

Erfassung von mutagenen und rekombinogenen Effekten durch die
Hefe Saccharomyces cerevisiae

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Anna, Neffgen geb. Kowol

aus Hindenburg, Polen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. U. Klinner
 Hochschul-Dozent Dr. B. Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

I Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Grundlage für Mutagenitäts- / Rekombinogenitätstests ..	1
1.2 Erfassung mutagener und rekombinogener Effekte	5
1.2.1 Mutationen	5
1.2.2 Mitotische Genkonversionen.....	7
1.2.3 Mitotische Crossover-Ereignisse	8
1.2.4 Chromosomenverluste	8
1.3 Beispiele bekannter <i>S. cerevisiae</i>-Testsysteme	9
1.3.1 <i>S. cerevisiae</i> -Stamm D4	9
1.3.2 <i>S. cerevisiae</i> -Stamm D7	10
1.3.3 <i>S. cerevisiae</i> -Stämme D6 und D61.M	10
1.3.4 <i>S. cerevisiae</i> -Stamm LBL1	12
1.3.5 <i>S. cerevisiae</i> -Stamm RS112	13
1.3.6 <i>S. cerevisiae</i> -Stamm YA72.....	13
1.3.7 <i>RNR3-lacZ</i> -Testsystem	14
1.3.8 <i>S. cerevisiae</i> -Stamm GenT01 – GSA (GreenScreen® assay)	15
1.4 Wirkungsweise verwendeter Modellsubstanzen und der UV-Strahlung.....	16
1.4.1 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)	16
1.4.2 UV-Strahlung	16
1.4.3 Ethidiumbromid	17
1.4.4 Benomyl	18
1.4.5 Anilin.....	19
1.5 Ziel der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Mikroorganismen	23
2.1.2 Plasmide	23
2.1.3 Oligonukleotide.....	24
2.1.4 Nährmedien	26
2.1.5 Chemikalien, Puffer, Enzyme und Kits.....	27
2.2 Molekulargenetische Methoden.....	28
2.2.1 DNA-Isolation	28
2.2.2 Transformation.....	29
2.2.3 Restriktion und Ligation von DNA	29
2.2.4 Aufreinigung von DNA.....	30
2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	30
2.2.6 Polymerase chain reaction (PCR)	30
2.2.7 Real-time PCR.....	31

2.2.8 Southern-Blot-Hybridisierung	32
2.2.9 Sequenzierung von DNA	32
2.3 Genetische Methoden.....	33
2.3.1 Sexuelle Hybridisierung von <i>S. cerevisiae</i>	33
2.3.2 Protoplastenfusion.....	33
2.3.3 Bestimmung des Ploidiegrades von <i>S. cerevisiae</i>	33
2.3.4 Bestimmung der Stabilität von Transformanten	34
2.3.5 Auxonaographie	35
2.4 Physiologische Methoden.....	35
2.4.1 Bestimmung der Aktivität von saurer Phosphatase in <i>S. cerevisiae</i>	35
2.4.2 Test der Wirkung von mutagenen und rekombinogenen Substanzen.....	35
2.4.2.1 Chemische Mutagenese	35
2.4.2.2 Physikalische Mutagenese mittels ultravioletem (UV) Licht	37
2.5 Statistik.....	37
2.5.1 Bestimmung des <i>t</i> -Werts.....	37
3 Ergebnisse.....	38
3.1 Konstruktion von HA	39
3.1.1 Bestimmung der Transformationseffizienz des Ausgangsstammes	39
3.1.2 Cyto duktion	39
3.1.3 Disruption von <i>URA3</i>	39
3.1.3.1 Reversion von <i>ura3-52</i>	39
3.1.3.2 Disruption von <i>URA3</i> mittels direkter Selektion auf den Ura ⁻ -Phänotyp.....	40
3.1.3.3 Disruption mittels „Marker-Rescue“-System	42
3.1.4 Disruption von <i>TRP1</i> mittels „Marker-Rescue“	45
3.2 Konstruktion von H7.....	48
3.2.1 Disruption von <i>HIS3</i> mittels „Marker-Rescue“.....	48
3.2.2 Centromernahe Integration von <i>TRP1</i>	50
3.2.2.1 Konstruktion des <i>TRP1</i> -Vektors mit Hilfe der SFH-Methode.....	51
3.2.2.2 Konstruktion des <i>TRP1</i> -Vektors mit Hilfe der LFH-Methode.....	53
3.2.2.3 Konstruktion des <i>TRP1</i> -Vektors durch Klonierung	56
3.3 Konstruktion von HAN	60
3.3.1 Reversion von <i>ade2-101</i>	60
3.3.2 Integration einer <i>URA3/kanMX4</i> -Kassette auf Chromosom XV	61
3.4 Konstruktion und Charakterisierung des Stammes DAN.....	69
3.5 Häufigkeit spontaner und induzierter Mutations- und Rekombinationsereignisse bei den Stämmen HAN und DAN.....	73
3.5.1 Häufigkeit spontaner Ereignisse	74
3.5.2 Wirkung von MNNG auf DAN.....	75
3.5.3 Wirkung von UV-Strahlung auf DAN	77

3.5.4 Wirkung von EB auf DAN -----	80
3.5.5 Wirkung von Benomyl auf DAN -----	81
3.5.6 Wirkung von Anilin auf DAN -----	83
3.5.7 Wirkung von MNNG, UV-Strahlung, EB, Benomyl und Anilin auf HAN -----	85
3.5.8 Charakterisierung einiger auxotrophen Mutanten / Rekombinanten -----	87
3.5.8.1 Stabilität von Ura ⁻ -Kolonien aus dem Stamm DAN -----	88
3.5.8.2 PCR-Charakterisierung von Ura ⁻ -Kolonien mittels PCR -----	88
3.5.8.3 PCR-Charakterisierung von Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻ -Kolonien aus dem Stamm DAN -----	90
3.5.9 Charakterisierung von Trp ⁻ -Kolonien -----	91
4 Diskussion -----	92
4.1 Transformationseffizienz beeinflussende Faktoren.....	92
4.1.1 Länge der homologen Regionen der Integrationskassette -----	92
4.1.2 Sequenz der flankierenden Regionen -----	94
4.2 Validierung des Testsystems HAN/DAN.....	95
4.2.1 Spontane Frequenzen -----	95
4.2.2 Induzierte Frequenzen -----	102
4.2.2.1 MNNG -----	102
4.2.2.2 UV-Strahlung -----	103
4.2.2.3 Ethidiumbromid -----	105
4.2.2.4 Benomyl -----	106
4.2.2.5 Anilin -----	107
4.3 Eignung des HAN/DAN-Testsystems zur routinemäßigen Erfassung genetischer Ereignisse.....	108
5 Zusammenfassung -----	110
6 Abstract -----	112
7 Literatur -----	114
8 Anhang -----	125
8.1 Sequenzierung der PCR-Amplifikate 1 und 2.....	125
8.2 Ergebnisse der Real-time PCR.....	126
8.3 Behandlung der Testerstämme HAN und DAN mit den Modellsubstanzen und UV... 127	
8.3.1 MNNG -----	127
8.3.2 UV -----	128
8.3.3 EB -----	129
8.3.4 Benomyl -----	130
8.3.5 Anilin -----	131
8.3.6 Behandlung von HAN mit den Modellsubstanzen und mit UV-Strahlen -----	132
8.4 Charakterisierung der Lage der URA3/kanMX4-Kassette.....	133

II Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Ethidiumbromid
5-FAA	2-Amino-5-Fluorobenoesäure
FACS	fluorescence-activated cell sorting
5-FOA	5-Fluoro-Orotsäure
GFP	green fluorescent protein
His	Histidin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalctopyranosid
kb	Kilobasen
MBC	Methyl-benzimidazole-2-yl-carbamat
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multi cloning site)
MGC	Mittel lange Genkonversion (medium gene conversion)
MM	Minimalmedium
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
LGC	Lange Genkonversion (long gene conversion)
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real-time PCR
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SGC	Kurze Genkonversion (short gene conversion)
SM	Selektionsmedium
Std.abw.	Standardabweichung
Trp	Tryptophan
Ura	Uracil
VM	Vollmedium
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-Indyl- β -D-Galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Saccharomyces cerevisiae als Grundlage für Mutagenitäts- / Rekombinogenitätstests

Allein in den USA werden jährlich mehr als 1000 Tonnen genotoxischer und / oder karzinogener Industrieabfall in die Umwelt entlassen (CLAXTON *et al.*, 1998). Die vorgeschriebene chemische Charakterisierung dieser Abfallprodukte allein bietet kaum die Möglichkeit zur Einschätzung ihrer Genotoxizität. Doch nicht allein der Industrieabfall, der die Luft und die Gewässer belastet, birgt potentielle Risiken. So sind in den letzten Jahren einige neue Substanzen (beispielsweise Pharmaprodukte, Kosmetikprodukte, Nahrungsergänzungsmittel u.a.) entwickelt worden. Bevor sie zur täglichen Nutzung auf den Markt kommen dürfen, müssen die mit ihnen verbundenen Risiken aufgeklärt werden. So unterscheidet das geltende EU-Recht zwischen "Altstoffen" (vor 1981 auf dem EU-Markt) und "neuen Stoffen" (seit 1981 auf den Markt gekommen). Neue Stoffe müssen bereits ab 10 kg / Jahr angemeldet und mengenabhängig geprüft werden, Altstoffe werden seit 10 Jahren in aufwändigen Verfahren auf der Basis von Priolisten von öffentlichen Behörden abgearbeitet. Das hat bewirkt, dass die meisten Altstoffe weiterhin ungeprüft verwendet werden, und das Neustoffverfahren Forschung, Entwicklung und Innovation behindert. Seit 1981 sind in Deutschland nur etwa 4000 neue Chemikalien auf den Markt gekommen. Dagegen waren 1981 100106 Altstoffe marktfähig. Mit der geplanten REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals)-Verordnung, die mehr als 40 bestehende Richtlinien ersetzen soll, hätte die künstliche Unterscheidung zwischen "Altstoffen" und "neuen Stoffen" ein Ende. So würden alle Unternehmen, die Chemikalien herstellen oder importieren, verpflichtet sein, die mit der Verwendung verbundenen Risiken zu bewerten. Das REACH-Programm schreibt vor, nach Möglichkeit auf Tierversuche zu verzichten. Als Alternativen werden mikrobiologische Testverfahren mit *Salmonella* und *Saccharomyces cerevisiae* vorgeschlagen (www.umweltbundesamt.de Stand 23.04.2004).

Derzeit muss beispielsweise vor der Kommerzialisierung von Kosmetika die Toxi-Kinetik, die systemische Toxizität, die Dermatotoxizität sowie die Mutagenität / Kanzerogenität getestet werden (hier EU-Richtlinie 76/768/EWG). Zur Bestimmung der Mutagenität / Kanzerogenität werden Ratten-Experimente sowie zwei *in vitro* Tests (Punktmutationstest und Chromosomenaberrationstest) durchgeführt (www.bfr.bund.de). Als Tierexperiment wird der 90-Tage Toxizitätstest bei Ratten vorgeschrieben. Bei der Wahl weiterer Testmethoden

wie dem Genmutationstest kann das zu vermarktende Unternehmen selbst entscheiden, welche Methode es aus den anerkannten Testsystemen auswählt.

Tierexperimente, wie die erwähnten Ratten-Experimente, werden stets dazu genutzt, die Wirkung von potentiellen Gefahrenstoffen auf den Menschen zu erforschen. Sie kosten allerdings mehr als 1 Million Dollar pro Chemikalie und dauern ca. 2-4 Jahre (SCHIESTL, 1989). Aufgrund des hohen Zeit- und Kosten-Faktors sowie aus ethischen Gründen wäre es daher wünschenswert und auch im geplanten REACH-Projekt vorgeschrieben, Tierversuche erst einzusetzen, wenn mit Hilfe eines mikrobiellen Schnelltests die Substanz als positiv eingestuft wurde. Diese Schnelltests liefern oft Ergebnisse innerhalb von wenigen Tagen bzw. Wochen, und man kann mit ihnen auch kostengünstiger arbeiten (ZIMMERMANN, 1975). Die kurze Zeitspanne bis zum Vorliegen des Ergebnisses beruht auf den hohen Wachstumsraten der verwendeten Mikroorganismen. Die Verdopplungszeit von Bakterien wie *E. coli* und *Salmonella* liegt bei ca. 20-30 Minuten und bei Hefen wie zum Beispiel *S. cerevisiae* je nach verwendetem Wachstumsmedium bei 1,5 bis 4 Stunden. Weiterhin bieten diese Testsysteme den Vorteil, dass sie in Laboratorien mit mikrobiologischer Grundausstattung durchgeführt werden können. Ein weiterer Vorteil ist die "Größe" der Mikroorganismen. So können leicht zahlreiche Substanzen parallel getestet werden. Auch die Anwendung mehrerer verschiedener Konzentrationen einer Substanz ist möglich, wodurch schwache Mutagene erfasst werden können. Darüber hinaus können viele Mikroorganismen über lange Zeit in kleinen Flüssigmedium-Volumina gelagert werden, was eine Nachuntersuchung der veränderten bzw. unveränderten Organismen nach einer Mutagenbehandlung ermöglicht.

Zur Zeit verwendet man zur schnellen Identifikation von Mutagenen am häufigsten den Ames-Test (AMES *et al.*, 1975), bei dem die Häufigkeit von his^+ -Revertanten auf Histidin-Mangelmedium als Maß für eine mutagene Wirkung erfasst wird. Mehrere (meistens fünf) *Salmonella typhimurium*-Stämme detektieren dabei zwei Mutationstypen (Basenpaar-Substitution und Frameshift). Rückmutationen durch Basenaustausch werden mit Hilfe der Allele *hisG46* und *hisG428* ermittelt, Frameshift-Mutationen führen bei den Allelen *hisC3076*, *hisD3052*, *hisO1242* sowie *hisD6610* zur Rekonstitution des Wildtyps. Man erhöht die Sensitivität gegenüber Mutagenen durch unterschiedliche genetische Veränderungen wie die Steigerung der Zellpermeabilität (*rfa*), die Unterdrückung der DNA-Reparatur (*uvrA*) sowie durch die Integration von *his⁻*-tragenden Plasmiden (CHOY, 1996). Die Zugabe der S9-

Fraktion (Extrakt aus der Rattenleber) imitiert die endogene Metabolisierung in höheren Organismen, in Fällen bei der eine Substanz aus der inaktiven in die aktive Form überführt wird (TURNER *et al.*, 1978). Es wurde jedoch gezeigt, dass trotz der Verwendung von mehreren Stämmen mit unterschiedlichen Primärdefekten im Ames-Test sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse erzielt werden. So haben ASHBY und TENNANT (1991) gezeigt, dass nur die Hälfte der getesteten Karzinogene eine korrekte Antwort im Ames-Test liefern konnte. Nur 50 % aller Karzinogene induzieren Punktmutationen bei *Salmonella*, was nahe legt, dass es alternative Mechanismen für die biologische Aktivität der Karzinogene gibt (SCHIESTL *et al.*, 1997). Es sollte hervorgehoben werden, dass die Reversion einer Primärmutation nur möglich ist, wenn genau dieser Defekt außer Kraft gesetzt wird. So kann die Reversion nur durch eine Punktmutation aufgehoben werden. Nicht jedes Mutagen aber verursacht Punktmutationen (Mutagenspezifität), so dass der Einsatzbereich zur Testung potentieller Gefahrenstoffe mit dem Ames-Test nur eingeschränkt möglich ist.

Um sowohl die Vorteile eines mikrobiologischen Testsystems zu nutzen als auch neben der Induktion von Punktmutationen andere genetische Ereignisse detektieren zu können, bietet sich die Hefe *S. cerevisiae* als eukaryontischer Testorganismus an. Zum Beispiel kann die Chromatinstruktur der Chromosomen für die Mutagenitäts-Testung entscheidend sein. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass eine nicht zufällige Verteilung von DNA-Schäden in Nucleosomen-assoziiierter DNA erfolgt (FRIEDBERG *et al.*, 1995). Weitere Systeme sind spezifisch für Eukaryonten, wie der Spindelapparat, die Mechanismen der mitotischen Rekombination und der Reparatur. Deshalb sind die Ergebnisse aus Bakterien-Testsystemen auf Eukaryonten nur eingeschränkt übertragbar. Auch wenn es sich um einen niederen Eukaryonten handelt, ermöglicht Hefe eher die Übertragung von Testergebnissen auf die Verhältnisse bei höheren Eukaryonten.

Ein weiterer Vorteil eines eukaryotischen Testsystems liegt in einer Besonderheit des zelleigenen Metabolismus von *S. cerevisiae*. CALLEN und PHILPOT (1977) haben die Existenz eines Hydroxylierungssystems basierend auf Cytochrom-P-450 entdeckt. Cytochrom-P-450-Oxygenasen sind intrazelluläre Enzyme, die normalerweise dazu dienen, Giftstoffe und fettlösliche Fremdstoffen in ungefährliche Verbindungen umzuwandeln, die leicht ausgeschieden werden können. Bei manchen Substanzen „versagen“ sie jedoch und metabolisieren die „unschädliche“ Substanz zu dem eigentlichen Karzinogen (ALBERTS *et*

al., 1994). Die Verwendung der S9-Fraktion von Lebermikrosomen der Ratte erhöht in einigen Fällen die Sensitivität der Hefezellen gegenüber Mutagenen (BRUSICK und ANDREWS, 1974). Auch aus Pflanzen (PLEWA und GENTILE, 1976) oder aus Muscheln gewonnene Extrakte (PARRY *et al.*, 1976) hatten bei *S. cerevisiae* den gleichen Effekt. Darüber hinaus kann das zelleigene P-450-System von *S. cerevisiae* eine Verstärkung der mutagenen Wirkung einer Substanz verursachen (POLI *et al.*, 1999). Die Verwendung eines exogenen Aktivators ist somit aufgrund des eigenen P-450 Systems bei *S. cerevisiae* anscheinend nicht erforderlich, kann aber zur Erhöhung der Sensitivität führen.

Zusätzlich zum Kerngenom besitzen Hefen ein mitochondriales Genom (mtDNA) (PRUNELL *et al.*, 1977). ERNSTER *et al.* (1995) beschrieben einen erheblichen Einfluss des mitochondrialen Genoms auf das Altern, degenerative Krankheiten und Krebs beim Menschen. So ist es von großem Interesse, xenobiotische Einflüsse auf die mitochondriale DNA zusätzlich zur genotoxischen Wirkung auf die Kern-DNA zu erforschen. Der Vorteil der Hefe liegt hierbei in der Fähigkeit, auch mit umfangreichen Mutationen in der mtDNA zu überleben. Diese Mutanten verlieren jedoch die Fähigkeit, auf veratembaren Substanzen zu wachsen. Aufgrund dieser wichtigen Eigenschaft ist es möglich, Substanzen zu identifizieren, die am mitochondrialen Genom ihren Angriffsort haben.

Durch das Vorhandensein einer Zellwand haben Hefen sehr robuste Zellen (WALMSLEY und KEENAN, 2000), wodurch das Experimentieren mit diesen Organismen erleichtert wird. Sie besitzen eine hohe Toleranz gegenüber Schwankungen des pH-Wertes (Wachstum zwischen pH 3 und pH 9 möglich) und der Temperatur, die sie in einem Temperaturbereich zwischen 0°C und 40°C überleben lässt. Diese Eigenschaft der Hefen ermöglicht es auch, Substanzen unter suboptimalen Wachstumsbedingungen zu testen. So konnten beispielsweise ZIMMERMANN und MOHR (1992) durch eine Behandlung der Zellen mit Chromosomenverlust-induzierenden Substanzen (Glyoxal, Formaldehyd, Bavistan, etc.) im Eisbad ein eindeutigeres Ergebnis erzielen als durch die Inkubation der Zellen bei 28°C.

Die Hefe *S. cerevisiae* hat anderen Ascomyceten gegenüber noch weitere wesentliche Vorteile. Das Genom ist vollständig sequenziert, und es sind mehr als 60 % der Genfunktionen bekannt. Es gibt zahlreiche etablierte molekulargenetische Methoden, wie die gerichtete Integrationsmutagenese. Dieses Wissen erleichtert die notwendige Manipulation des Genoms, um einen Testerstamm konstruieren zu können. Die Zellen sind sowohl im

haploiden als auch im diploiden Zustand stabil. Außerdem handelt es sich bei dieser Hefe nicht um einen pathogenen Organismus, so dass die Arbeit mit *S. cerevisiae*-Zellen keine gesundheitlichen Risiken birgt. Auch die molekulargenetische Manipulation ist ohne Risiko, da es sich bei der Bäckerhefe um einen GRAS (Generally Recognized As Safe)-Organismus handelt.

1.2 Erfassung mutagener und rekombinogener Effekte

1.2.1 Mutationen

Mutationen sind selten vorkommende Ereignisse, deren quantitative Erfassung die Untersuchung einer großen Anzahl von Zellen erfordert (ZIMMERMANN, 1975). Die Detektion kann durch Vorwärtsmutationen oder Rückmutationen erfolgen. Die Mutation wird als Veränderung der Sequenz der genomischen DNA definiert (LEWIN, 1991), so dass die Rückmutation eine Umkehrung der Wirkung der Mutation, die Gene inaktiviert hat, und somit die Wiederherstellung des Wildtyps darstellt.

Eine Rückmutation kann aufgrund von zwei unterschiedlichen Veränderungen hervorgerufen werden. Man kennt zum einen die echte Reversion, die zur Wiederherstellung der ursprünglichen Nucleotidsequenz führt. Zum anderen gibt es die Suppression, die zur Wiederherstellung des primären Phänotyps führt. Bei der Suppression tritt eine weitere Mutation an einer anderen Stelle im Genom auf, die den Effekt der primären Mutation kompensiert. Beobachtet wurden Suppressionen zum Beispiel bei der Induktion von Frameshift-Mutationen durch Acridin (LEWIN, 1991).

Meist ist die Erfassung von Rückmutationen einfacher als die von Vorwärtsmutationen. Dabei wird auf einem synthetischen Medium ohne den Zusatz (wie z.B. Aminosäure, Vitamin, Purin oder Pyrimidin) selektiert, der von den mutierten Organismen zum Wachstum benötigt wird (ZIMMERMANN, 1975). Der Ames-Test bedient sich dieser Methode, mit der man Revertanten selektieren kann. Die Erfassung von Reversionseignissen hat jedoch den Nachteil, dass sie einer spezifischen genetischen Veränderung bedarf.

Vorwärtsmutationen führen meistens zum Verlust der Genfunktion, was vielfach ein aufwendiges Screening der Mutanten erfordert. Es gibt jedoch einige Systeme, die bei der Hefe *S. cerevisiae* zur positiven Selektion von Vorwärtsmutanten angewendet werden

können. Im Folgenden werden einige Beispiele zur Selektion und zum Screening von Vorwärtsmutanten vorgestellt.

Das von ROMAN (1955) beschriebene Screening-System basiert auf der Beobachtung, dass bei einem Defekt an den Genen *ADE1* oder *ADE2* die Kolonien von *S. cerevisiae* ein rotes Pigment anreichern. Die Bildung des roten Pigments kann aber bei *ade1*- und *ade2*-Mutanten durch eine Mutation eines weiteren Purin-Biosynthesegens (z.B. *ADE5*) unterdrückt werden, wenn es im Biosyntheseweg vor den beiden Loci liegt. Zur Detektion von derart mutierten Zellen werden diese auf ein Medium ausplattiert, welches wenig Adenin beinhaltet. Anschließend werden weiße oder weiß-sektorierte Kolonien von roten Kolonien unterschieden.

Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung von Vorwärtsmutationen wurde von SRB (1955) entwickelt. Diese Methode basiert auf dem Erkenntnis, dass die Arginin-Permease ihre Funktion verliert. Dies wiederum führt zur Resistenz gegen das Arginin-Analogon Canavanin, was zur Selektion dem Medium zugesetzt wird.

Auch die Selektion von Cycloheximid-resistenten Kolonien ist durch die Mutation eines *CYH2*-Allels in *CYH2/cyh2*-Stämmen möglich (FRIED und WARNER, 1982). Durch den entstandenen homozygoten *cyh2/cyh2*-Zustand, der durch eine Mutation verursacht wird, kann die rezessive Resistenz zur Expression kommen.

Außerdem können Vorwärtsmutationen im *URA3*-Gen selektiert werden. Mutanten mit einem *URA3*-Defekt können direkt auf 5-Fluoro-Orotsäure-haltigem Medium (5-FOA) angereichert werden (BOEKE *et al.*, 1984). Die Selektion ist durch den Verlust der Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase-Aktivität bedingt und auf viele eukaryotische wie auch prokaryotische Zellen anwendbar. Die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase wird zur Bildung der Orotsäure benötigt, die eine Vorstufe der Pyrimidine ist. Bei der Zugabe von 5-FOA zum Medium wird durch das *URA3*-Genprodukt das toxische 5-Fluorouracil gebildet, und Zellen, die einen funktionierenden Pyrimidin-Biosyntheseweg besitzen, können auf dem Medium nicht mehr wachsen. Die Zellen, die jedoch eine Mutation im *URA3*-Gen haben und somit kein aktives Enzym besitzen, können zu Kolonien heranwachsen, wenn Uracil zum Medium supplementiert wird.

ESPOSITO *et al.* (1994) schlagen die Selektion von Vorwärtsmutanten auf Medium mit L- α -Aminoacidat (α -Aa) als Stickstoffquelle vor. Auf diesem Medium können Zellen mit *lys2*-Mutationen oder *lys5*-Mutationen zu Kolonien heranwachsen. 97 % der auf α -Aa-Medium selektierten Kolonien tragen jedoch eine *lys2-x* Mutation.

Die von TOYN *et al.* (2000) entwickelte Methode ermöglicht es schließlich, *TRP1*-Mutanten auf 5-FAA(5-fluoroantranilic acid)-haltigem-Medium zu selektieren. 5-Fluorotryptophan, 5-Methyltryptophan sowie Tryptophan sind „feedback“-Inhibitoren der Anthranilat-Synthase. Die Anthranilat-Synthase katalysiert den ersten Schritt des Biosyntheseweges, welcher die Wachstumslimitierung verursacht, wenn Tryptophan-Mangel im Medium auftritt (SCHÜRCH *et al.*, 1974; MIOZZARI *et al.*, 1977). Zusätzlich wird 5-Fluorotryptophan in ein Protein eingebaut, was zu einem nicht funktionalen Enzym führt. Durch den Verlust der Enzymaktivität nach einer Mutation von *TRP1*, *TRP3*, *TRP4* oder *TRP5* (diese sind verantwortlich für die Konversion von Anthranilsäure in Tryptophan) können Mutanten mit Hilfe des Antimetaboliten 5-FAA selektiert werden, da sie gegenüber diesem resistent sind, weil 5-Fluorotryptophan nicht gebildet werden kann. Durch eine gleichzeitige Zugabe von Tryptophan ins Selektionsmedium können die Auxotrophen zu Kolonien heranwachsen.

1.2.2 Mitotische Genkonversionen

Unter einer Genkonversion versteht man den nicht-reziproken Transfer von genetischer Information zwischen homologen Sequenzen. ZIMMERMANN und SCHWEIER (1967) gingen davon aus, dass die mitotische Genkonversion ein Transfer kurzer – bis zu 1 kb großer – DNA-Abschnitte zwischen entsprechenden Regionen von Chromatiden homologer Chromosomen ist. JUDD und PETES (1988) fanden jedoch heraus, dass die mittlere Größe von mitotisch konvertierten DNA-Segmenten im *URA3*-Locus von *S. cerevisiae* zwischen 4 und 10 kb liegt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass selten auch längere Bereiche konvertiert werden, wie es durch GOLIN und seine Mitarbeiter postuliert wurde (GOLIN *et al.*, 1986; GOLIN und FALCO, 1988; GOLIN und TAMPE, 1988). Spontane Genkonversionen ereignen sich mit einer Häufigkeit von 10^{-5} bis 10^{-6} pro Generation und Gen (CAMPBELL *et al.*, 1975).

Das Auftreten mitotischer Genkonversionen kann relativ einfach erfasst werden. ZIMMERMANN (1975) verwendete hetero-allele diploide Stämme, die zwei defekte Allele des gleichen Genlocus aufwiesen. Die Häufigkeit von wachsenden Wildtyp-Kolonien wurde

dabei mit der Frequenz der Genkonversionen gleichgesetzt. So wurden zum Beispiel im Stamm D4 *ade2-1/ade2-2* und / oder *trp5-12/trp5-27* Mutanten zur Bestimmung der Genkonversionshäufigkeit verwendet (ZIMMERMANN und SCHWEIER, 1967).

1.2.3 Mitotische Crossover-Ereignisse

Zur Erfassung von mitotischen Crossover-Ereignissen dienen zahlreiche diploide Hefestämme. Diese Stämme besitzen mindestens zwei Selektionsmarker auf dem gleichen Chromosomenarm. Findet ein Crossover-Ereignis zwischen dem Centromer und dem Markergen statt, das näher am Centromer positioniert ist, so kann das Ereignis detektiert werden.

Der Stamm D5 (ZIMMERMANN, 1973) wurde als einer der ersten *S. cerevisiae*-Stämme zur Erfassung von mitotischen Crossover-Ereignissen entwickelt. D5 und D7 (ZIMMERMANN 1975) sind diploide Stämme, die zwei Allele des *ade2*-Locus (*ade2-40/ade2-119*) besitzen. Durch die Mutation *ade2-40* kommt es in haploiden oder homozygoten diploiden Zellen (*ade2-40/ade2-40*) zur Bildung eines tiefroten Pigments, *ade2-119* Mutanten erscheinen dagegen rosa. Beide Mutationen können einander komplementieren, so dass Zellen des Stammes D7 (*ade2-40/ade2-119*) weiß und Adenin-prototroph sind. Kommt es zum Crossover-Ereignis zwischen Centromer und dem *ade2*-Locus, so segregieren zu 50 % *ade2-40/ade2-40* Tochterzellen und *ade2-119/ade2-119* Zellen und zu 50 % Zellen mit dem Phänotyp des Ausgangsstammes. Dieses Ereignis führt dann zu rot-rosa sektorierten Kolonien. 1975 wurde das gleiche System zur Erfassung von Crossover-Ereignissen von ZIMMERMANN in dem Stamm D7 etabliert. Eine Beschreibung dieses Stammes folgt im Abschnitt 1.3.2. 1994 wurde von ACUNA *et al.* im Stamm YA72 ein einfaches und eindeutiges System zur Ermittlung der Häufigkeit von mitotischen Crossover-Ereignissen konstruiert. Bei diesem Stamm ist es möglich, Uracil-auxotrophe Kolonien, die durch Crossover-Ereignisse entstanden sind, auf 5-FOA-Medium zu selektieren. (Beschreibung des Stammes in Abschnitt 1.3.6).

1.2.4 Chromosomenverluste

Es wurden einige *S. cerevisiae*-Stämme entwickelt, die das Auftreten von Aneuploidie anzeigen können. Bei allen beschriebenen Testsystemen ist entscheidend, dass möglichst viele Markergene auf beiden Seiten des Centromers vorhanden sind, um einen Verlust des entsprechenden Chromosoms zu verifizieren.

In den Abschnitten 1.3.3 und 1.3.4 werden drei solcher Stämme beschrieben. Auch die Stämme g632 und g551 (KUNZ und HAYES, 1982) dienen zur Ermittlung der Häufigkeit von mitotischen Chromosomenverlusten. Dort wird die rezessive Canavanin-Resistenz zur Selektion von möglichen aneuploiden Kolonien genutzt. Zusätzliche Markergene belegen anschließend den tatsächlichen Verlust des Chromosoms. DIXON (1983) beschrieb zwei weitere Stämme (XD72 und XD79), die zur Erfassung von mitotischen Chromosomenverlusten dienen. Diese Stämme tragen die Markergene *SUP4* und *SUP7*. Der Verlust des Suppressorgen-tragenden Chromosoms resultiert im Wachstum der Zellen auf Ethylenglycol- und Canavanin-haltigem Medium.

1.3 Beispiele bekannter *S. cerevisiae*-Testsysteme

Testerstämme dienen der Erfassung von Mutationen, Rekombinationsereignissen, Crossover-Ereignissen und Chromosomenverlusten oder detektieren die Induktion von DNA-Schäden. Aufgrund der im Abschnitt 1.1 beschriebenen und der vielen weiteren Vorteile, die ein *S. cerevisiae*-Testerstamm bietet, wurden bereits zahlreiche Testerstämme entwickelt. Im Folgenden sollen Einige beispielhaft vorgestellt werden.

1.3.1 *S. cerevisiae*-Stamm D4

Der Stamm D4 (ZIMMERMANN und SCHWEIER, 1967) wurde aus zwei haploiden Stämmen (MANNEY, 1964 a, b) konstruiert und diente der Erfassung von mitotischen Genkonversionsereignissen. D4 ist für die ungekoppelten Markergene *ade2* und *trp5* hetero-allel.

$$\text{D4: } \begin{array}{ccccc} \alpha & ga_2 & ade_{2-2} & trp_{5-12} & ilv_1 \\ \hline a & + & ade_{2-1} & trp_{5-27} & ilv_1 \end{array}$$

Bei diesem Stamm werden spontan und nach Induktion prototrophe Zellen aus den Populationen selektiert. Es konnten sowohl Adenin-Prototrophe als auch Tryptophan-Prototrophe isoliert werden. Da die Reversionsrate der einzelnen Markergene niedriger als 10^{-7} war, wurde sie in die Ergebnisse von ZIMMERMANN und SCHWEIER (1967) nicht einbezogen. Mögliche Crossover wurden bei der Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen. Es wurde beschrieben, dass benachbarte Selektionsmarker in den prototrophen Kolonien unverändert vorlagen. Folglich können mit Hilfe von D4 allein mitotische Genkonversionsereignisse erfasst werden.

1.3.2 *S. cerevisiae*-Stamm D7

Der Stamm D7 wurde von Zimmermann (ZIMMERMANN (1975); ZIMMERMANN *et al.*, 1975) konstruiert und zur Detektion der Induktion von mitotischen Crossover-, mitotischen Genkonversions- sowie Reversions-Ereignissen verwendet.

Mitotische Crossover können visuell durch eine Farbveränderung der Kolonien, wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, detektiert werden. Das Screening der durch Crossover veränderten Kolonien ist jedoch sehr aufwendig und bedarf eines geübten Auges.

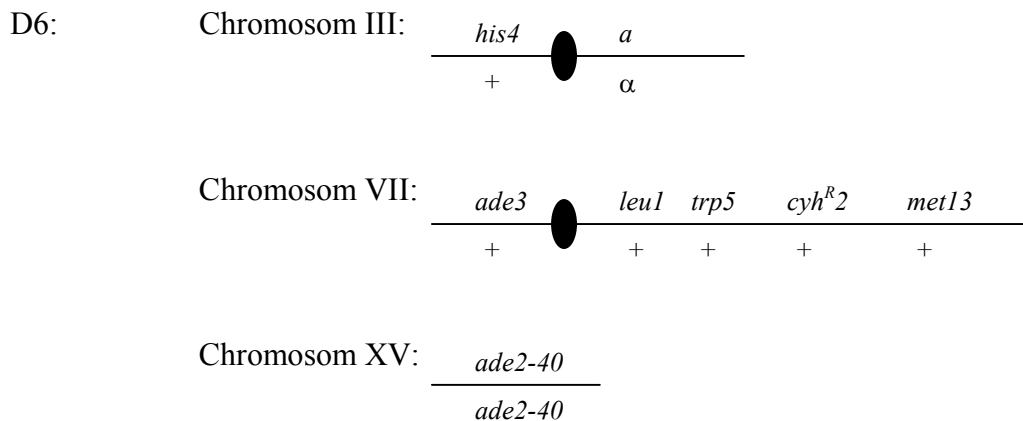
Mitotische Genkonversion kann bei D7 daran festgestellt werden, dass auf einem Tryptophan-Mangelmedium das Wachsen von Tryptophan-prototrophen Zellen beobachtet werden kann. Grundlage dieser Detektion sind die beiden Allele *trp5-12* und *trp5-27*, die bei D7 Tryptophan-Auxotrophie hervorrufen. Das Allel *trp5-27* wurde von EHRENHOFER-MURRAY *et al.* (1994) charakterisiert. Es konnten zwei Stop-Codons an Position 121 stromabwärts vom ATG und 1555 detektiert werden. Da die genaue Mutation *trp5-12* bisher nicht beschrieben wurde, ist die Länge der konvertierten DNA-Abschnitte, die bei D7 erfasst werden, unklar. Liegt *trp5-12* außerhalb der beiden Stop-Codons, so werden Genkonversionen beobachtet, die mehrere Kilobasen lang sein müssen. Liegt jedoch *trp5-12* innerhalb von Position 121 und 1555 (zum ATG), so ist die erfasste Genkonversionslänge maximal 1435 bp lang. Spontan werden bei D7 Genkonversionen mit einer Rate von ca. 10^{-5} detektiert. JUDD und PETES (1988), die sich mit der Länge von Genkonversionsabschnitten beim diploiden Stamm TPX befasst haben, konnten eine spontane Rate von 4×10^{-6} beobachten, was weniger als die Hälfte der bei D7 erfassten Ereignisse ausmacht.

Da die Mutation *ilv1-92* auf beiden homologen Chromosomen des Stamms D7 vorhanden ist, können mit Hilfe der Selektion auf Isoleucin/Valin-Mangelmedium Revertanten der *ilv1-92* Mutation detektiert werden. Die Anreicherung von Revertanten während der Anzuchtphase ist aber auch bei dieser Selektion gegeben.

1.3.3 *S. cerevisiae*-Stämme D6 und D61.M

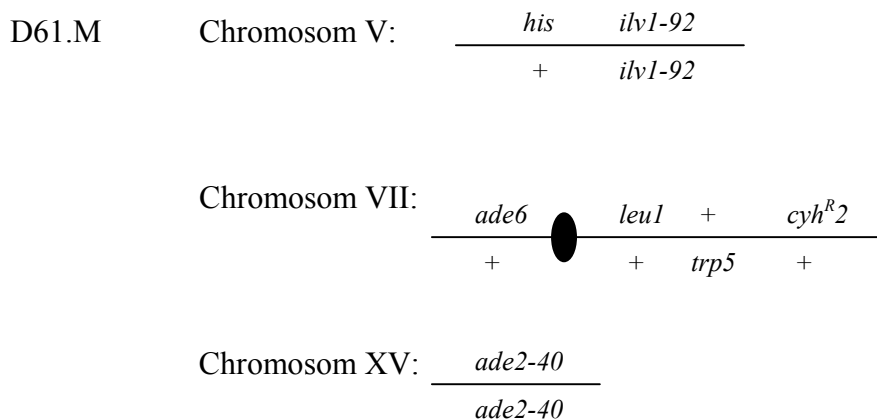
Die beiden Stämme D6 (PARRY und ZIMMERMANN, 1976) und D61.M (ZIMMERMANN *et al.*, 1985) dienen hauptsächlich dem Auffinden von mitotischen Chromosomenverlusten.

Der Adenin-auxotrophe und Cycloheximid-sensitive Stamm D6 hat den folgenden Genotyp:



Der Verlust eines Homologs von Chromosom VII verursacht die Entstehung von Zellen, die auf Cycloheximid-haltigem Medium wachsen können. Die Kolonien sind weiß und brauchen die Supplementation von Adenin, Histidin, Tryptophan und Methionin ins Medium.

Der Stamm D61.M wurde aus dem Stamm D6 weiter entwickelt. Er ist Adenin-auxotroph wie D6, sensitiv gegenüber Cycloheximid, wächst jedoch mit roten Kolonien.




Durch den Verlust von Chromosom VII (*ADE6*, *LEU1*, *CYH*) entstehen weiße, Adenin-auxotrophe, Cycloheximid-resistente Kolonien. Es können auch rote $Ade^- Cyh^R$ Kolonien beobachtet werden, die durch Genkonversion oder Vorwärtsmutation des *CYH*-Gens entstehen können. Eine Differenzierung zwischen diesen Ereignissen bietet D61.M jedoch nicht. Zusätzlich besitzt D61.M noch homozygot das Markergen *ilv1-92*, was die Detektion von Reversionsereignissen ermöglicht.

Nach der Selektion von $Ade^- Cyh^R$ Kolonien untersucht man die Leucin-Auxotrophie, um den Chromosomenverlust zu verifizieren. Bei D61.M liegt das Gen *ADE6* zwar näher am Centromer als *ADE3*, die weißen $Ade^- Cyh^R$ Kolonien könnten aber auch durch Genkonversion oder Mutationen entstanden und somit Leu^+ sein. Eine direkte Selektion auf Kolonien mit Chromosomenverlusten ist deshalb nicht möglich. Darüber hinaus wurde von ECKHARDT und HAYNES (1977) beschrieben, dass *ade2-x* Mutationen kein rotes Pigment anreichern, falls es sich um Petite-Kolonien handelt, was die Ermittlung der Häufigkeit von Chromosomenverlusten bei beiden Stämmen erschwert.

1.3.4 *S. cerevisiae*-Stamm LBL1

Der Stamm LBL1 (ESPOSITO *et al.*, 1982) ist im Gegensatz zu den bisher beschriebenen diploiden Stämmen ein hyperhaploider Stamm, bei dem Chromosom VII disom vorliegt. Die Zellen haben den folgenden Genotyp:

Chromosom III:	<i>a</i>						
Chromosom VII:	<i>cly8</i>	<i>ade6</i>		+	<i>trp5</i>	<i>cyh2</i>	<i>ade5</i>
	+	+		<i>leu1</i>	+	+	+
Chromosom XV:	<i>ade2</i>						

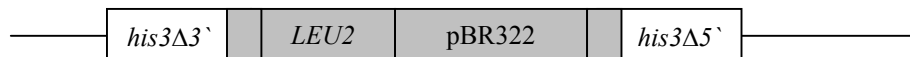
LBL1 bietet die Möglichkeit, die Wiederherstellung des haploiden Zustands zu detektieren. Weiterhin können auch mitotische Genkonversion und mitotische intergene Rekombination beobachtet werden. Der Vorteil dieses Stammes liegt in der vergleichbar niedrigen Rate von spontanen Rekombinationsereignissen wie bei *a/a*- oder *α/α*-Stämmen. Bei Stämmen, die für den *MAT*-Locus homozygot sind, konnte eine niedrigere Rekombinationsfrequenz beobachtet werden als bei heterozygoten Stämmen (FRIIS und ROMAN, 1968). Es konnte gezeigt werden, dass der *MAT*-Locus die Frequenz der Rekombinationensereignisse steuert.

LBL1 weist eine spontane Rate von $1,37 \times 10^{-5}$ für die Haploidisierung auf. Genkonvertanten wurden mit einer Rate von $3,66 - 4,47 \times 10^{-6}$ beobachtet. Die Umwandlung von Cyh^s in Cyh^f Kolonien wurde mit $2,0 \times 10^{-6}$ detektiert. Auffällig erscheint die Rate der Wiederherstellung des haploiden Zustandes, denn beim Stamm D61.M oder auch D6 wurde eine um eine Zehnerpotenz niedrigere Rate für Chromosomenverluste beschrieben (WHITTAKER *et al.*, 1989). Auch wenn ESPOSITO *et al.* den hyperhaploiden Zustand als stabil bezeichnen, so

stellt sich doch die Frage, warum Chromosomenverluste mit einer so hohen Frequenz auftreten.

1.3.5 *S. cerevisiae*-Stamm RS112

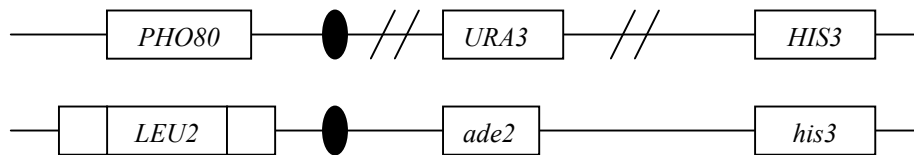
Der Stamm RS112 wurde von SCHIESTL *et al.* (1989) entwickelt und dient der Detektion von Deletionen (DEL: deletion assay) und interchromosomalen mitotischen Rekombinationen. RS112 (*MATa/MAT α* ; *ura3-52/ura3-52*; *leu2-3,112/leu2- Δ 98*; *trp5-27/TRP5*; *arg4-3/ARG4*; *ade2-40/ade2-10*; *ilv1-92/ILV*; *HIS3 ::pRS6/his3- Δ 200*; *LYS2/lys2-801*) besitzt durch die Integration des Plasmids pRS6 in die intakte Kopie des *HIS3*-Gens drei defekte *his3*-Allele. Auf einem Chromosom liegt *his3- Δ 200*, und auf dem Plasmid-tragenden Chromosom befinden sich eine *his3 Δ 3*'- und eine *his3 Δ 5*'-Kopie.



Der DEL-Assay beruht auf der Selektion von His⁺-Zellen, die durch einen Plasmidverlust (schraffierte Region), eine mitotische Genkonversion oder durch ein mitotisches Crossover entstehen können. Bei der Analyse der im DEL-Assay erhaltenen Histidin-Prototrophen konnten SCHIESTL *et al.* (1988) feststellen, dass Plasmidverluste 100fach seltener vorkommen als Rekombinationsereignisse. Die Mehrzahl der selektierten Segreganten ist durch ein mitotisches Genkonversionsereignis entstanden. Selektierte Adenin-Prototrophe spiegeln das Auftreten von interchromosomaler Rekombination wider, was durch die beiden Allele *ade2-40* und *ade2-101* ermöglicht wird. Bei RS112 ist es jedoch nicht möglich, die Frequenz von Mutationen oder Chromosomenverlusten zu bestimmen.

1.3.6 *S. cerevisiae*-Stamm YA72

Der Stamm YA72 (ACUNA *et al.*, 1994) wurde mittels sexueller Hybridisierung der Stämme YA67 (*MATa*; *ade2::URA3*; *ilv1-92*; *leu2-3,112*; *trp5-111*; *ura3 Δ 5*) mit YA68 (*MAT α* ; *ade2-119*; *his3-11,15*; *pho80::LEU2*; *lwu2-3,112*; *trp5-111*, *ura3 Δ 5*) und anschließender Selektion auf Ura⁺ His⁺ Leu⁺ Phänotypen konstruiert. Dieser Stamm ermöglicht durch die Konstruktion von Chromosom XV die Detektion von Crossover-Ereignissen, Chromosomenverlusten, Punktmutationen und Genkonversionen.



Die Erfassung aller Ereignisse erfolgt zunächst mit Hilfe der Selektion auf 5-FOA-Medium und anschließender phänotypischer Untersuchung der selektierten Ura⁻-Kolonien. ACUNA *et al.* (1994) konnten mit Hilfe von YA72 nachweisen, dass 82 % der LOH (loss of heterozygosity)-Ereignisse durch ein Crossover zwischen Centromer und dem *ade2*-Locus verursacht werden. Da die spontanen Frequenzen der Ura⁺-Kolonien mit den von ZIMMERMANN *et al.* (1975) angegebenen Häufigkeiten für den *ade2*-Locus übereinstimmen, wurde vermutet, dass es sich hier um einen Positionseffekt handelt. Sowohl Punktmutationen als auch Genkonversionen resultieren beim Stamm YA72 in einem Ura⁻ His⁺ Apase⁻ (erniedrigte Aktivität der sauren Phosphatase bei Δ *pho80*)-Phänotyp. Eine Differenzierung zwischen beiden Ereignissen erlaubt die aufwendige Southern-Blot-Hybridisierung. Mit dieser Methode kann gezeigt werden, dass vorwiegend Genkonversionen zu Ura⁻ His⁺ Apase⁻-Kolonien führen. Über diese Angaben hinaus kann allerdings über die Länge des konvertierten Bereiches keine Aussage gemacht werden.

