagegen spricht, oder weil es keine funktionellen Fabriken gibt. So könnte der von Burgess und Kleckner (1999) mittels Cre/loxP-Rekombination gezeigte Einfluss des Centromerabstandes auf die Wahrscheinlichkeit intermolekularer Kollisionen dadurch erklärt werden, dass die Intermediate der Cre/loxP-Rekombination nie als freie Enden und zu reparierende DSB erkannt werden. Auch wenn über die Funktionalität von "Reparaturfabriken" in *rad52* und *rad54* Mutanten bisher nichts bekannt ist, lassen sich möglicherweise unsere Ergebnisse der Bruchpunktkartierung in strahleninduzierten Translokationen dadurch erklären, dass in den dort verwendeten Mutanten der Einfluss der Kernarchitektur eben nicht verschleiert wird. Um diese Hypothese zu prüfen, müssten die Untersuchungen zu den Endonuklease-induzierten DSB in *rad52/rad54* Mutanten wiederholt werden.

Während Lisby und Mitarbeiter (2003) in Hefe eine Diskrepanz zwischen der Zahl der Rad52-Foci und der Zahl der DSB beobachten und auf die Existenz von "Reparaturfabriken" schließen, sind im Säugerzellsystem bisher keine direkten Hinweise auf solche Fabriken gefunden worden. Eine der ersten messbaren Antworten der Säugerzelle auf DSB-Induktion ist die Phosphorylierung des Histons H2AX in der Umgebung des Bruches zum sogenannten gamma-H2AX (Rogakou et al. 1999, Paull et al. 2000). Mit spezifischen Antikörpern können gamma-H2AX-Foci nach Bestrahlung innerhalb weniger Minuten nachgewiesen werden. Eine sorgfältige Bestimmung der Anzahl der Foci und Korrelation mit Daten aus DSB-Messung mittels PFGE zeigte, dass die Anzahl der gamma-H2AX-Foci kurz nach Bestrahlung mit der Anzahl der DSB sehr gut korreliert (Rothkamm und Löbrich 2003). Eine zu späteren Zeitpunkten zu beobachtende Abnahme der Anzahl an Foci wird allgemein durch stattgefundenene Reparatur erklärt. Unklar, und immunchemisch nicht klärbar, ist, ob

möglicherweise auch mehrere Foci verschmelzen, wie es im Falle eines Zusammenführens mehrerer gebrochener Regionen in einer "Reparaturfabrik" zu erwarten wäre. Im Zuge der zellulären Antwort auf DSB beobachtet man bei zahlreichen Proteinen eine Ko-lokalisierung mit den gamma-H2AX-Foci und ebenfalls Foci-Bildung. Darunter ist das Protein 53BP1, als eines der ersten, ebenfalls innerhalb von Minuten nach Bruchinduktion am Schadensort zu finden, und die Anzahl an 53BP1-Foci scheint in dieser frühen Phase mit der Zahl erwarteter Brüche zu korrelieren (Schultz et al. 2000). Eine Akkumulierung von Proteinen, die an Rekombinationsreparatur beteiligt sind, wie Rad51 oder Rad52, wird im allgemeinen erst zu späteren Zeitpunkten beobachtet (z.B. Liu und Maizels 1999, Paull et al. 2000), d.h. wenn die Zahl der gamma-H2AX-Foci schon abgenommen hat. Um zu klären, ob auch in Säugerzellen mehrere Bruchorte in einer "Reparaturfabrik" repariert werden, müssten verschiedenen frühe und späte Komponenten unter Lebendbedingungen beobachtet werden, z.B. nach Markierung mit GFP.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus Säuger- und Hefezellen sollte beachtet werden, dass die Messungen bei unterschiedlichen Schadensdichten erfolgten: Lisby und Mitarbeiter beobachten eine reduzierte Zahl von Rad52-Foci in Hefe bei Dosen von mehreren 100 Gy. Bei einer DSB-Induktionsrate von 3×10^{-9} DSB Gy⁻¹ bp⁻¹ (Kraxenberger et al. 1994) erwartet man bei 800 Gy etwa 30 DSB pro Zellkern. Dieser hat ein Volumen von 11 μm^3 (Ostashevsky 1998), d.h. pro μm^3 liegen etwa 3 DSB vor. Um in Säugerzellen genau Foci-Messungen durchführen zu können, werden gewöhnlich Dosen um 1 Gy verwendet, das entspricht etwa 35 DSB pro Zellkern. Bei einem Zellkernvolumen von mindestens 100 μm^3 (Ostashevsky 1998) ist die Schadensdichte also mindestens zehnmal niedriger als bei den Messungen im Hefesystem. Wenn man annimmt, dass eine "Reparaturfabrik" für ein bestimmtes Einzugsgebiet zuständig ist, ist möglicherweise die Schadensdichte bei den Messungen im Säugersystem nicht ausreichend, um Hinweise auf "Reparaturfabriken" zu finden. Bei den wenigen Arbeiten, wo Autoren versuchten, die Anzahl der Foci nach höheren Dosen zu bestimmen (z.B. Schultz et al. 2000) sieht man in der Tat ein Plateau in der Dosiseffektkurve, das gewöhnlich durch Limitierungen bei der optischen Auflösung erklärt wird. Im Lichte der Hefedaten betrachtet, könnten dies aber auch ein Hinweis auf "Reparaturfabriken" sein.