Des Weiteren muss zur Differenzierung zwischen Crossover-Ereignissen und Chromosomenverlusten die Aktivität der sauren Phosphatase bestimmt werden. Das verwendete Assay von MEYHACK *et al.* (1982) ermöglicht zwar die Detektion einer groben Veränderung der Phosphatase-Aktivität, arbeitet jedoch mit einem hohen Hintergrund, was die Auswertung der Ergebnisse zusätzlich erschwert.

1.3.7 *RNR3-lacZ*-Testsystem

JIA *et al.* stellten 2002 eine Möglichkeit zur Erfassung der Transkriptionseffizienz von Genen, die durch DNA-Schäden induziert werden, vor. Die verwendete Testmethode wurde dabei an das *umu-lacZ*-Testsystem bei Bakterien (ODA *et al.*, 1985) gekoppelt. Für dieses Testsystem wurde in den haploiden *S. cerevisiae*-Stamm DBY747 (*MATa his3-11 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52*) das Plasmid pZZ2 (*Ycp URA3 RNR-lacZ*) transformiert. Die Expressionsstärke von *RNR3* (Ribonucleotid-Reduktase), die durch die Wirkung einer Testsubstanz beeinflusst wird, kann über die β -Galactosidase-Aktivität erfasst werden. Die Ribonucleotid-Reduktase katalysiert einen Konzentrations-abhängigen Schritt der dNTP-Produktion und spielt daher eine essentielle Rolle bei der DNA-Synthese (YAO *et al.*, 2003).

Beim *RNR3-lacZ*-Testsystem wurde jedoch beobachtet, dass die Expressionsstärke von *RNR3* nicht linear zur eingesetzten Mutagensdosis ist. Nach Erreichen einer maximalen Transkriptionsaktivität nimmt diese bei höherer Dosierung ab, was zu einem Problem bei der Beurteilung starker Mutagene führt. Daher haben JIA und XIAO (2003) versucht, die Sensitivität des Testsystems zu erhöhen, indem sie Reparatur-Mutanten verwendeten. *MAG1*-Mutanten, die einen Defekt in der Basen-Excisions-Reparatur aufweisen, haben bei Verwendung von alkylierenden Substanzen die Sensitivität des Testsystems verbessert. *RAD2*-Mutanten der Nucleotid-Excisions-Reparatur erhöhten die Sensitivität des Testerstammes nach Bestrahlung mit UV-Licht, wohingegen die Gene der Rekombinations-Reparatur die Induktionsstärke von *RNR3* reduzierten. Es ist daher festzuhalten, dass das Testsystem unspezifisch reagiert und nur beschränkt zur Bestimmung der mutagenen / rekombinogenen Wirkung von Substanzen eingesetzt werden kann.

1.3.8 *S. cerevisiae*-Stamm GenT01 – GSA (GreenScreen® assay)

WALMSLAY *et al.* (1997) entwickelten einen weiteren Reporterstamm zur Detektion der Induktion von DNA-Schäden. Dieser Stamm FF18984 (*MATa leu2-3,112 ura3-52 lys2-1 his7-1*) trägt ein multicopy-Plasmid mit einem Fusionsprodukt aus dem *S. cerevisiae* *RAD54*-Gen und einem *GFP*-Gen (an die Codonusage von *S. cerevisiae* angepasst) beinhaltet. *RAD54* gehört der *RAD52*-Epistasis-Gruppe an, die für die homologe Rekombinations-abhängige Reparatur von Doppelstrangbrüchen verantwortlich ist (TAN *et al.*, 2003). Mit Hilfe des an Rad54p fusionierten GFP-Proteins kann aufgrund der Intensität des entstehenden Fluoreszenzsignals auf die Stärke der Transkriptionsinduktion geschlossen werden.

In einem Programm, bei dem die Wirkung von 102 Substanzen auf dieses System getestet wurde, konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Transkription von *RAD54* durch unterschiedliche Genotoxine reguliert wird (CAHILL *et al.*, 2004). Sowohl Substanzen, die eine direkte Wirkung auf die DNA haben, als auch Substanzen, die Topoisomerasen oder Bestandteile des Spindelapparats als Target haben, führten zur Transkriptionsinduktion von *RAD54*. In dieser Arbeit konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass es sich um ein stabiles System handelt, welches bei veränderten Bedingungen (z. B. Verwendung unterschiedlicher Medien) gleiche Ergebnisse liefert.

Dieses Testsystem kann im pharmazeutischen Bereich als Mikrotiterplatten-Test (CAHILL *et al.*, 2004) angewendet werden. Es kann aber auch mit einem kleinen portablen Instrument

beim Monitoring außerhalb eines Labors eingesetzt werden (KNIGHT *et al.*, 2004). Es ist daher zur schnellen Testung einer Substanz gut geeignet. Es ist jedoch unspezifisch und gibt keine Auskunft zum Wirkungsmechanismus der zu testenden Substanz.

1.4 Wirkungsweise verwendeter Modellsubstanzen und der UV-Strahlung

1.4.1 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

DNA methylierende Substanzen wie Methylsulfate, Methylsulfonate, Methylnitrosamine oder Methylnitrosamide (z.B. MNNG) sind elektrophile Komponenten, die Guanin an Position N³, N⁷ und O⁶ alkylieren (PIEPER, 1998). MNNG (Abb. 1-1) reagiert mit Cystein-Resten von Glutathion, welches intrazellulär vorhanden ist.

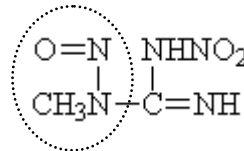


Abbildung 1-1: Strukturformel von MNNG; eingekreist durch unterbrochene Linie: reaktiver Anteil des Moleküls

Bei dieser aktivierenden Reaktion entsteht ein stark elektrophiles methylierendes Intermediat (FRIEDBERG *et al.*, 1995), welches am häufigsten zu der Entstehung von O⁶-Methylguanin führt. Durch die Veränderung bindet O⁶-Methylguanin eher an Thymin als an Cytosin (ABBOTT und SAFFHILL, 1979). So sind G:C nach A:T Transitionen die am häufigsten durch MNNG verursachten Punktmutationen (COULONDRE und MILLER, 1977).

Schon früher wurde gezeigt, dass MNNG eine hoch mutagene (MARQUARDT *et al.*, 1964) und rekombinogene (ZIMMERMANN *et al.*, 1966) Substanz ist. Die karzinogene Wirkung von MNNG wurde auch im Tierversuch bei Ratten (DRUCKREY *et al.*, 1966) bewiesen.

1.4.2 UV-Strahlung

UV-Strahlung ist eine der häufigsten natürlichen Ursachen für die Zerstörung von DNA (SNYDER und CHAMPNESS, 2003). DNA-Basen besitzen eine konjugierte Ringstruktur, die UV-Licht absorbiert. Die absorbierten Photonen erhöhen das Energieniveau der Basen, was zur Reaktion mit benachbarten Basen führt. So kommt es am häufigsten zur Paarung zwischen zwei Pyrimidinen. Liegen zwei Thymin-Reste benachbart, wird ein Cyclobutanring gebildet, so dass diese Reste in einem kovalent gebundenen Thymin-Dimer resultieren. Etwa 85 % der UV-vermittelten DNA-Schäden gehören zum Typ der Thymin-Dimere (KNIPPERS,

1997). Ein seltener (10 %) Typ der Dimere ist das TC(6-4)-Produkt, welches zur Verzerrung der DNA-Struktur führt. Diese Strukturen haben nur eine geringe Tendenz zur Basenpaarung. So werden auf dem komplementären Strang oft TC-, CC- und TT-Transitionen und Transversionen verursacht (FRIEDBERG *et al.*, 1995). MOSHINSKY und WOGAN (1997) verwendeten die γ IG397 *S. cerevisiae*-Stämme, in denen ein pLS76 wt-Plasmid (humanes *p53* unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors, *LEU2*-Selektionsmarker) transformiert wurde. Sie konnten nach Sequenzierung ein Spektrum von UV-induzierten *p53*-Mutationen aufnehmen. Sie beobachteten bei 61 % aller Mutationen GC- zu AT-Transitionen, bei 11 % GC- zu TA-Transversionen, bei 5 % GC- zu CG-Austausche und bei 6 % CC- zu TT (GG zu AA)-Basenaustausche. Weitere Doppel-Mutationen oder Deletionen wurden mit ≤ 3 % aller UV-induzierten Schäden detektiert. So wurde nachgewiesen, dass hauptsächlich Punktmutationen durch UV-Strahlung verursacht werden.

ZIMMERMANN (1971) zeigte am Hefestamm *S. cerevisiae* D4, dass UV-Strahlung Genkonversionsereignisse stark induziert. 1978 konnten KERN und ZIMMERMANN beim Stamm D7 einen Zusammenhang zwischen Komponenten der Nucleotid-Excisions-Reparatur und dem Anstieg von Genkonversionsereignissen, Crossover-Ereignissen und Reversionen nachweisen. ESPOSITO *et al.* (1982) testeten an dem hyperhaploiden (n+1) Stamm LBL1, der disom für Chromosom VII ist, die Wirkung von UV-Licht. Dabei konnte die Erhöhung von Genkonversionen und von intragenen Rekombinationsereignissen detektiert werden. Des Weiteren wurden vermehrte Änderungen in der Anzahl von Chromosomen nach der Behandlung mit UV-Strahlung festgestellt.

1.4.3 Ethidiumbromid

Ethidiumbromid (EB) ist ein in der biologischen und medizinischen Forschung weit verbreiteter Phenanthridin-Farbstoff (Abb. 1-2) zum direkten Nachweis von Nucleinsäuren zum Beispiel in Agarosegelen. Seine Bindung an die dsDNA und die anderer interkalierender Substanzen wurde im einzelnen *in vitro* untersucht. Man fand eine Verbindung zur Mutagenese und Karzinogenese (WARING, 1981). Die *in vivo* Interaktionen zwischen DNA und EB sind jedoch noch nicht hinreichend untersucht. Es wurde beschrieben, dass EB die Mitochondrien-Genome einiger Hefen und Pilze irreversibel zerstört (WHITTAKER *et al.*, 1972).

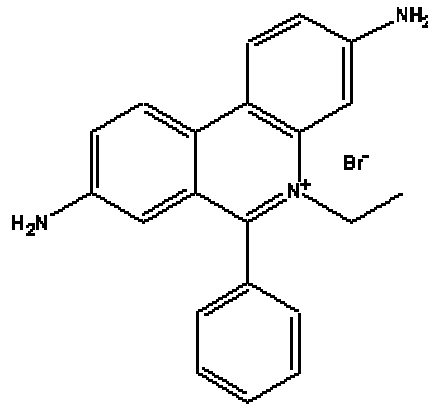


Abbildung 1-2: Strukturformel von Ethidiumbromid

PENA *et al.*, 1980 zeigten, dass die Substanz zunächst an die Zelle gebunden, dann aktiv in diese aufgenommen und in den Mitochondrien angehäuft wird. Dort wird die Synthese der mtDNA unterbunden und die vorhandene DNA abgebaut. Veränderungen in der Kern-DNA von *S. cerevisiae* wurden im Gegensatz dazu nicht nachgewiesen (GOLDRING *et al.*, 1970). MALESZKA (1994) beschrieb bei *Candida parapsilosis* Strukturveränderungen in rDNA Clustern, wobei andere Teile des Kern-Genoms sowie das Mitochondrien-Genom auch bei hohen EB Konzentrationen nicht verändert wurde. Dieser Widerspruch zwischen den unterschiedlichen Befunden an beiden Hefen könnte mit der linearen Konfiguration der mtDNA von *C. parapsilosis* zusammenhängen. Eine mutagene Wirkung dokumentierten SINGER *et al.* (1999) im Ames-Test. Sie beobachteten bei Zugabe von S9 Mix erhöhte Zahlen von Revertanten mit +1 und -1 Frameshift-Mutationen. Ohne S9-Fraktion war keine Induktion der Revertanten nachweisbar. Bei den Stämmen, bei denen Basen-Substitutionen detektiert wurden, induzierte EB nur einen sehr kleiner Anstieg (1,4-2fach) der Revertantenrate. Auch im Hefe-Teststamm (RS112) zur Detektion von intrachromosomalen Deletionen (SCHIESTL *et al.*, 1989) wurde EB als rekombinogen eingestuft. ACUNA *et al.* (1994) konnten im *S. cerevisiae*-Stamm YA72 einen Dosis-abhängigen Anstieg der Genkonversionsereignisse feststellen, die Anzahl der Chromosomenverluste vergrößerte sich dagegen nicht. Im Gegensatz dazu wurden im Testerstamm D7 keine Veränderungen der Frequenz von Genkonversionen, Crossover-Ereignissen und Revertanten nachgewiesen (HIXON und BURNHAM, 1979).

1.4.4 Benomyl

Benomyl ist ein weit verbreitetes Fungizid. Die aktive Komponente von Benomyl ist Methylbenzimidazole-2-yl-carbamat (MBC; Abb. 1-3).

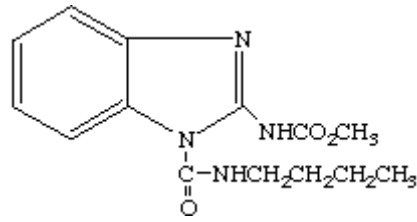


Abbildung 1-3: Strukturformel von MBC

Es wurde beschrieben, dass diese Substanz sowohl in Pilz- als auch in Säugerzellen einen Metaphase-Arrest bewirkt (HOWARD und AIST, 1977, STYLES und GARNER, 1974), jedoch nicht das Wachstum hemmt. Benomyl soll auch keine direkte Wirkung auf den RNA- oder DNA-Metabolismus haben (CLEMONS und SISLER, 1971). Darüber hinaus hat SEILER (1975) eine schwache mutagene Wirkung in Bakterien beschrieben. Über teratogene Effekte auf Ratten berichteten DELATOUR und RICHARD (1976).

Bei *S. cerevisiae* induzieren MBC und andere Benzimidazol-Derivate nachweislich Chromosomenverluste (WOOD, 1982), wahrscheinlich durch die Hemmung der Microtubulus-Assemblierung. WOOD (1982) verwendete unterschiedliche *S. cerevisiae*-Stämme, um die genetischen Effekte zu untersuchen, die durch MBC induziert werden. Er konnte keine mutagene Wirkung und keine intragene Rekombination nach der Behandlung der Zellen mit der Substanz beobachten. Eine geringfügige Induktion von intergenen Rekombinationsereignissen, aber vor allem der gleichmäßige Chromosomenverlust aller Chromosomen konnte in der Versuchsreihe nachgewiesen werden. Bereits 1983 wurde D61.M durch ZIMMERMANN erfolgreich zum Nachweis der Chromosomenverlust-induzierenden Wirkung von Benomyl eingesetzt. ALBERTINI (1991) verwendete den *S. cerevisiae*-Stamm D61.M, um die Wirkung von Benomyl und acht weiteren Chemikalien im Rahmen des Gene-Tox Programms zu ermitteln. Auch er konnte eine fehlerhafte Chromosomen-Segregation beobachten, die zu Aneuploidie führte.

1.4.5 Anilin

50 % der Karzinogene werden durch den *S. typhimurium*-Reversionstest (Ames-Test) nicht erfasst (ASHBY und TENNANT, 1991). Anilin (Abb. 1-4) ist eine dieser „falsch negativen“ Substanzen, denn sowohl im Hamster-Fibroblasten-Test (ISHIDATE, 1983) als auch bei der Maus (ASHBY *et al.*, 1991) wurde die krebserregende Wirkung von Anilin nachgewiesen.



Abbildung 1-4: Strukturformel von Anilin

Doch auch bei dem *S. cerevisiae*-Stamm D3 wirkte Anilin nicht rekombinogen (SIMMON, 1979). Erst 1989 wies SCHIESTL Anilin-induzierte Rekombinationsereignisse im DEL-Assay nach. Deletionen wurden nicht linear abhängig zu der eingesetzten Konzentration des Wirkstoffs induziert. Unterhalb einer bestimmten Schwellenkonzentration konnte kaum oder gar kein Effekt detektiert werden. BRENNAN und SCHIESTL (1997) beschrieben oxidativen Stress als Ursache für die toxische und rekombinogene Wirkung von Anilin. Dieser oxidative Stress ist an die Entstehung von Superoxid-Radikalen gebunden. So führte Anilin und - noch deutlicher als Anilin selbst - seine beiden Metaboliten 4-Aminophenol und 2-Aminophenol in einem Stamm, der einen Defekt des Enzyms Superoxid-Dismutase besaß, zu einer höheren cytotoxischen Wirkung. Die Hypersensitivität des Stammes gegenüber allen drei Substanzen wurde vermutlich durch die erhöhte Menge an freien Radikalen induziert.

1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Testsystem konstruiert und evaluiert werden, mit dem Vorwärtsmutationen, mitotische Genkonversionen, mitotische Crossover und Chromosomenverluste detektiert werden können. Der Selektionsmechanismus des Stammes YA72 (ACUNA *et al.*, 1994) diente als Vorbild für die Konstruktion dieses Systems.

Zur Selektion von Mutanten wurde das *URA3*-Gen (ROSE *et al.*, 1984) ausgewählt, da die Möglichkeit besteht, Vorwärtsmutationen in diesem Gen auf 5-FOA-Medium positiv zu selektieren (BOEKE *et al.*, 1984). Weiterhin waren bereits das spontane und das UV-induzierte Mutanten-Spektrum in diesem Locus untersucht worden (LEE *et al.*, 1988). In dem von ACUNA *et al.* (1994) konstruierten Stamm YA72 wurde das *ADE2*-Gen durch den *URA3*-Leserahmen komplett ersetzt. Die Frequenz Uracil-Auxotropher entsprach überraschenderweise den bereits durch ZIMMERMANN *et al.* (1975) im Stamm D7 beschriebenen Werten für das Auftreten von Adenin-auxotrophen Kolonien. ACUNA *et al.* (1982) führen das auf einen Positionseffekt zurück, der die Rate der spontanen Ereignisse angleichen könnte.

Vorwärtsmutationen sollten in erster Linie in einem haploiden (HAN) Testerstamm ermittelt werden. Die Grundlage für die Erfassung von mitotischen Genkonversionen, Crossover-Ereignissen und Chromosomenverlusten sollte die Konstruktion von Chromosom XV (Abb. 1-5) des diploiden Testerstamms (DAN) legen.

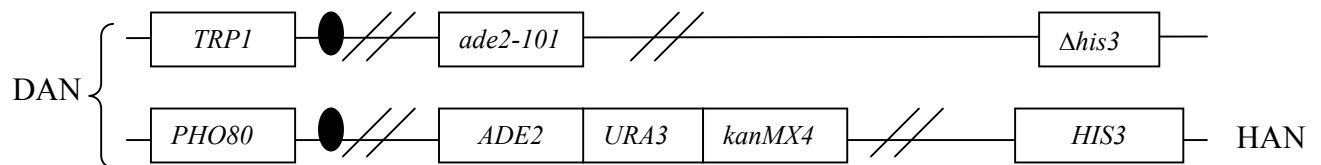


Abbildung 1-5: Chromosom XV der zu konstruierenden Stämme HAN und DAN

Die Unterscheidung dieser Ereignisse sollte dann zunächst durch eine weitere phänotypische Charakterisierung erfolgen. Das Auftreten von Vorwärtsmutationen und kleineren Genkonversionen sollte sich in Uracil-auxotrophen und G418-resistenten Segreganten widerspiegeln. Klone, die durch größere Genkonversionen entstanden sind, sollten $\text{Ade}^- \text{Ura}^-$, $\text{Ura}^- \text{G418}^s$ oder $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^s$ sein. Im Gegensatz zum Stamm YA72 können durch die Integration von *kanMX4*-Kassette distal von *URA3* auch leicht Genkonversionen erfasst werden, die größere DNA-Abschnitte von mehreren kb umfassen. Die Größe der phänotypisch erfassbaren Genkonversions-Abschnitte wird darüber hinaus beim Stamm DAN durch die Einbeziehung der homologen Regionen des *ADE2*-Gens erweitert.

Die heterozygoten Flankenmarker *HIS3/his3* sollten die Detektion von Crossover-Ereignissen dadurch ermöglichen, dass $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{His}^-$ -Segreganten erfasst werden können.

Zur Erfassung der Raten von Chromosomenverlusten war ein Selektionsmarker auf der anderen Seite des Centromers notwendig. Als besonders geeignet erschien dabei eine Centromer-nahe Insertion des *TRP1*-Gens. Der am nächsten zum Centromer von Chromosom XV gelegene Leserahmen ist YOL001w, welcher für das Pho80p kodiert. Das Produkt des Gens *PHO80* ist ein Repressor der sauren Phosphatase Pho85p. Die Disruption dieses Leserahmens liefert lebensfähige Zellen mit einer dereprimierten Aktivität der sauren Phosphatase. Da die Insertion des *TRP1*-Gens in den *PHO80*-Leserahmen zwei Phänotypen hervorrufen würde –Tryptophan-Prototrophie und erhöhte Aktivität der sauren Phosphatase – erschien der Leserahmen YOL001w als besonders geeignet. Einen besonderen Vorteil bei der Verwendung des *TRP1*-Gens zur Erfassung von Chromosomenverlusten bietet die Möglichkeit der direkten Selektion von *trp1*-Mutanten auf dem von TOYN *et al.* (2000)

beschriebenen 5-FAA-Medium. Im Vergleich zum Stamm YA72 muss kein Phosphatase-Assay nach MEYHACK *et al.* (1982) unbedingt durchgeführt werden.

Die Konstruktion der Testerstämmen im Rahmen dieser Arbeit sollte folglich alle vier Ereignisse in einem System mit einem nahezu identischen genetischen Kern-Hintergrund erfassbar machen.

Des Weiteren besteht ein Vorteil des DAN-Systems darin, dass der Stamm homozygot für den Paarungstyp α ist, und eine Sporulation weder durch Kultivierungsbedingungen noch durch die zu prüfenden Substanzen zu erwarten ist.

Die folgende Tabelle soll die Möglichkeiten hinsichtlich der Erfassung der selektierbaren Ereignisse zusammenfassen.

Stamm	Ereignis	Phänotyp	Selektionsmedium
DAN	Mutation + Mitotische Genkonversion < 1614 bp	Ura ⁻ Ade ⁺ G418 ^r His ⁺ Trp ⁺	YNB+5-FOA+Ura+G418
DAN	Mitotische Genkonversion > 1614 bp	Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r His ⁺ Trp ⁺	YNB+5- FOA+Ura+Ade+G418
DAN	Mitotisches Crossover	Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s His ⁻ Trp ⁺	YNB+5- FOA+Ura+Ade+His
DAN	Chromosomenverlust	Ade ⁺ Ura ⁺ G418 ^r His ⁺ Trp ⁻	5-FAA
HAN	Mutation	Ura ⁻ Trp ⁻	YNB+5-FOA+Ura+Trp

Die Differenzierung der verschiedenen genetischen Ereignisse zwischen einzelnen Segreganten kann aufgrund der Sequenzkenntnisse mit Hilfe der PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzierung der betroffenen Bereiche erfolgen.

Die Validierung der Stämme sollte durch die Prüfung des Einflusses von Mutagenen und Rekombinogenen mit bekannter Wirkung vorgenommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mikroorganismen

Eine Auflistung der in der Arbeit eingesetzter Hefestämme und des verwendeten Bakterien ist in Tabelle 2-1 zu finden.

Tabelle 2-1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen

Name	Phänotyp
Hefestämme: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
MCC 109	<i>MATα</i> , <i>ade2-101</i> , <i>ura3-52 p⁰</i>
YJH 486	<i>MATα</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ade2-101</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1-289</i> , <i>his3Δ1</i>
161-K10	<i>MATα</i> , <i>ade1</i> , <i>lys1 GII⁰</i>
202a	<i>MATα</i> , <i>ade1</i> , <i>his2</i>
41 α	<i>MATα</i> , <i>ade2-119</i> , <i>trp5</i> , <i>ilv1</i>
Bakterienstamm: <i>Escherichia coli</i>	
DH5 α	F'/endA1; hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺); supE44; thi-1; recA1; gyrA; (Nal ^r); relA1; Δ (lacZYA-argF) _{U169} (ϕ 80lacZ Δ M15); HANAHAN, 1983

2.1.2 Plasmide

Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden in Tabelle 2-2 zusammengestellt.

Tabelle 2-2: Verwendete Plasmide

Name	Eigenschaften	Herkunft
pUC 19	Amp ^R , oriV, LacZ, Polycloning site im LacZ-Gen	YANISH-PERON <i>et al.</i> , 1985
pUG 6	Amp ^R , oriV, loxP-P _{TEF} -kan ^R -T _{TEF} -loxP	GÜLDENER <i>et al.</i> , 1996
pSH 47	Amp ^R , oriV, CEN6/ARSH4, <i>URA3</i> , <i>CYC1</i> -term. <i>CRE</i> , <i>GAL1</i> -Prom.;	GÜLDENER <i>et al.</i> , 1996
pFA6a-kanMX4	Amp ^R , oriV, LacZ, P _{TEF} -kan ^R -T _{TEF}	WACH <i>et al.</i> , 1994
YE _p 352	pPA100 + COX2-Fragment	BUTOW <i>et al.</i> , 1996

Plasmidkonstrukte

Während der Konstruktion der Stämme HAN/DAN wurden die in Tabelle 2-3 aufgelisteten Plasmide kloniert.

Tabelle 2-3: In Arbeit klonierte Plasmide

Name	Vektor	Insert / ORF	Herstellung des Inserts	Restriktionsendonukleasen
pADE	pUC19	YOR128c (ADE2)	PCR : Primer: <i>AdeL-Eco</i> + <i>AdeR-Kpn</i> Template: genom. DNA 202a	<i>EcoRI</i> + <i>KpnI</i>
pURA	pUC 19	(URA3)	PCR : Primer: <i>URA/L0</i> + <i>URA/R2</i> Template: genom. DNA 202a	<i>BamHI</i> + <i>KpnI</i>
pUC-kanMX4	pUC 19	kanMX4	Restriktion aus pFA6a-kanMX4	<i>BamHI</i> + <i>HincII</i>
pURA-kanMX4	pURA	kanMX4	Restriktion aus pUC-kanMX4	<i>BamHI</i> + <i>SphI</i>
pURAv-kanMX4	pURAv-kanMX4		Restriktion und Religation des Vektors ohne das 715 bp große Fragment	<i>SmaI</i>
pADE2/1-URAv-kanMX4	pURAv-kanMX4	Fragment von YOR128c	PCR : Primer: 5' <i>Ade2/1-Kpn</i> + 3' <i>Ade2/1-Kpn</i> Template: genom. DNA 202a	<i>KpnI</i>
pURAv-kanMX4-ADE2/2	pURAv-kanMX4	Fragment von YOR128c	PCR : Primer: 5' <i>Ade2/2-Sph</i> + 3' <i>Ade2/2-Sph</i> Template: genom. DNA 202a	<i>SphI</i>
pPTP (pPHO80/1-TRP1-PHO80/2)	pUC19	5' <i>PHO80</i> <i>TRP1</i> -ORF 3' <i>PHO80</i>	PCR : Primer: 5' <i>pho1/SacI</i> + 3' <i>pho1/SmaI</i> Template: genom. DNA 202 Primer: 5' <i>Trp1/SmaI</i> + 3' <i>Trp1/SalI</i> Template: genom. DNA 202 Primer: 5' <i>pho2/SalI</i> + 3' <i>pho2/SphI</i> Template: genom. DNA 202a	<i>SacI</i> + <i>SmaI</i> <i>SmaI</i> + <i>SalI</i> <i>SalI</i> + <i>SphI</i>
pPT1/2P (pPHO80/1-TRP1/2-PHO80/2)	pPHO80/1-TRP1-PHO80/2	<i>TRP1</i> -ORF	PCR : Primer: 5' <i>Trp1/SmaI</i> + 3' <i>Trp1/2-SalI</i> Template: genom. DNA 202	<i>SmaI</i> + <i>SalI</i>

2.1.3 Oligonukleotide

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2-4 angegeben.

Tabelle 2-4: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Primer	Datenbank Eintrag	Position zum ATG	Sequenz 5' → 3'
<i>PUC uni</i>	VB0033		CAG GAA ACA GTC ATG AC
<i>PUC rev</i>	VB0033		TGT AAA ACG ACG GCC AGT
<i>Ura/L0</i>	U00092	-865 bis -839	AGT CGG TAC CGG CAC ATC AAT GCA TCA ATC CGT GTA
<i>Ura/L1</i>	U00092	-715 bis -689	GTA GGA TCC TTC GAG TGA AAC ACA GGA AGA CCA GA

Primer	Datenbank Eintrag	Position zum ATG	Sequenz 5' → 3'
<i>Ura/R2</i>	U00092	+1562 bis +1589	CTA GGA TCC GCT ACG GCG TGA GCG TGA AGG TCT GTT
<i>Ura-kanlox-5'</i>	U00092	-152 bis -112	CGG TAA TCT CCG AGC AGA AGG AAG AAC GAA GGA AGG AGC AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
<i>Ura-kanlox-3'</i>	U00092	+725 bis +765	GCC TGC TTT TCT GTA ACG TTC ACC CTC TAC CTT AGC ATC CCA GCT GAA GCT TCG TAC GC
<i>kan1</i>	AJ002680	-391 bis -369	CCA GAT CTG TTT AGC TTG CCT C
<i>kan2</i>	AJ002680	+1031 bis +1051	GAG CTC GTT TTC GAC ACT GG
<i>kanlox-TRP-5'</i>	JO1374	-48 bis -8	TTG AGC ACG TGA GTA TAC GTG ATT AAG CAC ACA AAG GCA GGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
<i>kanlox-TRP1-3'</i>	JO1374	+592 bis +632	TCT TTT ACA CCA TTT GTC TCC ACA CCT CCG CTT ACA TCA ACA GCT GAA GCT TCG TAC GC
<i>5'-TRP1-Sall</i>	JO1374	-198 bis -178	GTA GTC GAC CCA GAT GGC AGT AGT GGA AG
<i>3'-TRP1-BamHI</i>	JO1374	+902 bis +922	GTA GGA TCC ATT GTA GCG TAT GCG CCT GT
<i>5'HIS3-kanlox</i>	AJ585719	+75 bis +115	GGT CCC CTA GCG ATA GAG CAC TCG ATC TTC CCA GAA AAA GGC ATA GGC CAC TAG TGG
<i>3'HIS3-kanlox</i>	AJ585719	+595 bis +635	ACA TCG TTG GTA CCA TGG GGC GAG GTG GCT TCT CTT ATG GCA GCT GAA GCT TCG TAG
<i>5'EcoRI-HIS3</i>	AJ585719	-187 bis -207	CAT GAA TTC CTA TTA CTC TTG GCC TCC TC
<i>3'XbaI-HIS3</i>	AJ585719	+963 bis +983	GCT TCT AGA TTC GCT CAG TTC AGC CAT AA
<i>AdeL-Eco</i>	Y13140	+1680 bis +1694	AGT CGA ATT CTC GTA ACC GAC AGT
<i>AdeR-Kpn</i>	Y13140	+193 bis +207	AGC TGG TAC CAA TGT GAT GTG CTA
<i>ADE/R-raus</i>	Y13140	+209 bis +229	ACA TCA ACA TGC TCA ATC TC
<i>URA3/L-raus</i>	U00092	-494 bis -474	CAT GAG ATG ATG AAC CGT TG
<i>Kan/R-raus</i>	AJ002680	+632 bis +652	TTG TAT TGA TGT TGG ACG AG
<i>5'PHO80-Trp1</i>	XO7464 JO1374	<i>PHO80</i> : -20 bis +30; <i>TRP1</i> : -618 bis -599	GGA GAC TCA TAG AAA TCA TCA TGG AAA GCA CAT CAG GAG ATG AAT GGG TCC TTG GCT GGT CCA TCT CTA T
<i>3'Trp1-PHO80</i>	JO1374 XO7464	<i>TRP1</i> : +1002 bis +1022; <i>PHO80</i> : +750 bis +800	CCT TTA GTT GAG TAG TTT GGG AGC CAC TTT CAC TCA CTA TGA TTA CGA GGA TAC GGA GAG AGG TAT GTA
<i>5'-pho80</i>	XO7464	-260 bis -240	AGT GCT CAT CGT ATA CAC TG
<i>3'-TRP1(N)</i>	JO1374	-17 bis -37	ACG TAT ACT CAC GTG CTC AA
<i>5'Pho/D1</i>	XO7464	0 bis +30	ATG GAA AGC ACA TCA GGA GAA CGT TCC GAA
<i>3'PhoTrp1/D1</i>	XO7464 JO1374	<i>PHO80</i> : +280 bis +300; <i>TRP1</i> : -518 bis -468	ACT CCT CTT CCG TTT TCA GAA TAG AGA TGG ACC AGC CAA GGA CCC ATT CAA ATC GAT ATA ATA GAG TGA TGT CAT AAG CA
<i>5'Trp1Pho/D2</i>	XO7464 JO1374	<i>PHO80</i> : +790 bis +1110; <i>TRP1</i> : +972 bis +1022	CTT AGT ATA TAA ATA CAC ATG TAC ATA CCT CTC TCC GTA TCC TCG TAA TCA TAG TGA GTG AAA GTG GCT CCC AAA CTA CT
<i>3'Pho/D2</i>	XO7464	+963 bis +993	CCC AAT TGC TTA TTA TAC ACA CAC AGA TAT
<i>5'pho1/SacI</i>	XO7464	-250 bis -230	ATG CGA GCT CAG TGC TCA TCG TAT ACA CGT
<i>3'pho1/SmaI</i>	XO7464	+380 bis +400	TTA ACC CGG GAG CCT TTT GTT GCG ACT GTG
<i>5'Trp1/SmaI</i>	JO1374	-208 bis 188	ATA TCC CGG GAG TTA TGA CGC CAG ATG GCA
<i>3'Trp1/Sall</i>	JO1374	+753 bis +733	GCC GGT CGA CAT CTT TTA TGC TTG CTT TTC
<i>5'pho2/Sall</i>	XO7464	+600 bis +580	AGC TGT CGA CAC GCA TTA GGG TCT CTC GAT

Primer	Datenbank Eintrag	Position zum ATG	Sequenz 5' → 3'
3' <i>pho2/SphI</i>	XO7464	+880 bis +860	GTA CGC ATG CAA TCT GCC TTT GAT CGC TTG
5' <i>TRP-NP</i>	JO1374	+618 bis +592	TGA TGT AAG CGG AGG TGT GGA GAC A
3' <i>PHO-NP</i>	XO7464	+920 bis +895	CAA TCA TGA TGG CTT TCA TAA TAC C
5- <i>TRP1P-S</i>	JO1374	-202 bis -182	GAC GCC AGA TGG CAG TAG TG
3- <i>TRP1P-S</i>	JO1374	-37 bis -19	GCT GCC TTT GTG TGC TTA
5- <i>A2U3</i>	Y13140 U00092	<i>ADE2</i> : -576 bis -529; <i>URA3</i> : -803 bis -775	ACG GAA ATG AGA TGA TAT ACT GGT AGT GCG CTA GTC AAG TTC TAA TTG CAG TGG TAA CGC TAG AGC AGA CGC TCA
5' <i>Ade2/1-Kpn</i>	Y13140	-619 bis -599	ACT GGT ACC GTC AGA TGG ACA CAT TGG GC
3' <i>Ade2/1-Kpn</i>	Y13140	-1099 bis -1079	GAT GGT ACC AGG ATT CTG GGA GGT AAT GG
5' <i>Ade2/2-Sph</i>	Y13140	-1409 bis -1389	CAG GCA TGC CTA TCA CCG TGT AAC TGA GCT
3' <i>Ade2/2-Sph</i>	Y13140	-1809 bis -1789	TAG GCA TGC TCG ACG AAT ATC ATG ATA GT
3' <i>-129c-NP</i>	Z75037	-2103 bis -2083 (<i>ADE2</i>)	TTT GCG GGC GTA TGT AGC AT
5' <i>-128c-NP</i>	Y13140	-303 bis -283	GGT GTT ACA AAA TTC TCG GC
5' <i>-TM-Ade2</i>	Y13140	+1425 bis +1405	CCA CCA TAC CTG GCA AGT GA
3' <i>-TM-Ade2</i>	Y13140	+1368 bis +1391	GCA AGC GTG GAA TTA AAA CAA TT
5' <i>-TM-kan</i>	AJ002680	+500 bis +519	GCG TAA TGG CTG GCC TGT T
3' <i>-TM-kan</i>	AJ002680	+546 bis +567	GAC GAC TGA ATC CGG TGA GAA
5' <i>-TM-Trp1</i>	JO1374	+536 bis +556	TGG ACT GAC GCC AGA AAA TG
3' <i>-TM-Trp1</i>	JO1374	+578 bis +600	CAC ACC TCC GCT TAC ATC AAC A
3' <i>-kanL-NP</i>	AJ002680	-274 bis -294	TGT ACG GGC GAC AGT CAC AT

2.1.4 Nährmedien

Hefemedien

- Vollmedium (YEP) (AUSUBEL *et al.*, 1991):
 - 10 g/l Hefeextrakt
 - 20 g/l Pepton
 - 20 g/l Glukose
 - 20 g/l Agar (bei festem Medium)
- Minimalmedium (YNB):
 - 1,7 g/l yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)
 - 5 g/l Ammoniumsulfat
 - 20 g/l Glukose
 - 20 g/l Agar (bei festem Medium)

Yeast nitrogen base wurde getrennt vom übrigen Medium filtersterilisiert. Bei Bedarf wurde das Medium mit den folgenden Substanzen supplementiert:

60 mg/l Adenin, 25 mg/l L-Histidin, 30 mg/l Leucin, 25 mg/l Uracil, 10 mg/l L-Tryptophan.

- YNB+5-FOA-Medium (BOEKE *et al.*, 1984):

- YNB-Medium
- 1 g/l 5-FOA (Apollo Scientific LTD)
- 50 mg/l Uracil

Es wurde je nach Selektionsmethode 200 mg/l G418 (Geneticindisulfat Roche) dem Medium sterilfiltriert beigelegt.

- 5-FAA-Medium (TOYN *et al.*, 2000):

5-FAA (Sigma Aldrich) wurde in einer Konzentration von 0,5 g/l verwendet.

- YEP-G418 / YNB-G418 Medium:

Dem autoklavierten und auf 60°C abgekühlten Voll- bzw. Minimalmedium wurde 200 mg/l G418 (Roche) sterilfiltriert zugegeben.

Nährmedium für *E.coli*

LB-Medium (AUSUBEL *et al.*, 1991):

- 10 g/l Trypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 5 g/l Natriumchlorid
- 20 g/l Agar (bei festem Medium)

Bei Bedarf wurden 100 µg/ml Ampicillin (LBA), 100 µl/ml X-Gal (Sigma Aldrich) und 4 mM IPTG (Sigma Aldrich) zugesetzt.

2.1.5 Chemikalien, Puffer, Enzyme und Kits

Chemikalien, Puffer

Chemikalien für Nährmedien wurden im allgemeinen von Fluka, Merck, Roth und Sigma bezogen.

Alle verwendeten Puffer wurden wie in AUSUBEL *et al.*, 1991 beschrieben angefertigt.

Die für die Mutagenese verwendeten Modellsubstanzen wurden wie folgt verwendet. MNNG (Aldrich, Taufkirchen) und EB (Serva, Heidelberg) wurden in der jeweiligen Konzentration in sterilem Wasser gelöst und eingesetzt. Von der Substanz Benomyl wurde eine Stammlösung mit 40 mg eines Benomylgemisches (Du Pont, Wilmington USA) hergestellt, welches zu 50 % aus der Substanz Benomyl bestand. Diese Stammlösung wurde vor jedem Gebrauch für 5

Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt, abgekühlt und zu den Zellen der Testerstämme zugegeben. Bei der Verwendung von Anilin (Merck, Darmstadt) wurden pro 1 ml Ansatz zunächst 10 µl Ethanol vorgelegt und darin die jeweilig eingesetzte Konzentration von Anilin gelöst, dann wurde das Volumen mit der Zellsuspension wie im Protokoll (2.4.4.1) beschrieben auf 1 ml aufgefüllt.

Enzyme

Die Herkunft von Enzymen wurde in Tabelle 2-5 aufgelistet.

Tabelle 2-5: Herkunft von Enzymen

Enzym	Hersteller
Lyticase	Sigma
Taq-Polymerase mit Puffer und MgCl ₂	Promega
Pwo-Polymerase mit Puffer und MgCl ₂	Roche
Restriktionsendonukleasen mit Puffern	Roche
RNase A	Sigma Aldrich
T4-Ligase mit Puffer	Roche
Alkalische Phosphatase SAP	USB

Kits

Zur Plasmidisolation wurde das Nucleospin-Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet.

Zur Aufreinigung von PCR Produkten und zur Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Nucleospin-Extract Kit (Macherey-Nagel, Düren) angewandt.

Das PCR DIG probe synthesis kit der Firma Roche wurde zur Markierung von Sonden für Southern-Blot-Hybridisierung verwendet. Detektion mittels Chemilumineszenz wurde mit dem DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (Roche, Mannheim) durchgeführt.

Für die Real time PCR wurde das kit der Firma Eurogentec verwendet.

PCR-Produkte über 4 kb wurden mit dem Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche amplifiziert.

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 DNA-Isolation

Plasmidisolierung aus *E. coli*

- Die analytische Plasmidminipräparation wurde nach HE *et al.*, 1990 durchgeführt.

- Zur Gewinnung reiner Plasmide für Klonierungsexperimente (Restriktion, Ligation, Transformation) wurde die Spin-Minipräparation mit dem Nucleospin-Extract Kit nach dem Handbuch des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt.

Isolation von Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolation der Gesamt-DNA wurde die von CAMPBELL und DUFFUS (1988) beschriebene Methode verwendet.

2.2.2 Transformation

Herstellung kompetenter Zellen und Transformation in *E. coli*

Die Transformation in *E. coli* DH5 α erfolgte nach der Standardmethode (SAMBROOK *et al.*, 1989) mittels Temperaturschock.

Herstellung kompetenter Zellen und Transformation in *S. cerevisiae*

Hefezellen wurden nach der Methode von AGATEP *et al.* (1998), mit PCR-Produkten und restringierten Plasmidfragmenten zur Disruption von Genen oder zur Lokalisation von offenen Leserahmen transformiert. Die Selektion von Transformanten erfolgte auf dem jeweils supplementierten YNB-Minimalmedium. Bei der Transformation der kanMX4-Kassette wurde auf YEP-G418 Medium selektiert.

"Marker-Rescue"

Mit loxP-kanMX4-loxP-Integrationskassetten transformierte, Geneticin-resistente *S. cerevisiae*-Stämme wurden mit ca. 1 μ g pSH47 (*CRE*, *URA3*)-Plasmid-DNA nach der Methode von AGATEP *et al.* (1998) transformiert. Die Transformanten wurden mit Hilfe des *URA3*-Markergens auf dem jeweiligen Minimalmedium ohne Uracil selektiert. Zur Induktion der Cre-Rekombinase wurden die Transformanten 2 bis 5 Stunden im flüssigen Galactosehaltigen Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Vollmedium ausplattiert und nach Wachstum die Kolonien auf Platten mit und ohne Geneticin gestempelt. Schließlich wurde der prozentuelle Anteil der Kolonien errechnet, die das loxP-kanMX4-Modul verloren haben.

2.2.3 Restriktion und Ligation von DNA

Die Restriktion von DNA wurde jeweils mit Restriktionsendonukleasen der Firma Roche und den dazugehörigen Puffern entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Ligation wurde T4-Ligase (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Aufgereinigte DNA aus einem Einfach- oder Doppelrestriktionsverdau von Vektor und Insert-DNA wurde im Verhältnis 1:3 bei 15°C über Nacht inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend in *E. coli* transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LBA-Medium. Die korrekte Zusammenlagerung von Vektor und Insert wurde nach Reisolation der Plasmide mittels Plasmidminipräparation (HE *et al.*, 1990) und nachfolgendem Restriktionsverdau in einer Agarosegel-Elektrophorese untersucht.

2.2.4 Aufreinigung von DNA

PCR-Produkte, restringierte DNA und DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden gereinigt/isoliert mit Hilfe des Nucleospin Extrakt kits (Macherey-Nagel). Die entsprechende Methode wurde dem Handbuch des Herstellers entnommen.

2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden in 0,9%igen Agarosegelen (Roth, Karlsruhe) in TBE-Puffer bei 70-120 Volt aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid erfolgte die Detektion im UV-Durchlicht (256 nm). Die Dokumentation wurde mittels einer Polaroid Kamera (Rotfilter) durchgeführt.

2.2.6 Polymerase chain reaction (PCR)

DNA-Templates

Bei der Verwendung genomischer Hefe-DNA als Template (Matritze) wurde die DNA mittels der oben beschriebenen Methode nach CAMPBELL & DUFFUS, 1988 isoliert. Wurden Plasmide als Template verwendet, so wurde die DNA mittels des Kits zur Isolation von Plasmiden aus Bakterien (Macherey-Nagel, Düren) gewonnen. Bei Verwendung von genomischer *S. cerevisiae*-DNA wurden etwa 100 ng DNA pro PCR-Ansatz eingesetzt. Die Konzentration von Plasmid-DNA als Template betrug 10-50 ng.

Reaktionsbedingungen der PCR

Es wurden zwei Reaktionsvolumina für die Reaktion gewählt. Wurde eine Disruptionskassette mittels PCR hergestellt, so betrug das Reaktionsvolumen 50-100 µl. Für analytische Experimente wurde ein Reaktionsvolumen von 25 µl gewählt. Die Komponenten der Reaktion waren neben dem Template der nach Herstellerangaben verdünnte Reaktionspuffer, Taq-Polymerase (1 unit/25 µl Reaktionsvolumen), 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM

dNTP, 0,4 μ M des jeweiligen Primerpaares. Bei Verwendung von genomischer Hefe-DNA als Template wurde eine hot start PCR gewählt. Bei dieser Reaktion wird eine 3 Minuten lange Denaturierung bei 99°C vor die Zugabe der Taq-Polymerase gewählt. Bei Verwendung von Plasmiden als Template war dieser hot start nicht erforderlich. Die Reaktion beginnt mit einer Denaturierung bei 94°C (1 min). Anschließend folgte die Anlagerung der Primer bei 50°C - 60°C (1 min). Die Elongation wurde bei 72°C durchgeführt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Produkte. Pro 1 kb wurde 1 Minute Elongation im Cycler programmiert. Nach 30 Zyklen (analytische Ansätze) bzw. 40 Zyklen (bei Herstellung von Disruptionskassetten (Denaturierung, Anlagerung der Primer, Elongation)) folgte eine Endelongation bei 72°C für 10 Minuten.

2.2.7 Real-time PCR

Zur Bestimmung des Verhältnisses der Gene *ADE2*, *TRP1* und des *kanMX4*-Gens zueinander in der genomischen DNA des konstruierten Stammes DAN wurde die Methode der Real-time PCR gewählt. Die quantitative Real-time PCR wurde am ABI Prism 7700 Sequence Detektion System (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das für die Reaktion verwendete Kit wurde von Eurogentec bezogen. Die Primer für die Reaktion sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Sie wurden mit der Primer Express software (Version 2.0, PE Applied Biosystems) so konstruiert, dass eine Annealingtemperatur von 60°C optimal für die Reaktion war und die gebildeten Produkte eine Größe von 50 - 150 bp besaßen.

Die Bedingungen für die Amplifikation waren wie folgt: 10 Minuten Denaturierung bei 95°C; 40 Zyklen mit 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C und 1 Minute Anlagerung der Primer kombiniert mit der Polymerisation bei 60°C. Zur Quantifizierung der Amplifikate wurde der Doppelstrang-DNA-spezifische SYBR Green I Fluoreszenz Farbstoff verwendet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der ABI Prism 7000 SDS Software. Die Kurven des Standards (H7 und HAN in gleicher Konzentration gemischt) und der Unbekannten (Fusionsprodukte) wurden in einem Lauf gemessen und automatisch mit der software quantifiziert. Die Anzahl der Zyklen (C_t) bei der die Kurve den Schwellenwert übersteigt und in die exponentiale Phase eintritt, wurde in die Auswertung einbezogen. Je mehr Template für die verwendeten Primer zur Verfügung steht, um so niedriger ist die Anzahl der Zyklen beim Erreichen der exponentiellen Phase (BUSTIN, 2000). Die C_t -Werte sind direkt proportional zum Logarithmus der eingesetzten Konzentration (WILHELM *et al.*, 2003). Es wurde eine Standardgerade ermittelt, bei der die C_t -Werte gegen die Konzentration der Verdünnungen des Gemisches beider haploiden Stämme aufgetragen wurden. Basierend auf dieser Geraden

wurden die Konzentrationen des Templates der Fusionsprodukte ermittelt. Die Standardabweichung von Template kanMX4/*ADE2* sowie *TRP1/ADE2* wurde mit Hilfe der halb-logarithmischen Ableitung errechnet.

2.2.8 Southern-Blot-Hybridisierung

Herstellung von DIG-markierten Sonden

Zur Herstellung der *TRP1*-spezifischen Sonde wurde das PCR DIG probe synthesis kit der Firma Roche nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Template für die Reaktion wurde ein vom Template gereinigtes PCR Produkt der Primer am Template der genomische DNA des Stammes *S. cerevisiae* MCC *ade⁻ Δura3* eingesetzt. Es wurden die Oligonukleotide 5-*TRPIP-S* und 3-*TRPIP-S* (siehe Tabelle 2-4) für die *TRP1*-spezifische Sonde verwendet. Die Synthese der Sonde führte zu einem Produkt, das 194 bp groß war.

Hybridisierungsbedingungen

Bei der DNA-Hybridisierung nach SOUTHERN, 1975 wurden Standardmethoden (AUSUBEL *et al.*, 1991) verwendet. Hierfür wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Durch Backen der Membran bei 120°C für 30 Minuten wurde die DNA fixiert. Nach einer 1 - 3 Stunden langen Prähybridisierung (DIG-Easy Hyb, Roche) wurde über Nacht bei 42°C hybridisiert. Die Detektion mittels Chemilumineszenz erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche, Mannheim).

2.2.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden vom ZEDA Sequencing Service (Fraunhofer Insitut Molekularbiologie und Angewandte Oekologie) am Applied Biosystems 3700 DNA Analyser durchgeführt. Das Sequenzierungsprinzip wurde durch SANGER *et al.* (1977) beschrieben. Die Sequenzierungsreaktion beinhaltet markierte Didesoxynukleotide, Taq-Polymerase und einen Thermocycler zur Herstellung der verlängerten Oligonukleotid-Produkte, die durch Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt wurden. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Lasers mit anschließender Messung der Fluoreszenz mit einer CCD (charge-coupled device) Kamera.

2.3 Genetische Methoden

2.3.1 Sexuelle Hybridisierung von *S. cerevisiae*

Die Kreuzungen mit *S. cerevisiae* wurden nach der „drop overlay Methode“, die von Spencer J.F.T und Spencer D.M. beschrieben in *Yeast a practical approach* (CAMPBELL & DUFFUS 1988) veröffentlicht wurde, durchgeführt. Diese Methode wurde für die Cytoduktion von MCC109 α *ade2-101 ura3-52 p⁰* mit 161-K10a verwendet.

Nach der Kreuzung der Stämme auf Vollmedium wurden die Zellen abgenommen und auf Vorselektionsmedium YNB+Adenin+Uracil ausgestrichen. Auf diesem Vorselektionsmedium konnte sowohl der Elternstamm MCC109 wie auch die atemungskompetenten Nachkommen der Hybridisierung wachsen. Durch Screening auf Glycerin (2%)-haltigem Medium und YNB-Minimalmedium wurden nur die atemungskompetenten Klone die Adenin- und Uracil-auxotroph waren ausgewählt.

2.3.2 Protoplastenfusion

Die Protoplastenfusion von *S. cerevisiae*-Stämmen wurde nach der von SKALA und KOTYLAK, 1984 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zur frühen log-Phase angezogen und mit Lyticase und β -Mercaptoethanol protoplastiert. Die Protoplasten wurden gewaschen und vorsichtig und mit PEG (30 %) / DMSO (15 %) gemischt. Nach einer 30 Minuten langen Inkubation bei 28°C wurde das Gemisch verdünnt und mit YNB-Überschichtungsagar vermischt und auf YNB-Agar-Platten überschichtet.

2.3.3 Bestimmung des Ploidiegrades von *S. cerevisiae*

FACS (fluorescence-activated cell sorting)

Die Anfärbung der DNA erfolgte für die FACS-Analysen mit Propidiumjodid (8 μ g/ml) nach VINDELOV *et al.*, 1983. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale wurde mit der Cell Quest™ software durchgeführt und in Form von Histogrammen dargestellt (DARZYNKIEWICZ und CRISSMAN, 1990).

Bestimmung des DNA-Gehaltes pro Zelle

Der DNA-Gehalt pro Zelle wurde mit der Diphenylamin-Methode nach BURTON (1965) nach Extraktion löslicher Nukleotide (HERBERT *et al.*, 1971) bestimmt. Um einen möglichst genauen Wert zu bekommen, wurden dreimal 200 mg Zellen (Nassgewicht), die bis zur stationären Phase gewachsen sind, in Zentrifugenröhrchen abgewogen. Mit 11 ml Aqua dest. wurden die Zellen suspendiert. 1 ml der Zellsuspension wurde für die Bestimmung der

Zellzahl mit Hilfe der Thoma-Kammer verwendet. Die restlichen Zellen wurden abzentrifugiert und mit eiskalter 0,25 N Perchlorsäure versetzt. Zur Extraktion der löslichen Nukleotide wurde diese Suspension 30 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen 3 mal mit 3 ml 0,5 N Perchlorsäure je 15 Minuten bei 70°C behandelt. Die Nukleinsäure Extrakte wurden in Schliffröhrchen gesammelt. Anschließend wurde das Probevolumen auf 10 ml mit Perchlorsäure aufgefüllt. Ein Milliliter des Extraktes wurde mit einem Milliliter Diphenylaminreagenz vermischt und 19 h bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 600 nm gegen einen Leerwert, der 1 ml 0,5 N Perchlorsäure und 1 ml Diphenylaminreagenz enthielt. Bei jeder Messung wurde jeweils eine Eichreihe mit Heringssperm-DNA bekannter Konzentration angelegt. Die Steigung der Eichgeraden wurde zur Berechnung der DNA-Konzentration pro Zelle verwendet.

2.3.4 Bestimmung der Stabilität von Transformanten

Stabilität von *URA3* und *ADE2* nach Reversion

Ein Klon der jeweiligen Transformation wurde unter nicht-selektiven Bedingungen in YEP-Flüssigmedium angezogen, verdünnt und auf YEP-Platten ausgestrichen. Nach Wachstum von Kolonien wurden geeignete Platten auf Medium mit und ohne Uracil bzw. Adenin gestempelt und die gewachsenen Kolonien verglichen.

Stabilität von Δura

Ein Klon des Stammes MCC *ade2* Δura wurden in YEP-Flüssigmedium angezogen. Jeweils 10^8 Zellen dieser Kultur wurden anschließend auf YNB- YNB-Ade-Agarplatten mit und ohne Uracil ausgestrichen und nach Inkubation auf Wachstum untersucht.

Stabilität von *TRP1::pho80*

Der Klon H7 wurde über Nacht in YEP-Flüssigmedium angezogen. Nach 18 Stunden Inkubation wurden 10^6 Zellen in frische 50 ml-YEP-Kulturen überimpft, zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen, verdünnt und auf YEP-Platten ausgesplattiert. Nach Wachstum wurden die Kolonien auf YNB+Ade+Ura+His-Agarplatten mit und ohne Tryptophan gestempelt. Nach 3 Tagen Inkubation bei 28 °C wurde das Wachstum der Kolonien verglichen.

2.3.5 Auxonaographie

Um die Disruption von *URA3*, *TRP1* und *HIS3* mittels „Marker-Rescue“ zu verifizieren, wurde der Phänotyp der jeweiligen Transformanten bestimmt. Hierzu wurden die isolierten Stämme auf Minimalmediumplatten mit und ohne das jeweilige Supplement (Uracil, Tryptophan bzw. Histidin) ausgestrichen. Nach Vergleich des Wachstums auf diesen Platten, konnte der Phänotyp bestimmt werden.

2.4 Physiologische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Aktivität von saurer Phosphatase in *S. cerevisiae*

Die Aktivität des Repressors *PHO80* der sauren Phosphatase, die von dem Gen *PHO85* kodiert wird, wurde gemessen über die Hydrolyse des Substrates p-Nitrophenylphosphat (Sigma) zu p-Nitrophenol. Für die Messung wurde die Methode von TOH-E *et al.*, 1973 angewendet. Dabei wurden 2 ml der in YNB+Supplemente Medium gewachsenen Zellen abzentrifugiert und in 1 ml p-Nitrophenylphosphat in Acetat-Puffer (pH 4) gelöst. Diese Reaktionslösung wurde 30 Minuten bei 28°C inkubiert. Durch die Zugabe von 1 ml 10%iger Trichlorsäure wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden 2 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung dem Reaktionsgemisch zugegeben. Die Zellen wurden durch vorsichtige Zentrifugation bei 2000 g für 10 Minuten getrennt. Das in der Reaktion entstandene p-Nitrophenol wurde im Photometer (Biometra) bei 420 nm gemessen.

2.4.2 Test der Wirkung von mutagenen und rekombinogenen Substanzen

2.4.2.1 Chemische Mutagenese

Bei der Durchführung des Tests auf mutagene und rekombinogene Substanzen mit dem konstruierten Stamm DAN wurde das Protokoll der Behandlung an die Methode von ZIMMERMANN *et al.*, (1975) angelehnt. Zunächst wurde der Testerstamm auf eine frische YNB-Platte überimpft und 18 h bei 28°C inkubiert. Mit einer Impföse des Zellmaterials wurden 100 ml YNB Medium angeimpft und bis zur stationären Phase (48 h; 28°C) wachsen gelassen. Die Zellen wurden abzentrifugieren (6000 g / 10 min /RT) und zweimal mit sterilem destillierten Wasser (A. dest) gewaschen. Das Pellet wurde in 5 ml Phosphatpuffer (pH 7, 0,1 M) resuspendiert und es wurden zweimal 950/800 (bei EB) µl der Zellen pro Stamm in ein 2ml-Eppi überführt. Bei einer Probe (Kontrolle) wurde das Volumen mit Phosphatpuffer auf 1 ml eingestellt. Der zweiten Probe wurde Mutagenlösung zugefügt und das Volumen auf 1 ml mit Phosphatpuffer eingestellt. Die Zellen wurden 30 Minuten leicht schüttelnd (750 rpm) bei 28°C im Thermoblock inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml kalten

(eisgekühlt) A. dest abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert (8000 g/ 5 min/ 4°C). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem A.dest gewaschen und in 1 ml A. dest resuspendiert. 500 µl der Suspension von Kontrolle und mutagenbehandeltem Ansatz wurden abgenommen und in 10er Schritten bis 10^{-6} verdünnt. Zur Bestimmung des Lebediters wurden auf YEP die Verdünnungen ausgespatelt. Auf die Selektionsplatten YNB+5-FOA+Ura+G418 (5-FOA-MM) zur Erfassung von Mutanten wurden von den Kontrollansätzen zwischen 500 µl und 1000 µl pro Platte gegeben. Auf die YNB-5-FOA+Ade+Ura+His+Trp- (5-FOA-SM) Selektionsplatten wurden 50-100 µl der Ansätze plattiert. Die YEP-Platten wurden 2-3 Tage bei 28°C inkubiert und anschließend ausgezählt und der Titer bestimmt. Die 5-FOA-Platten wurden 14 Tage bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten ausgezählt. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) der 5-FOA-MM wurden als Uracil-auxotroph und Kanamycin-resistent eingestuft und diese Werte direkt in die Auswertung übernommen. Die KBE von 5-FOA-SM-Platten wurden gezählt und auf unterschiedlich supplementierte Minimalmedien gestempelt: YNB+Ura; YNB (Screening gegen Resistente); YNB+Ura+Ade (Genkonvertanten); YNB+Ura+Ade+G418 (Genkonvertanten); YNB+Ura+Ade+His (Crossover und Chromosomenverluste); YNB+Ura+Ade+His+Trp (zwei Crossover, zwei Genkonversionen etc.). Diese Platten wurden noch mal 2 Tage bei 28°C inkubiert und gezählt.

Bei der zweiten Mutagenesereihe erfolgte die Selektion der entstandenen Phänotypen auf (5-FOA-SM und auf 5-FAA-Medium. Auf dem 5-FOA-Medium wurden Uracil-auxotrophe auf 5-FAA-Medium Tryptophan-auxotrophe Kolonien selektiert. Dabei wurden von den Kontrollen 50 µl des Ansatzes auf je zwei Platten gegeben. Bei Zellen, die mit Mutagen behandelt wurden, wurden bei EB, Anilin und Benomyl je 50 µl des Ansatzes auf je zwei Platten gegeben, bei MNNG wurde der Ansatz 1: 10 verdünnt und erst dann 50 µl auf die Selektionsplatten ausgespatelt. Die Selektionsplatten wurden 10 Tage bei 28°C inkubiert. Nachdem die Anzahl der Kolonien bestimmt worden ist, wurden diese Platten auf die folgenden supplementierten Minimalmedium-Platten gestempelt:

5-FOA-SM: YNB+Ura; YNB (Screening gegen Resistente); YNB+Ura+ G418 (Mutanten+Genkonvertanten); YNB+Ura+Ade (Genkonvertanten); YNB+Ura+Ade+G418 (Genkonvertanten); YNB+Ura +Ade+His (Crossover und Chromosomenverluste); YNB+Ura+Ade+His+Trp

5-FAA: YNB (Screening gegen Resistente); YNB+Trp (Chromosomenverluste); YNB+Trp+Ade (Doppelcrossover); YNB+Trp+Ade+Ura (Doppelcrossover); YNB+Trp+Ade+ Ura+His (Crossover)

Diese Screening-Platten wurden zwei Tage bei 28°C inkubiert und anschließend ausgewertet. Dabei wurde Frequenz der jeweiligen Phänotypen berechnet, indem die Anzahl der Kolonien zur Gesamtzahl der eingesetzten Zellen (Zahl der Überlebenden in den Mutageneseversuchen) ins Verhältnis gesetzt wurde.

2.4.2.2 Physikalische Mutagenese mittels ultravioletem (UV) Licht

Für die Erfassung mutagener und rekombinogener Effekte durch UV-Licht wurde das Protokoll für die chemische Mutagenese etwas abgeändert. Die in YNB-Flüssigmedium gewachsenen Zellen wurden wie oben beschrieben abzentrifugiert und gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde in 10 ml Phosphatpuffer aufgenommen, und es wurde 1 ml dieser Zellsuspension abgenommen. Dieser Ansatz diente als unbestrahlte Kontrolle. Die restlichen 9 ml der Suspension wurden 3,5 Minuten mit UV Licht (Lampenabstand 20 cm) in einer Petrischale (mit dem Durchmesser 90 mm) bestrahlt. Bei der Bestrahlung musste besonders auf die gleichmäßige Bewegung der Petrischale geachtet werden, um eine möglichst gleiche Bestrahlung aller Zellen zu gewährleisten. Den bestrahlten Zellen wurde 1 ml für die Erfassung des Überlebens-titers und der mutagenen und rekombinogenen Ereignisse abgenommen. Von der unbestrahlten Kontrolle und bei UV-behandelten Zellen wurde wie oben beschrieben der Lebend-/Überlebens-titer durch das Wachstum auf Vollmedium bestimmt. Zur Erfassung von mutagenen und rekombinogenen Effekten wurden die oben genannten Selektionsplatten verwendet. Auf die 5-FOA-MM Platten wurde jeweils 1 ml ausgespatelt auf 5-FOA-SM Platten 100 µl.

2.5 Statistik

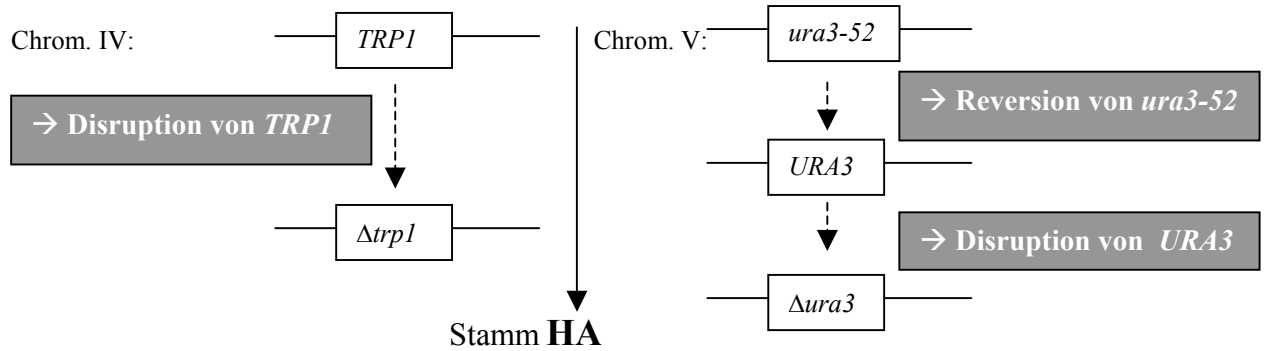
2.5.1 Bestimmung des *t*-Werts

Zur Auswertung der Ergebnisse der Mutagenese-Experimente wurde der *t*-Test angewendet. Die Methode wurde nach CAVALLI-SFORZA (1969) durchgeführt. Nach Berechnung des *t*-Wertes konnte bestimmt werden, ob bestimmte Phänotypen nach der Behandlung mit MNNG, EB, Benomyl, Anilin oder nach Bestrahlung mit UV-Licht mit einer signifikant höheren Frequenz vorkamen als spontan.

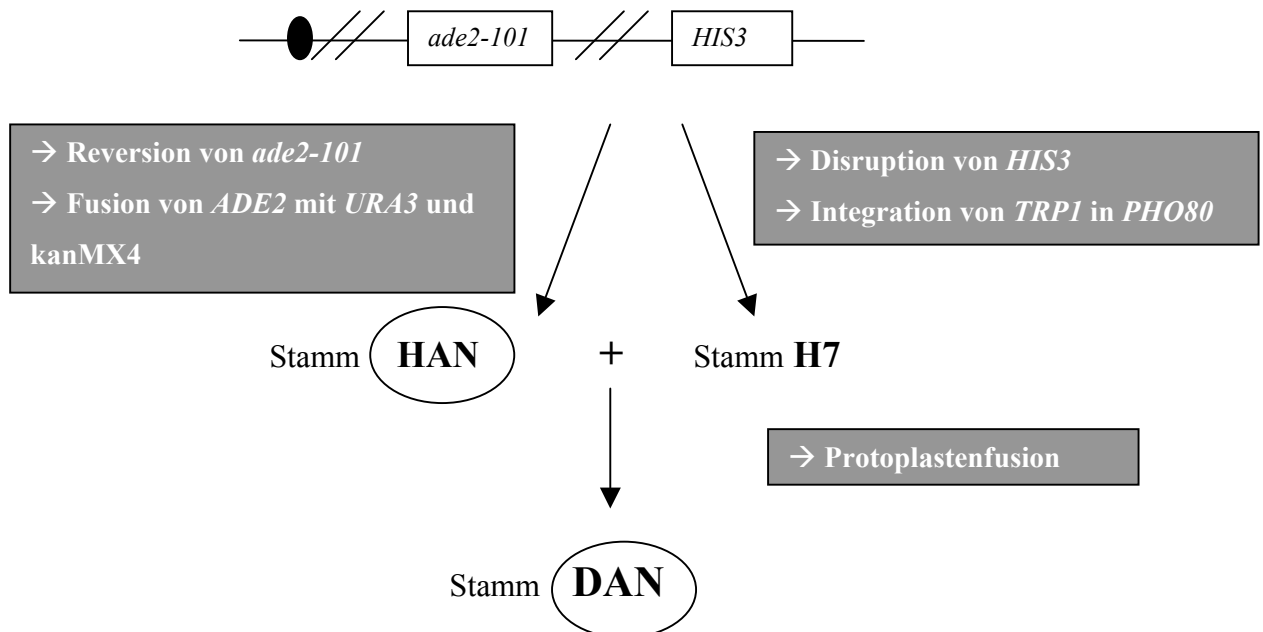
3 Ergebnisse

Um einen Überblick über die Konstruktionstakt zu bieten, wurden die einzelnen Schritte in einem Schema zusammengestellt:

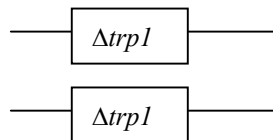
Ausgangsstamm: MCC109 α *ade2-101*, *ura3-52* p^0



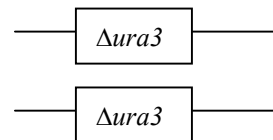
Chrom. XV:



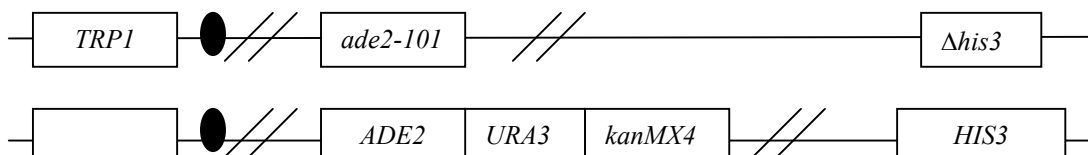
Chrom. IV:



Chrom. V:



Chrom. XV:



3.1 Konstruktion von HA

3.1.1 Bestimmung der Transformationseffizienz des Ausgangsstammes

Die Konstruktion der Testerstämme bestand hauptsächlich aus Disruptionen und Integrationen von Markergenen, deshalb musste zu Beginn der Konstruktion ein Stamm ausgewählt werden, der möglichst hohe Transformationsraten aufwies. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden die Ausgangsstämme MCC109 *MAT α ade2-101 ura3-52 p⁰* und YJH 486 *α leu2-3,112 ade2-101 ura3-52 trp1-289 his3 Δ 1* mit dem autonomen Plasmid YEp352 (*URA3*) transformiert. Die Selektion der Transformanten von MCC109 erfolgte auf YNB+Ade-Platten, von YJH 486 auf YNB+Leu+Ade+Trp+His-Platten. Bei der Transformation von YJH 486 wurden durchschnittlich $3,7 \times 10^4$ Kolonien/ μ g Plasmid-DNA selektiert, bei der Transformation von MCC109 $3,5 \times 10^5$. Da die Transformationseffizienz von MCC109 um eine Zehnerpotenz höher war als die von YJH 486, wurde dieser Stamm für die Konstruktion verwendet.

3.1.2 Cytoduktion

Bei dem Stamm MCC109 *MAT α ade2-101 ura3-52 p⁰* handelte es sich um eine petite-Mutante. Da der Testerstamm möglichst einer humanen eukaryotischen Zelle ähneln sollte, war es sinnvoll, einen diploiden, atmungskompetenten Stamm zu konstruieren. Zusätzlich würde dieser Stamm zur Testung mitochondrialer Mutagene einsetzbar sein.

Mittels Cytoduktion mit dem Stamm 161-K10a wurde ein Ade⁻ Ura⁻-Klon, der auf Glycerinhaltigem Medium wachsen konnte, ausgewählt und weiterverwendet.

3.1.3 Disruption von *URA3*

3.1.3.1 Reversion von *ura3-52*

Der zu konstruierende Testerstamm DAN sollte auf Chromosom XV hemizygot das *URA3*-Gen tragen. Um diese Konstruktion zu ermöglichen, musste zunächst der Leserahmen am Originallocus auf Chromosom V disruptiert werden. Eine direkte Disruption war nicht durchführbar, da die Disruptanten phänotypisch dem Ausgangsstamm MCC109 gleichen würden. Deshalb wurde ein Umweg gewählt, bei dem der *ura3-52* Locus zunächst durch das Wildtyp *URA3*-Gen ersetzt wurde.

Mittels PCR wurden mit Hilfe der Primer *Ura/L0* und *Ura/R2* Amplifikate des *URA3*-Wildtyp-Allels mit der genomischen DNA des Stammes 202a hergestellt.

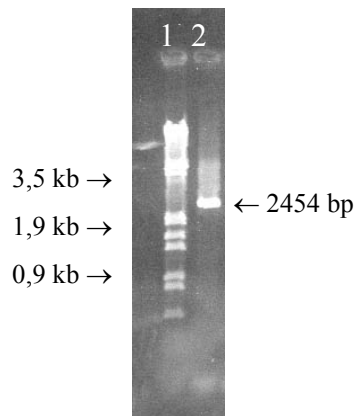


Abbildung 3-1: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate der Primer *Ura/L0* und *Ura/R2* mit genomischer DNA des Stammes 202a (**Spur 2**); Marker λ *EcoRI* / *HindIII* (**Spur 1**)

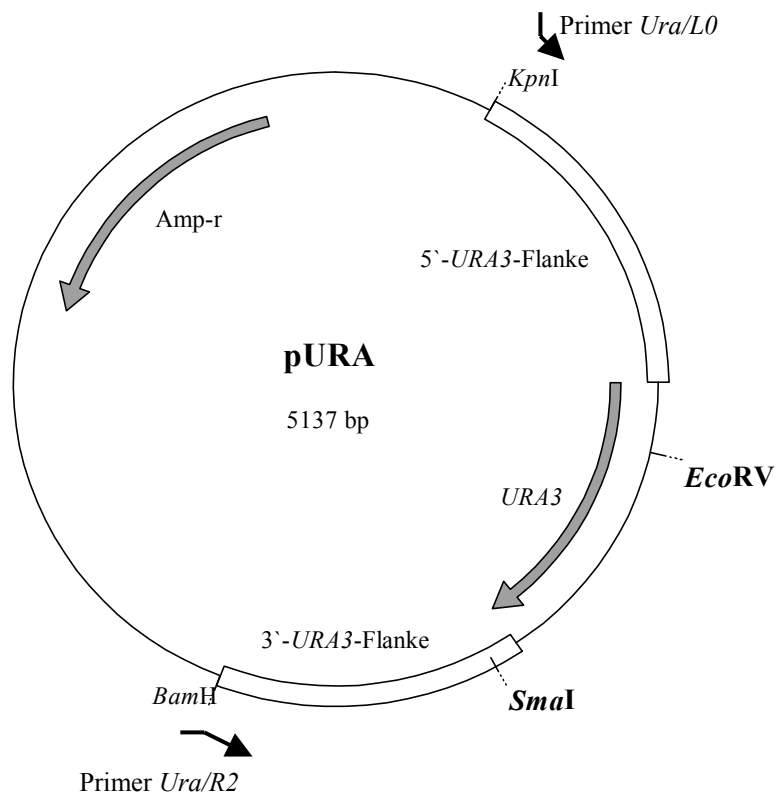
Bei dieser Reaktion wurde ein ca. 2,5 kb großes PCR-Fragment amplifiziert (Abb. 3-1), das mit der Größe des erwarteten (2454 bp) Amplifikats übereinstimmte. Mit dem aufgereinigten Fragment wurde der Stamm MCC109 transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf YNB+Ade-Platten, auf denen 828 Transformanten/ μ g DNA wuchsen. Die Platten der Negativkontrolle (Transformation mit sterilem Wasser) waren unbewachsen.

An einem Klon (MCC *ade2*) wurde anschließend geprüft, ob das Wildtyp-Gen stabil integriert worden war. Hierzu wurde dieser Klon unter nicht selektiven Bedingungen angezogen, auf Vollmedium ausgestrichen und die Kolonien wurden auf Medium mit und ohne Uracil gestempelt. Alle 986 untersuchten Kolonien konnten ohne Zugabe von Uracil wachsen. Diese Transformante war dem nach stabil und wurde daher für die weitere Konstruktion verwendet.

3.1.3.2 Disruption von *URA3* mittels direkter Selektion auf den *Ura*⁻-Phänotyp

Um die *Ura3*⁻-Selektionsmethode mittels 5-FOA-Medium nutzen zu können, sollte aus den 5'- und 3'-Flanken eine Disruptionskassette konstruiert werden. Zunächst wurde der *URA3*-Leserahmen zusammen mit den flankierenden Regionen mittels PCR (siehe Abschnitt 3.1.3.1) amplifiziert und das PCR-Produkt über *Bam*HI und *Kpn*I in den Vektor pUC19 inkloniert. Dieses Plasmid wurde pURA (Karte Abb. 3-2 A) benannt. Das Plasmid wurde mit den Enzymen *Eco*RV und *Sma*I verdaut, das Fragment (694 bp) von dem restlichen Vektor (4443 bp) getrennt und der Vektoranteil religiert. Dieses verkürzte pURA Plasmid wurde im Folgendem als pU-Dis bezeichnet. Für die Transformation wurden Amplifikate eingesetzt, die mit Hilfe der Primer *URA/L0* und *URA/R2* an pU-Dis vervielfältigt wurden.

A:



B:

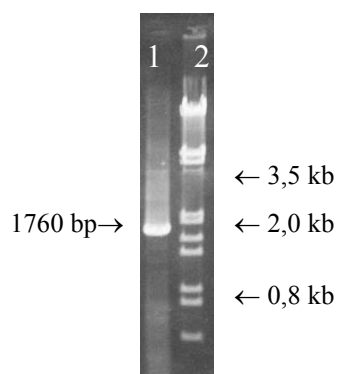


Abbildung 3-2: **A:** Karte des pURA Plasmids; Amp^r: β -Galactosidase-Gen (Resistenz gegen Ampicillin); fett: Enzyme zur Verkürzung des Plasmids zu pU-Dis; **B:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate; Verwendet wurde der Primer *Ura/L0* und *Ura/R2* am Template pU-Dis (**Spur 1**); Marker λ *EcoRI* / *HindIII* (**Spur 2**)

In der Reaktion wurde, wie erwartet, das 1760 bp große Amplifikat gebildet (Abb. 3-2 B). Nach der Transformation von Stamm MCC *ade2* mit 1 μ g der PCR-Produkte erfolgte die Selektion der Transformanten auf YNB+5-FOA+Ura+Ade-Platten. Auf den Selektionsplatten der Transformation wuchsen 35 Kolonien, bei der Wassertransformation 32. Keine der selektierten Kolonien wies eine Uracil-Auxotrophie auf.

Obwohl in weiteren vier Transformationen mit dieser Disruptionskassette die Koloniezahl in einem Bereich zwischen 24 und 43 Kolonien auf YNB+5-FOA+Ura+Ade-Platten selektiert

wurden, handelte es sich bei allen Kolonien um Uracil-Prototrophe. Eine erfolgreiche Disruption des *URA3*-Locus war entgegen allen Erwartungen mittels direkter Selektion nicht möglich.

Eine Sequenzierung der Disruptionskassette sollte Auskunft darüber geben, ob bei der Konstruktion dieser Kassette Fehler unterlaufen waren, die eine Disruption verhinderten. Es wurden die pUC19-spezifischen Primer *pUC uni* und *pUC rev* eingesetzt. Nur eine Base der 3'-Flanke stimmte nicht mit der in der CYGD (comprehensive yeast genome database) Datenbank unter der Bezeichnung U00092 angegebenen Sequenz überein, was daran liegen könnte, dass unterschiedliche Stämme sequenziert worden waren. Die Sequenz der 5'-Flanke war identisch zu der unter der Bezeichnung U00092 angegebenen Sequenz, was die korrekte Konstruktion der Disruptionskassette belegte.

3.1.3.3 Disruption mittels „Marker-Rescue“-System

Nach der direkten Selektion auf Ura⁻-Phänotypen wurde das „Marker-Rescue“-System (GÜLDENER *et al.*, 1996) zur Disruption von *URA3* angewendet. Dafür konstruiert man einen ends-out-Integrationsvektor mit zentraler kanMX4-Kassette als Selektionsmarker und Flanken mit Homologie zur 5'- bzw. 3'-Region des zu disruptierenden Gens. Nach der Transformation und Selektion auf Geneticin-haltigen Medium kann bei Klonen, in denen die Integration homolog erfolgte, die kanMX4-Kassette entfernt werden, indem ein autonomes Plasmid (pSH47) mit dem Gen für die ortsspezifische Rekombinase Cre transformiert wird. Da die Excision über die lox-sites mit einer hohen Frequenz geschieht, können unter den Cre-Rekombinaten leicht Geneticin-sensitive Klone herausgefunden werden.

Zur Herstellung der Disruptionskassette wurde in einer PCR mit den Primern *Ura-kanlox-5'* und *Ura-kanlox-3'* das loxP-kanMX4-loxP-Modul von Plasmid pUG6 mit 40 bp langen *URA3*-Flanken versehen. Bei dieser Reaktion wurde die in Abbildung 3-3 dargestellte Disruptionskassette amplifiziert. Nach Transformation des Stammes MCC *ade2* mit 0,2 µg des PCR-Amplifikats wuchs auf dem Selektionsmedium (YEP+G418) eine Kolonie. Dann wurde das Plasmid pSH47 in diesen Klon transformiert (Selektion: YNB+Ade; 1,2 x10⁵ Transformanten/µg DNA). Zur Induktion der Cre-Rekombinase, deren Gen auf dem Plasmid unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors steht, wurde die Transformante MCC *ade2 G418'* + pSH47 in Flüssigmedium mit Galaktose inkubiert.

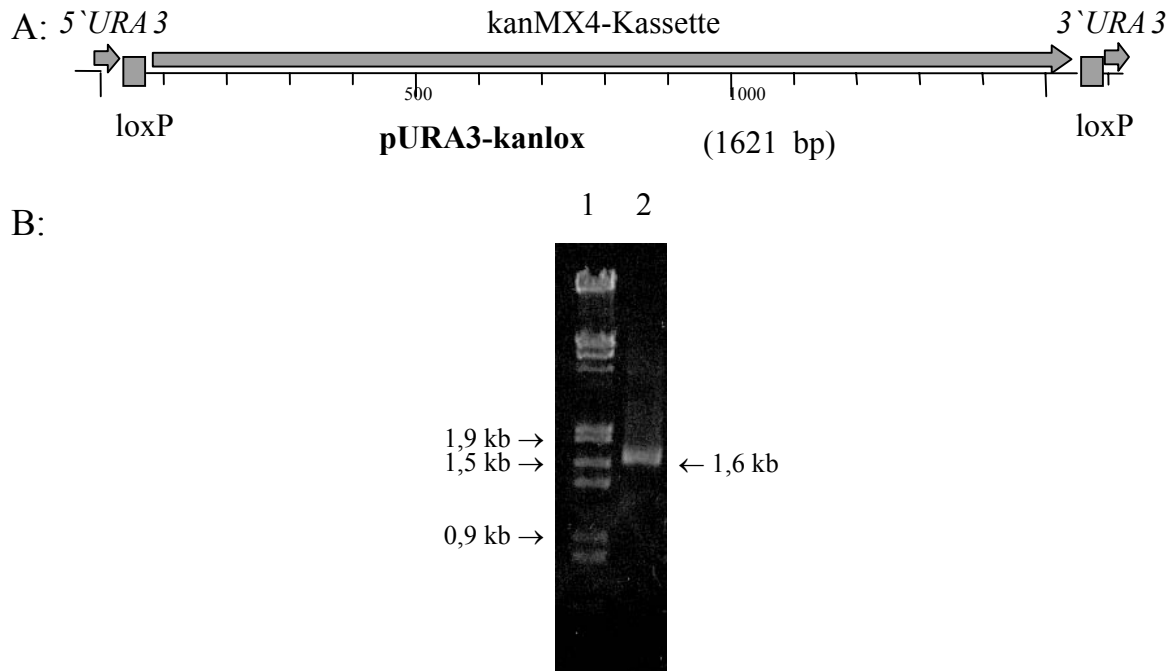
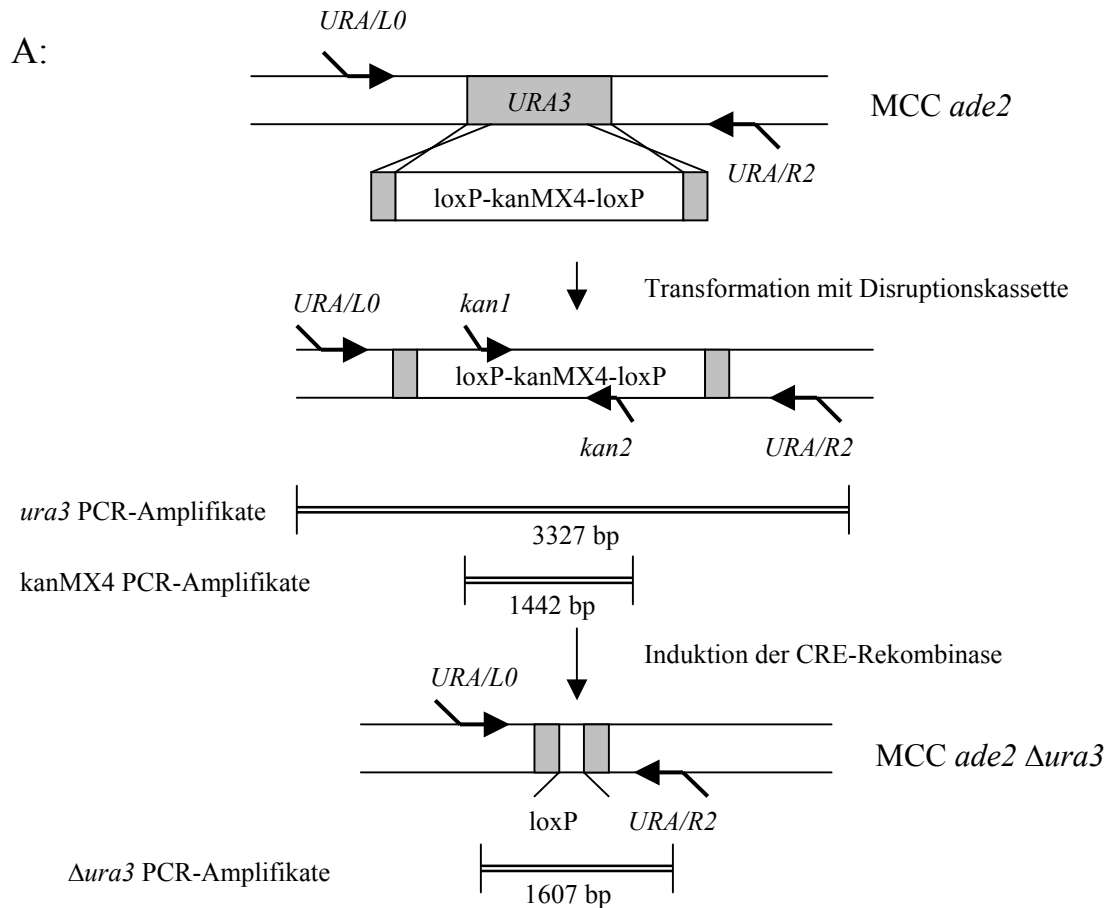


Abbildung 3-3: A: Schematische Darstellung der kanlox-Disruptionskassette zur Disruption von *URA3*; B: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate der Primer *Ura-kanlox-5'* und *Ura-kanlox-3'* am Template pUG6 (**Spur 2**); Marker λ *EcoRI* / *HindIII* (**Spur 1**)

Nach Inkubation der Zellen in Galaktose-Medium hatten 90 % (nach 3 Stunden) bzw. 96 % (nach 5 Stunden) der Zellen ihre G418-Resistenz verloren. Zellen eines Klons, der nach der Inkubation in Galaktose keine Geneticin-Resistenz mehr aufwies (MCC *ade2 G418^s* + pSH47), wurden auf YNB+5-FOA+Ura+Ade-Platten ausgestrichen, um die Kolonien zu selektieren, die das Plasmid verloren hatten. Bei einer dieser Kolonien wurde der Phänotyp durch einen Wachstumstest auf unterschiedlich supplementierten Minimalmediumplatten bestimmt. Erwartungsgemäß konnte der Stamm MCC *ade2 G418^s* nicht mehr ohne die Zugabe von Uracil wachsen. Ebenso entsprachen alle anderen phänotypischen Eigenschaften den Erwartungen.

Neben der phänotypischen Charakterisierung des konstruierten Stammes MCC *ade2 Δura* wurde die Disruption von *URA3* mittels PCR geprüft. Abbildung 3-4 zeigt in einem Übersichtsschema die Lage der verwendeten Primer, die erwarteten PCR-Produkte (A) und die Ergebnisse der PCR (B). Bei den beiden Stämmen mit dem Plasmid pSH47 und dem Stamm MCC *ade2 Δura* wurden mit den *kan1/kan2* Primern keine Amplifikate gebildet. Die Cre-Rekombinase scheint auch schon vor der Induktion eine basale Aktivität besessen und das loxP-kanMX4-Modul aus dem Leserahmen entfernt zu haben. Mit den Primern *URA/L0* mit *URA/R2* wurde bei diesen drei Stämmen erwartungsgemäß ein 1,6 kb großes Produkt amplifiziert.



B:

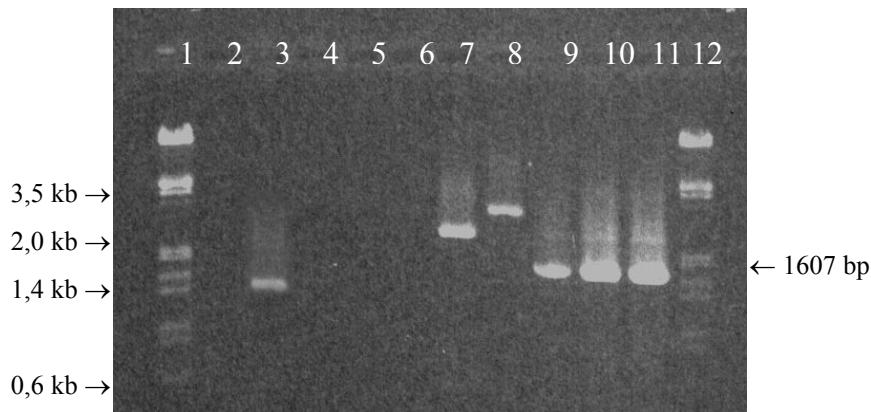


Abbildung 3-4: **A:** Schematische Darstellung der Disruption von *URA3* mittels loxP-kanMX4-loxP-Kassette und Lage der zum Nachweis der Disruption verwendeten Primer; grau: *URA3*-Sequenzen; **B:** Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR Amplifikaten der Primer *kan1* mit *kan2* am Template in der genomischen DNA der Stämme MCC *ade*⁻ (**Spur 2**); MCC *ade*⁻ *G418*^r (**Spur 3**); MCC *ade*⁻ *G418*^r+pSH47 (**Spur 4**); MCC *ade*⁻ *G418*^s+pSH47 (**Spur 5**); MCC *ade*⁻ *G418*^s (**Spur 6**); und der Primer *URA/L0* mit *URA/R2* bei MCC *ade*⁻ (**Spur 7**); MCC *ade*⁻ *G418*^r (**Spur 8**); MCC *ade*⁻ *G418*^r+pSH47 (**Spur 9**); MCC *ade*⁻ *G418*^s+pSH47 (**Spur 10**); MCC *ade*⁻ *G418*^s (**Spur 11**); Marker λ *EcoRI* / *HindIII* (**Spur 1** und **12**)

Da eine Größenbestimmung der PCR-Produkte alleine zum Nachweis einer Disruption nicht ausreicht (WHEELER *et al.*, 1999), sollte eine Sequenzierung den Beweis dafür liefern, dass mit den Primern *URA/L0* und *URA/R2* mit der genomischen DNA des Stammes MCC *ade2* Δ *ura* das gewünschte Amplifikat gebildet worden war. Hierfür wurden die gleichen Primer wie zur Herstellung des Amplifikats verwendet.

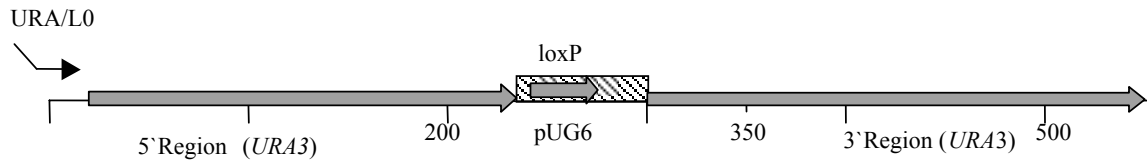


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Sequenzierungs-Ergebnisse des PCR-Produktes $\Delta ura3$ mit dem Primer URA/L0; schraffiert: Homologiebereich zu pUG6

In Abbildung 3-5 sind die Sequenzierungs-Ergebnisse des 5'-Primers dargestellt. In der 5'- und 3'-flankierenden Region von *URA3* wurden keine Abweichungen zu der in der CYGD-Datenbank angegebenen Sequenz (U00092) gefunden. Der *URA3*-Leserahmen war durch die Disruption entfernt worden (Position -153 bis $+765$ zum ATG). Zwischen die flankierenden Sequenzen wurde eine 72 bp lange Sequenz identisch zur Sequenz des pUG6-Plasmids inseriert. Durch diese Sequenzierung wurden die durch die Länge der PCR-Amplifikate gewonnenen Ergebnisse bestätigt.

Anschließend wurde der Selektionsmarker des Stammes MCC *ade2 Δura3* auf seine Stabilität hin untersucht (Abschnitt 2.3.4). Im *ade2*- wie auch im *ura3*-Markergen wurden eine Revertantenraten von $< 4 \times 10^{-9}$ ermittelt, die stabile Selektionsmarker auszeichnen und somit zeigen, dass sich der Stamm zur weiteren Konstruktion eignete.