9. Literatur

- Aragon-Alcaides L, Strunnikov AV (2000) Functional dissection of in vivo interchromosome association in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Cell Biol* 2:812-818
- Aylon Y, Liefshitz B, Bitan-Banin G, Kupiec M (2003) Molecular dissection of mitotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23:1403-1417
- Burgess SM, Kleckner N (1999) Collisions between yeast chromosomal loci in vivo are governed by three layers of organization. *Genes Dev* 13:1871-1883
- Cremer T, Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev Genet* 2:292-301
- Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N (2002) Capturing chromosome conformation. *Science* 295:1306-1311
- Ferreira J, Paoletta G, Ramos C, Lamond AI (1997) Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J Cell Biol* 139:1597-1610
- Friedl AA, Kiechle M, Fellerhoff B, Eckardt-Schupp F (1998) Radiation-induced chromosome aberrations in *Saccharomyces cerevisiae*- influence of repair pathways. *Genetics* 148:975-988
- Gasser SM (2002) Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science* 296:1412-1416.
- Gotta M, Laroche T, Formenton A, Maillet L, Scherthan H, Gasser SM (1996) The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3 and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J cell Biol* 134:1349-1363
- Guacci V, Hogan E, Koshland D (1994) Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* 125:517-530,
- Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2298-2302
- Haber JE, Leung WY (1996) Lack of chromosomal territoriality in yeast: Promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13949-13954
- Heun P, Lariche T, Shimada K, Furrer P, Gasser SM (2001) Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science* 294:2181-2186
- Inbar O, Kupiec M (1999) Homology search and choice of homologous partner during mitotic recombination. *Mol Cell Biol* 19:4134-42
- Jin Q, Fuchs J, Loidl J (2000) Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J Cell Sci* 113:1903-1912
- Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A, Squire JA (2002) The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal alterations in tumours. *Genes Chrom Cancer* 35:97-112
- Kraxenberger A, Friedl AA, Kellerer AM (1994) Computer simulation of pulsed field runs allows the quantitation of radiation-induced double-strand breaks in yeast. *Electrophoresis* 15: 128-136
- Lea DE (1946) Actions of radiations on living cells. Cambridge University Press
- Lisby M, Mortensen UH, Rothstein R (2003) Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nature Cell Biol* 5:572-577
- Liu Y, Maizels N (2000) Coordinated response of mammalian Rad51 and Rad52 to DNA damage. *EMBO Rep* 1:85-90
- Loidl J (2003) Chromosomes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Rev Cytol* 222:141-196
- Mirzoeva OK, Petrini JH (2001) DNA damage-dependent nuclear dynamics of the mre11 complex. *Mol Cell Biol* 21:281-288
- Ostashevsky J (1998) A polymer model for the structural organization of chromatin loops and minibands in interphase chromosomes. *Mol Biol Cell* 9:3031-3040
- Ostashevsky J (2002) A polymer model for large-scale chromatin organization in lower eukaryotes. *Mol Biol Cell* 13:2157-2169
- Parada LA, Misteli T (2002) Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol* 12:425-432
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kichgessner CU, Gellert M, Bonner WM (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10:886-895
- Richardson C, Moynahan ME, Jasin M (1998) Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev* 12:3831-3842
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-915
- Rothkamm K, Löbrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5057-5062
- Rothstein R (1989) Targeting, disruption, replacement and allelic rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol* 194:281-301
- Sachs RK, Chen AM, Brenner DJ (1997) Review: Proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 71:1-19.
- Sadoni N, Langer S, Fauth C, Bernardi G, Cremer T, *et al.* (1999) Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* 146:1211-26
- Savage JRK (1996) Insight into sites. *Mutat Res* 366:81-95
- Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 151:1381-1390

- Tanabe H, Habermann FA, Solovei I, Cremer M, Cremer T (2002) Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res* 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. *J Cell Biol* 150:283-291
- Verschure PJ, van der Kraan I, Manders EM, van Driel R (1999) Spatial relationship between transcriptional sites and chromosome territories. *J Cell Biol* 147:13-24
- Vrieling H. Mitotic maneuvers in the light (2001) *Nature Genetics* 28:101-102
- 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
- Weiss K, Simpson RT (1998) High-resolution structural analysis of chromatin at specific loci: *Saccharomyces cerevisiae* silent mating type locus HMLalpha. *Mol Cell Biol.* 18:5392-403.