3.1.4 Disruption von *TRP1* mittels „Marker-Rescue“

Entsprechend der *URA3*-Disruption wurde der *TRP1*-ORF auf Chromosom IV disruptiert. Für die PCR zur Herstellung der Disruptionskassette wurden die Primer *kanlox-TRP1-5'* und *kanlox-TRP1-3'* konstruiert. Als Template diente pUG6. Die Reaktion ergab 1,6 kb große Amplifikate, die in Abbildung 3-6 schematisch (A) und nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Ethidiumbromid-Färbung (B) dargestellt sind. Der Stamm MCC *ade2 Δura3* wurde mit 1 μ g der Disruptionskassette transformiert. Nach Selektion der Transformanten auf YEP+G418 wurden drei Klone isoliert. Das Wachstum dieser Klone wurde auf 5-FAA-Medium untersucht, um einen Funktionsverlust eines Gens der Tryptophansynthese (betroffene Gene können sein: *TRP1*, *TRP3*, *TRP4* und *TRP5* [TOYN *et al.*, 2000]) zu verifizieren. Im Gegensatz zu dem Ausgangsstamm konnten alle drei Klone uneingeschränkt auf 5-FAA-Medium zu Kolonien heranwachsen. Nach der Transformation eines *Ade⁻ Ura⁻ Trp⁻*-Klons (MCC *ade2 Δura3 trp⁻ G418^r*) mit ca. 500 ng der pSH47-Plasmid-DNA wurden die Transformanten auf YNB+Ade+Trp-Platten selektiert. Bei dieser Transformation wurde eine Rate von $1,5 \times 10^4$ Transformanten/ μ g DNA erreicht.

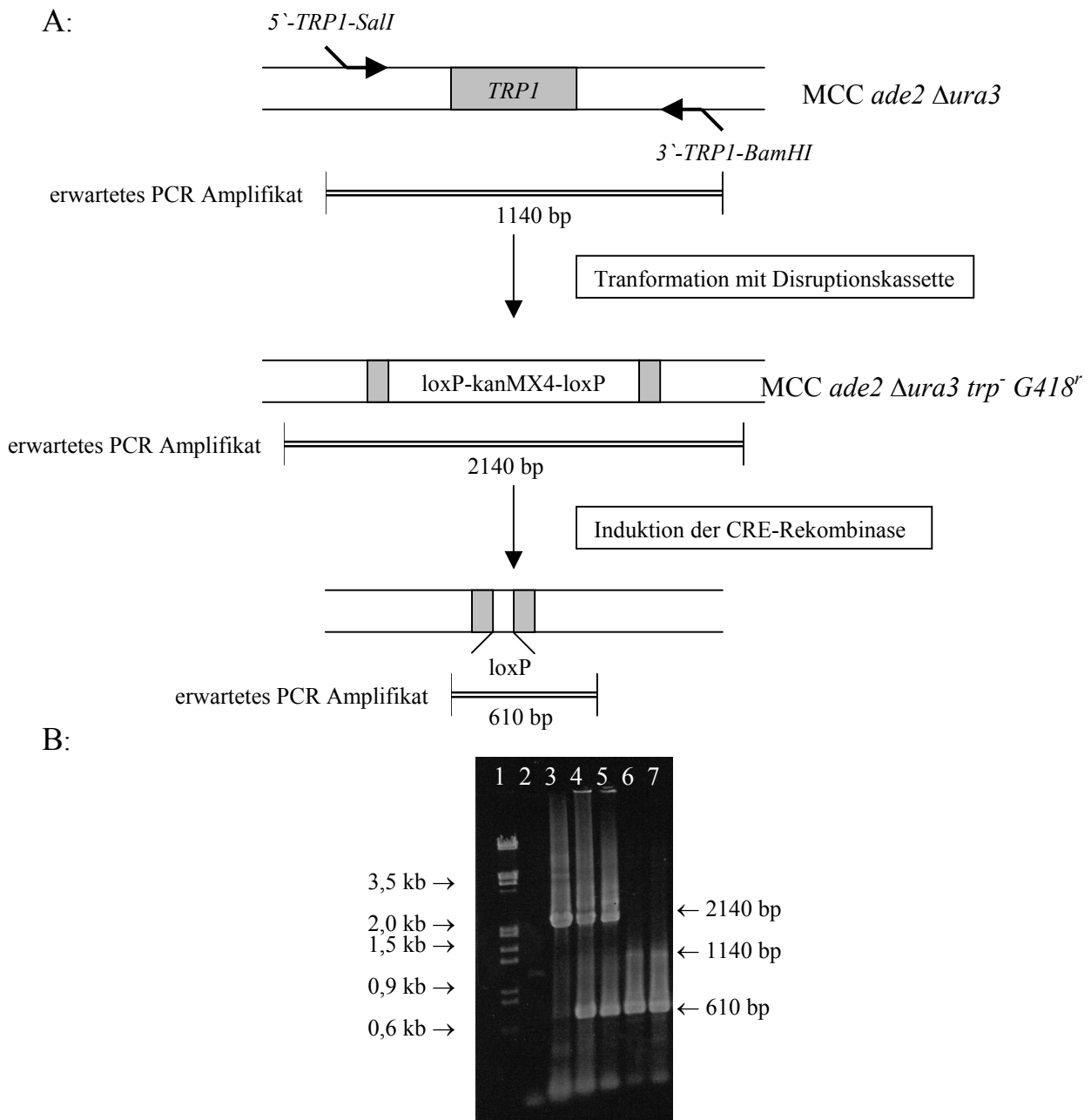


Abbildung 3-7: A: Schematische Darstellung der Disruption von *TRP1* mittels loxP-kanMX4-loxP-Kassette und Lage der zum Nachweis der Disruption verwendeten Primer sowie das erwartete PCR Amplifikat; grau: *TRP1*-Sequenzen; **B:** Gelelektrophorese der PCR mit den Primern 5'-*TRP1-Sall* und 3'-*TRP1-BamHI* mit MCC *ade⁻ Δura3* (**Spur 2**); MCC *ade⁻ Δura3 trp⁻ G418^r* (**Spur 3**); MCC *ade⁻ Δura3 trp⁻ G418^r +pSH47*(Nr.2 und Nr.5) (**Spur 4** und **5**); MCC *ade⁻ Δura3 trp⁻ G418^r +pSH47* (**Spur 6**); MCC *ade⁻ Δura3 trp⁻* (**Spur 7**); **Spur 1** Marker (λ *EcoRI/HindIII*)

Zur Prüfung des PCR-Produkts wurde eine Sequenzierung durchgeführt, bei der die beiden Primer 5'-*TRP1-Sall* und 3'-*TRP1-BamHI* eingesetzt wurden. Die 5'- und 3'-flankierenden Regionen von *TRP1* zeigten keine Abweichungen von der bekannten Sequenz JO1374. Statt der Sequenz des Leser Rahmens (Position -7 bis + 591 zum ATG) wurden drei Abschnitte von loxP-sites wiedergefunden (Abb. 3-8).

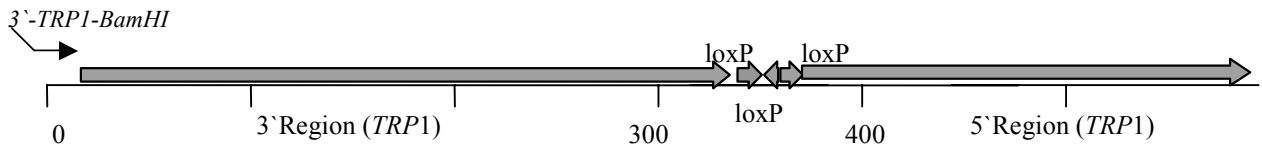


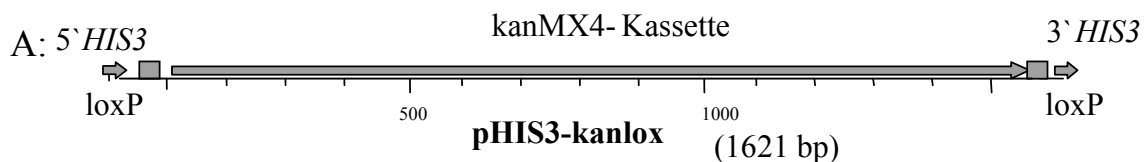
Abbildung 3-8: Schematische Darstellung der Sequenzierungs-Ergebnisse des PCR-Produktes $\Delta trp1$

Die Ergebnisse belegten, dass mit den Nachweis-Primern ($5'$ -*TRP1-Sall* / $3'$ -*TRP1-BamHI*) eine verkürzte Region des *TRP1*-Gens amplifiziert worden war, und die Disruption erwartungsgemäß am gewünschten Locus erfolgt war. Zusätzlich konnte anhand der Ergebnisse festgestellt werden, dass die Rekombination zwischen den loxP-sites nicht basengenau stattgefunden hatte. Der Stamm MCC *ade2 Δura3 Δtrp1* wurde nun zur weiteren Konstruktion der Testerstämme verwendet und wird im Folgenden als HA bezeichnet.

3.2 Konstruktion von H7

3.2.1 Disruption von *HIS3* mittels „Marker-Rescue“

Die Herstellung der Disruptionskassette erfolgte mit den Primern $5'$ -*HIS3-kanlox* und $3'$ -*HIS3-kanlox* am Template pUG6. Bei dieser PCR-Reaktion sollte die in Abbildung 3-9 A dargestellte Disruptionskassette gebildet werden. Die elektrophoretische Größenbestimmung ergab ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 1,6 kb (Abb. 3-9 B).



B:

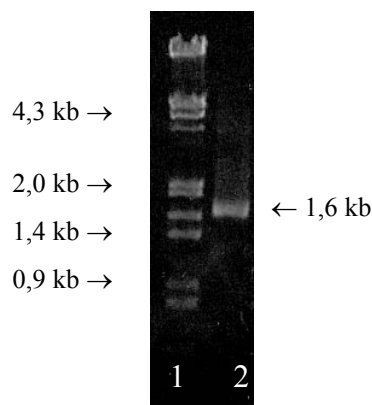


Abbildung 3-9: A: kanlox-Disruptionskassette zur Disruption von *HIS3*; B: Gelelektrophoretische Trennung der PCR-Amplifikate der Primer $5'$ -*HIS3-kanlox* und $3'$ -*HIS3-kanlox* am Template pUG6 (**Spur 2**); Marker λ *EcoRI* / *HindIII* (**Spur 1**)

Der Stamm HA wurde mit den 1,6 kb großen Amplifikaten transformiert. Es wurden vier Transformanten/ μg Kassetten-DNA auf YEP+G418-Platten selektiert. Ein G418-resistenter Klon wurde zur Transformation mit dem Plasmid pSH47 verwendet. Bei dieser Transformation wurden $2 - 7 \times 10^5$ Transformanten/ μl Plasmid-DNA auf YNB+Ade+Ura+Trp-Platten selektiert. Anschließend wurde ein Uracil-prototropher Klon einem zweistündigen Galaktose-Shift unterzogen, bei dem 63 % der getesteten Zellen ihre Resistenz gegen Geneticin verloren.

Überraschenderweise konnte dann auf YNB+5-FOA+Ura-Platten kein Klon isoliert werden, der das Plasmid pSH47 verloren hatte. Deshalb wurden Kolonien auf Vollmedium ausgestrichen und auf YNB+Ade+Ura+Trp- sowie YNB+Ade+Trp-Platten gestempelt. Bei dieser Selektion konnte bei 40 % der ausgestrichenen Zellen eine Uracil-Auxotrophie beobachtet werden, die durch den Verlust des Plasmids pSH47 hervorgerufen worden war.

Der Phänotyp des Stammes HA, der Transformanten (HA *his⁻ G418^r*; HA *his⁻ G418^r + pSH47*; HA *his⁻ G418^s + pSH47*) und des His⁻-Zielstammes (HA $\Delta his3$) wurde mittels Auxanographie bestimmt. Die Transformanten sowie der Zielstamm waren nicht mehr in der Lage auf Histidin-Mangelmedium zu wachsen und entsprachen phänotypisch den Erwartungen.

Anschließend wurde in einer PCR die Disruption des *HIS3*-Locus überprüft. Hierfür wurden die Primer 5' *EcoRI-HIS3* und 3' *XbaI-HIS3* verwendet (Abb. 3-10 A). Hierbei wurde gezeigt, dass mit der DNA des Stammes HA $\Delta his3$ erwartungsgemäß ein Fragment mit einer Größe von ca. 740 bp gebildet (Abb. 3-10 B) wurde, was einen Nachweis für die Disruption lieferte. Daher konnte dieser Stamm zur centromernahen Integration des *TRP1*-Leserahmens weiter verwendet werden.

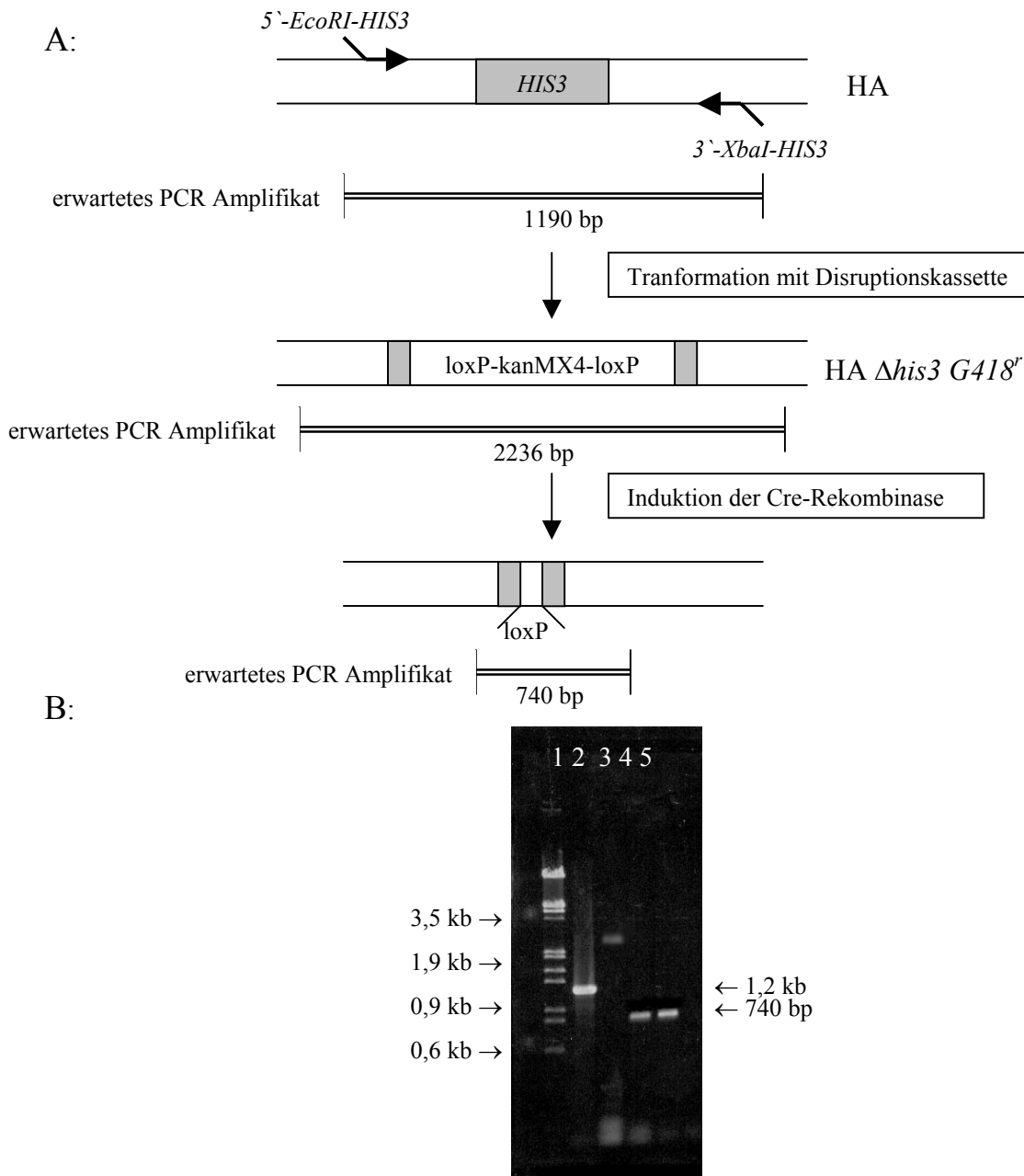


Abbildung 3-10: **A:** Schematische Darstellung der Disruption von *HIS3* mittels loxP-kanMX4-loxP-Kassette und Lage der zum Nachweis der Disruption verwendeten Primer sowie das erwartete PCR Amplifikat; grau: *HIS3*-Sequenzen; **B:** Gelelektrophoretische Trennung der PCR Amplifikate der Primer 5'-*EcoRI*-*HIS3* und 3'-*XbaI*-*HIS3* an HA (**Spur 2**), HA *his⁻ G418^r* (**Spur 3**), HA *his⁻ G418^r* + pSH47 (**Spur 4**); HA Δ *his3* (**Spur 5**); Marker λ *EcoRI* / *HindIII* (**Spur 1**)

3.2.2 Centromernaher Integration von *TRP1*

Zur centromernahen Integration des *TRP1*-Gens auf Chromosom XV wurden drei Strategien (Abb. 3-11) parallel zueinander angewendet.

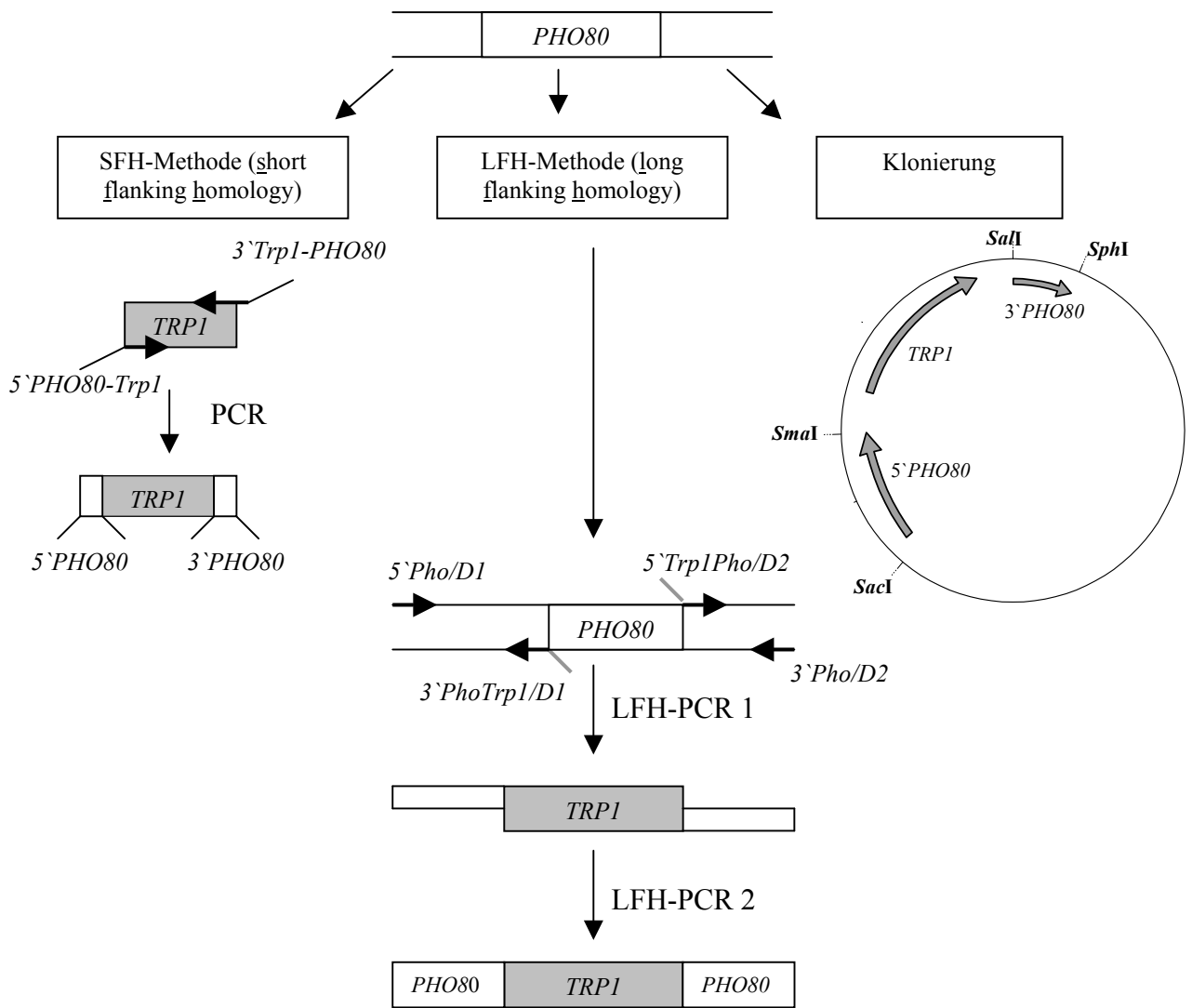


Abbildung 3-11: Übersicht der zur centromernahen Integration von *TRP1* verwendeten Strategien

3.2.2.1 Konstruktion des *TRP1*-Vektors mit Hilfe der SFH-Methode

In einer PCR-Reaktion, bei der die Primer *5'PHO80-Trp1* und *3'Trp1-PHO80* mit der DNA des Stammes MCC *ade2 Δura3* eingesetzt wurden, konnten 1,7 kb große Amplifikate gebildet werden (Abb. 3-12).

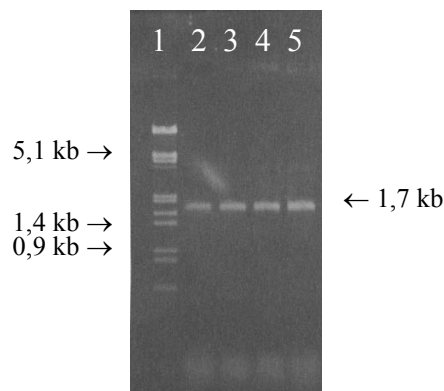


Abbildung 3-12: Agarosegel-Elektrophorese von PCR Produkten aus den Reaktionen mit den Primern *5'PHO80-Trp1* und *3'Trp1-PHO80* und dem Template MCC *ade⁻ura3*; **Spur 1:** Marker (λ *EcoRI/HindIII*); **Spur 2-5:** PCR Amplifikate

Nach der Transformation des Stammes HA $\Delta his3$ mit 1 μg der aufgereinigten Amplifikate konnten 139 Kolonien auf YNB+Ade+Ura+His-Platten selektiert werden. Ein Nachweis der korrekten Integration der Kassette erfolgte mittels PCR. Hierfür wurde DNA aus je 10 Klonen im Pool mit jeweils zwei Primer-Paaren (Abb. 3-13 A) eingesetzt. In Abbildung 3-13 B sind die beiden erwarteten PCR Amplifikate (610 bp und 1140 bp) der Primer 5'-*TRP1-Sall* und 3'-*TRP1-BamHI* bei Verwendung aller 13 DNA-Pools zu erkennen. Zusätzlich wurden in allen Pools größere Amplifikate (>1,2 kb) gebildet. Hierbei könnte es sich um unspezifische Produkte gehandelt haben, die bedingt durch eine niedrige Annealing-Temperatur (50°C) erzeugt wurden.

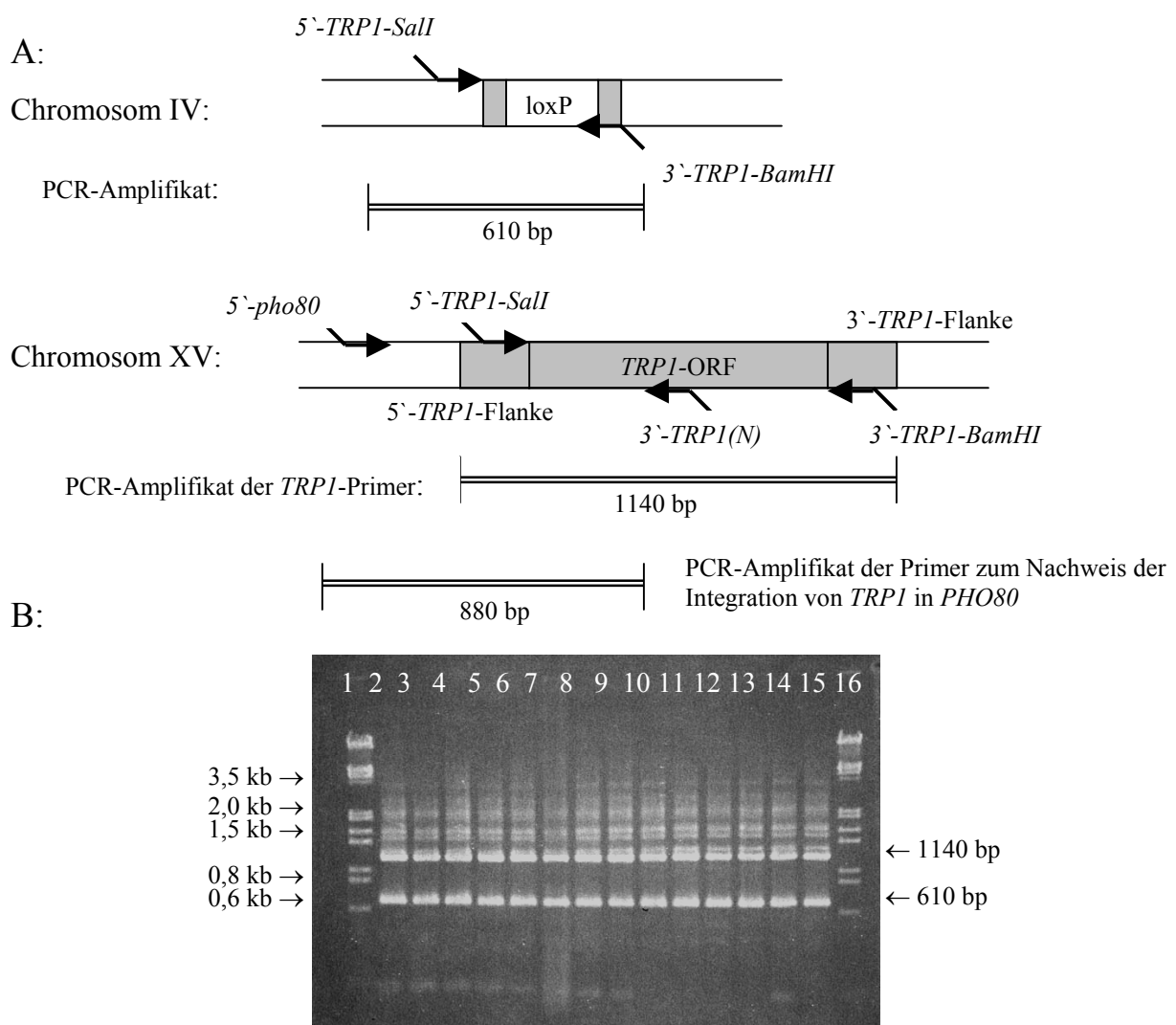


Abbildung 3-13: **A:** Schematische Darstellung der PCR mit den Primern 5'-*TRP1-Sall* und 3'-*TRP1-BamHI* an der DNA der Transformanten des Stammes MCC *ade⁻ Δura3 Δtrp1 Δhis3* mit einer *TRP1*-SFH-Kassette zur Disruption von *PHO80*; **B:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR Produkten der Reaktionen mit den Primern 5'-*TRP1-Sall* und 3'-*TRP1-BamHI* und dem Template aus den 10er Pools; **Spur 1** und **16:** Marker (λ *EcoRI/HindIII*); **Spur 2:** PCR Amplifikate bei Klonen 1-10; **Spur 3:** 11-20; **Spur 4:** 21-30; **Spur 5:** 31-40; **Spur 6:** 41-50; **Spur 7:** 51-60; **Spur 8:** 61-70; **Spur 9:** 71-80; **Spur 10:** 81-90; **Spur 11:** 91-100; **Spur 12:** 101-110; **Spur 13:** 111-120; **Spur 14:** 121-130; **Spur 15:** 131-139

Als zweites Primer-Paar wurden die Primer 5`-*pho80* und 3`-*TRP1(N)* eingesetzt, mit denen ein direkter Nachweis der korrekten Integration des *TRP1*-Leserahmens erbracht werden sollte. Bei der Reaktion wurde in keinem Ansatz ein PCR-Produkt amplifiziert. Somit führte die Transformation bei keinem der Klone zur Disruption des *PHO80*-Gens.

In zwei weiteren Versuchen mit der SFH-Methode wurden jeweils ca. 200 Kolonien auf den Selektionsplatten isoliert. Bei allen Transformanten konnte die Integration des *TRP1*-Leserahmens nachgewiesen werden, die Disruption von *PHO80* jedoch nicht. Vermutlich reichten die kurzen, 50 bp langen homologen Bereiche nicht, um *PHO80* zu disruptieren.

3.2.2.2 Konstruktion des *TRP1*-Vektors mit Hilfe der LFH-Methode

Zur Herstellung des einzelsträngigen langen 5`-Primers mit Homologie zu *PHO80* wurden die beiden Primer 5`*Pho/D1* und 3`*PhoTrp1/D1* verwendet. Mit Hilfe dieser beiden Primer sollten am Template in der DNA des Stammes MCC *ade2* Amplifikate mit einer Länge von 380 bp gebildet werden (330 bp identisch mit dem *PHO80*-Gen und 50 bp identisch mit *TRP1*). Für die Konstruktion des einzelsträngigen 3`-Primers wurden die Primer 5`*PhoTrp1/D2* und 3`*Pho/D2* eingesetzt. Bei dieser Reaktion sollten 293 bp (243 bp *PHO80* + 50 bp *TRP1*) lange Produkte amplifiziert werden. In Abbildung 3-14 ist das Ergebnis dieser PCR nach Gelelektrophorese der Amplifikate dargestellt. Die Amplifikate, die mit den Primern 5`*Pho/D1* und 3`*PhoTrp1/D1* (künftig als *D1* bezeichnet) sowie 5`*PhoTrp1/D2* und 3`*Pho/D2* (*D2*) vervielfältigt wurden, waren kleiner als das kleinste 600 bp große Fragment des λ *EcoRI/HindIII*-Markers. Es wurde angenommen, dass diese die jeweils gewünschte Größe aufwiesen. Bei der Amplifikation von *D2* könnten aber auch zwei Produkte mit jeweils ähnlicher Größe entstanden sein.

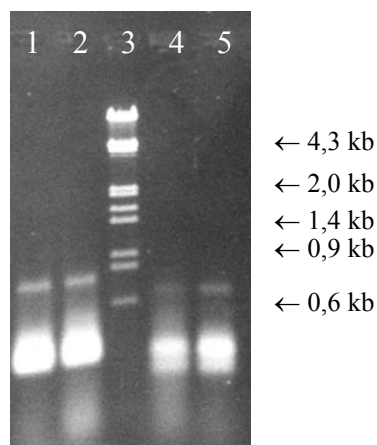


Abbildung 3-14: Gelelektrophoretische Trennung von PCR Produkten aus den Reaktionen mit den Primern 5`*Pho/D1* und 3`*PhoTrp1/D1* am Template MCC *ade2* (**Spur 1+2**); 5`*PhoTrp1/D2* und 3`*Pho/D2* am Template MCC *ade2* (**Spur 4+5**); **Spur 3:** Marker (λ *EcoRI/HindIII*)

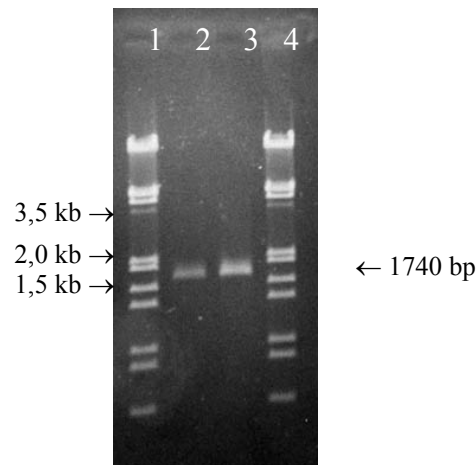


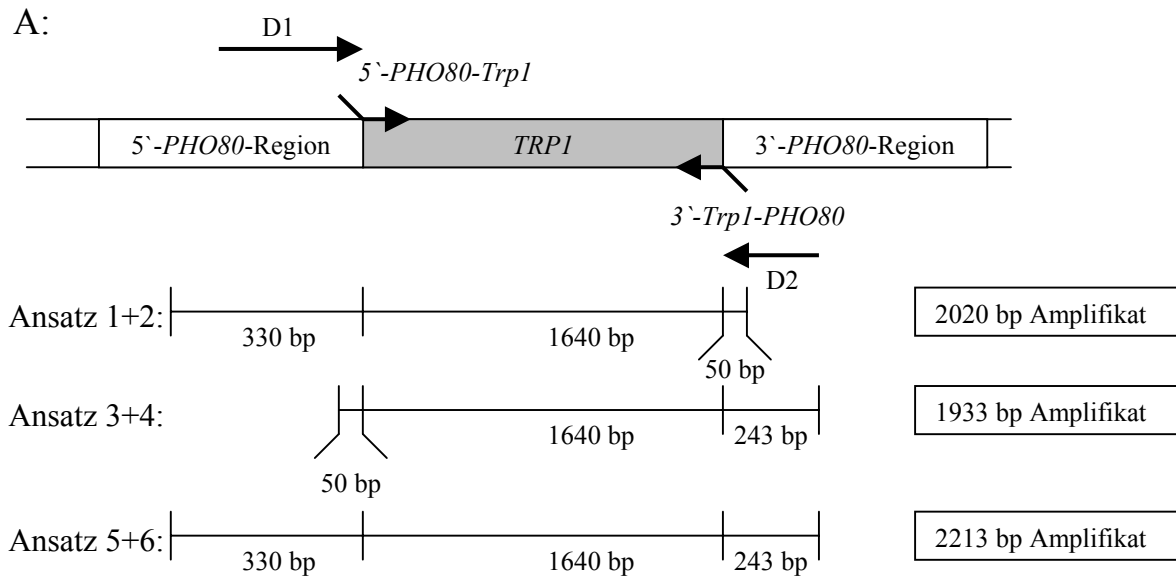
Abbildung 3-15: Gelelektrophoretische Trennung von PCR Produkten aus den Reaktionen mit den Primern $5'$ PHO80-*Trp1* und $3'$ *Trp1*-PHO80 und dem Template MCC *ade2 Δura3* (**Spur 2 + 3**); Marker λ Eco RI/Hind III (**Spur 1 + 4**)

Als Template für die LFH-PCR 2 (Abb. 3-11) wurde neben der genomischen DNA des Stammes MCC *ade2 Δura3* ein 1,7 kb großes *TRP1*-Amplifikat der Primer $5'$ PHO80-*Trp1* und $3'$ *Trp1*-PHO80 mit der DNA des Stammes MCC *ade2 Δura3* verwendet (Abb. 3-15). Weiterhin wurden unterschiedliche Ansätze gewählt, bei denen neben dem Template auch die Primer variierten wurden, um eine möglichst hohe Ausbeute an Produkten zu erzielen. (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Variation von Template und Primern bei LFH-PCR 2

Ansatz	1	2	3	4	5	6
<i>TRP1</i> -PCR Produkt als Template	-	+	-	+	-	+
MCC <i>ade2 Δura3</i> als Template	+	-	+	-	+	-
<i>D1</i>	+	+	-	-	+	+
<i>D2</i>	-	-	+	+	+	+
$5'$ Pho/ <i>D1</i>	-	-	-	-	+	+
$3'$ Pho/ <i>D2</i>	-	-	-	-	+	+
$5'$ PHO80- <i>Trp1</i>			+	+	-	-
$3'$ <i>Trp1</i> -PHO80	+	+	-	-	-	-

Bei den Ansätzen 5 und 6 wurden sowohl die langen Primer *D1* und *D2* als auch die kurzen äußeren Primer $5'$ Pho/*D1* und $3'$ Pho/*D2* eingesetzt. Bei den Ansätzen 1 bis 4 wurden zusätzlich zu den für die Konstruktion der LFH-Kassette beschriebenen Primern die Primer aus der Konstruktion der SFH-Kassette verwendet ($5'$ PHO80-*Trp1* und $3'$ *Trp1*-PHO80). Mit Hilfe dieser Primer sollte es möglich sein, Kassetten herzustellen, die eine lange und eine kurze Flanke zu *PHO80* besitzen würden. Abbildung 3-16 A gibt einen Überblick über die erwarteten PCR-Amplifikate der durchgeführten Ansätze, Abbildung 3-16 B zeigt die Ergebnisse von LFH-PCR 2.



B:

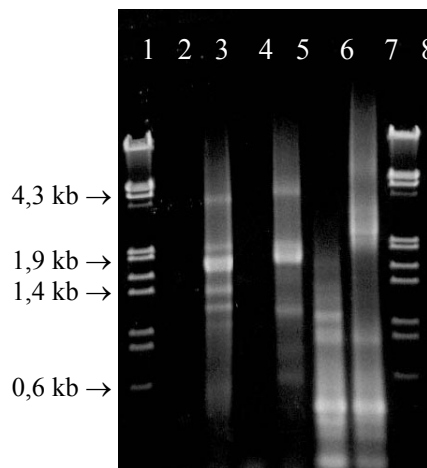


Abbildung 3-16: **A:** Schema zur Herstellung von *TRP1*-Kassetten zur Disruption von *PHO80* mittels PCR mit kurzen und langen Flanken; **B:** Gelelektrophoretische Auftrennung der LFH-PCR 2; **Spur 1+8:** Marker (λ *EcoRI/HindIII*); **Spur 2:** Ansatz 1; **Spur 3:** Ansatz 2; **Spur 4:** Ansatz 3; **Spur 5:** Ansatz 4; **Spur 6:** Ansatz 5; **Spur 7:** Ansatz 6 (siehe Tabelle 3-10)

In den Ansätzen mit genomischer DNA als Template wurden keine der gewünschten Produkte gebildet, bei den Ansätzen mit dem *TRP1*-PCR-Produkt als Template entstanden Amplifikate unterschiedlicher Größe. Beim Ansatz 2 (*D1* und 3'*Trp1-PHO80*; erwartetes Produkt 2020 bp) wurde neben mehreren schwach ausgebildeten Nebenprodukten (ca. 3,5 kb, 2,0 kb, 1,4 kb, 1,2 kb) ein ca. 1,8 kb großes Fragment vervielfältigt. In Ansatz 6 wurden mehr als 2 kb große Amplifikate und kleiner als 800 bp große Produkte gebildet (Ein 2213 bp großes Amplifikat wurde erwartet.). Die PCR-Produkte der Ansätze 2 (*D1-TRP1-50 bp*) und 6 (*D1-TRP1-D2*) wurden direkt für die Transformation in den Stamm HA Δ *his3* eingesetzt. Bei der Transformation mit beiden Ansätzen konnten zwar auf den YNB+Ade+Ura+His-Platten Kolonien selektiert werden, jedoch konnte die homologe Integration der Disruptionskassette mittels PCR (5'-*pho80* und 3'-*TRP1(N)*; Abb. 3-13 A) nicht nachgewiesen werden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die gewählte Methode zur Herstellung der Disruptionskassette nicht geeignet war. Möglicherweise wurden schon bei LFH-PCR 1 die erwarteten Amplifikate nicht gebildet. Da jedoch zwischenzeitlich mit einer mittels Klonierung gewonnenen Disruptionskassette die gewünschte Integration von *TRP1::pho80* erfolgreich abgeschlossen werden konnte, wurden die Fehlerquellen der LFH-Methode nicht weiter analysiert.

3.2.2.3 Konstruktion des *TRP1*-Vektors durch Klonierung

Um eine Kassette mit langen *PHO80*-Flanken zu klonieren, mussten drei Konstruktionsschritte durchgeführt werden, bei denen drei Inserts nacheinander in den Vektor pUC19 kloniert wurden. Alle Inserts wurden mittels PCR mit Hilfe genomischer DNA des Stammes MCC *ade2 Δura3* amplifiziert (5'-*PHO80* mit den Primern 5'*pho1/SacI* und 3'*pho1/SmaI*; *TRP1* mit 5'*Trp1/SmaI* und 3'*Trp1/SalI*; 3'-*PHO80* mit 5'*pho2/SalI* und 3'*pho2/SphI*). Im ersten Schritt wurde die 5'-*PHO80*-Region mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *SmaI* in den Vektor kloniert. Im zweiten Schritt wurde das *TRP1*-Gen in den Vektor pPHO80/1 kloniert. Bei dieser Klonierung wurden die Restriktionsendonucleasen *SmaI* und *SalI* verwendet. Der dritte und letzte Schritt bestand in der Klonierung der 3'-*PHO80*-Region in den pPHO1-*TRP1* Vektor. Für diesen Schritt wurden die Restriktionsendonucleasen *SalI* und *SphI* benutzt, die sich dafür besonders gut eigneten. Abbildung 3-17 zeigt eine Karte des pPHO1-*TRP1*-*PHO2* Plasmids, welcher durch Restriktion und PCR kontrolliert wurde (Daten nicht gezeigt).

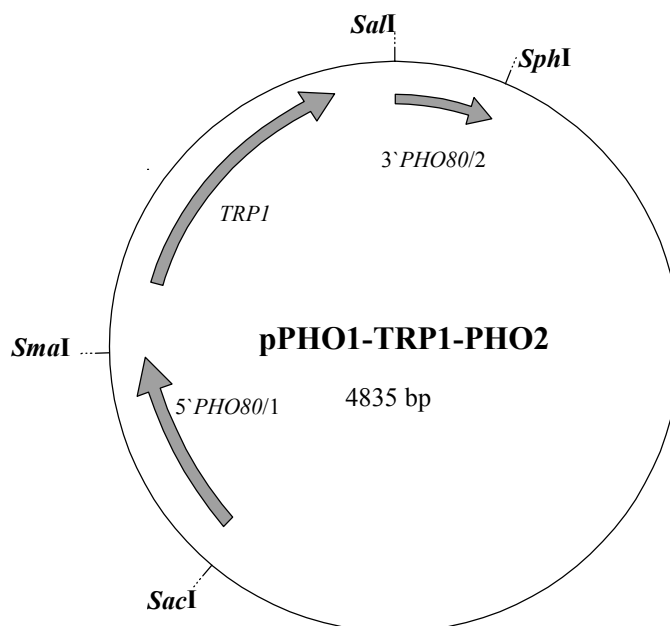
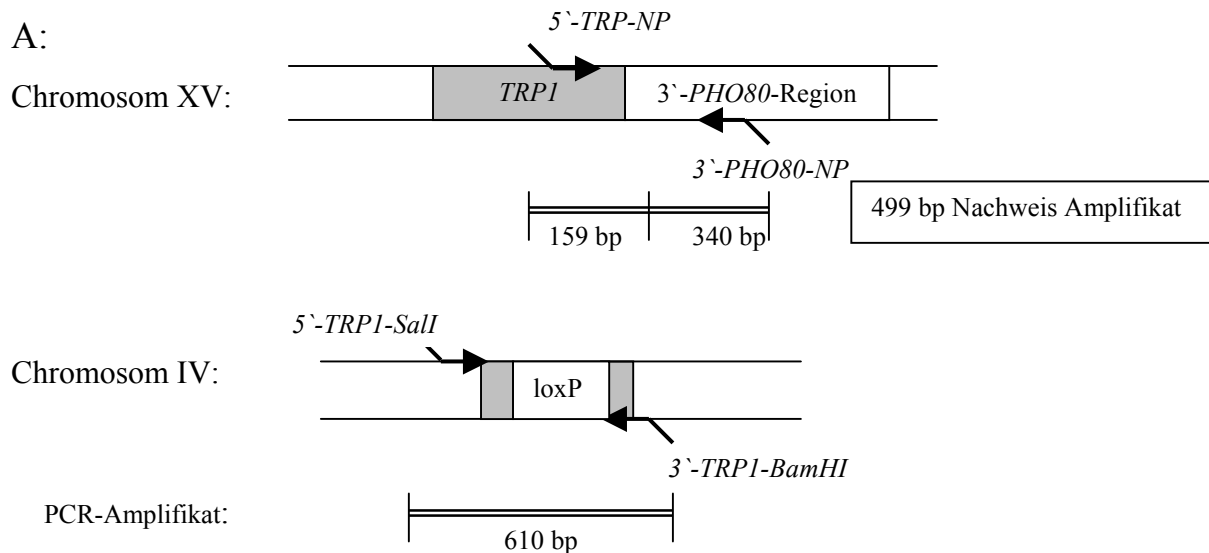


Abbildung 3-17: Karte des Plasmids pPHO1-*TRP1*-*PHO2*

Die Disruptionskassette wurde gewonnen, indem das Plasmid mit den Enzymen *SphI* und *SacI* restringiert wurde. Nach der Transformation dieser Kassette in den Stamm HA $\Delta his3$ wurden 41 Trp^+ Klone/ μg Kassetten-DNA auf YNB+Ade+Ura+His-Platten selektiert.

Bei acht Klonen wurde die Integration der Disruptionskassette mittels PCR mit zwei verschiedenen Primer-Paaren ($5'$ -*TRP1-SalI* und $3'$ -*TRP1-BamHI* / $5'$ -*TRP-NP* und $3'$ -*PHO-NP*) untersucht (Abb. 3-18 A: Lage der Primer und die erwarteten Amplifikate; Abb. 3-18 B: Ergebnisse der PCR). Bei Klon H7 wurden die erwarteten PCR Amplifikate mit Hilfe der Primer zur Amplifikation des *TRP1*-Gens in einer Größe von 610 bp ($\Delta trp1$) und mit Hilfe der Nachweisprimer $5'$ -*TRP-NP* und $3'$ -*PHO-NP* in einer Größe von ca. 500 bp gebildet.



B:

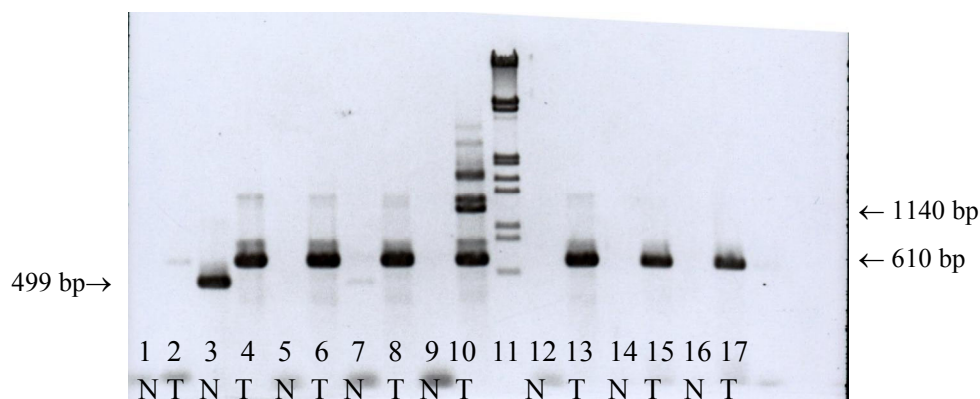


Abbildung 3-18: A: Lage der zum Nachweis verwendeten Primer und Größe des erwarteten Amplifikats; B: Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR Produkte mit den Primern $5'$ -*TRP1-SalI* und $3'$ -*TRP1-BamHI* (T) und $5'$ -*TRP-NP* und $3'$ -*PHO-NP* (N) bei den Klonen H8 (**Spur 1: N; Spur 2: T**); Klon H7 (**Spur 3: N; Spur 4: T**); H6 (**Spur 5: N; Spur 6: T**); H5 (**Spur 7: N; Spur 8: T**); H4 (**Spur 9: N; Spur 10: T**); H3 (**Spur 12: N; Spur 13: T**); H2 (**Spur 14: N; Spur 15: T**); H1 (**Spur 16: N; Spur 17: T**); Marker λ *EcoRI/HindIII* (**Spur 11**)

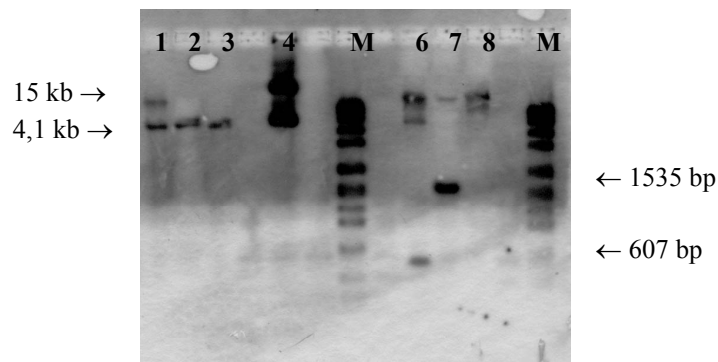


Abbildung 3-19: Southern-Blot-Hybridisierung mit *TRP1*-Promotor-Sonde der restringierten genomischen DNA der Stämme H7 *NcoI* (**Spur 1**); MCC109 *NcoI* (**Spur 2**); HA $\Delta his3$ *NcoI* (**Spur 3**); pPHO80/1-*TRP1*-PHO80/2 (**Spur 4**); H7 *XbaI* (**Spur 5**); MCC109 *XbaI* (**Spur 6**); HA $\Delta his3$ *XbaI* (**Spur 7**); **M**: DIG-labelled Marker VII (Roche)

Darüber hinaus wurde mit einer *TRP1*-Promotor-spezifischen Sonde eine Southern-Blot-Hybridisierung der genomischen DNA von Klon H7 durchgeführt. Bei der Konstruktion der Sonde gelang es, durch Einsatz der Primer *5-TRPIP-S* und *3-TRPIP-S* unter Verwendung genomischer DNA des Stammes MCC *ade2* $\Delta ura3$ DIG-markierte Amplifikate des Promotor-Bereiches mit einer Länge von 194 bp herzustellen. Anschließend hybridisierte diese Sonde an die *XbaI* und *NcoI* restringierte genomische DNA der verwendeten Stämme (Abb. 3-19). Bei dem Stamm H7 würde man bei einer korrekten Integration des *TRP1*-Gens in *PHO80* nach *NcoI*-Restriktion zwei Fragmente erwarten, an die die Sonde binden kann. Diese Sonde sollte an ein 4073 bp großes $\Delta trp1$ -Fragment (laut JO1374) von Chromosom IV sowie an ein Fragment von Chromosom XV mit einer Größe von 14383 bp binden. Beide Signale sind in Spur 1 gut zu erkennen. Bei der Restriktion der DNA von H7 mit *XbaI* würde man ebenfalls zwei Signale erwarten. Hier sollte die Sonde zusätzlich zu dem $\Delta trp1$ -Fragment von Chromosom IV auch an ein 607 bp großes Fragment hybridisieren. Auch diese beiden Signale konnten detektiert werden (Spur 7). So zeigen sowohl die Ergebnisse der Nachweis-PCR als auch die der Southern-Blot-Hybridisierung, dass die Integration des *TRP1*-Leserahmens in die *PHO80*-Region erfolgreich war.

Eine Überprüfung der Stabilität der Tryptophan-Prototrophie zeigte, dass der Stamm H7 auch nach längerer Inkubation (bis zu 120 Stunden) unter nichtselektiven Bedingungen seine Tryptophan-Prototrophie nicht verlor. Unter insgesamt 559 getesteten Zellen wurden keine Trp^- -Kolonien gefunden.

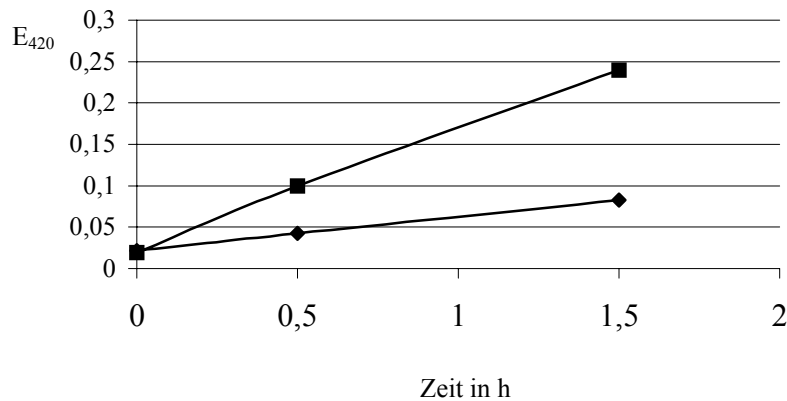


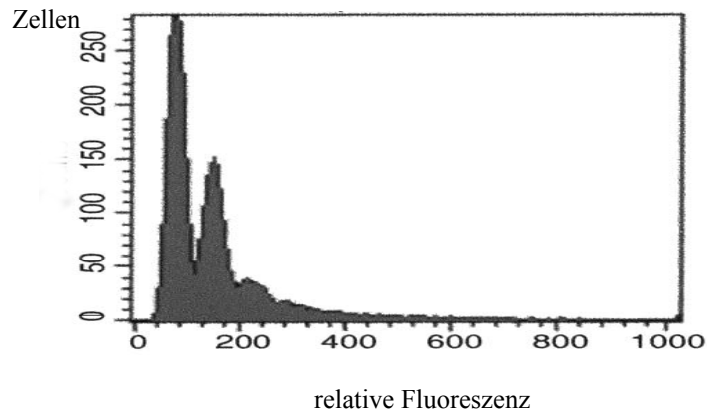
Abbildung 3-20: Phosphatase-Aktivität der Stämme HA $\Delta his3$ (Rauten) und H7 (Quadrate) von je 3×10^6 Zellen pro Messung

Zur weiteren Charakterisierung von H7 wurden die Phosphatase-Aktivitäten gemessen, da das Genprodukt Pho80p ein Repressor der sauren Phosphatase Pho85p ist. Eine erfolgreiche Disruption des Leserahmens sollte daher lebensfähige Zellen liefern, bei denen die saure Phosphatase dereprimiert arbeiten kann (MADDEN *et al.*, 1988). In Abbildung 3-20 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Bei dem Stamm H7 wurde eine deutlich höhere Phosphatase-Aktivität gemessen als bei dem Ausgangsstamm. Somit war bei H7 der Repressor der sauren Phosphatase Pho80p wahrscheinlich nicht mehr aktiv und die Reaktion lief dereprimiert ab.

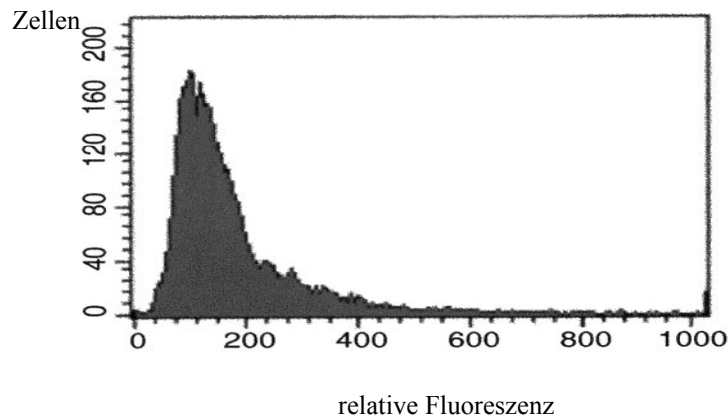
Da für die Konstruktion des Stammes DAN ein haploider Stamm benötigt wurde, erfolgte die Bestimmung des DNA-Gehalt pro Zelle von H7 mit Hilfe der Diphenylamin-Methode. Bei dem Referenzstamm 41 α , dem Ausgangsstamm MCC109, HA $\Delta his3$ und dem Stamm H7 wurden DNA-Gehalte zwischen 16 und 25 fg pro Zelle gemessen, was einem haploiden DNA-Gehalt entspricht, wenn man die durch die mtDNA verursachte Schwankung einbezieht (CARR und SHEARER, 1998).

Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde nach Anfärbung der DNA mit Propidiumjodid eine zytometrische Analyse durchgeführt. In Abbildung 3-21 sind die FACS Histogramme der Messungen zusammengestellt. Diese zeigen, dass bei allen hier untersuchten Stämmen die G1-Peaks ihr Maximum etwa im gleichen Bereich hatten.

A:



B:



C:

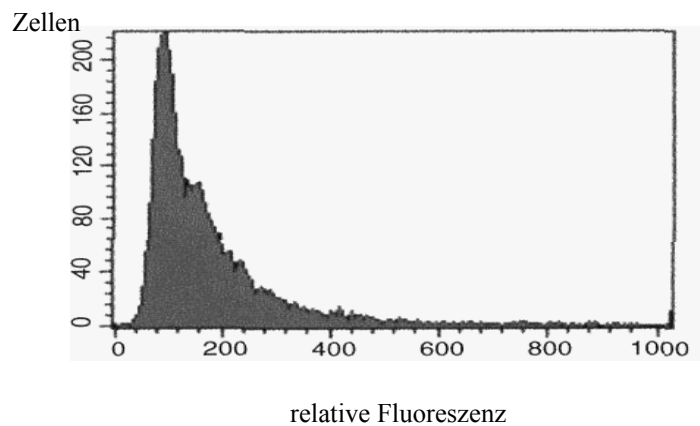


Abbildung 3-21: FACS Histogramme der Stämme 41 α (A), MCC109 (B) und H7 (C)

3.3 Konstruktion von HAN

3.3.1 Reversion von *ade2-101*

Um die *ade2-101* Mutation im Stamm HA (*ade2-101 Δura3 Δtrp1*) zu heilen, wurde dieser Stamm mit einer Wildtyp-Kopie des *ADE2*-Gens transformiert. Diese Kopie wurde mittels PCR mit Hilfe der Primer *AdeL-Eco* und *AdeR-Kpn* mit der genomischen DNA des Stammes 202a amplifiziert. Bei dieser Reaktion wurde erwartungsgemäß ein 1,5 kb großer DNA-Abschnitt vervielfältigt (Abb. 3-22).

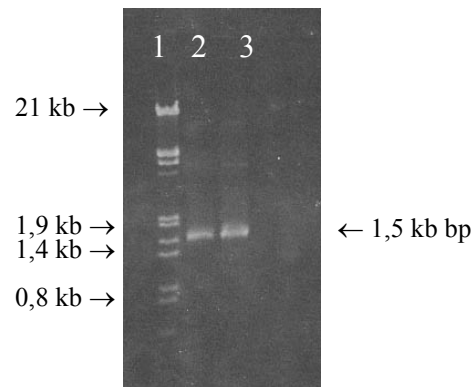


Abbildung 3-22: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR Amplifikaten der Primer *AdeL-Eco* und *AdeR-Kpn* beim Stamm 202a (**Spur 2 + 3**); **Spur 1:** Marker (λ *EcoRI/HindIII*)

Nach Transformation mit ca. 500 ng der Amplifikat-DNA wurden auf YNB+Ura+Trp-Platten 163 Kolonien isoliert. Anschließend wurde bei einem Klon die Stabilität der Reversion getestet. Bei 987 untersuchten Kolonien wurden keine Adenin-Auxotrophen gefunden.

3.3.2 Integration einer *URA3/kanMX4*-Kassette auf Chromosom XV

URA3 sowie das Kanamycin-Resistenz-Gen sollten in den Stamm HA $\Delta ura3 \Delta trp1$ distal zum *ADE2*-ORF integriert werden. Eine *URA3/kanMX4*-Integrationskassette, die lange homologe Flanken zur Zielregion besaß, wurde mittels Klonierung hergestellt. Für diese Klonierungsschritte konnte das in Abschnitt 3.1.3.2 beschriebene pURA-Plasmid verwendet werden. Zunächst wurde die *kanMX4*-Kassette aus dem Ursprungsvektor pFA6a-*kanMX4* in pUC19 (verwendete Restriktionsenzyme waren *Bam*HI und *Hinc*II) und anschließend in pURA (*Bam*HI und *Sph*I) kloniert. Die direkte Klonierung von *kanMX4* in pURA war nicht möglich, da *Hinc*II - neben *Bam*HI das einzige geeignete Enzym - in der *URA3*-Region von pURA schneidet. Zur Veranschaulichung dieser Klonierung dient Abbildung 3-23 (Plasmid pURA-*kanMX4*).

Um eine Integration der *URA3/kanMX4*-Kassette in Chromosom XV zu begünstigen, wurde dann die 3`-*URA3*-Region im Vektor pURA-*kanMX4* von 786 bp auf 157 bp verkürzt. Hierfür wurde das Plasmid mit Hilfe von *Sma*I restringiert. Nach einer elektrophoretischen Separation wurde der Vektoranteil ohne das 629 bp große 3`-*URA3*-Flanken-Fragment religiert. Als Nächstes sollten lange 5`- und 3`-*ADE2*-Flanken in den pURA-*kanMX4* Vektor kloniert werden. Für die Klonierung des 5`-*ADE2*-Fragments wurde das Fragment zunächst mit den Primern *5-Ade2/1-Kpn* und *3-Ade2/1-Kpn* mit Hilfe der genomischen DNA des Stammes 202a amplifiziert und anschließend über *Kpn*I einkloniert.

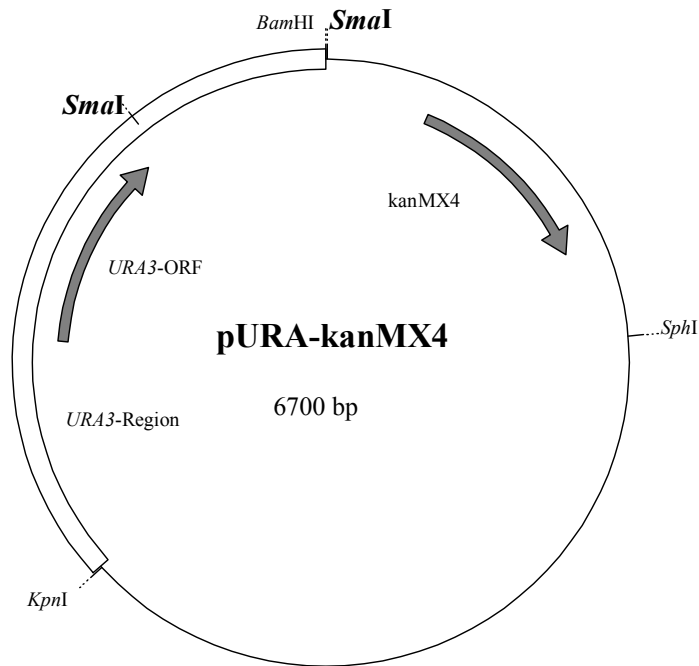


Abbildung 3-23: Schematische Darstellung des Plasmids pURA-kanMX4; fett: Schnittstellen zur Verkürzung des Plasmids

Das 3'-*ADE2*-Fragment wurde über *SphI* kloniert. Zur Amplifikation des Fragments mit der genomischen DNA des Stammes 202a wurden die Primer *5-Ade2/2-Sph* und *3-Ade2/2-Sph* verwendet. Da beide *ADE2*-Fragmente über nur eine Restriktionsschnittstelle kloniert wurden konnten, musste die Orientierung der Fragmente mittels PCR geklärt werden. Drei Plasmidklone des 5'-*ADE2*-Abschnitts (A1: Ansatz 1) dienten als Template in einer PCR mit den Primern *5-Ade2/1-Kpn* und *URA/L-raus* (Primer-Paar 1) sowie *3-Ade2/1-Kpn* und *URA/L-raus* (Primer-Paar 2) (Abb. 3-24 A). Bei vier Plasmidklonen der zweiten Klonierung (A2: Ansatz 2) wurden die Primer *5-Ade2/2-Sph* mit *kan1* (Primer-Paar 3) und *3-Ade2/2-Sph* mit *kan1* (Primer-Paar 4) verwendet (Abb. 3-24 B). Die Amplifikate der Reaktionen wurden im Agarosegel getrennt und sind in Abbildung 3-24 C dargestellt. Bei den Plasmiden der Klone A1/11 und A2/17 zeigte die PCR Produkte die gewünschte 5'-3'-Orientierung. Bei Klon A1/11 entstand mit dem Primer-Paar 1 ein 886 bp großes Amplifikat. Mit dem Primer-Paar 2 wurde kein Produkt gebildet. Am Template der Plasmide des Klons A2/17 wurde mit dem Primer-Paar 4 ein 1985 bp großes Amplifikat gebildet. Das Primer-Paar 3 hingegen lieferte keine Produkte. Die Klone A1/11 und A2/17 wurden für die weitere Konstruktion des Stammes DAN verwendet.

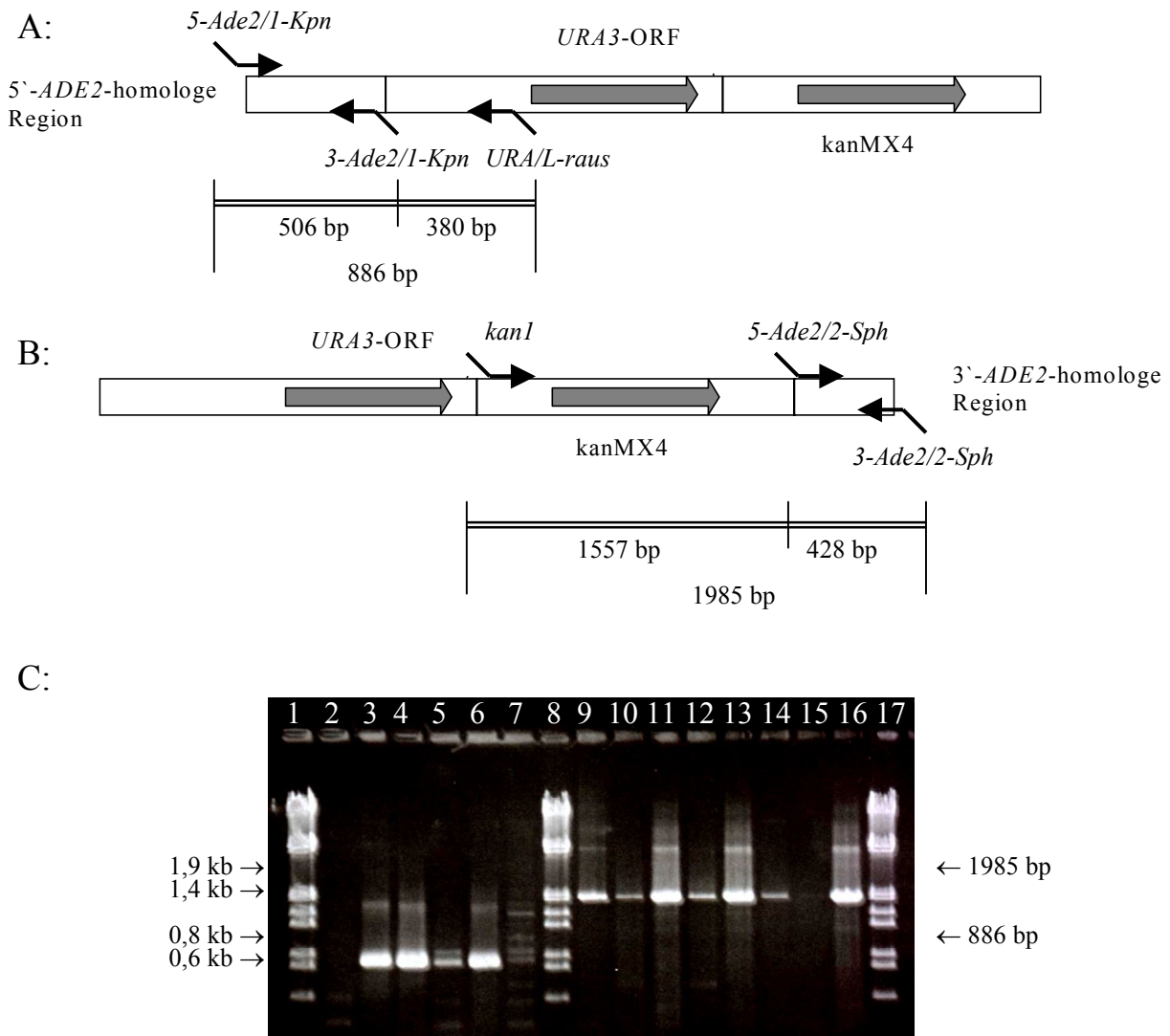


Abbildung 3-24: Schematische Darstellung der PCR-Nachweisreaktionen zur Bestimmung der Orientierung der Klonierung der 5'-*ADE2*-homologen Region in pURA-kanMX4 (**A**) und der 3'-*ADE2*-homologen Region in pURA-kanMX4 (**B**) sowie die Größe der erwarteten Amplifikate; **C:** Gelelektrophorese von PCR Produkten aus den Reaktionen: A1/2 mit 5-*Ade2/1-Kpn* und *URA/L-raus* (**Spur 2**); A1/2 mit 3-*Ade2/1-Kpn* und *URA/L-raus* (**Spur 3**); A1/3 mit 5-*Ade2/1-Kpn* und *URA/L-raus* (**Spur 4**); A1/3 mit 3-*Ade2/1-Kpn* und *URA/L-raus* (**Spur 5**); A1/11 mit 5-*Ade2/1-Kpn* und *URA/L-raus* (**Spur 6**); A1/11 mit 3-*Ade2/1-Kpn* und *URA/L-raus* (**Spur 7**); A2/1 mit 5-*Ade2/2-Sph* und *kan1* (**Spur 9**); A2/1 mit 3-*Ade2/2-Sph* und *kan1* (**Spur 10**); A2/5 mit 5-*Ade2/2-Sph* und *kan1* (**Spur 11**); A2/5 mit 3-*Ade2/2-Sph* und *kan1* (**Spur 12**); A2/10 mit 5-*Ade2/2-Sph* und *kan1* (**Spur 13**); A2/10 mit 3-*Ade2/2-Sph* und *kan1* (**Spur 14**); A2/17 mit 5-*Ade2/2-Sph* und *kan1* (**Spur 15**); A2/17 mit 3-*Ade2/2-Sph* und *kan1* (**Spur 16**); Marker λ *EcoRI/HindIII* (**Spur 1, 8 und 17**)

Für die Herstellung der *URA3*/kanMX4-Kassette wurden dann mittels PCR zwei unterschiedliche DNA-Abschnitte amplifiziert und als Vektoren verwendet. In der ersten Reaktion wurde eine 4,2 kb große Kassette mit langer 5'- und langer 3'-*ADE2*-Flanke hergestellt (verwendete Primer: 5-*Ade2/1-Kpn* und 3-*Ade2/2-Sph*; Abb. 3-25 A). Als Template dienten die beiden Plasmide pADE2/1-*URA3*-kanMX4 (A1/11) und pURA3-kanMX4-*ADE2/2* (A2/17).

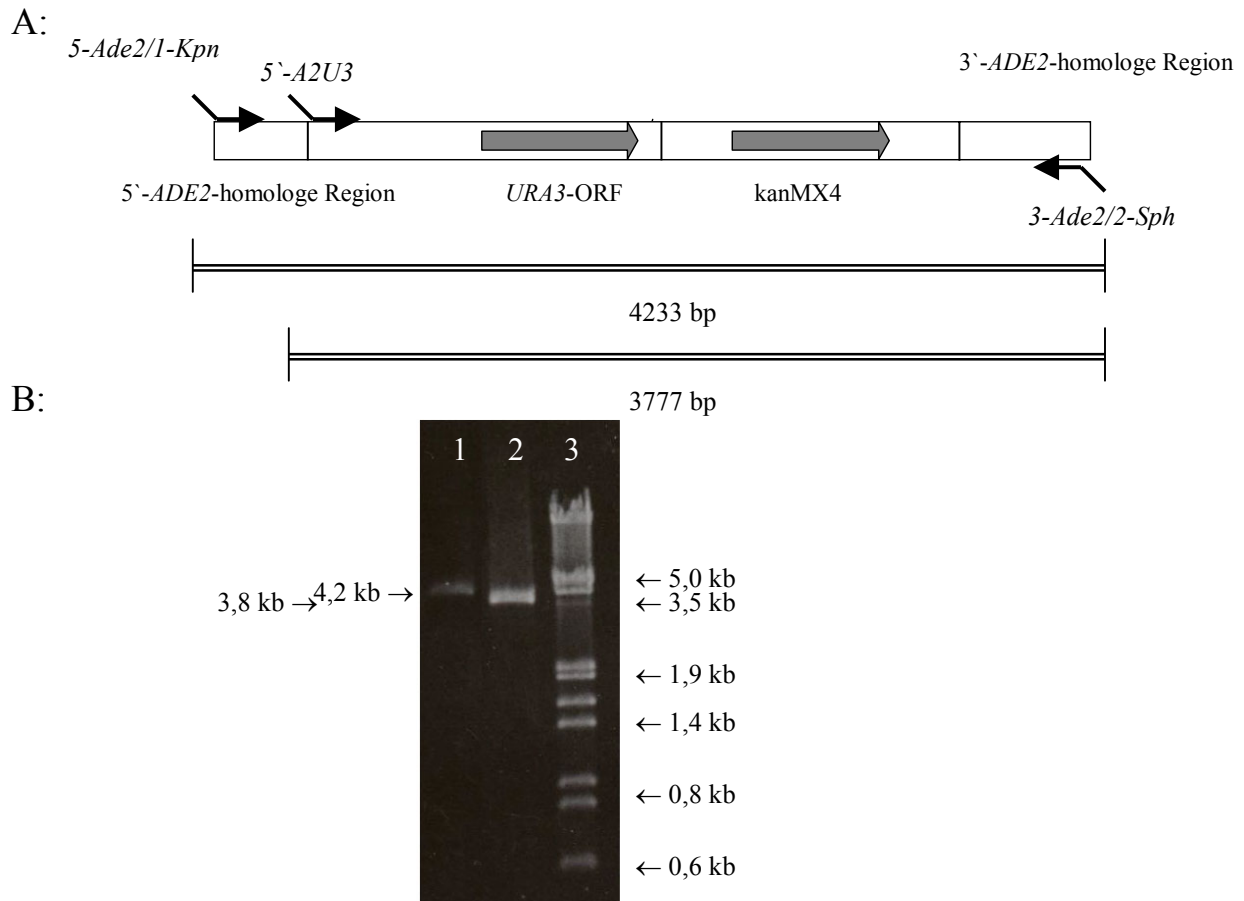


Abbildung 3-25: A: Schematische Darstellung der Kasette mit langen homologen Flanken, die zur *ADE2*-Zielregion homolog sind; Kasette dient zur Integration von *URA3* und *kanMX4* auf Chromosom XV; B: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR Produkten der Primer *5-Ade2/1-Kpn* und *3-Ade2/2-Sph* am Template der Plasmide pADE2/1-*URA3-kanMX4* und p*URA3-kanMX4-ADE2/2* (**Spur 1**); der Primer *5'-A2U3* und *3-Ade2/2-Sph* am Template p*URA3-kanMX4-ADE2/2* (**Spur 2**); Marker λ *EcoRI/HindIII* (**Spur 3**)

In der zweiten Reaktion wurde eine 3,8 kb große Integrationskasette mit einer kurzen (47 bp) 5'-Flanke und einer langen 3'-Flanke (*5'-A2U3* und *3-Ade2/2-SphI*; Abb. 3-25 A) am Template des p*URA3-kanMX4-ADE2/2* (A2/17) amplifiziert (Abb. 3-25 B). Nach Transformationen des Stammes HA Δ *ura3* Δ *trp1* mit den aufgereinigten PCR-Produkten wurden bei Verwendung der Kasette mit zwei langen Flanken (*ADE2/1-URA3/kanMX4-ADE2/2*) 1 Kolonie/ μ g DNA und bei Verwendung der Kasette mit einer kurzen und einer langen Flanke (*47bpADE2-URA3/kanMX4-ADE2/2*) 14 Kolonien/ μ g DNA auf YNB+Trp+G418-Platten selektiert. Durch wiederholtes Überimpfen der Kolonien auf Selektionsmedium konnten abortive von integrativen Transformanten getrennt werden. Der Klon mit der *ADE2/1-URA3/kanMX4-ADE2/2*-Kasette war nicht mehr imstande, anzuwachsen. Zehn Klone aus der Transformation mit *47bpADE2-URA3/kanMX4-ADE2/2*-Kasette bildeten gut wachsende Kolonien. Bei diesen Klonen mit der Bezeichnung AN1 bis AN10 wurde der Integrationsort der Kasette untersucht (Abb. 3-26 A, Seite 66).

Nach der PCR mit den Primern *ADE/R-raus* und *URA3/L-raus* wurde bei vier von insgesamt zehn Transformanten (AN3, AN6, AN7 und AN9) das gewünschte 1147 bp große Amplifikat gefunden. Bei diesen vier Klonen war die *URA3/kanMX4*-Kassette demnach distal zu *ADE2* im Chromosom XV integriert. Die PCR mit Δ *ura3*-spezifischen Primern (*Ura/L0* und *Ura/R2*) lieferte bei AN1-9 die erwarteten 1577 bp großen Amplifikate. Mit der genomischen DNA von Klon AN10 wurde dagegen ein Amplifikat gebildet, welches die Größe des Wildtyp *URA3*-Gens besaß. Hier wurde offensichtlich Δ *ura3* durch das *URA3*-Gen der Integrationskassette ersetzt.

In den darauf folgenden PCR-Reaktionen wurden weitere Primer-Paare (Abb. 3-26 A; Seite 66) verwendet, um die Vollständigkeit der Kassette und die genaue Position auf Chromosom XV zu bestätigen. Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen der Primer-Paare sind in Abbildung 3-26 B und C (Seite 67) dargestellt. Bei dem Stamm AN9 wurden mit allen Primerpaaren Fragmente in der erwarteten Größe amplifiziert. Dieser Stamm besitzt distal zum *ADE2*-Gens die vollständige *URA3/kanMX4*-Kassette.

Zur Prüfung der distalen und proximalen Umgebungssequenz der *URA3-kanMX4*-Kassette wurden zwei weitere PCR Reaktionen (Primer-Paare: 5`-*I28c-NP* mit *URA/L-raus* und 3`-*I29c-NP* mit *kan1* Abb. 3-26 A, Seite 66) mit der DNA des Stammes AN9 durchgeführt. Die erwarteten 635 bp bzw. 2275 bp großen Amplifikate wurden im Agarosegel aufgetrennt und sind in Abbildung 3-27 dargestellt.

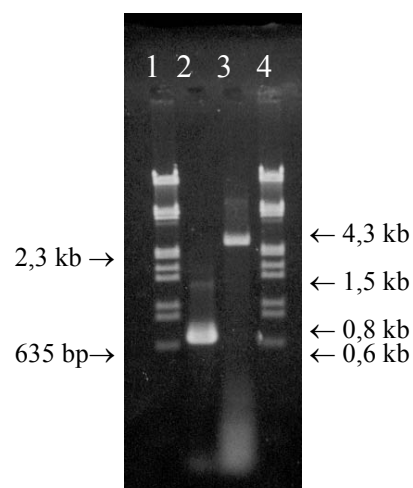
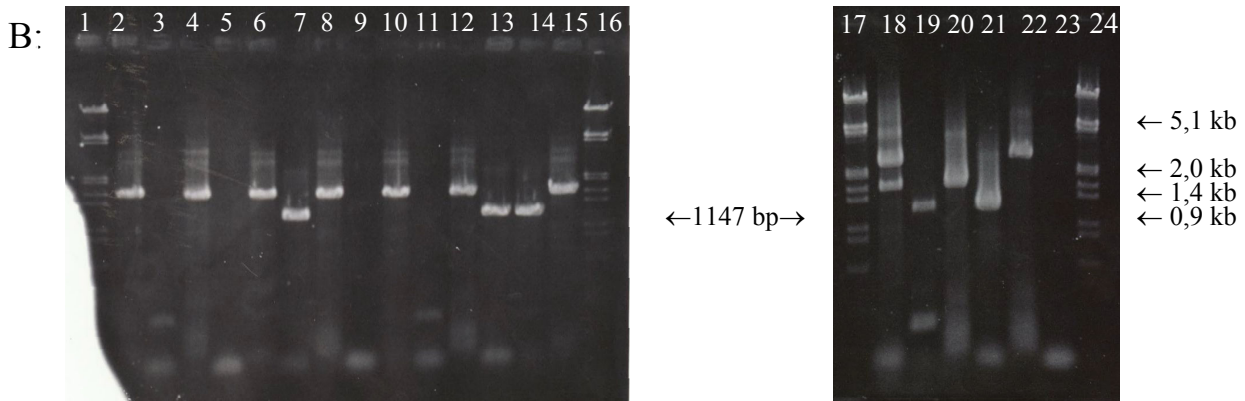
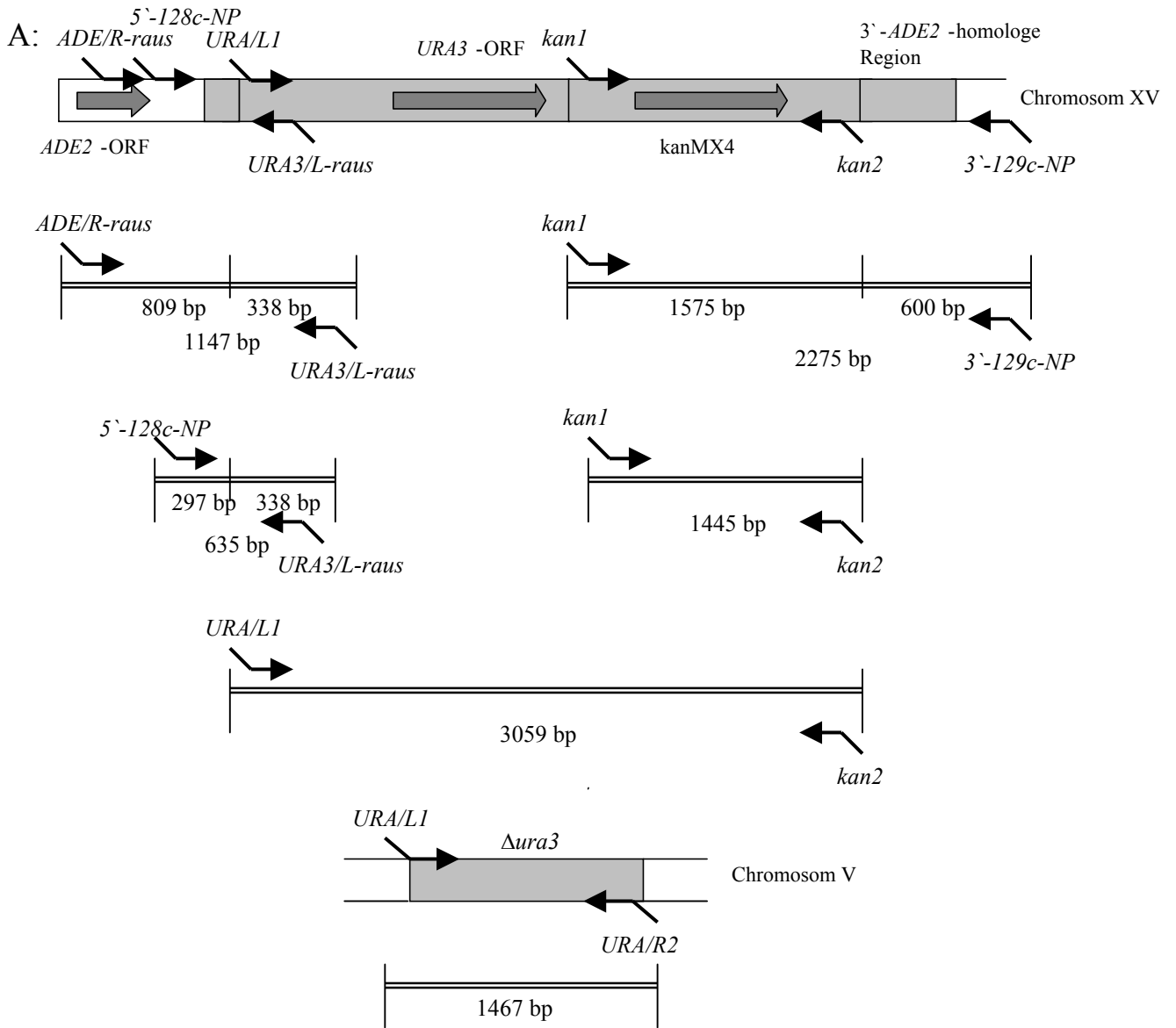


Abbildung 3-27: Gelelektrophoretische Trennung der PCR Amplifikate aus den Reaktionen von AN9 mit 5`-*I28c-NP* und *URA3/L-raus* (**Spur 2**); AN9 mit *kan1* und 3`-*I29c-NP* (**Spur 3**); Marker λ *EcoRI/HindIII* (**Spur 1+ 4**)



C:

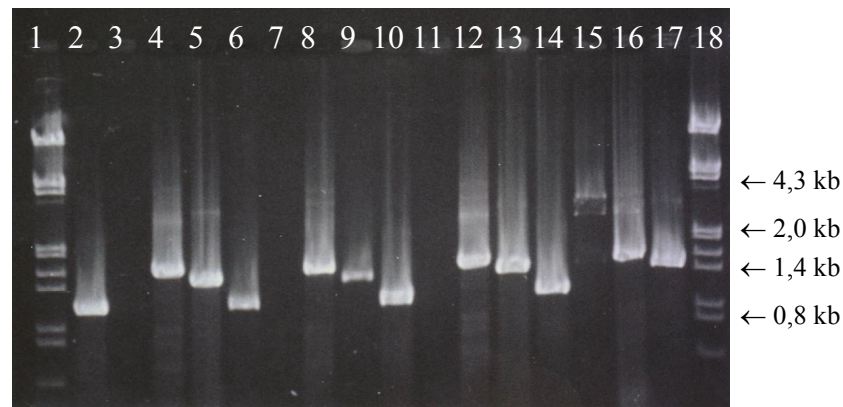


Abbildung 3-26: A: Schematische Darstellung der Lage der zum Nachweis der Integration von *URA2* und *kanMX4* verwendeten Primer und der Länge der erwarteten Amplifikate; schraffiert: Integrationskassette; **B:** Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Primer *ADE/R-raus* und *URA3/L-raus* bei den Transformanten AN1 (**Spur 3**); AN2 (**Spur 5**); AN3 (**Spur 7**); AN4 (**Spur 9**); AN5 (**Spur 11**); AN6 (**Spur 13**); AN7 (**Spur 14**); AN8 (**Spur 19**); AN9 (**Spur 21**); AN10 (**Spur 23**); und mit den Primern *Ura/L0* und *Ura/R2* bei AN1 (**Spur 2**); AN2 (**Spur 4**); AN3 (**Spur 6**); AN4 (**Spur 8**); AN5 (**Spur 10**); AN6 (**Spur 12**); AN7 (**Spur 15**); AN8 (**Spur 18**); AN9 (**Spur 20**); AN10 (**Spur 22**); **Spur 1, 16, 17** und **24** Marker (λ *EcoRI/HindIII*); **C:** Trennung im Agarosegel der Amplifikate der Reaktionen: AN3 mit *ADE/R-raus* + *URA3/L-raus* (**Spur 2**); AN3 mit *URA/L1* + *kan2* (**Spur 3**); AN3 mit *kan1* + *kan2* (**Spur 4**); AN3 mit *URA/L1* + *URA/R2* (**Spur 5**); AN6 mit *ADE/R-raus* + *URA3/L-raus* (**Spur 6**); AN6 mit *URA/L1* + *kan2* (**Spur 7**); AN6 mit *kan1* + *kan2* (**Spur 8**); AN6 mit *URA/L1* + *URA/R2* (**Spur 9**); AN7 mit *ADE/R-raus* + *URA3/L-raus* (**Spur 10**); AN7 mit *URA/L1* + *kan2* (**Spur 11**); AN7 mit *kan1* + *kan2* (**Spur 12**); AN7 mit *URA/L1* + *URA/R2* (**Spur 13**); AN9 mit *ADE/R-raus* + *URA3/L-raus* (**Spur 14**); AN9 mit *URA/L1* + *kan2* (**Spur 15**); AN9 mit *kan1* + *kan2* (**Spur 16**); AN9 mit *URA/L1* + *URA/R2* (**Spur 17**); Marker λ *EcoRI/HindIII* (**Spur 1+18**)

Eine Sequenzierung dieser beiden Amplifikate (Amplifikat 1: 5`-*I28c-NP* mit *URA3/L-raus*; Amplifikat 2: *kan1* mit 3`-*I29c-NP*) wurde mit den Primern durchgeführt, die zu ihrer Herstellung benutzt worden waren. Die Basenfolgen sind in Tabelle 8-1 im Anhang zusammengefasst. Die Ergebnisse der Sequenzierung von Amplifikat 1 mit dem Primer 5`-*I28c-NP* sind in Abbildung 3-28 schematisch zusammengestellt. Innerhalb der YOR128c (*Y13140*)-Sequenz sowie der *URA3*-Region von Chromosom V (*U00092*) wurden keine Abweichungen in der Basenfolge gefunden.

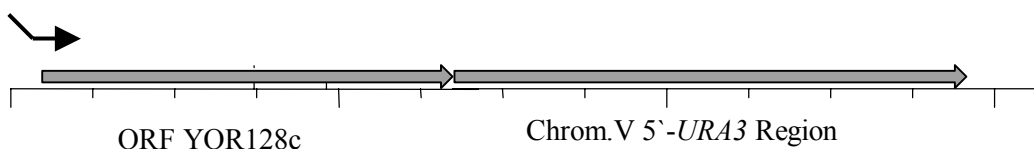
5`-*I28c-NP*

Abbildung 3-28: Schematische Darstellung der Sequenzierungs-Ergebnisse der *ADE2-URA3*-Übergangsregion des Stammes AN9 mit dem Primer 5`-*I28c-NP*

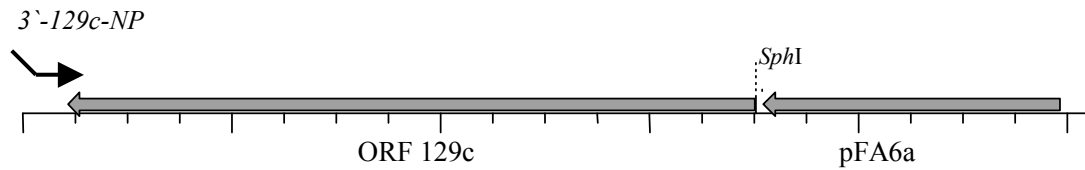


Abbildung 3-29: Schematische Darstellung der Sequenzierungs-Ergebnisse der Übergangsregion zwischen ORF129 und kanMX4(pFA6a)- mit dem Primer 3'-129c-NP in Stamm AN9

Abbildung 3-29 zeigt schematisch die Ergebnisse der Sequenzierung von Amplifikat 2 mit dem Primer 3'-129c-NP. Die Homologie zum pFA6a Plasmid lag bei dieser Sequenz bei 98 %. Die Sequenzierung zeigt eine Homologie von 99 % zum ORF YOR129c (Z75037) auf, der distal zum *ADE2*-Leserahmen an Chromosom XV liegt. Zwischen den Sequenzen von pFA6a und ORF YOR129c wurden sechs Basen der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *SphI* wiedergefunden. Mit diesem Restriktionsenzym war die kanMX4-Kassette in den pURA3-Vektor kloniert worden. Die Sequenzierung der Nachweisamplifikate hatte gezeigt, dass die Sequenz der PCR-Produkte wie erwartet ausfiel. Bei den Amplifikaten handelte es sich um die entsprechenden spezifischen Sequenzen der Integrationskassette und der angrenzenden Regionen.

Diese nach der Verifizierung ihres Genotyps später als HAN bezeichnete Transformante war dazu vorgesehen, einerseits den Stamm DAN zu konstruieren und andererseits als Testerstamm zur Erfassung von Vorwärtsmutationen zu fungieren. Zuerst sollte jedoch durch Untersuchung des DNA-Gehaltes pro Zelle und mittels FACS-Analysen überprüft werden, ob HAN haploid war.

Die Bestimmung des DNA-Gehalts ergab für die Zellen von HAN einen DNA-Gehalt von 16 fg DNA pro Zelle. Dieser Wert lag knapp unter dem des haploiden Referenzstamms MCC109 (16,5 fg/Zelle). Damit sprach das Ergebnis für den haploiden Zustand von HAN (CARR und SHEARER, 1998). Anschließend wurde dieses Ergebnis mit Hilfe der zytometrischen FACS-Analyse bestätigt (Histogramm Abb. 3-30). Der G1 Peak lag bei 80, was im Vergleich zu dem Referenzstamm 41 α (76) einen DNA Index von 1,05 ergab und den haploiden Zustand von HAN bestätigte.

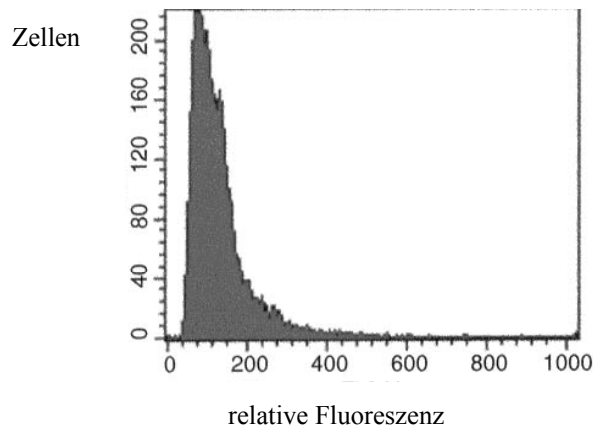


Abbildung 3-30: Histogramm des Stammes HAN

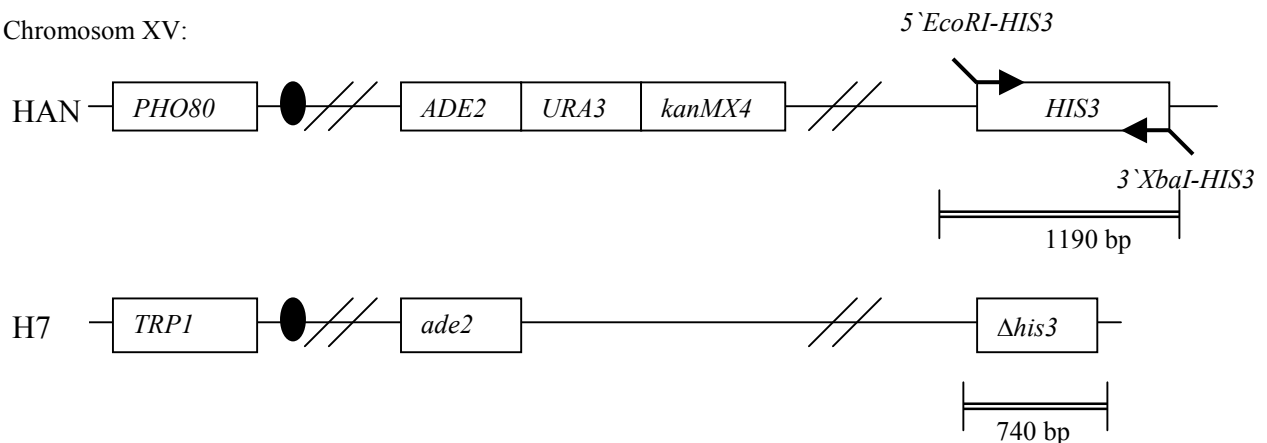
3.4 Konstruktion und Charakterisierung des Stammes DAN

Für die Fusion der Stämme H7 und HAN wurde die Methode von SKALA und KOTYLAK (1984) angewendet. Zur Berechnung der Protoplastierungseffizienz und der Regenerationsrate der Protoplasten wurden die Ausgangstitere beider Stämme bestimmt. Sie betragen bei dem Stamm HAN $6 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ und bei dem Stamm H7: $3,3 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$. Nach PEG-Behandlung wurden von beiden Stämmen Aliquots entnommen und auf osmotisch stabilisiertem YNB- (+ Supplemente) sowie nicht-stabilisiertem YEP-Agar ausgestrichen. Bei dem Stamm HAN wurden 80 % der Zellen zu Protoplasten umgewandelt. 2,5 % der eingesetzten Protoplasten konnten im überschichteten, supplementierten Minimalmedium regenerieren und wieder anwachsen. Bei dem Stamm H7 war die Protoplastierung zu fast 100 % erfolgreich.

Nach Vereinigung der Protoplasten beider Stämme konnten insgesamt 111 Fusionsprodukte aus dem Überschichtungs-YNB-Agar isoliert werden. Auf den Kontrollplatten mit unbehandelten Protoplastengemischen wuchsen keine Kolonien. Zum Nachweis der zwei partiell heterologen Kopien des Chromosoms XV beider Fusionspartner wurde die DNA von 10 Fusionsprodukten isoliert und als Template in eine PCR-Reaktion mit den *HIS3*-spezifischen Primern $5' \text{EcoRI-HIS3}$ und $3' \text{XbaI-HIS3}$ eingebracht (Abb. 3-31). Am Template der DNA des Stammes H7 wurde das erwartete 740 bp große Amplifikat gebildet. Bei dem Stamm HAN wurde ein 1190 bp großes Produkt amplifiziert. Bei allen Fusionsprodukten wurden beide Amplifikate vervielfältigt. Die Amplifikation des disruptierten und des Wildtyp-*HIS3*-Allels zeigte, dass *HIS3* von dem Stamm H7 und von dem Stamm HAN in den Fusionsprodukten vorhanden waren.

A:

Chromosom XV:



B:

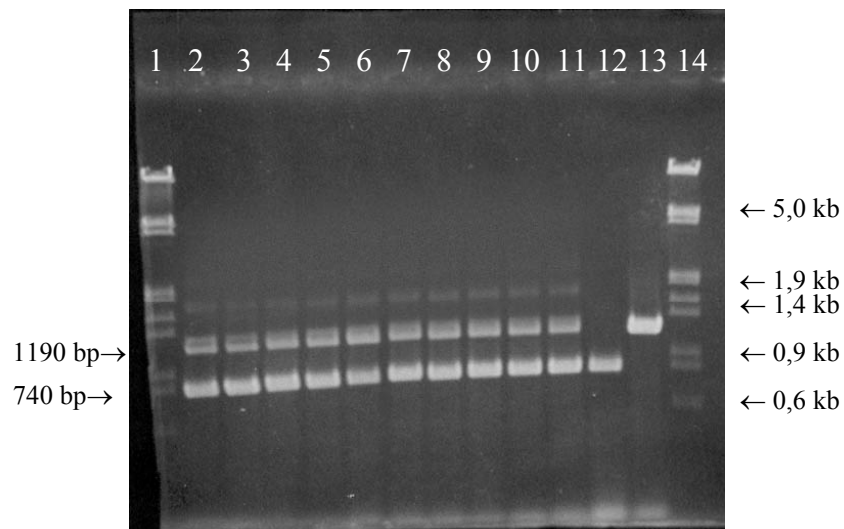
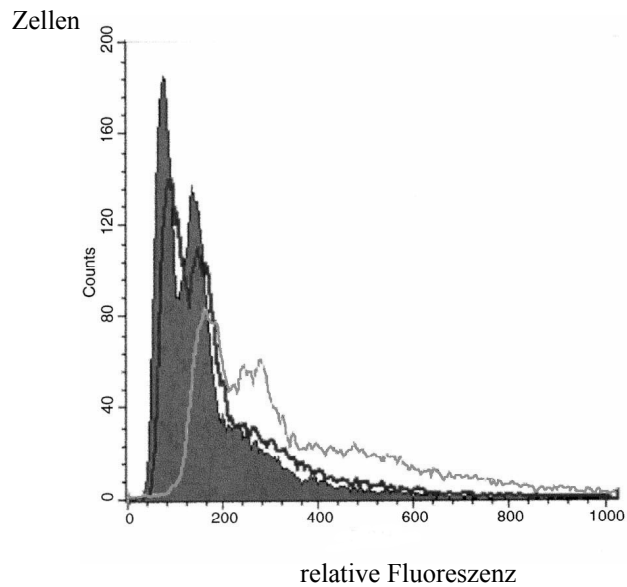


Abbildung 3-31: A: Schematische Darstellung des PCR-Nachweises von Chromosom XV der Stämme HAN und H7 mit *HIS3*-spezifischen Primern; B: Gelelektrophoretische Trennung der Produkte der PCR mit den Primern *5'EcoRI-HIS3* und *3'XbaI-HIS3* am Template der DNA der Fusionsprodukte 1-10 (**Spur 2-11**) und der Stämme H7 (**Spur 12**) und AN10 (**Spur 13**); Marker λ *EcoRI/HindIII* (**Spur 1 + 14**)

Das Ergebnis der PCR gab jedoch keine Auskunft darüber, ob es sich bei den Fusionsprodukten um diploide oder um aneuploide Stämme handelte, die durch die Protoplastenfusion entstanden sind. Zur Prüfung des Ploidiegrades der Fusionsprodukte wurde der DNA-Gehalt pro Zelle ermittelt und die FACS-Analyse angewendet.

Zunächst wurde der DNA-Gehalt pro Zelle von zwei mittels PCR charakterisierten Fusionsprodukten (FP4 und FP8) bestimmt. Dabei wurden bei FP4 durchschnittlich 52,5 fg DNA/Zelle gemessen. Der Stamm FP8 enthielt durchschnittlich 36 fg DNA/Zelle.

A:



B:

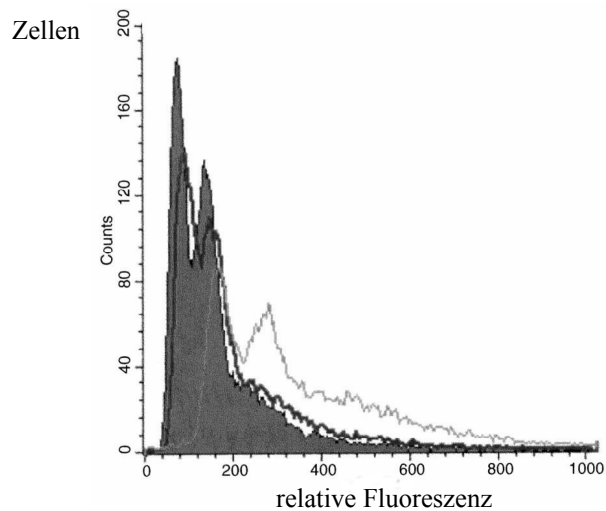


Abbildung 3-32: FACS Histogramme von FP4 mit H7 und HAN (**A**) und FP8 mit H7 und HAN (**B**); grau ausgefüllte Fläche: HAN; schwarze Linie: H7; hell-graue Linie: FP4 (A) bzw. FP8 (B)

Da die DNA-Gehaltsmessung keine klare Bestimmung des Ploidiegrads erlaubte, wurden FP4 und FP8 mittels FACS weiter charakterisiert. Zusätzlich wurden auch die haploiden Stämme H7 und HAN zur Analyse herangezogen. Die Histogramme der FACS-Analyse wurden in Abbildung 3-32 zusammengestellt. Diese zeigt, dass die beiden Peaks der G1- und G2-Phase der haploiden Stämme H7 und HAN fast übereinander lagen. Bei den Fusionsprodukten FP4 und FP8 dagegen lagen die G1 Peaks bei den G2 Peaks der haploiden Stämme. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es sich bei den beiden ausgewählten Fusionsprodukten um diploide Stämme handelte, da die DNA in der G2-Phase der haploiden Stämme verdoppelt vorliegen musste.

Mit Hilfe der Real-time PCR sollte nun ein direkter Bezug zu der Anzahl der Chromosomen XV in den wahrscheinlich diploiden Fusionsprodukten FP4 und FP8 hergestellt werden. Bei dieser Methode wurde die Kopiezahl pro Zelle der Templates für *ADE2*-, *kanMX4*- und *TRP1*-spezifische Primer über die Menge an PCR-Produkten ermittelt. Als Standard dienten gleiche Mengen genomischer DNA der beiden haploiden Stämme HAN und H7. Die Einzelergebnisse dieses Real-time PCR Laufes sind im Anhang in Tabelle 8-2 zusammengefasst. Eine Übersicht der Ergebnisse bietet Tabelle 3-2.

Tabelle 3-2: Ergebnisse der Real-time PCR zur Bestimmung der Verhältnisse des Templates für *kanMX4*-, *ADE2*- und *TRP1*-spezifische Primer

Fusionsprodukt	Template	Template-Menge**** (ng±Std.abw.)	Relatives Verhältnis <i>kanMX4</i> / <i>ADE2</i> (±Std.abw.)	Relatives Verhältnis <i>TRP1</i> / <i>ADE2</i> (±Std.abw.)
FP4	<i>ADE2</i> *	4,85 ± 0,29	0,53 ± 0,03	0,70 ± 0,05
	<i>kan</i> **	2,57 ± 0,07		
	<i>TRP1</i> ***	3,38 ± 0,17		
FP8	<i>ADE2</i>	5,51 ± 0,33	0,44 ± 0,07	0,61 ± 0,04
	<i>kan</i>	2,43 ± 0,37		
	<i>TRP1</i>	3,34 ± 0,08		

* verwendete Primer 5`-*TM-Ade2* und 3`-*TM-Ade2*

** verwendete Primer 5`-*TM-kan* und 3`-*TM-kan*

*** verwendete Primer 5`-*TM-Trp1* mit 3`-*TM-Trp1*

**** eingesetzte Templatemenge wurde aus den C_t -Werten mittels Software errechnet

Das Verhältnis der Template-Menge für die *kanMX4*-spezifischen Primer zu den *ADE2*-spezifischen Primern lag für FP4 bei 0,53 und für FP8 bei 0,44. Erwartet wurde ein Wert von 0,5 (entspricht 1 *kanMX4*:2 *ADE2*), da das Template für die *kanMX4* Primer nur einmal vorhanden war, nämlich vom Stamm HAN und das Template für die *ADE2* Primer zweimal vorhanden war und zwar von beiden haploiden Stämmen. Die ermittelten Verhältnisse entsprachen somit den Erwartungen für einen diploiden Stamm. Das Verhältnis der Template-Menge für die *TRP1*-spezifischen Primer zu der Template-Menge der *ADE2*-spezifischen Primer lag etwas über 0,5.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse ließen schon vermuten, dass die Stämme FP4 und FP8 diploid sind. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes pro Zelle und die Ergebnisse der Real-time PCR bestätigen vor allem für den Stamm FP8 den diploiden Status. Aus diesem Grund wurde FP8 als Teststamm DAN verwendet.

3.5 Häufigkeit spontaner und induzierter Mutations- und Rekombinationsereignisse bei den Stämmen HAN und DAN

Nachdem die Genotypen der beiden Stämme in den vorangegangenen Untersuchungen bestätigt worden waren, sollte nun geprüft werden, ob sie sich bei der Behandlung mit Mutagenen oder Rekombinogenen mit bekannten Wirkungsmechanismen (siehe Abschnitte 1.4.1 bis 1.4.4) den Erwartungen entsprechend verhalten würden. Dazu wurden spontan oder nach Behandlung entstandene Ura⁻- und Trp⁻-Kolonien selektiert und auf ihren Phänotyp hin untersucht. Die Ergebnisse der Behandlung sollten einen direkten Vergleich mit schon beschriebenen Ergebnissen bei anderen Reporterstämmen ermöglichen. Darüber hinaus wurde Anilin getestet, eine Substanz, die im Ames-Test keinen Effekt zeigt, aber bei Hefe die spontane Rekombinationsfrequenz erhöht. Tabelle 3-3 gibt einen Überblick darüber, welche genetischen Ereignisse zur Entstehung der selektierten Phänotypen führen können.

Tabelle 3-3: Möglichkeiten genetischer Ereignisse, die zur Ausprägung der selektierten Phänotypen bei den Stämmen DAN und HAN führen können

DAN Auxotrophie	Genetisches Ereignis
Ura ⁻ G418 ^r	<ul style="list-style-type: none"> • Punktmutationen im <i>URA3</i>-Gen • Deletionen, Inversionen im <i>URA3</i>-Gen • Genkonversionen mit einer Länge < 1,6 kb (SGC: <u>s</u>hort <u>g</u>ene <u>c</u>onversion)
Ura ⁻ G418 ^s	<ul style="list-style-type: none"> • Genkonversionen mit einer Länge > 1,6 kb (MGC: <u>m</u>edium <u>g</u>ene <u>c</u>onversion) • Großräumige Mutationen
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	<ul style="list-style-type: none"> • Genkonversionen mit einer Länge > 5,7 kb (LGC: <u>l</u>ong <u>g</u>ene <u>c</u>onversion) • Großräumige Mutationen
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	<ul style="list-style-type: none"> • Crossover zwischen Centromer und <i>ADE2</i> • Chromosomenverluste bei dem <i>URA3/kanMX4</i>-Kassette tragenden Homolog von Chromosom XV • Großräumige Deletion bei dem <i>URA3/kanMX4</i>-Kassette tragenden Homolog von Chromosom XV • Genkonversion > 182 kb
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻ Trp ⁻	<ul style="list-style-type: none"> • Crossover zwischen <i>PHO80</i> und Centromer + Crossover zwischen <i>ADE2</i> und Centromer • Crossover zwischen <i>PHO80</i> und Centromer + Chromosomenverlust bei dem <i>TRP1</i> tragenden Chromosom XV
Trp ⁻	<ul style="list-style-type: none"> • Chromosomenverluste des <i>TRP1</i> tragenden Chromosoms XV • Punktmutationen, Deletionen, Inversionen beim <i>TRP1</i>-Gen • Genkonversion < 961 bp
HAN	
Ura ⁻	<ul style="list-style-type: none"> • Vorwärtsmutationen im <i>URA3</i>-Gen

3.5.1 Häufigkeit spontaner Ereignisse

Das Verhalten der drei Klone DAN1, DAN2 und DAN3 wurde parallel zueinander untersucht. Dazu wurden frisch in YNB-Flüssigmedium gewachsene Zellen abzentrifugiert, gewaschen und in steriles Wasser überführt. Anschließend wurden Zellen auf YNB+5-FOA+Ura⁻G418^r-Platten (5-FOA-MM) gegeben, auf denen Ura⁻ G418^r-Kolonien selektiert werden konnten. Darüber hinaus wurden Zellen auf YNB+5-FOA+Ade⁻His⁻Trp⁻Ura (5-FOA-SM) gegeben, auf dem Ura⁻, aber auch Ade⁻Ura⁻, Ade⁻Ura⁻His⁻, Ade⁻Ura⁻His⁻Trp⁻, G418^r- und G418^s-Klone selektiert werden. Diese 5-FOA-SM-Platten wurden nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen auf supplementierte Minimalmediumplatten gestempelt, um die Phänotypen der selektierten Uracil-auxotrophen Kolonien genau zu bestimmen. Tabelle 3-4 zeigt die Häufigkeiten der einzelnen Phänotypen, die bei unabhängigen Experimenten ermittelt worden waren.

Tabelle 3-4: Frequenz von Ura⁻ Auxotrophen von DAN1, DAN2, DAN3; (x10⁻⁶)

Phänotyp (Selektionsmedium/Anzahl der Experimente)	DAN1 (Mittelwert ± Std.abw.)	DAN2 (Mittelwert ± Std.abw.)	DAN3 (Mittelwert ± Std.abw.)	Mittelwert ± Std.abw.
Ura⁻ G418^r (5-FOA-MM/5)	1,17 ± 0,15	1,19 ± 0,50	1,51 ± 0,29	1,3 ± 0,19
Ura⁻ G418^r (5-FOA-SM/4)	0,67 ± 0,28	0,80 ± 0,42	0,71 ± 0,32	0,7 ± 0,07
Ura⁻ (5-FOA-SM/4)	1,71 ± 0,29	1,44 ± 0,48	1,63 ± 0,29	1,6 ± 0,14
Ura⁻ G418^s (5-FOA-SM/3)	0,79 ± 0,63	1,12 ± 0,52	1,04 ± 0,54	0,9 ± 0,17
Ade⁻ Ura⁻ G418^r (5-FOA-SM/9)	1,60 ± 0,68	1,75 ± 0,52	1,91 ± 0,43	1,8 ± 0,16
Ade⁻ Ura⁻ G418^s (5-FOA-SM/6)	0,19 ± 0,08	0,27 ± 0,06	0,22 ± 0,13	0,2 ± 0,04
Ade⁻ Ura⁻ His⁻ (5-FOA-SM/9)	15,15 ± 4,92	16,42 ± 6,11	15,76 ± 3,96	15,8 ± 0,64
Ade⁻ Ura⁻ His⁻ Trp⁻ (5-FOA-SM/5)	< 0,08	< 0,10	0,29 ± 0,30	< 0,29
Trp⁻ (5-FAA/4)	2,90 ± 2,88	2,18 ± 2,21	1,53 ± 1,19	2,2 ± 0,69

Auf 5-FOA-MM selektiert Kolonien traten mit einer Häufigkeit von $1,3 \times 10^{-6}$ auf. Dieses Medium sollte zur Selektion von Kolonien dienen, die durch Vorwärtsmutationen und SGCs entstanden sind. Obwohl die Frequenz der auf 5-FOA-SM selektierten Ura⁻ G418^r-Phänotypen mit $0,7 \times 10^{-6}$ etwas geringer war, handelt es sich hier laut *t*-Test ($P = 5\%$) um keinen signifikanten Unterschied. Auf 5-FOA-SM selektierte Uracil-Auxotrophe wurden mit

einer Häufigkeit von $1,4 - 1,7 \times 10^{-6}$ gefunden. Da in dieser Zahl sowohl Ura⁻ G418^r- als auch Ura⁻ G418^s-Phänotypen enthalten sind, entspricht es den Erwartungen, dass sie höher ist als die oben erwähnte Frequenz der Ura⁻ G418^r-Klone. Die Summe der auf beiden Selektionsmedien gefunden Ura⁻ G418^s und Ura⁻ G418^r-Klone entspricht jedenfalls - wie erwartet - der Gesamtzahl an Ura⁻-Klonen auf 5-FOA-SM. Durch MGCs entstandene Ade⁻ Ura⁻ G418^r-Kolonien traten mit einer Häufigkeit $1,8 \times 10^{-6}$ auf, Ura⁻ G418^s-Kolonien mit einer Häufigkeit von $0,9 \times 10^{-6}$. Obwohl beide Phänotypen durch Genkonversionsereignisse mit ähnlicher Länge verursacht werden könnten, kommen Ura⁻ G418^s-Segreganten signifikant ($P = 5 \%$) seltener vor als Ade⁻ Ura⁻ G418^r-Segreganten. Ade⁻ Ura⁻ G418^s-Kolonien, die entweder durch LGCs oder durch zwei Crossover (zwischen Centromer und *ADE2* sowie *kanMX4* und *HIS3*) entstanden sein können, zeigten spontan einen Wert von 2×10^{-7} . Die meisten selektierten Kolonien waren Ade⁻ Ura⁻ His⁻. Durchschnittlich wurden $1,6 \times 10^{-5}$ Kolonien mit diesem Phänotyp beobachtet, der entweder durch ein Crossover-Ereignis zwischen Centromer und dem *ADE2*-Locus oder Chromosomenverluste verursacht wurde.

Die Selektion von Vorwärtsmutanten auf 5-FOA+Ura+Trp-Medium ergab beim dem Stamm HAN nur Uracil-auxotrophe Kolonien mit einer Frequenz von $3,3 - 7,6 \times 10^{-7}$. Diese Frequenz, die wahrscheinlich allein Vorwärtsmutationen widerspiegelt, hat die gleiche Größenordnung wie die Frequenz der auf 5-FOA-SM selektierten Ura⁻ G418^r-Kolonien des Stammes DAN.

3.5.2 Wirkung von MNNG auf DAN

Zur Bestimmung der Inaktivierung wurde der Klon DAN1 nach dem in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Test behandelt. Abweichend von dem beschriebenen Protokoll wurden unterschiedliche Konzentrationen von MNNG verwendet. Anschließend wurde der Lebendtitel der Zellen auf Vollmedium bestimmt. In Abbildung 3-33 ist die Inaktivierungskurve dargestellt. Danach wurden DAN1, DAN2 und DAN3 in zwei Experimenten mit einer $250 \mu\text{M}$ MNNG-Lösung behandelt, nach deren Einwirkung etwa 40 % der behandelten Zellen überleben sollten. Die beiden Experimente waren unterschiedlich durch die Art der Selektion. Bei dem Ersten wurden die Medien 5-FOA-MM und 5-FOA-SM verwendet, bei dem zweiten die Medien 5-FOA-SM und 5-FAA. Die Ergebnisse beider Versuche sind in Tabelle 3-5 (Seite 76) und 3-6 (Seite 77) zusammengefasst.

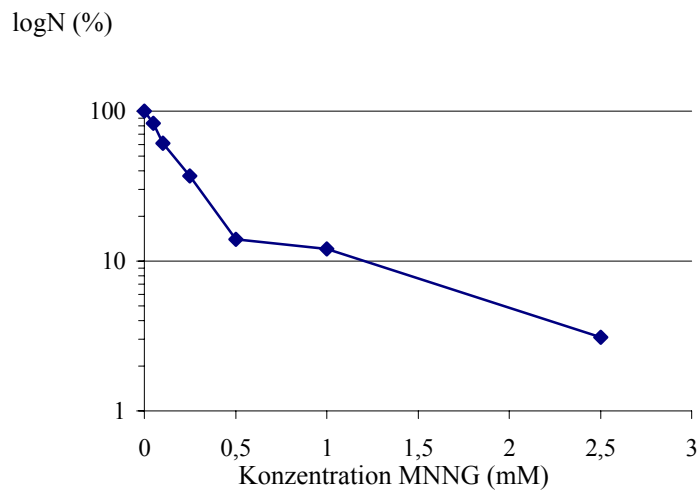


Abbildung 3-33: Inaktivierung des Stammes DAN1 durch MNNG

Bei der Auswertung fiel zunächst auf, dass der Klon DAN1 im Gegensatz zu DAN2 und DAN3 im zweiten Mutagenese-Experiment nicht so stark durch das Mutagen abgetötet wurde wie DAN1, DAN2 und DAN3 im ersten Experiment. Auch die Werte der entstandenen Phänotypen nach Mutagenbehandlung unterschieden sich bei diesem Klon nach Mutagenbehandlung stark von den anderen beiden Klonen, was in einer hohen Standardabweichung resultierte. Wahrscheinlich wurden diese Ergebnisse durch eine methodische Ungenauigkeit hervorgerufen, da im ersten Mutagenese-Experiment und in den Kontrollexperimenten kein abweichendes Verhalten dieses Klons beobachtet wurde.

Tabelle 3-5: Frequenz der Auxotrophen nach MNNG-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-MM und 5-FOA-SM; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2		Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^r	1,08	0,85	1,31	1,08 \pm 0,23
Ura ⁻	1,52	1,42	1,46	1,47 \pm 0,05
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	1,46	1,17	1,57	1,40 \pm 0,21
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,29	0,21	0,37	0,29 \pm 0,08
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	12,5	11,4	14,0	12,6 \pm 1,3
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻ Trp ⁻	< 0,08	< 0,10	0,07	< 0,07
MNNG				
Ura ⁻ G418 ^r	79,1	46,7	40,8	55,53 \pm 20,6
Ura ⁻	164	127	150	147 \pm 18,7
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	17,1	23,6	49,6	30,1 \pm 17,2
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	1,22	3,93	3,10	2,74 \pm 1,39
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	22	33,4	69,7	41,7 \pm 25
Überlebende in %	48	51	54	51 \pm 3

Tabelle 3-6: Frequenz der Auxotrophen nach MNNG-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-SM und 5-FAA; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^r	0,54	0,46	1,14	0,71 \pm 0,37
Ura ⁻ G418 ^s	0,15	< 0,11	0,46	0,31 \pm 0,22
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	1,77	1,83	2,17	1,92 \pm 0,22
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,23	0,34	0,11	0,23 \pm 0,12
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	16,8	14,9	16,7	16,1 \pm 1,1
Trp ⁻	0,21	0,26	0,06	0,18 \pm 0,11
MNNG				
Ura ⁻ G418 ^r	36,4	71,6	79,0	62,3 \pm 22,8
Ura ⁻ G418 ^s	1,82	5,97	5,26	4,35 \pm 2,22
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	9,09	29,8	13,2	17,4 \pm 11,0
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	2,73	20,9	7,89	10,5 \pm 9,4
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	24,5	26,9	23,7	25,0 \pm 1,7
Trp ⁻	0,59	0,45	0,26	0,43 \pm 0,16
Überlebende in %	84,2	38,3	43,4	

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch MNNG hauptsächlich Ura⁻ G418^r-Klone entstanden. Der Wert für die spontane Rate wurde durch den Einfluss von MNNG um etwa das 100fache auf $5,6 - 6,23 \times 10^{-5}$ erhöht. Weniger deutlich wurde die Anzahl der Ura⁻ G418^s-Kolonien erhöht. Hier konnte ein etwa 10facher Anstieg beobachtet werden. In der gleichen Größenordnung lag auch der Anstieg des Auftretens von Ade⁻ Ura⁻ G418^r-Kolonien. Bei Ade⁻ Ura⁻ His⁻ Klonen konnte nur eine geringe Induktion (ca. 1,5 bis 3fach) durch MNNG von $1,3 - 1,6 \times 10^{-5}$ auf $2,5 - 4,2 \times 10^{-5}$ beobachtet werden. Tryptophan-auxotrophe Kolonien wurden bei einer Frequenz von 4×10^{-7} etwa 2,5 mal öfter isoliert als im Kontrollexperiment, wobei dieser Unterschied laut *t*-Test nicht signifikant ist.

Aus den Daten geht hervor dass der Stamm DAN auf die Behandlung mit MNNG mit einer Erhöhung verschiedener genetischer Ereignisse reagiert. Die starke Erhöhung der Frequenz ausschließlich Ura-Auxotropher entspricht der Erwartung an den Einfluss eines Mutagens. Darüber hinaus werden wenn auch im geringeren Maße die Häufigkeiten von Phänotypen erhöht, die durch Genkonversion und Crossover entstanden sind.

3.5.3 Wirkung von UV-Strahlung auf DAN

Zur Bestimmung der inaktivierenden Wirkung von UV-Strahlen wurden Zellen im unbestrahlten Zustand und nach der Behandlung mit einer zunehmenden UV-Dosis ausplattiert. Abbildung 3-34 zeigt die Abnahme der Zahl von überlebenden Zellen bei Erhöhung der UV-Dosis.

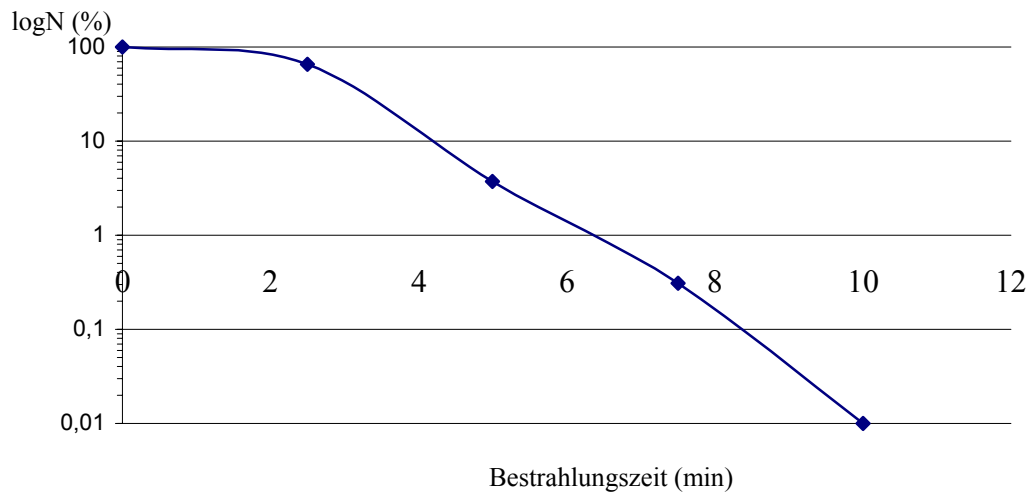


Abbildung 3-34: Inaktivierende Wirkung von UV Strahlen auf den Stamm DAN

Die UV-Inaktivierung des Stammes DAN zeigt eine ausgeprägte Schulterkurve, wie sie bei einer Hefe mit intaktem Reparatursystem zu erwarten ist (RESNICK *et al.*, 1983).

Bei der Mutagenese von DAN1, DAN2 und DAN3 wurde eine Bestrahlungszeit von 3,5 Minuten und ein Lampenabstand von 20 cm gewählt. Bei dieser Strahlendosis sollten ca. 20-30 % der Zellen überleben. In Tabelle 3-7 und 3-8 sind die Überlebenden und die entstandenen Phänotypen mit der Häufigkeit ihres Vorkommens aufgelistet.

Tabelle 3-7: Frequenz der Auxotrophen nach UV-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-MM und 5-FOA-SM; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^r	1,06	0,92	1,39	1,12 \pm 0,24
Ura ⁻	1,76	0,92	1,89	1,52 \pm 0,53
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	0,66	1,73	1,34	1,24 \pm 0,54
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,17	< 0,04	< 0,05	< 0,17
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	9,47	12,7	15,0	12,4 \pm 2,78
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻ Trp ⁻	< 0,3	< 0,4	0,5	< 0,5
UV				
Ura ⁻ G418 ^r	50	304	270	208 \pm 138
Ura ⁻ G418 ^s	1,25	13,4	12,7	9,12 \pm 6,82
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	5,63	70,1	59,5	45,1 \pm 34,6
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	6,88	1,49	< 1,27	< 6,88
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	46,3	201	171	139 \pm 82
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻ Trp ⁻	< 0,63	< 1,49	< 1,27	< 1,49
Überlebende in %	53	24	29	35 \pm 15,5

Tabelle 3-8: Frequenz der Auxotrophen nach UV-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-SM und 5-FAA; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^r	1,06	1,36	0,78	1,07 \pm 0,29
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	0,82	1,44	2,06	1,44 \pm 0,62
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	< 0,06	< 0,08	< 0,10	< 0,1
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	8,76	10,4	11,3	10,2 \pm 1,3
Trp ⁻	2,47	0,56	2,84	1,96 \pm 1,22
UV				
Ura ⁻ G418 ^r	183	176	175	178 \pm 44
Ura ⁻ G418 ^s	17,1	29,6	6,67	17,8 \pm 11,4
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	19,4	33,0	10,5	21,0 \pm 11,3
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	< 1,1	< 1,1	< 1,9	< 1,9
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	213	165	140	173 \pm 37
Trp ⁻	6,86	2,32	1,90	3,69 \pm 2,75
Überlebende in %	21	28	21	23 \pm 4

In den Parallelen DAN2 und DAN3 im ersten Experiment und aller drei Parallelen im zweiten Experiment führte die verwendete Strahlendosis zur Inaktivierung von ca. 70 % der Zellen (Tabelle 3-7 und 3-8). Die Unterschiede der Parallele DAN1 im ersten Experiment zu allen anderen Parallelen könnten durch eine geringeren Strahlendosis hervorgerufen worden sein, der die Zellen unbeabsichtigt ausgesetzt wurden.

In den Versuchen mit einer Inaktivierung von ca. 70 % war die Frequenz der Ura⁻ G418^r-Kolonien in beiden Experimenten von ca. 1×10^{-6} auf etwa 2×10^{-4} (200fach) erhöht. Auch Ura⁻ G418^s- sowie Ade⁻ Ura⁻ G418^r-Kolonien, die hauptsächlich durch MGCs entstanden sein sollten, wurden mit einer höheren Rate gefunden. Die Frequenz der Ade⁻ Ura⁻ G418^r-Kolonien wurde im ersten Experiment um ca. das 50fache auf $6 - 7 \times 10^{-5}$ angehoben, im zweiten Experiment dagegen auf 2×10^{-5} . Crossover-induzierte Ade⁻ Ura⁻ His⁻-Kolonien kamen spontan mit einem Wert von durchschnittlich $1,2 \times 10^{-5}$ vor. Durch die UV-Bestrahlung wurde dieser Wert auf durchschnittlich $1,5 \times 10^{-4}$ gesteigert, was eine etwa 10fache Erhöhung darstellt. Ein Anstieg der Frequenz von Trp⁻-Kolonien konnte nur bei einer der Parallelen, und zwar bei DAN1, beobachtet werden. Bei DAN2 und DAN3 war kein Unterschied im Vorkommen detektierbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die UV-Strahlung bei dem Stamm DAN bei einer Inaktivierung von 70 % hauptsächlich Vorwärtsmutationen induziert, aber auch mitotische Rekombination. Dies wurde im Ura⁻ G418^r-Phänotyp widerspiegelt.

Bei Klon DAN1 im ersten Experiment gab es bei der geringeren Inaktivierung ein erhöhtes Auftreten von Phänotypen ($\text{Ura}^- \text{G418}^s$, $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^r$ und $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^s$), die durch MGCs und LGCs hervorgerufen werden können. Die Häufigkeit der Phänotypen, die durch Mutationen ausgelöst werden ($\text{Ura}^- \text{G418}^r$), wurde bei einer Inaktivierung von ca. 50 % nicht so stark induziert wie bei einer Inaktivierung von ca. 70 %.

3.5.4 Wirkung von EB auf DAN

Im Gegensatz zu dem im Kapitel 2.4.2.1 beschriebenen Protokoll wurden zwei Einwirkzeiten von EB auf den Stamm DAN1 getestet, um die inaktivierende Wirkung dieser Substanz zu erfassen.

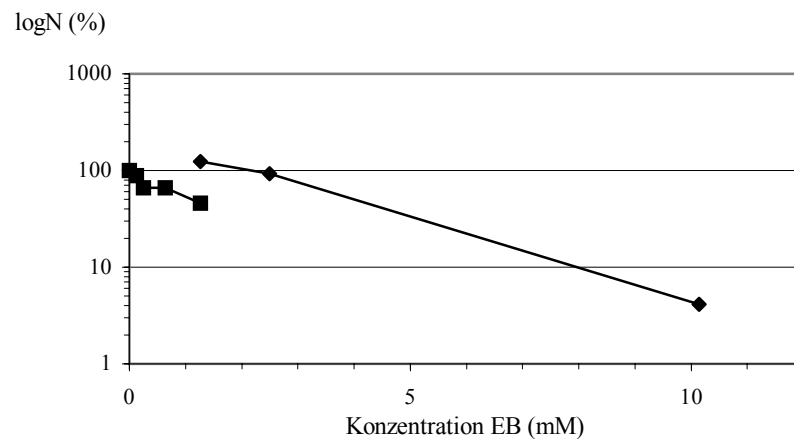


Abbildung 3-35: Inaktivierung des Stammes DAN1 mit EB; Rauten: 30 Minuten; Quadrate: 5 Stunden

Es wurden zwei Versuche mit 0,5 und 3 Stunden andauernder Inkubation durchgeführt, zusätzlich wurde die Konzentration des Mutagens variiert. Die Ergebnisse des Inaktivierungsexperimentes sind in Abbildung 3-35 dargestellt. Bei einer Einwirkzeit von 30 Minuten sank erst bei einer in Wasser kaum löslichen Menge von 4 mg/ml (10 mM) die Überlebensrate der Zellen des Stammes DAN1 unter 10 %. Da die Testbedingungen in allen Experimenten gleich gehalten werden sollten (30 Minuten lange Behandlung mit der Testsubstanz), wurden alle Mutagenesetests mit einer Konzentration von 1 mg/ml (2,5 mM) EB durchgeführt. In diesen Experimenten wurden die verschiedenen Phänotypen mit den in Tabelle 3-9 und 3-10 angegebenen Häufigkeiten selektiert.

Tabelle 3-9: Frequenz der Auxotrophen nach EB-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-MM und 5-FOA-SM; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^f	1,38	2,06	1,84	1,76 \pm 0,35
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^f	2,90	2,92	2,60	2,81 \pm 0,18
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	20	24	21	21,9 \pm 1,8
EB				
Ura ⁻ G418 ^f	1,49	1,18	1,19	1,29 \pm 0,18
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^f	< 1,59	5,88	1,59	< 5,88
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	17,1	33,3	39,7	30,0 \pm 11,6
Überlebende in %	27	26	29	27,3 \pm 1,5

Tabelle 3-10: Frequenz der Auxotrophen nach EB-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-SM und 5-FAA; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^f	0,65	0,49	0,45	0,53 \pm 0,11
Ura ⁻ G418 ^s	1,40	0,73	1,13	1,09 \pm 0,34
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^f	1,51	1,95	1,92	1,79 \pm 0,25
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	18,4	16,3	15,7	16,8 \pm 1,4
Trp ⁻	1,94	2,92	2,03	2,30 \pm 0,54
EB	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^f	0,089	0,43	0,53	0,35 \pm 0,23
Ura ⁻ G418 ^s	0,98	0,54	1,20	0,91 \pm 0,34
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^f	0,98	1,73	0,80	1,17 \pm 0,49
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	12,8	12,1	15,5	13,5 \pm 1,8
Trp ⁻	1,60	2,16	1,33	1,70 \pm 0,42
Überlebende in %	121	112	85	106

EB hatte keinen erfassbaren genetischen Effekt auf den diploiden Testerstamm DAN. Die Raten aller Phänotypen waren im ersten Experiment (Selektion 5-FOA-MM und 5-FOA-SM), obwohl ca. 70 % der behandelten Zellen abgetötet wurden, nicht höher als bei den Kontrollexperimenten. Auch im zweiten Experiment (Selektion 5-FOA-SM und 5-FAA) konnte keine eindeutige Wirkung auf den Stamm DAN beobachtet werden. Allerdings zeigte die Überlebensrate, dass hier keine Inaktivierung der Zellen erfolgt war.

3.5.5 Wirkung von Benomyl auf DAN

Benomyl wurde in DMSO gelöst (siehe 2.1.5) zur Mutagenese verwendet. Um neben der inaktivierenden Wirkung von zwei Konzentrationen von Benomyl auch die von DMSO zu untersuchen, wurde diese Substanz in der höchst verwendeten Konzentration (10 μ l/ml) im Test eingesetzt. Die Ergebnisse dieses Inaktivierungsexperimentes sind in Tabelle 3-11 aufgelistet.

Tabelle 3-11: Inaktivierungsaktivität von Benomyl und DMSO

Proben	Benomyl in µg/ml	Überlebende in %
1	0 (ohne DMSO)	100
2	DMSO (10µl/ml)	101
3	20	66,5
4	100	54

Benomyl wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt. Die Häufigkeit der selektierten Phänotypen ist in Tabelle 3-12 und 3-13 zusammengestellt.

Tabelle 3-12: Frequenz der Auxotrophen nach Benomyl-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-MM und 5-FOA-SM; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^r	1,07	1,16	1,21	1,15 \pm 0,07
Ura ⁻	2,09	2,08	1,87	2,01 \pm 0,12
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	1,72	1,94	2,1	1,92 \pm 0,19
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,22	0,28	0,28	0,26 \pm 0,03
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	23,4	27,1	20,7	23,7 \pm 3,2
Benomyl				
Ura ⁻ G418 ^r	1,23	1,22	1,38	1,28 \pm 0,09
Ura ⁻	3,71	3,54	2,77	3,34 \pm 0,5
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	6,09	3,66	2,54	4,10 \pm 1,81
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,40	0,12	0,69	0,40 \pm 0,29
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	43,3	39,9	27,7	37,0 \pm 8,2
Überlebende in %	56	57	74	62 \pm 10

Tabelle 3-13: Frequenz der Auxotrophen nach Benomyl-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-SM und 5-FAA; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^r	0,54	0,46	1,14	0,71 \pm 0,37
Ura ⁻ G418 ^s	0,15	< 0,11	0,46	0,31 \pm 0,22
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	1,77	1,83	2,17	1,92 \pm 0,22
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,23	0,34	0,11	0,23 \pm 0,12
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	16,8	14,9	16,7	16,1 \pm 1,1
Trp ⁻	0,21	0,26	0,06	0,18 \pm 0,11
Benomyl				
Ura ⁻ G418 ^r	0,91	2,0	1,67	1,53 \pm 0,56
Ura ⁻ G418 ^s	0,99	< 0,25	0,71	0,85 \pm 0,20
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	4,13	5,75	3,57	4,48 \pm 1,1
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,74	0,48	0,95	0,72 \pm 0,24
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	20,7	31,5	30,5	27,6 \pm 6,0
Trp ⁻	0,33	0,13	0,24	0,23 \pm 0,10
Überlebende in %	93	46	48	62 \pm 27

Die Häufigkeit von Uracil-auxotrophen Kolonien (G418^r und G418^s), die auf 5-FOA-MM oder 5-FOA-SM selektiert wurden, lag sowohl bei den Kontrollversuchen als auch bei Benomyl-behandelten Zellen bei ca. $1 - 2 \times 10^{-6}$. Hier konnte im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Anstieg beobachtet werden. Die Frequenz der Ade⁻ Ura⁻ G418^r-Kolonien lag nach Behandlung mit Benomyl bei ca. 4×10^{-6} , was einem Anstieg der MGCs um etwa 100 % (spontan 2×10^{-6}) entsprechen würde. Hier handelt es sich laut *t*-Test um einen signifikanten Anstieg ($P = 1 \%$). Bei den Ade⁻ Ura⁻ G418^s-Kolonien (LGCs) konnte ein durch Benomyl induzierter nicht signifikanter Anstieg (um das 3fache) auf $4 - 7 \times 10^{-7}$ beobachtet werden. Durch Crossover oder Chromosomenverlust entstandene Ade⁻ Ura⁻ His⁻-Kolonien kamen im ersten Experiment spontan mit einer Häufigkeit von $2,4 \times 10^{-5}$ vor. Dieser Unterschied war laut *t*-Test ($P = 5 \%$) nicht signifikant. Im zweiten Experiment war dagegen die Anzahl der Ade⁻ Ura⁻ His⁻-Kolonien von $1,6 \times 10^{-5}$ auf $2,8 \times 10^{-5}$ signifikant erhöht ($P = 5 \%$). Die erhöhte Frequenz von Ade⁻ Ura⁻ His⁻-Kolonien kann entweder durch vermehrtes Auftreten von Crossover-Ereignissen oder durch eine Induktion des Verlustes des *URA3/kanMX4*-Kassette tragenden Chromosoms entstanden sein. Für die erste Erklärung spricht die in Kontrolle und Versuchen unveränderte Häufigkeit von Trp-Auxotrophen ($1,8 - 2,3 \times 10^{-7}$), die außer durch Mutationen auch durch Chromosomenverluste entstehen können.

3.5.6 Wirkung von Anilin auf DAN

Anilin muss aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit in Ethanol gelöst verwendet werden (siehe 2.1.5). Deshalb wurde zusätzlich zur Inaktivierung durch Anilin auch die inaktivierende Wirkung von Ethanol getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-14 zusammengefasst.

Tabelle 3-14: Inaktivierung durch Anilin und Ethanol

Konzentration von Anilin	Titer ($\times 10^7$)	Überlebende in %
0 (10 μ l Ethanol/ml)	9,65	101
5 mg/ml	7,35	77
7,5 mg/ml	7,65	81
10 mg/ml	3,0	31
0 (ohne Ethanol)	9,5	100

Bei den Mutagenese-Experimenten wurden wieder die Klone DAN1, DAN2 und DAN3 verwendet. Die Konzentration von Anilin lag bei 10 mg/ml, das entsprach 0,11 mM. In Tabelle 3-15 und 3-16 sind die Ergebnisse der Mutagenese aufgeführt.

Tabelle 3-15: Frequenz der Auxotrophen nach Anilin-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-MM und 5-FOA-SM; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^r	1,28	0,95	1,80	1,34 \pm 0,43
Ura ⁻	1,45	1,34	1,31	1,37 \pm 0,07
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	2,25	1,52	1,27	1,68 \pm 0,51
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,14	0,23	0,12	0,16 \pm 0,06
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	14,7	10,6	9,2	11,5 \pm 2,9
Anilin				
Ura ⁻ G418 ^r	1,44	1,07	2,52	1,68 \pm 0,75
Ura ⁻	1,44	1,65	2,37	1,82 \pm 0,49
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	2,33	1,94	2,89	2,39 \pm 0,48
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,33	0,19	0,071	0,20 \pm 0,13
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	21	17,2	12,2	16,8 \pm 4,4
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻ Trp ⁻	< 0,11	< 0,10	0,15	< 0,15
Überlebende in %	65	60	52	59 \pm 6,6

Tabelle 3-16: Frequenz der Auxotrophen nach Anilin-Behandlung (spontan und induziert); Selektion 5-FOA-SM und 5-FAA; ($\times 10^{-6}$)

Kontrolle	DAN1	DAN2	DAN3	Mittelwert \pm Std.abw.
Ura ⁻ G418 ^r	0,41	0,87	0,47	0,58 \pm 0,25
Ura ⁻ G418 ^s	0,81	1,49	1,53	1,28 \pm 0,40
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	1,33	1,24	2,12	1,56 \pm 0,48
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,06	< 0,12	< 0,12	< 0,06
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	12,3	20,4	18,2	17,0 \pm 4,2
Trp ⁻	6,96	4,97	1,18	2,28 \pm 2,34
Anilin				
Ura ⁻ G418 ^r	0,83	1,03	0,62	0,83 \pm 0,21
Ura ⁻ G418 ^s	2,14	2,05	1,44	1,88 \pm 0,38
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^r	3,10	1,88	2,27	2,42 \pm 0,62
Ade ⁻ Ura ⁻ G418 ^s	0,12	< 0,17	< 0,21	< 0,12
Ade ⁻ Ura ⁻ His ⁻	19,5	26,5	17,7	21,2 \pm 4,6
Trp ⁻	2,38	1,71	1,65	1,91 \pm 0,41
Überlebende in %	49	73	57	59 \pm 12

Die Zellen wurden durch die Einwirkung von Anilin in einem Bereich zwischen 27 % und 51 % inaktiviert. Die Häufigkeit der meisten Phänotypen wurde durch die Anilin-Behandlung leicht erhöht. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse dient das Balkendiagramm in Abbildung 3-36, in dem die Häufigkeiten der Phänotypen Ura⁻ G418^r, Ade⁻ Ura⁻ G418^r, Ade⁻ Ura⁻ His⁻ und Trp⁻ festgehalten sind.

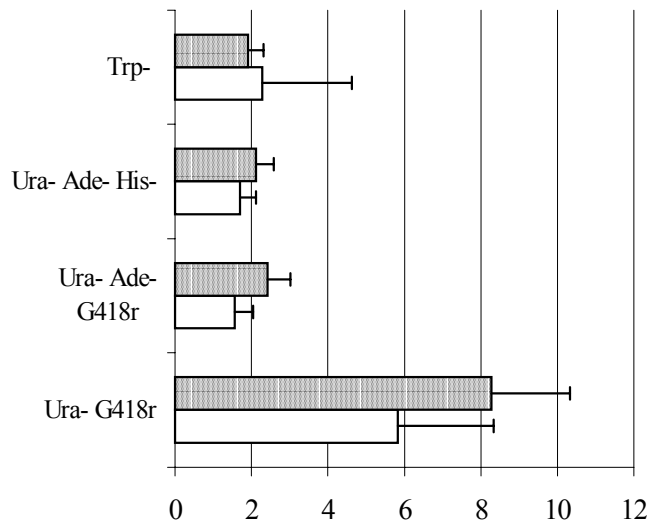


Abbildung 3-36: Balkendiagramm der im zweiten Experiment selektierten Phänotypen nach Behandlung mit Anilin; schraffiert: Anilin; weiß: Kontrolle

Laut t -Test ($P = 5\%$) konnte im ersten Experiment eine signifikante Erhöhung des Auftretens von durch Mutationen und SGCs verursachten $\text{Ura}^- \text{G418}^r$ -Kolonien durch Anilin beobachtet werden. Sowohl bei den $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^r$ -Phänotypen als auch bei den $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^s$ -Phänotypen konnte eine geringfügige jedoch nicht signifikante Induktion beobachtet werden. Das könnte bedeuten, dass Genkonversionsereignisse verstärkt aufgetreten könnten oder das Anilin großräumige Mutationen induzieren könnte. Durch Crossover induzierte $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{His}^-$ -Kolonien kamen bei den Kontrolleexperimenten ($1,15 \times 10^{-5}$) seltener vor als nach der Behandlung mit Anilin (2×10^{-5}). Diese Werte spiegeln aber keinen signifikanten Anstieg wider. Das Vorkommen von Trp^- -Kolonien (hervorgerufen durch Chromosomenverluste und/oder TRP -Mutation) wurde durch die Behandlung mit Anilin nicht beeinflusst.

3.5.7 Wirkung von MNNG, UV-Strahlung, EB, Benomyl und Anilin auf HAN

Zunächst wurde die inaktivierende Wirkung von MNNG auf den Stamm HAN getestet. Daher wurden die Zellen des Stammes in YNB+Trp-Minimalmedium angezogen. Die weitere Behandlung wurde wie bereits für den diploiden Stamm beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung der Inaktivierung nach MNNG-Behandlung wurden die Zellen nur auf Vollmedium ausplattiert und nach 3 Tagen Inkubation ausgewertet. In dem Diagramm der Abbildung 3-37 sind die Zahlen der KBE prozentual zu der verwendeten Konzentration von MNNG angegeben.

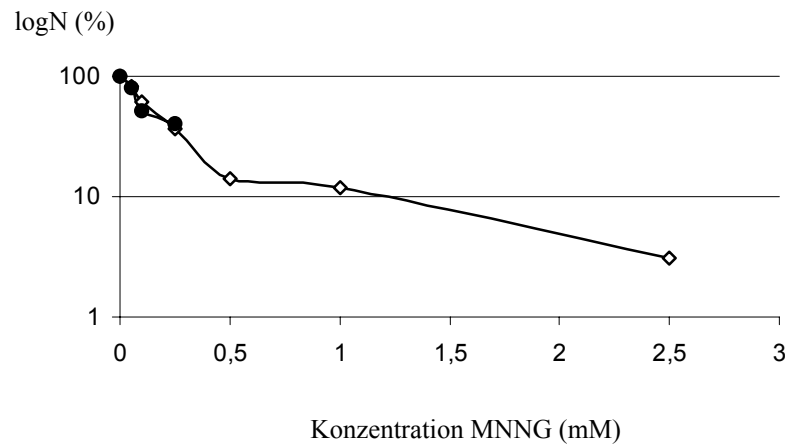


Abbildung 3-37: Inaktivierung der Stämme HAN (Kreise) und DAN (Rauten) durch MNNG

Bei der Verwendung einer 0,1 mM MNNG-Lösung wurde etwa die Hälfte der Zellen inaktiviert. Bei einer Konzentration von 0,25 mM MNNG wurden 60 % der Zellen abgetötet. Da diese Ergebnisse mit denen des Stammes DAN (Abb. 3-37) vergleichbar waren, wurden auch im haploiden Stamm HAN die gleichen Konzentrationen für die Mutagenese verwendet. MNNG wurde mit einer Konzentration von 0,25 mM eingesetzt, EB mit 0,25 mM, Anilin mit 0,11 mM und Benomyl mit 0,1 mg/ml. Die mit den Mutagenen behandelten Zellen wurden zur Bestimmung der Inaktivierung auf Vollmedium und zur Selektion auf YNB-5-FOA+Ura+Trp-Platten ausplattiert und zur Bestimmung des Phänotyps auf unterschiedlich supplementierte YNB-Minimalmedien gestempelt. Nach Inkubation der Zellen konnten allein Ura⁻-Kolonien und keine weiteren Phänotypen detektiert werden. In Abbildung 3-38 sind die Häufigkeiten der selektierten Kolonien in ein Diagramm eingetragen.

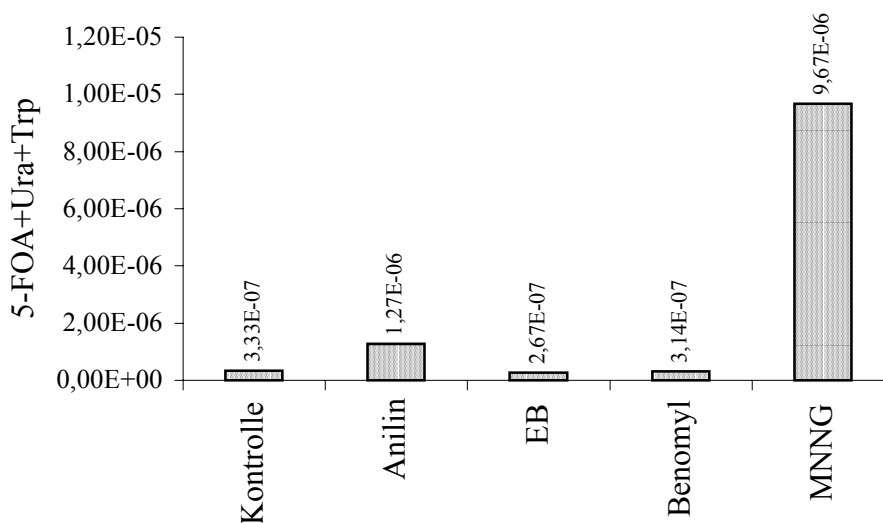


Abbildung 3-38: Häufigkeit Ura⁻ Kolonien nach Behandlung mit Anilin (0,11 mM), EB (0,25mM), Benomyl (0,1 mg/ml), MNNG (0,25 mM); Selektion auf YNB+5-FOA+Ura+Trp

Weder mit Ethidiumbromid noch mit Benomyl wurde die Anzahl der Ura⁻-Kolonien erhöht. Die Häufigkeit lag bei allen drei Versuchsansätzen (Kontrollversuch, EB, Benomyl) bei ca. 3×10^{-7} . Benomyl führt zu Chromosomenverlusten (ALBERTINI (1991), was bei einem haploiden Stamm eine letale Wirkung hätte. Es entsprach daher der Erwartung, dass mit diesem Mutagen bei dem Stamm HAN, der allein Vorwärtsmutationen detektieren sollte, keine mutagene Wirkung zu beobachten war, obwohl nur 71 % der eingesetzten Zellen nach der Behandlung überleben konnten. Ethidiumbromid schädigt irreversibel die Mitochondrien (WHITTAKER *et al.*, 1972). Eine zweifelsfreie mutagene oder rekombinogene Wirkung auf das Kerngenom ist jedoch nicht eindeutig bewiesen, so dass wie vermutet, das vermehrte Auftreten Ura⁻-Kolonien bei dem Stamm HAN nicht durch EB induziert wurde. Durch die Behandlung mit dem methylierenden MNNG wurde die spontane Rate sogar auf das 30fache vergrößert (72 % Inaktivierung). Nach der Behandlung mit Anilin (81 % Inaktivierung) wurden etwa viermal mehr Ura⁻-Kolonien gefunden als bei der mit Wasser behandelten Kontrollprobe.

In einem separaten Experiment wurde die Wirkung von UV-Strahlung auf den Stamm HAN getestet. Hierbei wurde dieselbe Bestrahlungsdosis wie bei dem Stamm DAN gewählt (3,5 Minuten bei 20 cm Lampenabstand). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-17 zusammengestellt. UV-Strahlen induzieren im Stamm HAN Ura⁻-Mutationen jedoch nicht Ade⁻ Ura⁻-, Ade⁻ Ura⁻ G418^r-, Ade⁻ Ura⁻ G418^s- oder Ade⁻ Ura⁻ His⁻-Phänotypen. Deshalb kann dieser Stamm für die Bestimmung der Mutationsfrequenz genutzt werden, die auch dazu dient, die Frequenzen von Mutationen und kleinen Genkonversionen im Stamm DAN zu differenzieren.

Tabelle 3-17: Wirkung von UV-Strahlung auf den Stamm HAN; Selektion auf YNB+5-FOA+Ura+Trp

	Kontrolle	UV
Ura ⁻	$7,5 \times 10^{-7}$	$3,3 \times 10^{-4}$
Überlebende in %	100	14

3.5.8 Charakterisierung einiger auxotrophen Mutanten / Rekombinanten

Wie aus Tabelle 3-3 ersichtlich, können Ura⁻- und Trp⁻-Kolonien bei dem Stamm DAN durch unterschiedliche Ereignisse hervorgerufen werden. So wurden die Kolonien Ura⁻ G418^r spontan auf 5-FOA-MM und 5-FOA-SM mit Frequenzen zwischen $0,7 - 1,3 \times 10^{-7}$ beobachtet. Es stellt sich die Frage, ob diese Phänotypen durch Vorwärtsmutationen oder kurze Genkonversionen entstanden sind. Mit Hilfe eines Reversionstests und der PCR-Analyse

sollte diese Frage beantwortet werden. Ade⁻ Ura⁻ His⁻-Kolonien können entweder durch ein Crossover-Ereignis oder durch den Verlust des *URA3/kanMX4*-Kassetten tragenden Chromosoms verursacht werden. Auch hier liefert die PCR-Analyse mit geeigneten Primer-Paaren eine Möglichkeit, um das Verhältnis von Crossover-Ereignissen zu Chromosomenverlusten zu bestimmen. Weiterhin können Trp⁻-Kolonien entstehen, wenn das *TRP1*-tragende Chromosom in der Mitose verloren gegangen ist oder wenn die Sequenz des *TRP1*-Gens aufgrund von Vorwärtsmutationen verändert wurde. Welches Ereignis zu dem Phänotyp geführt hat, kann man entscheiden, wenn man mittels PCR-Analyse die Anzahl der *PHO80*-Allele im jeweiligen Klon bestimmt.

3.5.8.1 Stabilität von Ura⁻-Kolonien aus dem Stamm DAN

Charakteristisch für Punktmutationen ist ihre Neigung zu revertieren. Punktmutationen im *URA3*-Locus revertieren spontan mit einer Rate von $2-5 \times 10^{-7}$ pro Generation (ACUNA *et al.*, 1994). Die Reversion mitotischer Genkonversionen ist äußerst unwahrscheinlich. Die Bestimmung der Stabilität der Uracil-Auxotrophie sollte nun einen Hinweis darauf liefern, um die Art des „DNA-Schadens“ zu bestimmen.

Zum Test der Reversion wurden je 6 Uracil-auxotrophe Klone, die auf 5-FOA-MM selektiert worden waren, verwendet. Die Klone wurden unter nichtselektiven Bedingungen im Vollmedium angezogen. 1×10^9 Zellen wurden auf Minimalmedium ausplattiert und nach 14 Tagen ausgezählt. Von 90 untersuchten spontan entstandenen Ura⁻-Kolonien revertierten 11 Klone mit Häufigkeiten zwischen 4×10^{-9} und 6×10^{-8} . Das entspricht einem Wert von ca. 12 %. Bei den 90 nach Mutagenbehandlung (18 MNNG-, 18 EB-, 18 Benomyl-, 18 UV- und 18 Anilin-behandelt) erhaltenen Kolonien bewegte sich die Revertantenrate in der gleichen Größenordnung wie bei den spontan Uracil-auxotrophen Kolonien. Da über 80 % der Ura⁻-Kolonien einen stabilen Phänotyp aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass ein großer Anteil der mit dem 5-FOA-MM isolierten Kolonien nicht durch Vorwärts-Punktmutationen entstanden ist.

3.5.8.2 PCR-Charakterisierung von Ura⁻-Kolonien mittels PCR

Um das Ergebnis der Reversion zu untermauern, wurden 10 Klone ausgewählt, deren Stabilität im vorausgegangenen Experiment bestimmt worden war. Es handelte sich hierbei um spontan entstandene Ura⁻-Klone der Stämme DAN1 (Nr.1-6) und DAN2 (Nr. 7-10). Die DNA dieser Klone wurde isoliert und mit unterschiedlichen Kombinationen von Primern eingesetzt. Tabelle 3-18 und Abbildung 3-39 geben einen Überblick über die verwendeten

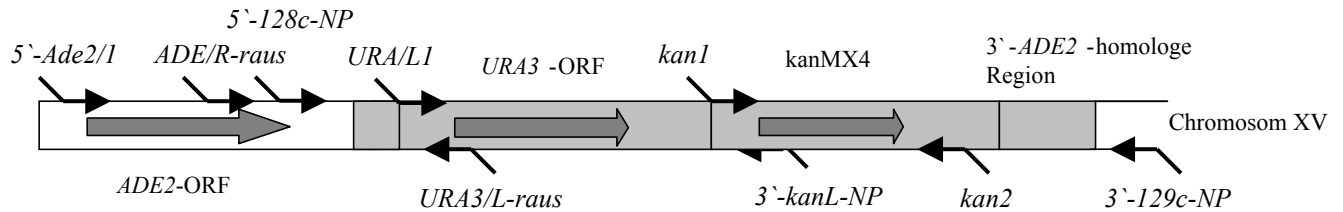


Abbildung 3-39: Schematische Darstellung der zur Charakterisierung von Ura⁻-Klonen verwendeten Primer; URA3/kanMX4-Insertionskassette ist schraffiert dargestellt

Primer und die erhaltenen Amplifikate. Die Dokumentationen der Elektrophoresen sind in Abbildung 8-1 – 8-7 im Anhang zusammengestellt.

Bei den Klonen 3 und 4 konnte die URA3/kanMX4-Kassette mittels PCR-Analyse nachgewiesen werden. Bei Klon 3 handelte es sich um einen Klon, der mit einer Frequenz von 3×10^{-8} revertierte. Es ist daher wahrscheinlich, dass dieser Klon durch eine Punktmutation entstanden ist. Da Klon 4 stabil Ura⁻ war, könnte dieser Phänotyp durch eine kurze Deletion oder eine Inversion entstanden sein, die keine prägnanten Unterschiede im PCR-Muster verursachen würden.

Tabelle 3-18: Primer zur Charakterisierung von Ura⁻-Kolonien und Ergebnisse der PCR am Template der genomischen DNA von 10 Ura⁻-Klonen, die auf 5-FOA-MM selektiert wurden

Primer 1	Primer 2	Amplifikat bei Klon Nr.
5'-128c-NP	3'-kanL-NP	3 + 4
5'-Ade2/1	3'-kanL-NP	keine Amplifikate
AdeR-raus	UraL-raus	3 + 4
AdeR-raus	3'-kanL-NP	3 + 4
kan1	kan2	3 + 4
5'-128c-NP	3'-129c-NP	1820 bp: 1-10 (Chromosom ohne URA3/kanMX4-Kassette) 4213 bp: 3 + 4 (Chromosom mit URA3/kanMX4-Kassette)*

*: Für dieses Experiment wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) verwendet. Alle anderen PCR-Amplifikationen wurden mit der Taq-Polymerase durchgeführt.

Bei den Klonen 1, 2 und 5-10 konnte die URA3/kanMX4-Kassette jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Mit dem Primer-Paar 5'-128c-NP / 3'-129c-NP konnte eine Deletion der Kassette, welche ein 833 bp langes Amplifikat zur Folge gehabt hätte, nicht verifiziert werden. Somit kann bei einer Mehrzahl der auf 5-FOA-MM selektierten Ura⁻-Klone eine Punktmutation im URA3-Gen oder eine Deletion der Kassette als Ursache ausgeschlossen werden.

3.5.8.3 PCR-Charakterisierung von *Ade⁻ Ura⁻ His⁻*-Kolonien aus dem Stamm DAN

Möglicherweise entstanden die *Ade⁻ Ura⁻ His⁻*-Kolonien durch Chromosomenverluste oder durch mitotisches Crossover. Wurde dieser Phänotyp durch den Chromosomenverlust verursacht, so konnte der Stamm DAN nur das disruptierte Allel von *PHO80* tragen, in das das *TRP1*-Gen inseriert war. Wurde dieser Phänotyp jedoch durch mitotisches Crossover erzeugt, so beinhalten die Zellen zwei Allele des *PHO80*-Locus (Abb. 3-40 A). Zur Überprüfung der *PHO80*-Allele wurde die DNA von je 20 spontan entstanden Klonen und 20 nach MNNG-Behandlung isolierten Klonen als Template in die PCR Reaktion mit den Primern 5`-*pho1/SacI* und 3`-*pho2/SphI* verwendet.

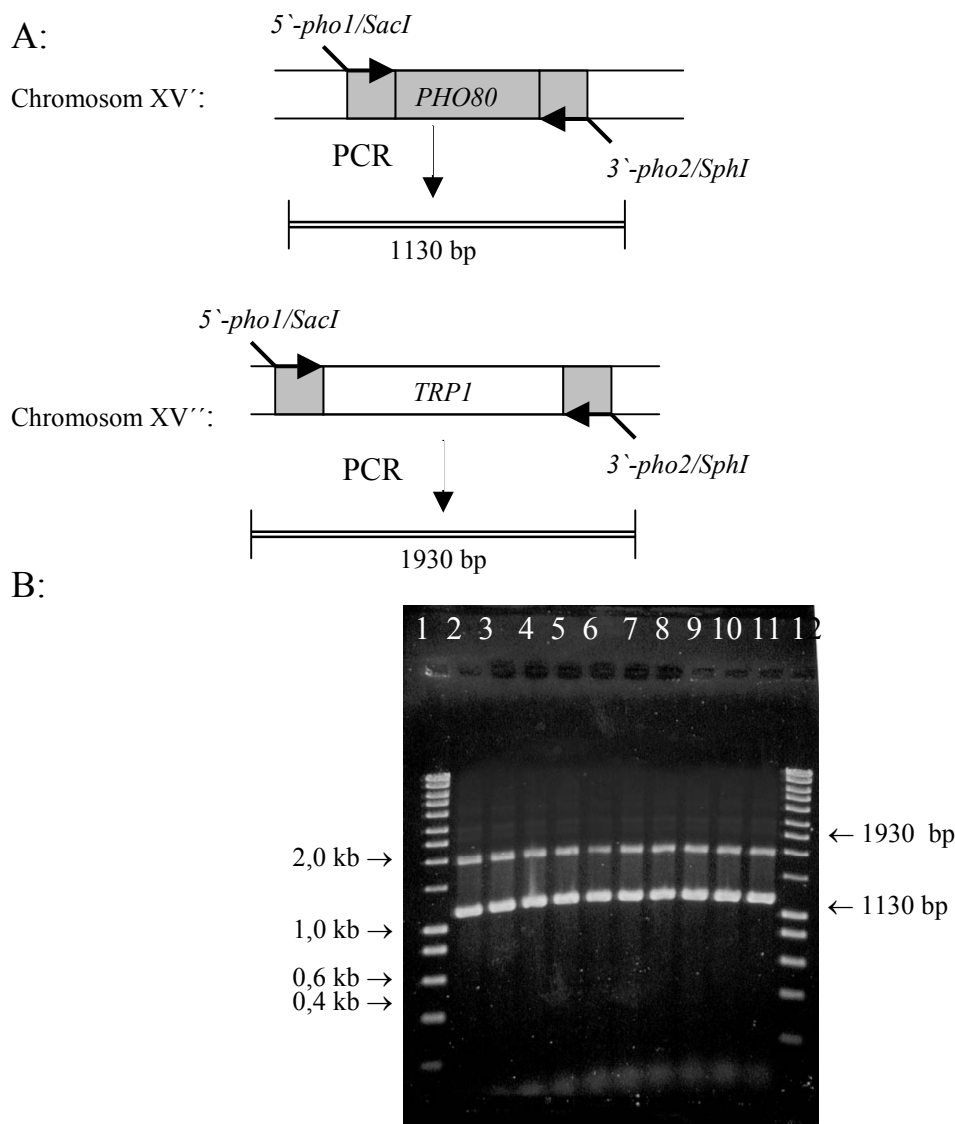


Abbildung 3-40: A: Schematische Darstellung des Nachweises von *PHO80* in *Ade⁻ Ura⁻ His⁻*-Kolonien; grau: *PHO80* homologe Region; B: Gelelektrophorese von PCR-Produkten von 10 Klonen (Spur 2-11) aus dem Kontrollversuch des ersten Mutagenese-Experiments von DAN1 mit den Primern 5`-*pho1/SacI* / 3`-*pho2/SphI*; Marker: Hyperladder I (Bioline) (Spur 1 + 12)

Abbildung 3-40 B zeigt die erhaltenen Amplifikate von 10 Klonen nach elektrophoretischer Trennung. Wie bei den 10 Klonen aus Abb. 3-40 B waren bei allen 40 getesteten Kolonien mit den Primern 5`-*pho1/SacI* und 3`-*pho2/SphI* zwei Produkte entstanden. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Phänotyp Ade⁻ Ura⁻ His⁻ bei allen getesteten Klonen wahrscheinlich durch ein mitotisches Crossover entstanden ist.

3.5.9 Charakterisierung von Trp⁻-Kolonien

Trp⁻-Kolonien, die aus dem Stamm DAN entstanden sind und auf 5-FAA-Medium selektiert wurden, könnten durch einen Chromosomenverlust von Chromosom XV, auf dem das *TRP1*-Gen im *PHO80*-Leserahmen inseriert wurde, oder durch eine Mutation im *TRP1*-Leserahmen entstanden sein. Mit Hilfe einer PCR-Reaktion mit den Primern 5`*pho1/SacI* und 3`*pho2/SphI* wurde bei 20 Klonen geprüft, ob der *PHO80*-Leserahmen in 2 Allelen (Wildtyp oder mit *TRP1*) in der genomischen DNA der Klone vorhanden war (Abb. 3-40 A). Es wurden 10 Klone aus dem Kontrollexperiment des zweiten Anilin-Mutagenese-Experiments verwendet sowie 10 weitere Klone, die nach Anilin-Behandlung selektiert worden waren. Die Produkte der PCR-Analyse wurden im elektrophoretischen Feld getrennt und sind in Abbildung 3-41 dargestellt. Bei 18 der getesteten Klone (1-10, 12-17, 19-20) wurde mit den Primern 5`*pho1/SacI* und 3`*pho2/SphI* nur das 1130 bp große Amplifikat gebildet. Bei den Klonen 11 und 18 entstand zusätzlich noch ein zweites 1930 bp großes Amplifikat. Bei diesen beiden Klonen wurde die Tryptophan-Auxotrophie offenbar durch eine Punktmutation im *TRP1*-Leserahmen ausgelöst. Bei 18 von 20 getesteten Klonen (90 %) wurde die Auxotrophie wahrscheinlich nach einem Chromosomenverlust exprimiert.

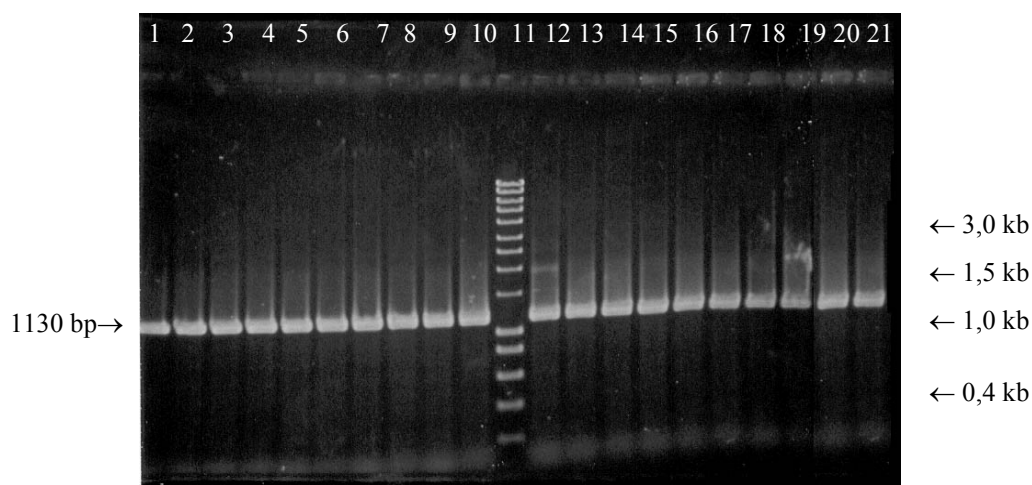


Abbildung 3-41: Gelelektrophoretische Auftrennung von Amplifikaten der Primer 5`*pho1/SacI* und 3`*pho2/SphI* an der genomischen DNA von 10 Klonen des Kontrollexperimentes der parallel zur Anilin-Behandlung durchgeführt wurde (**Spur 1-10**) und 10 Klonen der Anilin-behandelten Zellen (**12-21**) nach Selektion auf 5-FAA; Marker: Hyperladder I (**Spur 11**)

4 Diskussion

4.1 Transformationseffizienz beeinflussende Faktoren

Zur Konstruktion der Stämme wurden bei *S. cerevisiae* etablierte Methoden der Integrationsmutagenese verwendet. Überraschenderweise führten diese Methoden nicht in jedem Falle zum gewünschten Ergebnis. In einigen Fällen wurde auch eine relativ hohe Rate von ektopischen Integrationen beobachtet. Im Folgenden werden Faktoren, die zu diesen unerwarteten Resultaten geführt haben, diskutiert. Sie betreffen hauptsächlich die Sequenz und die Länge der zu den jeweiligen Zielsequenzen homologen Region der Integrations-Kassetten.

4.1.1 Länge der homologen Regionen der Integrationskassette

Bei der Konstruktion der Stämme H7 und HAN konnte der Einfluss der Länge von homologen Flanken auf die Integration eines Selektionsmarkers bzw. die Disruption eines Leserahmens beobachtet werden. Da MANIVASAKAM *et al.* (1995) nachweisen konnten, dass bei *S. cerevisiae* schon 30 bp lange Flanken zur Zielregion für die Insertion eines Markergens ausreichen, wurden in dieser Arbeit zum einen kurze Flanken von 50 bp in Verbindung mit dem „Marker-Rescue“-System (GÜLDENER *et al.*, 1996) für Disruptionsversuche bei den Genen *URA3*, *TRP1* und *HIS3* benutzt, zum anderen erfolgte die Anwendung der SFH-Methode (WACH *et al.*, 1994) in Versuchen zur Integration von *TRP1* in *PHO80*. Bei der Verwendung des „Marker-Rescue“-Systems wurde die Integration des loxP-kanMX4-loxP-Moduls bei 4 - 18 Transformanten/ μ g DNA erreicht. GÜLDENER *et al.* (1996) gelang es, 10 – 100 Transformanten/ μ g DNA zu erhalten; damit liegt die in dieser Arbeit gefundene Transformationseffektivität in der gleichen Größenordnung.

Um mit der SFH-Methode eine möglichst effiziente Integration des *TRP1*-Selektionsmarkers in den *PHO80*-Lokus zu erreichen, wurden 50 bp lange *PHO80*-Flanken – wie von WACH *et al.* (1994) vorgeschlagen – mit Hilfe der PCR-Methode an das *TRP1*-Gen fusioniert. Der resultierende Vektor führte mit einer Effizienz von 139 Kolonien/ μ g zur Transformation. Allerdings konnte eine Disruption von *PHO80* mit dieser Methode nicht erreicht werden. Mit Hilfe von PCR-Reaktionen wurde zwar bei allen Transformanten das *TRP1*-Gen nachgewiesen, jedoch wurde bei keinem der 139 Klone eine homologe Integrierte gefunden. Demnach ist es wahrscheinlich bei diesen Experimenten zu ektopischen Integrationen des Vektors gekommen. Allerdings ist es schwer zu erklären, warum die Methode zur Konstruktion des Vektors die homologe Integrationseffektivität beeinflussen sollte. Das

könnte nur der Fall sein, wenn die Flanken des Integrationsvektors nicht die korrekten homologen Sequenzen besessen haben, was jedoch nicht weiter analysiert wurde. Eine andere Möglichkeit ist, dass die homologe Integrationseffektivität von Vektoren mit kurzen Homologien zum Target in dieser sehr centromernahen Region geringer ist als in anderen Bereichen eines Chromosoms.

In weiteren Versuchen wurde ein Vektor mit langen Flanken mittels Klonierung zur Disruption des *TRP1*-Gens hergestellt. WACH (1996) führte an, dass durch die Verwendung langer flankierender Regionen (5'-Flanke: 400 bp bzw. 720 bp und 3'-Flanke: 300 bp) mit dem Selektionsmarker-Modul kanMX4 eine 30 – 50fache Erhöhung der Effizienz gegenüber der Verwendung kurzer Flanken festzustellen war, was einer Transformationsrate von 30 – 500 Transformanten/μg DNA entsprach. Nachweislich führen Flanken mit einer Länge über 200 bp zu einer höheren Transformationseffizienz (GRAY und HONIGBERG, 2001). Auch in dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Verwendung langer Flanken zur Integration von *TRP1* in *PHO80* effizienter war als die Verwendung kurzer Flanken. Mit dem durch Klonierung hergestellten Integrationsvektor konnten 41 Trp⁺ Klone/μg DNA selektiert werden. Die bei der Konstruktion des Stammes H7 erreichte Transformationseffektivität bewegt sich somit im unteren Bereich der von WACH (1996) beschriebenen Werte. Bei einem von acht untersuchten Klonen wurde die korrekte Integration und gleichzeitige Disruption von *PHO80* nachgewiesen. Das entspricht immer noch einer für *S. cerevisiae* geringen Rate der homologen Integration von 12,5 %. Möglicherweise ist das auch eine Folge der sehr centromernahen Lage von *PHO80*.

In weiteren Versuchen sollte die Disruption des *URA3*-Gens allein durch die Transformation von einem Vektor mit langen homologen Regionen (ohne zusätzlichen Selektionsmarker) erfolgen. Ausgehend von erfolgreichen Verwendungen der LFH-Kassette hatte WACH (1996) diese Methode zur Disruption des *URA3*-Gens bei *S. cerevisiae* vorgeschlagen. Die Selektion der Transformanten wurde auf 5-FOA-Medium durchgeführt. Überraschenderweise konnten mit dieser Methode aber keine *URA3*-Disruptanten selektiert werden. Das lag nicht an der mangelnden Aufnahmefähigkeit der Zellen für DNA, denn mit autonomen Vektoren waren sie, wie beschrieben, sehr effektiv transformierbar. Aus unbekanntem Gründen fand offensichtlich keine homologe Integration statt, obwohl die Flanken des Vektors lange Homologien zum Target besaßen.

Für die Integration der *URA3/kanMX4*-Kassette distal zum *ADE2*-Gen wurde ein Vektor erfolgreich verwendet, der eine kurze (46 bp) 5'- und eine lange (428 bp) 3'-*ADE2*-Flanke besaß. Nach der Transformation in Stamm HA $\Delta ura3 \Delta trp1$ wurden 10 Ura⁺ G418^r-Transformanten/ μ g DNA selektiert. Bei fünf Transformanten wurde die Kassette ektopisch, bei einer Transformante homolog in $\Delta ura3$ und bei vier Transformanten homolog distal zu *ADE2* integriert. Das entsprach einer homologen Integrationseffektivität von 5 μ gDNA⁻¹, und war damit genauso effektiv wie die *TRP1*-Integration bei der ein Vektor mit zwei langen Flanken eingesetzt wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung von GRAY und HONIGBERG (2001), dass nur eine lange homologe Flanke für eine effiziente Integration ausreicht.

4.1.2 Sequenz der flankierenden Regionen

GRAY und HONIGBERG (2001) konnten nachweisen, dass die Transformationseffizienz abhängt vom GC-Gehalt der homologen Regionen. Sie verwendeten einen GC-Gehalt, der zwischen 35 bis 48 % lag. Mit steigendem GC-Gehalt nahm auch die Transformationsrate zu. Wurde der GC-Gehalt jedoch auf über 50 % gesteigert, so beeinflusste das die Transformationseffizienz kaum. Bei GC-Gehalten zwischen 40 und 50 % wurden die höchsten Ausbeuten erreicht. Die Autoren vermuteten, dass die Effizienz durch die stärkere Bindung zwischen GC im Vergleich zu AT Basen beeinflusst wird. Entweder kommt es zu einer stärkeren Assoziation zwischen den homologen Bereichen der Disruptionskassette und des Chromosoms oder es kommt zu einer Hemmung der Mismatch-Reparatur. Enzyme der Mismatch-Reparatur inhibieren die Rekombination schon zwischen Bereichen mit geringen Unterschieden in der DNA-Sequenz (GUPTA *et al.*, 1999). Dadurch kann auch die Effizienz eines Disruptionsversuches beeinflusst werden. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Disruptionen des *URA3*-, *TRP1*- und *HIS3*-Gens wurden homologe Flanken mit einem GC-Gehalt von 43 – 55 % verwendet. Bei der Disruption vom *TRP1*-Gen wurde mit 18 Transformanten/ μ g DNA die höchste Effizienz erreicht. Bei diesem Experiment lag der GC-Gehalt der 5'-flankierenden Region mit 48 % und der 3'-Flanke mit 43 % im optimalen Bereich. Bei den Versuchen zur Integration des *TRP1*-Gens in *PHO80* lag der GC-Gehalt der homologen Regionen auch im Optimum von 42 bzw. 44 %. Trotzdem führte diese Methode nicht zum erwarteten Ergebnis.

GRAY und HONIGBERG (2001) zeigten, dass vor allem die 5'-Enden des Vektors identisch mit der Zielsequenz sein müssen, um eine homologe Integration mit hoher Effizienz zu erreichen. Auch WACH (1996) betont, dass der Erfolg der Disruption mit Vektoren, die

kurzen homologen Flanken beinhalten, von der Sequenzgenauigkeit abhängt. Er zeigte, dass kleinste Sequenzungenauigkeiten die Disruption unterbinden. Es kann sein, dass solche kleinen Abweichungen in der Sequenz auch bei den Versuchen der Integration des *TRP1*-Gens in *PHO80* eine Rolle gespielt haben. Für das Primerdesign bei der SFH-Methode wurden Datenbank-Sequenzen benutzt, die nicht unbedingt mit den Sequenzen des Stammes MCC109 übereinstimmen müssen.

4.2 Validierung des Testsystems HAN/DAN

4.2.1 Spontane Frequenzen

Spontane Veränderungen der DNA-Sequenz spielen eine wichtige Rolle in der Evolution. Sie entstehen als Konsequenz von intrazellulären Ereignissen wie zum Beispiel bei der Replikation, Reparatur, Rekombination oder durch die Transposition von beweglichen Elementen (RAMEL 1989). Es gibt unterschiedliche *in vivo* Mutagenese-Testsysteme, die verschiedenartige Veränderungen detektieren können. In folgendem Abschnitt wurde ein Vergleich der in den Testerstämmen HAN und DAN erhaltenen Ergebnisse mit den aus der Fachliteratur bekannten Daten vergleichbarer Testsysteme vorgenommen.

Die Gesamtzahl aller spontan beim Stamm DAN entstehenden 5-FOA-Resistenten wird ebenso wie beim Stamm YA72 (ACUNA *et al.*, 1994) durch verschiedene genetische Ereignisse bestimmt. In die Zahl gehen die Häufigkeiten von Vorwärtsmutationen, Genkonversionen, mitotischen Crossover-Ereignissen und Chromosomenverlusten ein, die in einem *Ura⁻*-Phänotyp resultieren. Darüber hinaus entstehen prototrophe 5-FOA-Resistente mit einer Häufigkeit von ca. 1×10^{-7} (BOEKE *et al.*, 1984). Der Vergleich der Gesamtzahlen der 5-FOA-Resistenten zwischen den beiden Stämmen ergibt, dass sie beim Stamm DAN mit geringerer Frequenz ($2,1 \times 10^{-5}$) auftreten als ACUNA *et al.* (1994) für den Stamm YA72 (ca. 4×10^{-4}) beschrieben haben. Dieser Unterschied kann darauf beruhen, dass beide Stämme heterogen sind.

Die geringeren Frequenzen von DAN können aber auch damit zusammenhängen, dass dieser Stamm homozygot für den Paarungstyp ist (α/α), es sich bei dem Stamm YA72 jedoch um einen heterozygoten *a*/ α -Stamm handelt. Schon FRIIS und ROMAN (1968) haben beschrieben, dass bei *a/a*- bzw. α/α -Stämmen die mitotische Rekombinationsrate niedriger ist als bei heterozygoten Stämmen. Ein weiterer Faktor, der bei *a*/ α -Stämmen zu höheren Frequenzen führen könnte, ist die Fähigkeit zu sporulieren. ZIMMERMANN (1984) konnte

zeigen, dass Zellen, die sehr lange oder mit einer hohen Dosis eines Mutagens behandelt wurden, sporulieren und so erhöhte Rekombinationsraten detektiert wurden. Bei dem hyperhaploiden a-Stamm LBL1 (ESPOSITO *et al.*, 1982) wurden Cycloheximid-resistente Kolonien mit einer Frequenz von $2,44 \times 10^{-5}$ isoliert. In dieser Zahl sind Vorwärtsmutations-, Genkonversions- und Crossover-Ereignisse auf dem Chromosom VII enthalten. Sie liegt in der gleichen Größenordnung wie die Gesamtrate der Ura⁻-Auxotrophen in dem Stamm DAN.

Mutationen, die die Uracil-Auxotrophie bei *S. cerevisiae* herbeiführen können, entstehen aufgrund zahlreicher Veränderungen der DNA-Sequenz. Der Austausch einer einzelnen Base könnte die Basenfolge so verändern, dass er zu einer Missense- oder Nonsense-Mutation führt. Weiterhin kann es durch den Einschub oder das Wegfallen einer Base zu einer Frameshift-Mutation kommen. Außerdem könnten kurze Deletionen, Inversionen oder Insertionen innerhalb der Sequenz des Promotors, des Leserahmens oder des Terminators veränderte Phänotypen hervorrufen. LEE *et al.* (1988) untersuchten die spontanen sowie UV-induzierten Vorwärtsmutationen bei *S. cerevisiae* im *URA3*-Lokus. Sie beobachteten keinen „hot spot“-Bereich für Mutationen in dieser Region. Die spontane Mutationsrate liegt nach LEE *et al.* (1988) bei ca. 2×10^{-6} . Im Gegensatz dazu fanden, HIRAOKA *et al.* (2000) eine weit geringere spontane Rate von 5-FOA-resistenten Mutanten bei dem haploiden Stamm YMH1. Sie betrug nur 4×10^{-7} . Auch im haploiden Stamm HAN konnte die Rate von Vorwärtsmutationen durch die Selektion Uracil-Auxotropher erfasst werden. Sie betrug $3 - 7,5 \times 10^{-7}$, was mit der von HIRAOKA ermittelten Rate vergleichbar ist.

Die Rate der Ura⁻ G418^r-Kolonien bei Stamm DAN, welche die Anzahl von Mutationen und SGCs (short gene conversion) widerspiegelt, betrug 1×10^{-6} . Eine indirekte Art der Differenzierung zwischen Mutationen und SGCs ergibt die Verwendung des Stammes HAN. Mittels Subtraktion der bei dem Stamm HAN erfassten Mutationsrate von der bei dem Stamm DAN erfassten Rate von Ura⁻ G418^r-Kolonien kann die ungefähre Häufigkeit von SGCs ermittelt werden. Diese Differenz beträgt 5×10^{-7} . Das ist vermutlich die Rate mit der SGCs entstehen. Kurze Genkonversionen machen nach Untersuchungen am Stamm TPX bis zu 10 % (4×10^{-7}) der mitotischen Genkonversionsereignisse bei *S. cerevisiae* aus (JUDD und PETES, 1988). Damit liegt der errechnete Wert im gleichen Bereich.

JUDD und PETES (1988) beschäftigten sich mit der Länge von meiotischen und mitotischen Genkonversionsereignissen. Sie fanden heraus, dass die in der Mitose konvertierten Bereiche bei mehr als 90 % der Genkonvertanten länger als 4 kb waren. Da sie in ihrem System keinen

klaren Anfangs- und Endpunkt dieser konvertierten Bereiche definieren konnten (genaue Aussagen waren nur bis 4,2 kb möglich), vermuteten sie, dass die mitotische Genkonversion ca. 4 - 10 kb umfasst. Wenn man nun die Phänotypen des Stammes DAN betrachtet, so kann man feststellen, dass mehrere Phänotypen durch MGCs (medium gene conversion) oder LGCs (long gene conversion) entstehen können, nämlich $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^r$, $\text{Ura}^- \text{G418}^s$ und $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^s$. Der Phänotyp $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^r$ wurde im Vergleich zu den anderen beiden Phänotypen mit der höchsten Frequenz ($1,8 \times 10^{-6}$) detektiert. $\text{Ura}^- \text{G418}^s$ -Kolonien, die vermutlich nach Genkonversionen in etwa gleichem Umfang wie $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^r$ über zwei Gene entstanden sind, wurden jedoch weniger häufig mit einer Rate von ca. $0,9 \times 10^{-6}$ erfasst. Gründe für unterschiedliche Konversionsraten können im Ausmaß der Sequenz-Heterologie von zwei Allelen liegen. So haben CHENOFF *et al.* (1984) sowie VINCENT und PETES (1989) gezeigt, dass die mitotische Genkonversionssequenz von dem Ausmaß der Mutation abhängt. Wenn ein Allel Insertionen oder Deletionen enthält, dann ist die Frequenz geringer als bei Punktmutationen. Diese Abhängigkeit kann aber im Falle des Stammes DAN nicht vermutet werden, da es sich bei dem Allel *ade2-101* um eine Punktmutation handelt (BRACHMANN *et al.*, 1998). Die geringere Rate dieser Ereignisse könnte aber mit der Insertion der *URA3/kanMX4*-Kassette distal zum *ADE2*-Gen zusammenhängen. Während es im Bereich der beiden *ADE2/ade2-101*-Allele auf beiden Chromosomen XV große Sequenz-Homologie gibt, fehlt diese vollkommen in Bezug auf die hemizygot auf einem homologen Chromosom vorliegenden *URA3*- und *kanMX4*-Allele. Die Initiation einer Genkonversion im Bereich dieser beiden Allele kann deshalb nur illegitim erfolgen. Der $\text{Ura}^- \text{G418}^s$ -Typ der Konvertanten beruht also im Gegensatz zu dem $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^r$ -Typ eher auf illegitimer Genkonversion und kommt vielleicht deshalb seltener vor, obwohl es sich um Konversionsereignisse mit etwa gleicher Größe handeln sollte. Die Häufigkeit der $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^s$ -Kolonien war noch geringer (2×10^{-7}) als die Rate von $\text{Ura}^- \text{G418}^s$ -Kolonien. Dieser Phänotyp entsteht wahrscheinlich durch LGCs (*ADE2-URA3-kanMX4*) und zeigt, dass im Stamm DAN umfassendere Genkonversionen über diese Distanz seltener vorkommen als mittlere.

Nach folgender Abhängigkeit lässt sich die Häufigkeit aller über Ura^- -erfassbaren Genkonversionsereignisse im Stamm DAN berechnen: $\text{Ura}^- \text{G418}^r$ (aus DAN) – $\text{Ura}^- \text{G418}^r$ (aus HAN) + $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^r$ (aus DAN) + $\text{Ura}^- \text{G418}^s$ (aus DAN) + $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^s$ (aus DAN). Diese Summe beträgt $3,6 \times 10^{-6}$.

JUDD und PETES (1988) detektierten eine Genkonversionsrate im a/α -Testerstamm TPX von insgesamt 4×10^{-6} . Beim Stamm LBL1 (ESPOSITO *et al.*, 1982) wurden Genkonversionen mit einer Häufigkeit von $1,45 \times 10^{-6}$ beobachtet. Diese Werte entsprechen der im Stamm DAN erhaltenen Frequenz von Genkonvertanten. Allerdings beobachtete ZIMMERMANN (1971) Genkonversion bei dem Stamm D7 mit einer Frequenz von $0,51 - 3,91 \times 10^{-5}$ in unbehandelten Kontrollproben (ZIMMERMANN, 1971), so dass bei diesem Stamm die Menge der isolierten Genkonvertanten um eine Zehnerpotenz höher lag als bei den Stämmen DAN und LBL1. Eine Möglichkeit der Erklärung für diese relativ starke Abweichung der spontanen Genkonvertanten-Frequenz des Stammes D7 von denen der anderen beschriebenen Stämme kann sein, dass es beim D7 keine Möglichkeit gibt gegen Fluktuationen der Konvertanten-Häufigkeit zu selektieren. Die Konvertanten werden dadurch erfasst, dass Tryptophan-Auxotrophe prototroph werden. Allerdings ist diese Konvertanten-Anreicherung auch beim Stamm LBL1 möglich und kann deshalb nicht die einzige Erklärung sein.

Die Erfassung von Crossover-Ereignissen sollte bei dem Stamm DAN mittels Selektion von $Ade^- Ura^- His^-$ -Kolonien erfolgen. Der Phänotyp $Ade^- Ura^- His^-$ konnte jedoch durch zwei unterschiedliche Ereignisse entstehen: Crossover oder Verlust des Homologs von Chromosoms XV. Um zu untersuchen, welches der beiden Ereignisse hauptsächlich zum Phänotyp der spontanen Segreganten geführt hat, wurden PCR-Analysen mit *PHO80*-spezifischen Primern mit der DNA mehrerer Segreganten durchgeführt. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass bei 40 untersuchten Klonen kein Chromosomenverlust stattgefunden hatte, weil beide *PHO80/\Delta pho80*-Allele detektiert werden konnten. Daraus folgt, dass Chromosomenverluste bei weniger als 2,5 % der $Ade^- Ura^- His^-$ -Kolonien zu diesem Phänotyp geführt haben. Es kann daher angenommen werden, dass die genetische Ursache für die spontane Entstehung dieses Phänotyps hauptsächlich Crossover-Ereignisse waren. Außerdem könnten seltene Ereignisse wie eine großräumige Deletion oder eine großräumige Genkonversion zu der Ausprägung des beobachteten Phänotyps führen. Diese sind aber nahezu zu vernachlässigen, da großräumige Deletionen laut HIRAOKA *et al.* (2000) bei *S. cerevisiae* weniger als 3 % der insgesamt selektierten genetischen Veränderungen in der DNA ausmachen. Auch die Genkonversion kann unberücksichtigt bleiben, da das Vorkommen von Genkonversionsereignissen dieser Länge extrem unwahrscheinlich ist. Der Abstand zwischen dem *ADE2*-Locus und dem *HIS3*-Gen liegt bei 54,5 cM (MORTIMER *et al.*, 1992), was einer Länge von 182 kb entspricht. Die Häufigkeit der spontan beobachteten Crossover-Ereignisse lag bei dem Stamm DAN bei $1,6 \times 10^{-5}$. Dieser Wert ist viel höher als

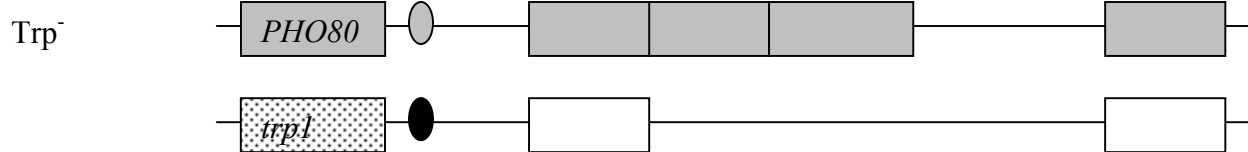
die Rate der Vorwärtsmutanten oder Genkonvertanten und entspricht 77 - 87 % aller spontan selektierten 5-FOA-resistenten Kolonien. ACUNA *et al.* (1994) wiesen spontane Crossover-Ereignisse in dem gleich langen DNA-Abschnitt zwischen Centromer und *ADE2*-Locus im Stamm YA72 mit einer deutlich höheren Frequenz von $4 - 9 \times 10^{-4}$ nach, wobei 82 % aller selektierten Phänotypen durch Crossover hervorgerufen worden waren. Das heißt, die relative Häufigkeit der Crossover-Produkte ist in beiden Stämmen gleich. Die höhere absolute Zahl dieser Ereignisse im Stamm YA72 ist wahrscheinlich in dem bereits oben hervorgehobenen Unterschied in der Konfiguration der Paarungstyp-Allele begründet. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass ZIMMERMANN *et al.* (1975), ähnlich wie ACUNA *et al.* (1994), im a/α -Stamm D7 das Auftreten von Crossover-Ereignissen im *ade2*-Locus mit einer Häufigkeit von $2,6 \times 10^{-4}$ beobachten.

Die Häufigkeit von Chromosomenverlusten sollte mittels Selektion von Tryptophan-auxotrophen Kolonien erfasst werden. Diese Selektion des Trp^- -Phänotyps gibt jedoch zunächst keinen eindeutigen Hinweis auf das verursachende genetische Ereignis. In Abbildung 4-1 sind die wahrscheinlichsten Ereignisse, die die Entstehung des Trp^- -Phänotyps verursachen können, zusammengestellt.

A: Chromosomenverluste



B: Mutation oder Genkonversion im *TRP1*



C: Crossover zwischen *PHO80* und Centromer

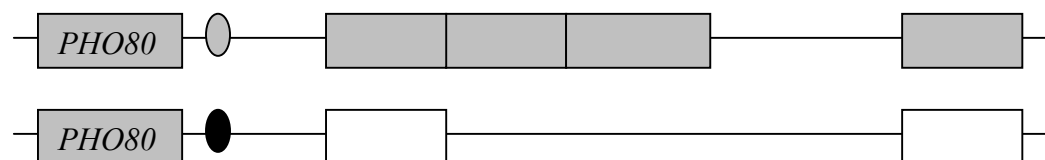


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung möglicher Konfigurationen von Chromosom XV in Trp^- -Phänotypen (nicht maßstabsgerecht)

Für die Untersuchung der Trp^- -Kolonien kann ein Crossover zwischen *PHO80* und dem Centromer wahrscheinlich vernachlässigt werden, da der Abstand zwischen Leserahmen und Centromer sehr gering ist. Crossover-Ereignisse im Abstand von 1 cM

(www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview) sind äußerst selten. Um zwischen Chromosomenverlusten, Mutationen bzw. Genkonversionsereignissen zu unterscheiden, wurde mit der DNA von spontanen und mit Anilin behandelten Trp⁻-Klonen eine PCR-Analyse durchgeführt, bei der *PHO80*-spezifische Primer außerhalb des *PHO80*-ORFs binden konnten. Bei 90 % der untersuchten Klone wurde nur ein Allel nachgewiesen, wie es bei Chromosomenverlust zu erwarten ist. Das heißt, dass das Verhältnis zwischen spontanen Vorwärtsmutationen und Chromosomenverlusten etwa 1:10 beträgt. Das Ergebnis zeigt, dass es die Selektion auf 5-FAA ermöglicht, die Häufigkeit von Chromosomenverlusten indirekt zu bestimmen. Demnach treten bei dem Stamm DAN spontan Chromosomenverluste mit einer Häufigkeit von $2,2 \times 10^{-6}$ auf. Bei dem Stamm D61.M war die Rate der spontanen Verluste von Chromosom VII abhängig von der Art der Inkubation. WHITTAKER *et al.* (1989) beobachteten bei der Standardbehandlung (16 Stunden bei 30°C) einen Wert von 1×10^{-6} . Diese Werte sind durchaus mit den bei dem Stamm DAN detektierten Chromosomenverlusten vergleichbar, obwohl mehrere Arbeitsgruppen nachweisen konnten, dass die Frequenz der spontanen Verluste eines bestimmten der 16 Chromosomen spezifisch ist (ESPOSITO *et al.*, 1982; HIRAOKA *et al.*, 2000). Im Vergleich zu den Chromosomenverlust-Frequenzen des Stammes DAN und D61.M konnte bei dem hyperhaploiden *S. cerevisiae*-Stamm LBL1 die Wiederherstellung des haploiden Zustands mit einer Häufigkeit von $1,37 \times 10^{-5}$ nachgewiesen werden (ESPOSITO *et al.*, 1982). Diese relativ hohe Verlustrate ist wahrscheinlich auf den aneuploiden Status des Stammes LBL1 zurückzuführen.

Allerdings fällt bei der genauen Betrachtung der Frequenz von Tryprophan-Auxotrophen auf, dass die Werte der einzelnen Versuche sehr stark streuen.

Tabelle 4-1: spontane Frequenz Trp⁻-Auxotropher in mehreren unabhängigen Versuchen; ($\times 10^{-6}$)

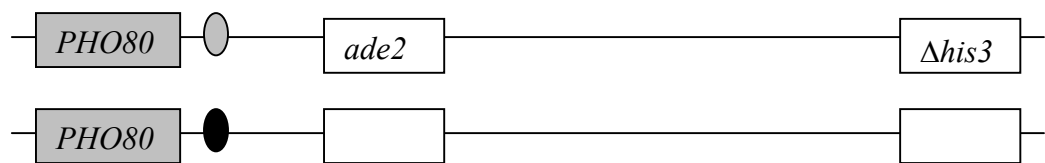
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
DAN1	0,21	2,47	1,94	6,96
DAN2	0,26	0,56	2,92	4,97
DAN3	0,06	2,84	2,03	1,18

Die Extremwerte unterscheiden sich um zwei Zehnerpotenzen und es dürfte sich kaum um eine normale Verteilung handeln. Da die Frequenz anderer spontan entstandener Phänotypen bei weitem geringere Streuungen aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass diese Schwankungen weniger an dem Stamm selbst sondern auf methodische Probleme zurück zu

führen sind, die bisher nicht erkannt wurden. Um die Erfassung der Chromosomenverluste eindeutiger zu gestalten, könnte man einen zusätzlichen Selektionsmarker auf dem *TRP1*-tragenden Chromosomenarm integrieren.

Unter den 5-FOA-resistenter Kolonien wurde mit geringer Häufigkeit nur in einem Experiment auch der Phänotyp *Ade⁻ Ura⁻ His⁻ Trp⁻* gefunden. Die geringe Rate von 7×10^{-8} entsprach den Erwartungen. Diese 4fach-Auxotrophen können nur durch mindestens zwei unabhängige Ereignisse entstanden sein. Einige Beispiele zeigt Abbildung 4-2.

A: Crossover zwischen *PHO80* und Centromer + Crossover zwischen *ADE2* und Centromer



B: Crossover zwischen *PHO80* und Centromer + Chromosomenverlust

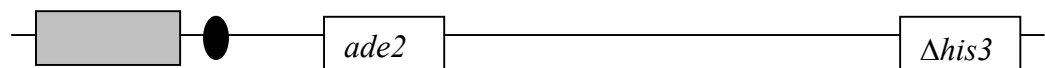


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Konfigurationen von Chromosom XV bei *Ade⁻ Ura⁻ His⁻ Trp⁻*-Kolonien

Schlussfolgerungen:

Die Diskussion der spontanen Ergebnisse hat gezeigt, dass sich sowohl der Stamm HAN als auch der Stamm DAN weitgehend den theoretischen als auch den aus der Literatur bekannten Erwartungen entsprechend verhalten. Das zeigt, dass mit großer Wahrscheinlichkeit der molekularbiologisch nachgewiesene Genotyp tatsächlich in den Stämmen vorliegt.

Durch die einfache Selektion auf Uracil- oder Tryptophan-Auxotrophie kann die Gesamtfrequenz mehrerer genetischer Ereignisse simultan bestimmt werden. Die Stämme erlauben durch den Vergleich von Mutations- / Segregations-Frequenzen und durch wenige molekularbiologische Analysen eine relativ eindeutige Differenzierung zwischen Vorwärtsmutationen, Genkonversionen, Crossover-Ereignissen und Chromosomenverlusten. Die geringe Häufigkeit der spontanen Ereignisse unterstützt die Annahme, dass bei den Stämmen HAN und DAN im Gegensatz zu anderen bekannten Hefe-Testsystemen keine störenden Fluktuationen auftreten.

4.2.2 Induzierte Frequenzen

4.2.2.1 MNNG

Durch die Behandlung des Stammes DAN wurde die Rate von $\text{Ura}^- \text{G418}^r$ -Kolonien bei einer Inaktivierung von 60 % von 1×10^{-6} auf 6×10^{-5} (60fach) deutlich erhöht. Im Stamm HAN erfolgte bei Mutagenbehandlung unter gleichen Bedingungen und einer Inaktivierung von 70 % ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Anzahl von Kolonien dieses Phänotyps von $3,3 \times 10^{-7}$ auf $9,7 \times 10^{-6}$ (30fach). Aus der Differenz zwischen beiden Frequenzen kann man die Häufigkeit der Mutationen bzw. SGCs ungefähr bestimmen. MNNG induzierte unter diesen Bedingungen demnach Mutationen mit einer Frequenz von rund 1×10^{-5} und SGCs mit einer Häufigkeit von 5×10^{-5} . Die indirekt ermittelte spontane Mutationsfrequenz im *URA3*-Gen hatte etwa 5×10^{-7} betragen. Das heißt, MNNG verursacht unter diesen Bedingungen eine deutliche Erhöhung der Mutationsrate um das etwa 100fache. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich mit Hilfe dieser indirekten Methode durch Kombination an Stamm DAN und HAN ermittelten Werte eine Steigung der Mutationsrate durch ein chemisches Mutagen sicher erfassen lässt.

MGCs und LGCs spiegelten sich wieder in der Häufigkeit der folgenden Phänotypen: Ade^- $\text{Ura}^- \text{G418}^r$, $\text{Ura}^- \text{G418}^s$ und $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^s$. Aus den Versuchen ergab sich für MGCs eine durchschnittliche Frequenz von $1,6 \times 10^{-5}$ und für LGCs von 6×10^{-6} . Aus dem Vergleich der Raten ergibt sich das durch die MNNG-Behandlung die Genkonversionsrate generell deutlich erhöht wird. Dabei überrascht, dass die kurzen Genkonversionsereignisse anscheinend am häufigsten auftreten. Das ist ein Unterschied zu den Frequenzen der spontanen Genkonversionsereignisse. Sie bestanden hauptsächlich aus MGCs und LGCs. Allerdings ist die Streuung der Werte relativ groß und erst weitere Versuche werden zeigen, ob es sich um signifikante Unterschiede handelt.

Die Frequenz von Crossover-Ereignissen, die hauptsächlich zur Entstehung von $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{His}^-$ -Kolonien führen sollten, war durch die Einwirkung von MNNG verdoppelt (von $1,2 - 1,6 \times 10^{-5}$ auf $2,5 - 4,2 \times 10^{-5}$) worden. Diese Phänotypen können auch durch Chromosomenverluste entstehen. Die unveränderte Häufigkeit von Trp^- -Phänotypen in Kontrolle und Versuch zeigt aber, dass diese Zahlen offensichtlich zum größten Teil auf Crossover-Ereignissen beruhen.

ZIMMERMANN und SCHWAIER (1967) wiesen erstmals am Stamm D4 nach, dass durch MNNG in *S. cerevisiae* Genkonversion induziert werden. Sie fanden am Stamm D4 bei einer Überlebensrate von 80 % nach der MNNG-Behandlung eine Erhöhung der Genkonvertanten von 8×10^{-6} auf $5,6 - 6,2 \times 10^{-4}$. ZIMMERMANN (1971) zeigte das am gleichen Stamm durch MNNG die Rate der Genkonversion relativ stark erhöht wurde (51fach) während die Rate der Mutationen nur um das 21fache stieg. SIMMON (1979) verwendete den Stamm D3 mit und ohne Zusatz des S9-Mix zur Erfassung von Rekombinationsereignissen. Es gelang ihm nach MNNG-Behandlung bei einer Überlebensrate von 78 % Rekombinationen mit einer Frequenz von $3,6 \times 10^{-4}$ (spontan $5,4 \times 10^{-5}$) zu detektieren. NADATHUT *et al.*, (1995) wiesen aufgrund der Einwirkung von MNNG bei dem Stamm D7 ebenfalls erhöhte Konvertanten- und Revertanten-Raten nach.

Schlussfolgerung:

Die Ergebnisse zeigen, dass durch eine chemische Noxe wie MNNG induzierte genetische Ereignisse mit Hilfe der Stammkombination HAN/DAN quantitativ in den erwarteten Größenordnungen erfasst werden können. Am deutlichsten wurden offensichtlich die Häufigkeiten von Mutationen und Genkonversionen erhöht, während die Frequenz von Crossover-Ereignissen (bei gleicher Inaktivierung) nur eine relativ geringe Induktion zeigte. Die Induktion von Chromosomenverlusten konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2.2.2 UV-Strahlung

Der haploide Testerstamm HAN und der diploiden Stamm DAN wurden in einem bzw. zwei Experimenten mit der gleichen UV-Dosis bestrahlt. HAN wies bei einer Inaktivierung von 86 % eine Erhöhung der Mutationsrate von $7,5 \times 10^{-7}$ auf $3,3 \times 10^{-4}$ (400fach) auf. Die Rate von Mutationen und SGCs wurde bei der ersten UV-Behandlung des Stammes DAN und einer durchschnittlichen Inaktivierung von 65 % von spontan $2,5 \times 10^{-6}$ auf 5×10^{-4} (200fach) erhöht. Bei der zweiten UV-Behandlung (78 % Inaktivierung) wurde eine Induktion von 1×10^{-6} auf $1,8 \times 10^{-4}$ (180fach) nachgewiesen. Die Unterschiede in der Inaktivierung zwischen den Stämmen HAN und DAN beruhen vielleicht auf den unterschiedlichen Ploidiestufen, diploide Zellen sind unempfindlicher als haploide (GAME, 1983). Da die UV-Dosis aber gleich war, sollte man, wie schon oben beschrieben, die annähernde Häufigkeit der SGCs aus der Differenz zwischen den Frequenzen der Ura^{-} G418^r-Phänotypen beider Stämme erhalten. Allerdings erwies sich dies nicht als durchführbar, weil die Frequenz dieser Phänotypen im zweiten Versuch mit dem Stamm DAN geringer war als in dem Versuch mit dem Stamm HAN. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob dieser Weg praktikabel ist oder ob man von

vornherein auf die weitere Differenzierung zwischen Mutationen und SGCs verzichten sollte. Wahrscheinlich ist für eine sichere Differenzierung eine größere Anzahl von parallelen Versuchen notwendig.

Die Induktion von MGCs, die durch $\text{Ade}^- \text{Ura}^- \text{G418}^r$ -Kolonien erfasst wurde, unterschied sich in beiden Mutagenese-Experimenten um etwa die Hälfte. So wurde nach der ersten Mutagenese durchschnittlich die Rate von $1,2 \times 10^{-6}$ auf $4,5 \times 10^{-5}$ (38fach) angehoben und im zweiten Experiment von $1,44 \times 10^{-6}$ auf $2,1 \times 10^{-5}$ (15fach). LGCs konnten in beiden Experimenten weder spontan noch nach UV-Bestrahlung eindeutig nachgewiesen werden. Das hängt vermutlich mit der relativ geringen Anzahl von Überlebenden in diesen Experimenten zusammen.

Die Frequenz der Crossover-Ereignisse wurde in beiden Mutagenese-Versuchen von 1×10^{-5} auf 1,4 bzw. $1,6 \times 10^{-4}$ (15fach) gesteigert.

Mit dem Stamm D7 untersuchten ZIMMERMANN *et al.* (1975) den Einfluss von UV-Strahlen auf Rückmutationen, mitotische Genkonversionen und mitotische Crossover-Ereignisse (Abstand zum Centromer: 54,5 cM [MORTIMER *et al.*, 1992]). Bis zu einer Inaktivierung von 73 % wurden Genkonversionsereignisse von $0,8 \times 10^{-5}$ bis auf $6,8 \times 10^{-3}$ (850fach) und Rückmutationen von $3,6 \times 10^{-7}$ bis auf $9,1 \times 10^{-5}$ (250fach) dosisabhängig gesteigert. Auch die Frequenz mitotischer Crossover-Ereignisse stieg von spontan $< 3,7 \times 10^{-4}$ auf bis zu $2,9 \times 10^{-5}$ bei einer Inaktivierung von 26 %. Bei höherer UV-Dosis fiel die Frequenz der Crossover-Ereignisse wieder ab. Sie betrug bei einer Inaktivierung von 73 % nur noch $1,6 \times 10^{-5}$. Folglich scheinen die in dieser Arbeit konstruierten Testerstämme HAN und DAN in Bezug auf die Induktion von Mutationen nach UV-Bestrahlung ähnlich sensitiv zu reagieren wie der Stamm D7. Im Gegensatz dazu werden mitotische Genkonversionsereignisse im Stamm DAN jedoch nicht so stark induziert wie beim Stamm D7.

ACUNA *et al.* (1994) beobachteten bei einer vergleichbaren Inaktivierung (70 %) nach UV-Bestrahlung ein Auftreten von Genkonvertanten mit einem Wert von $1,3 \times 10^{-3}$ (200fach; spontan 7×10^{-6}), Crossover-Ereignisse wurden mit einer Rate von $1,3 \times 10^{-2}$ detektiert, wobei diese Daten nur aus einem Einzelexperiment ermittelt wurden. Die von ACUNA *et al.* beobachteten Ergebnisse liegen um knapp zwei Zehnerpotenzen höher als die im Stamm

DAN beobachteten Frequenzen nach UV-Bestrahlung. Möglicherweise werden in a/α -Stämmen Rekombinationsereignisse weniger stark induziert als in α/α -Stämmen. Hierfür spricht auch, dass die Induktionsrate von Genkonversionen bei dem Stamm D7 weit höher war als bei dem Stamm DAN.

Schlussfolgerung:

Physikalische Mutagenese in Form von kurzwelligen UV-Strahlen ruft sowohl bei dem Stamm DAN als auch bei dem Stamm HAN hauptsächlich die Induktion von Mutationen hervor. Genkonversionsereignisse und Crossover werden weniger deutlich durch UV-Strahlung induziert.

4.2.2.3 Ethidiumbromid

Weder im diploiden Stamm DAN noch im haploiden Testerstamm HAN konnte unter den gewählten Bedingungen ein Einfluss von Ethidiumbromid festgestellt werden. Auch beim Stamm D7 (HIXON und BURNHAM, 1979) konnten nach Ethidiumbromid-Behandlung keine signifikanten Unterschiede bei den Häufigkeiten von Genkonversionen, Crossover-Ereignissen und Rückmutationen zwischen Versuchen und Kontrollen gefunden werden.

Im Gegensatz dazu beschrieben ACUNA *et al.* (1994) bei dem Testerstamm YA72 nach der Behandlung mit Ethidiumbromid eine Induktion von Genkonversions- und Crossover-Ereignissen sowie Chromosomenverlusten. Bei einer EB-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ (48 % Inaktivierung) wurden Chromosomenverluste mit einer Rate von $4,3 \times 10^{-6}$ (spontan 2×10^{-6}) detektiert, Genkonversionen kamen mit einer Frequenz von $2,2 \times 10^{-5}$ (spontan 5×10^{-6}) vor und Crossover mit einer Frequenz von $6,4 \times 10^{-4}$ (spontan 4×10^{-4}). Bei der Verwendung einer höheren EB-Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ wurde für die Chromosomenverluste eine Frequenz von $2,5 \times 10^{-6}$ ermittelt, für die Genkonversionen eine Rate von $5,9 \times 10^{-5}$ und für Crossover die Häufigkeit von $9,4 \times 10^{-4}$ erreicht. Im Unterschied zu den Versuchen mit den Stämmen HAN und DAN wurden bei ACUNA *et al.* (1994) die Zellen über einen wesentlich längeren Zeitraum von fünf Stunden mit der Substanz behandelt.

Schlussfolgerung:

Erwartungsgemäß konnten weder im Stamm HAN noch im Stamm DAN mit Ethidiumbromid erhöhte Mutations- bzw. Rekombinationsfrequenzen erfasst werden.

4.2.2.4 Benomyl

Bei dem haploiden Testerstamm HAN konnte kein Einfluss von Benomyl beobachtet werden. Das entsprach den Erwartungen, da der Stamm Vorwärtsmutationen detektieren sollte und Benomyl bei *S. cerevisiae* zur Chromosomenverlusten führt (WOOD, 1982). Diese sind in Haploiden letal; die nach Benomyl-Behandlung beobachtete Inaktivierung von HAN könnte so verursacht worden sein.

Im diploiden System DAN wurden durch diese Substanz keine Vorwärtsmutationen und auch keine SGCs im *URA3*-Gen induziert. Die Frequenz der MGCs wurde um das 2,0fache (von 2×10^{-6} auf 4×10^{-6}) gegenüber der spontanen Rate erhöht. Wie bei den Raten der Crossover-Ereignisse waren diese Unterschiede jedoch nicht signifikant. Der erwartete Anstieg der Tryptophan-Auxotrophen, die auf Chromosomenverlusten beruhen, trat in dem Testsystem nur im sehr geringen Masse auf (von $1,8 \times 10^{-7}$ auf $2,3 \times 10^{-7}$).

WOOD (1982) wies bei unterschiedlichen *S. cerevisiae*-Stämmen Benomyl-induzierte Chromosomenverluste mit einer Häufigkeit zwischen $1 - 4 \times 10^{-2}$ nach. Die Rate für Chromosom XV lag nach einer 24 Stunden dauernden Inkubation mit 20 µg/ml MBC (98 %) bei 4×10^{-2} . ZIMMERMANN (1983) verwendete den Stamm D61.M, um die Wirkung von Benomyl zu testen. Nach einer 17stündigen Inkubation der Zellen (entspricht vier bis fünf Generationen) mit 123 µg/ml Benomyl fand er einen Anstieg der Chromosomenverluste von spontan 1×10^{-7} auf etwa 2×10^{-5} . Auch ALBERTINI (1991) wählte für der Erfassung der Wirkung von Benomyl auf den Stamm D61.M längere Inkubationszeiten. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass Benomyl mindestens eine Generationszeit auf die Zellen einwirken muss, um eine deutliche Wirkung nachweisen zu können.

Benomyl wurde in einer Formulierung verwendet, die zu 50 % aus MBC bestand. WOOD (1982) verwendete zu 98 % reines MBC. Es wäre möglich, dass die Löslichkeit einer nahezu reinen Substanz in DMSO besser ist als die des gewählten Gemisches und aus diesem Grund die Zellen mit einer zu geringen Konzentration an MBC behandelt wurden.

Schlussfolgerung:

In dem Stamm HAN wurde erwartungsgemäß außer einer inaktivierenden, keine Wirkung von Benomyl nachgewiesen. Aber auch im Stamm DAN zeigte Benomyl keine deutliche Wirkung.

4.2.2.5 Anilin

Nach der Behandlung des Stammes HAN mit Anilin wurden $1,3 \times 10^{-6}$ Ura⁻-Kolonien beobachtet. Das entspricht einer ca. 3fachen Erhöhung der spontanen Mutationsrate (3×10^{-7}). Hier wurde reproduzierbar ein Einfluss von Anilin auf die Entstehung von Vorwärtsmutationen nachgewiesen, der bei der Verwendung einer größeren Anzahl von Daten vermutlich signifikant wäre.

Auch im Stamm DAN wurden offensichtlich durch Anilin Vorwärtsmutationen und/oder SGCs induziert. Die Zunahme dieser Ereignisse war jedoch weit geringer (von 0,8 auf $1,6 \times 10^{-6}$) als bei dem haploiden Testerstamm. Auch MGCs (Ade⁻ Ura⁻ G418^r: von 1,7 auf $2,4 \times 10^{-6}$ bzw. Ura⁻ G418^s: von $1,3 \times 10^{-6}$ auf $1,8 \times 10^{-6}$) und Crossover-Ereignisse (Experiment 1: von $1,1 \times 10^{-5}$ auf $1,7 \times 10^{-5}$ bzw. Experiment 2: von $1,7 \times 10^{-5}$ auf $2,2 \times 10^{-5}$) wurden leicht, allerdings nicht signifikant, erhöht. Chromosomenverluste wurden im DAN-Testsystem durch Anilin nicht induziert.

Die Daten sprechen dafür, dass Anilin auf *S. cerevisiae* mutagen und rekombinogen wirkt. Die Induktion rekombinogener Ereignisse war jedoch im Vergleich zu den durch BRENNAN und SCHIESTL (1997) beschriebenen Ergebnissen deutlich geringer. Bei ihrem Testerstamm RS112 wurde nach einer Behandlung mit einer 10 mg/ml konzentrierten Anilin-Lösung (17 Stunden Inkubationsdauer) bei einer Inaktivierung von 98,8 % die Rekombinationshäufigkeit von $1,37 \times 10^{-4}$ auf $4,7 \times 10^{-4}$ (etwa 3,5fache) gesteigert.

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Stämme DAN und RS112 beruhen wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Inkubationsperioden, was schon in der Inaktivierung sichtbar wird. Im DAN-Testsystem wurden durch eine 30 Minuten lange Behandlung 40 % der Zellen inaktiviert. Bei gleichen Versuchsbedingungen, aber deutlich längerer Inkubationszeit (17 Stunden) fanden BRENNAN und SCHIESTL (1997) eine 99 %ige Inaktivierung.

Schlussfolgerung:

Anilin hat anscheinend bei Stamm HAN bzw. bei Stamm DAN einen Einfluss auf die Häufigkeiten von Vorwärtsmutationen und/oder SGCs, MGCs und Crossover-Ereignissen.

4.3 Eignung des HAN/DAN-Testsystems zur routinemäßigen Erfassung genetischer Ereignisse

Der Stamm HAN macht die summarische Erfassung der verschiedenen genetischen Ereignisse möglich, die zu einem Ura⁻-Phänotyp führen können. In Kombination mit dem Stamm DAN sollte die Differenzierung zwischen Vorwärtsmutationen auf der einen Seite und mitotischen Rekombination und Chromosomenverlusten auf der anderen Seite möglich sein. Für die Differenzierung zwischen Genkonversionen vom unterschiedlichen Ausmaß, Crossover-Ereignissen und/oder Chromosomenverlusten können molekularbiologische Analysen mit Hilfe der PCR leicht durchgeführt werden. Das Prinzip des Indikationssystems beruht auf dem Stamm YA72 von ACUNA *et al.* (1994), der zur Erfassung von mitotischen Rekombinationsereignissen, die zu einer Homozygotisierung führen, diente. Das HAN/DAN-Testsystem ist eine Weiterentwicklung mit dessen Hilfe außerdem Vorwärtsmutationen und Chromosomenverluste durch Selektion erfasst werden können. Darüber hinaus erlaubt die Fusion des *ADE2*-Allels mit dem *URA3*-Gen und der kanMX4-Kassette die Differenzierung zwischen Genkonversionsereignissen unterschiedlicher Länge. Weiterhin ist durch die Homozygotie im Paarungstyp eine Verfälschung der Ergebnisse durch meiotische Rekombination praktisch ausgeschlossen. Die Homozygotie kann sogar genutzt werden, um genetische Ereignisse durch Kreuzung von Mutanten/Segreganten mit geeigneten Testerstämmen des oppositionellen Paarungstyps zu analysieren. Das HAN/DAN-System erfordert nicht die mühsame Auswahl von geeigneten Klonen (ZIMMERMANN, 1975) mit möglichst wenigen spontan entstandenen Mutanten oder Rekombinanten vor dem eigentlichen Test. Bei der Anzucht der Stämme HAN und DAN auf Minimalmedium wird direkt gegen diese selektiert, so dass Mutanten- und Segregantenfrequenzen erfasst werden, die nicht durch zufällige Anreicherung verfälscht sind. Beide Stämme zeigen nach der Behandlung mit mutagenen oder rekombinogenen Noxen die erwarteten Reaktionen. Das Testsystem HAN/DAN zeichnet sich durch seine einfache Handhabung aus. Ergebnisse stehen schon nach wenigen Tagen zur Verfügung, und neben den Selektionssubstanzen 5-FOA, 5-FAA und G418 werden keine Substanzen oder Gerätschaften benötigt, die nicht routinemäßig in einem mikrobiologischen Labor vorhanden sind. Es gibt jedoch auch noch einige Möglichkeiten, die dieses System „Anwender-freundlicher“ machen. So bestünde die Möglichkeit, durch Berücksichtigung der folgenden Punkte die Kosten dieses Systems zu verringern.

1. Man könnte die Selektion der Mutanten und Rekombinanten statt auf supplementiertem YNB+5-FOA-Minimalmedium auf YEP+5-FOA-Vollmedium durchführen, um Supplemente sowie YNB zu sparen

2: Durch eine weitere Vereinfachung, bei der nur noch Ura⁻ G418^r-(YNB+Ura+G418), Ade⁻ Ura⁻ G418^r-(YNB+Ura+Ade+G418 oder noch günstiger YNB+Ura), Ade⁻ Ura⁻ His⁻-(YNB+Ura+Ade+His) und Trp⁻-(5-FAA) Klone gescreent werden, könnte der Aufwand weiter herabgesetzt werden. Durch dieses Replica-plating würden sowohl Vorwärtsmutationen, Genkonversionen, Crossover-Ereignisse als auch Chromosomenverluste detektiert werden. Um Genkonversionsraten zu erhalten, würde es ausreichen auf YNB+Ura+Ade zu stempeln.

Neben der Suche nach Möglichkeiten, das vorhandene Testsystem in Hinsicht auf den wirtschaftlichen Kostenfaktor zu optimieren, stellt sich die Frage, ob die Sensitivität von HAN/DAN verbessert werden könnte. Hier würde sich zum Beispiel eine längere Mutagenbehandlung anbieten. Würde man die Inkubation der Zellen statt 30 Minuten etwa 17 Stunden (4-5 Generationen) lang durchführen, könnten auch schwache Mutagene detektiert werden. Zusätzlich sollte man prüfen, ob Zellen des Stammes HAN und des Stammes DAN, die in der log-Phase mit dem Mutagen behandelt werden, sensitiver sind als Zellen in der stationären Phase (ZIMMERMANN, 1984). Die Verlängerung der Inkubationszeit auf mindestens fünf Stunden sollte nach ACUNA *et al.* (1994) ausreichend sein.

Außer der Art und Dauer der Mutagenbehandlung gibt es weitere Möglichkeiten zur Erhöhung der Sensitivität eines Testsystems, wie zum Beispiel die Veränderung der Zellwandpermeabilität, Ausschaltung von multi drug-Transportern, exogene Metabolisierung von Substanzen oder die Verwendung von Reparatur-Mutanten.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es ein Testsystem zu konstruieren und zu validieren, mit dem mutagene und rekombinogene Effekte erfasst werden können. Das System umfasst zwei *S. cerevisiae*-Stämme. Bei dem haploiden Stamm HAN $\alpha \Deltaura3 \Delta trp1 ADE2::URA3::kanMX4$ wurde auf dem Chromosom XV distal zum *ADE2*-Locus das *URA3*-Gen und die *kanMX4*-Kassette inseriert. Der diploide Stamm DAN $\alpha/\alpha \Deltaura3/\Deltaura3 \Delta trp1/\Delta trp1 PHO80/pho80::TRP1 ade2-101/ADE2::URA3::kanMX4$ enthält auf Chromosom XV das gleiche Konstrukt wie der Stamm HAN. Darüber hinaus ist auf dem anderen Arm des Homologs von Chromosom XV centromernah das *TRP1*-Gen in den *PHO80*-Locus inseriert. Die beiden Stämme wurden durch Serien von gerichteten Mutationen und durch Protoplastenfusion konstruiert. Die Genotypen wurden durch molekulargenetische Methoden verifiziert. Die Verwendung der Antibiotikum-Resistenz und der counter-selektierbaren Marker *URA3-ura3* und *TRP1-trp1* ermöglicht die direkte quantitative Erfassung unterschiedlicher genetischer Ereignisse.

Das *URA3*-Gen im Stamm HAN dient der Detektion von Vorwärtsmutationen. Durch die enge Kopplung des *URA3*-Gens mit dem *ADE2*-Locus und der *kanMX4*-Kassette können neben Punktmutationen auch großräumigere Sequenzänderungen wie Deletion, Insertion oder Inversion detektiert werden.

Im diploiden Stamm DAN ermöglicht die Ermittlung der Gesamtzahl an Uracil-Auxotrophen die gleichzeitige Erfassung von Mutationen, mitotischen Genkonversionen, Crossover-Ereignissen sowie Chromosomenverlusten. Die Häufigkeit von mitotischen Rekombinationsereignissen wird durch die Berechnung der Differenz zwischen dieser Gesamtzahl und der Mutationsfrequenz im Stamm HAN ermittelt. Die Selektion auf Tryptophan-Auxotrophie ergänzt die Erfassung der Chromosomenverluste. Die enge Kopplung zwischen den *ADE2*-, *URA3*-, und *kanMX4*-Loci im Stamm DAN erlaubt eine phänotypische Differenzierung der Genkonversionen nach ihrer Länge in kurze (SGCs), mittel lange (MGCs) und lange (LGCs) Ereignisse.

Durch die Homozygotie im Paarungstyp wird ausgeschlossen, dass meiotische Rekombinationsereignisse die Ergebnisse verfälschen.

Die Häufigkeit spontaner Mutationen und Rekombinationsereignisse war bei dem Stamm-System etwa im erwarteten Bereich. Abweichungen betrafen das Auftreten von Genkonversionen und Crossover-Ereignissen im Stamm DAN. Sie kamen mit geringerer

Frequenz vor als in einigen anderen Hefe-Testsystemen. Eine Ursache dafür kann in der homozygoten Konfiguration der Paarungstyp-Allele liegen.

Die Validierung des Testsystems mit Substanzen mit bekannter Wirkung erbrachte die erwarteten Ergebnisse. MNNG und UV-Strahlung führten hauptsächlich zur Erhöhung der Mutationsfrequenz. Im geringeren Maße wurde das Vorkommen von Genkonversionen und Crossover-Ereignissen induziert. Eine Wirkung von Ethidiumbromid oder Benomyl konnte unter den gewählten Inkubationsbedingungen nicht nachgewiesen werden. Eine schwache mutagene und rekombinogene Wirkung von Anilin war zu beobachten.

Bei dem HAN/DAN-System handelt es sich um ein Testsystem, mit dem mutagene und rekombinogene Einflüsse innerhalb weniger Tage erfasst werden können. Darüber hinaus können die genetischen Ereignisse durch phänotypische und molekularbiologische Methoden charakterisiert werden. Weitere Vorteile des hier entwickelten Testsystems liegen in der einfachen Handhabung und in der kostengünstigen sowie sensitiven Art potentielle Gefahrenstoffe zu identifizieren.

6 Abstract

It was the aim of this work to design and validate a test system, which makes it possible to recognize mutagenic and recombinogenic effects. The system consists of two *S. cerevisiae* strains. In the haploid strain HAN $\alpha \Delta ura3 \Delta trp1 ADE2::URA3::kanMX4$ the *URA3* gene and the kanMX4 cassette were inserted on chromosome XV distal to the *ADE2* locus. On chromosome XV the diploid strain DAN $\alpha/\alpha \Delta ura3/\Delta ura3 \Delta trp1/\Delta trp1 PHO80/pho80::TRP1 ade2-101/ADE2::URA3::kanMX4$ contains the same construction as the strain HAN. The *TRP1* gene is inserted into the *PHO80* locus, which is next to the centromere on the other arm of the homologue of chromosome XV. The two strains were designed by series of targeted mutations and by fusion of the protoplasts. The genotype was verified by molecular-genetic methods. The use of the antibiotic resistance and the counterselective markers *URA3-ura3* and *TRP1-trp1* makes the direct quantitative registration of different genetic events possible.

With the help of the *URA3* gene in the strain HAN forward mutations can be detected. The close coupling of the *URA3* gene with the *ADE2* locus and the kanMX4 cassette makes it possible to detect beside point mutations also more spacious sequence changes such as deletion, insertion or inversion.

In the diploid strain DAN the determination of the total number of uracil auxotrophs allows the simultaneous registration of mutations, mitotic gene conversions, crossing over events as well as chromosome losses. The frequency of mitotic recombination events is determined by the calculation of the difference between this total number and the mutation frequency in the strain HAN. The selection of tryptophan auxotrophes supplements the assessment of the chromosome losses. The close coupling between the *ADE2*, *URA3*, and kanMX4 loci in the strain DAN allows a phenotypic differentiation of gene conversions according to their length, between short (SGCs), medium (MGCs) and long (LGCs) events.

The homocytogicity of the mating type it prevents the falsification of the results by meiotic recombination events.

Using the strain system, the frequency of spontaneous mutations and recombination events was as had been expected. Deviations concerned the frequency of gene conversions and crossing over events in the strain DAN. They occurred less frequently than in some other

yeast test systems. A cause for this can be the homocygote configuration of the mating type alleles.

Validating the test system with substances with well-known effect provided the expected results. MNNG and UV-radiation led mainly to the increase of the mutation frequency. To a smaller extent frequencies were induced by gene conversions and crossing over events. An effect caused by ethidiumbromide or benomyl could not be proven under the incubation conditions, which had been chosen. A weak mutagenic and recombinogenic effect of aniline was observed.

The HAN/DAN system is a test system, with which mutagenic and recombinogenic influences can be recognized within few days. Beyond that the genetic events can be characterized by applying phenotypic and molecular-biological methods. Further advantages of the test system developed in this work are its easy handling and its reasonable price as well as the possibility to identify potential danger materials in a sensitive way.

7 Literatur

- Abbott, P. J., Saffhill, R. (1979). DNA synthesis with methylated poly(dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O6-methylguanin.
Biochim. Biophys. Acta **562**: 51-61
- Acuna, G., Würigler, F. E., Sengstag, C. (1994). Reciprocal mitotic recombination is the predominant mechanism for the loss of heterozygous gene in *Saccharomyces cerevisiae*.
Environ. Mol. Mutagen. **24**: 307-316
- Agatep, R., Kirkpatrick, R.D., Parchaliuk, D.L., Woods, R.A., and Gietz R.D. (1998). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol.
Technical Tips Online (<http://tto.trends.com>).
- Albertini, S. (1991). Reevaluation of the 9 compounds reported conclusive positive in yeast *Saccharomyces cerevisiae* aneuploidy test systems by the Gene-Tox Program using strain D61.M of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutat. Res. **260**: 165-180
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1994).
Molekularbiologie der Zelle.
2. Auflage, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft
- Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.
Mutat. Res. **31**: 347-364
- Ashby, J., Tennant, R. W. (1991). Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP.
Mutat. Res. **257**: 229-306
- Ashby, J., Vlachos, D. A., Tinwell, H. (1991). Activity of aniline in the mouse bone marrow micronucleus assay.
Mutat. Res. **263**: 115-117
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Struhl K. (1991). Current protocols in molecular biology.
iley & sons; New York.
- Boeke, J. D., LaCroute, F., Fink, G. R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance.
Mol. Gen. Genet. **197**: 345-346
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications.
Yeast **14**: 115-132

- Brennan, R. J., Schiestl, R.H. (1997). Aniline and its metabolites generate free radicals in yeast.
Mutagenesis **12**: 215-220
- Brusick, C. J., Andrews, H. (1974). Comparison of the genetic activity of dimethylnitrosamine, ethyl methanesulfonate, 2-acetylaminofluorene and ICR-170 in *Saccharomyces cerevisiae* strains D3, D4 and D5 using in vitro assays with and without metabolic activation.
Mutat. Res. **26**: 491-500
- Burton, K. (1965). A study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid.
Biochem. J. **62**: 315-322
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.
J. Mol. Endocrinol. **25**: 169-193
- Butow, R. A., Henke, R. M., Moran, J. V., Belcher, S. M., Perlaman, P. S. (1996). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria using the biolistic gun.
Methods Enzymol. **264**: 265-278
- Cahill, P. A., Knight, A. W., Billinton, N., Barker, M.G., Walsh, L., Keenan, P. O., Williams, C. V., Walmsley, R. M. (2004). The GreenScreen[®] genotoxicity assay: a screening validation programme.
Mutagenesis **19**: 105-119
- Callen, D. F., Philpot, R. M. (1977). Cytochrome P-450 and the activation of promutagens in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutat. Res. **45**: 309-324
- Campbell, I., Duffus J.H. (1988). Yeast a practical approach.
Oxford: IRL Press
- Campbell, D. A., Fogel, S., Lusnak, K. (1975). Mitotic chromosome loss in a disomic haploid of *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics **79**: 383-396
- Carr, J., Shearer, G. Jr. (1998). Genome size, complexity, and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*.
J. Bacteriol. **180**: 6697-703
- Cavalli-Sforza, L. (1969). Biometrie Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
VEB Gustav Fischer Verlag Jena
- Chernoff, Y. O., Kidgotko, O. V., Demberelijn, O., Luchnikova, I. L., Saldatov, S. P., Glazer, V. M., Gordenin, D. A. (1984). Mitotic intragenic recombination in the yeast *Saccharomyces*: Marker effects on conversion and reciprocity of recombination.
Current Genet. **9**: 31

- Choy, W. N. (1996). Principles of Genetic Toxicology.
Drug Chem. Toxicol. **19**: 149-160
- Claxton, L.D., Houk, V. S., Hughes, T. J. (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents.
Mutat. Res. **410**: 237-243.
- Clemons, G. P., Sisler, H. C. (1971). Localization of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative.
Pestic. Biochem. Physiol. **1**: 32-43
- Coulondre, C., Miller, J. H. (1977). Genetic studies of the *lac* repressor. IV. Mutagenic specificity in the *lacI* gene of *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **117**: 577-606
- Darzynkiewicz, Z., Crissman, H. A. (1990). Flow cytometry.
Methods Cell Biol. **33**, San Diego: Academic Press
- Delatour, P., Richard, Y. (1976). Propriétés embryotoxiques et antimitotiques en série benzimidazole.
Thérapie **31** : 505-515
- Dixon, M. (1983). A yeast screening system for the detection of mutation, recombination and aneuploidy.
U.S. Dept. of Energy Document LBL-16686
- Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., So, B. T., Schmidt C. H., Bücheler, J. (1966). Zur Erzeugung subcutaner Sarkome an Ratten. Carcinogene Wirkung von Hydrazodicarbonsäure-bis-(methylnitrosamid), N-Nitroso-N-n-butyl-harnstoff, N-Methyl-N-nitroso-nitroguanidin und N-Nitroso-imidazolidon.
Z. Krebsforsch. **68**: 87-102
- Eckhardt, F., Haynes, R. H. (1977). Induction of pure and sectored mutant clones in excision proficient and deficient strains for yeast.
Mutat. Res. **43**: 327-338
- Eckhardt, F., Haynes, R. H. (1980). Quantitative measures of mutagenicity and mutability based on mutant data.
Mutat. Res. **74**: 439-458
- Ehrenhofer-Murray, A. E., Würgler, F. E., Sengstag, C. (1994). Characterisation of the *trp5-27* allele used to monitor drug-induced mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* tester strain D7.
Mutagenesis **9**: 377-381
- Ernster, L., Luft, R., Orrenius, S. (1995). Mitochondrial diseases.
Biochim. Biophys. Acta **1271**: 1-292
- Esposito, M. S. (1978). Evidence that spontaneous mitotic recombination occurs at the two-strand stage.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 4436-4440

- Esposito, M. S., Maleas, D. T., Bjornstad, K. A., Bruschi, C. V. (1982). Simultaneous detection of changes in chromosome number, gene conversion and intergenic recombination during mitosis of *Saccharomyces cerevisiae*: spontaneous and ultraviolet light induced events.
Curr. Genet. **6**: 5-11
- Esposito, M. S., Ramirez, R. M., Bruschi, C. V. (1994). Nonrandomly-associated forward mutation and mitotic recombination yield yeast diploids homozygous for recessive mutations.
Curr. Genet. **26**: 302-307.
- Fried, H. M., Warner, J. R. (1982). Molecular cloning and analysis of yeast gene for cycloheximide resistance and ribosomal protein L29.
Nucleic Acids Res. **10**: 3133-3148
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis.
Washington D. C.: ASM Press
- Friis, J., Roman, H. (1968). The effect of the mating type alleles on intragenic recombination in yeast.
Genetics **59**: 33-36
- Game, J. C. (1983). Radiation-sensitive mutants and repair in yeast: *In*: Spencer, J. F.T., Spencer, D. M., Smith, A. R. W. Yeast genetics Fundamental and applied aspects.
Springer-Verlag New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: 109-135
- Goldring, E. S., Grossman, L. I., Krupnick, D., Dryer, D. R. Marmur, J. (1970). The petite mutation in yeast-Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide.
J. Mol. Biol. **52**: 323-335
- Gray, M., Honigberg, S. M. (2001). Effect of chromosomal locus, GC content and length of homology on PCR-mediated targeted gene replacement in *Saccharomyces*.
Nucleic Acids Res. **29**: 5156-5162
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast.
Nucleic Acids Res. **24**: 2519-2524.
- Güldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D., Hegemann, J. H. (2002). A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast.
Nucleic Acids Res. **30**: e23
- Gupta, R. C., Folta-Stogniew, E., O'Malley, S., Takahashi, M., Radding, C. M. (1999). Rapid exchange of A:T base pairs is essential for recognition of DNA homology by human Rad51 recombination protein.
Mol. Cell **4**: 705-714
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. **166**: 557 – 580.

- He, M., Wilde, A., and Kaderbhai, M. A. (1990). A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids.
Nucleic Acids Res. **18**:1660
- Herbert, D., Phipps, P.J., Strange, R.E. (1971). Chemical analysis of microbial cells.
Methods Microbiol. **5 B**: 209-344
- Hiraoka, M., Watanabe, K., Umezu, K., Maki, H. (2000). Spontaneous loss of heterozygosity in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells.
Genetics **156**: 1531-48
- Hixon, S. C., Burnham, A. D. (1979). Nuclear mutations and mitotic recombination in *Saccharomyces* by light – activated ethidium azides.
Mutat. Res. **66**: 385-390
- Howard, R. J., Aist, J. R. (1977). Effects of MBC on hyphal tip organization, growth, and mitosis of *Fusarium acuminatum*, and their antagonism by D20.
Protoplasma **92**: 195-210
- Ishidate Jr., M. (1983). The data book of chromosomal aberrations tests *in vitro* on 587 chemical substances using a Chinese hamster fibroblast cell line (CHL cells).
Realize Inc., Tokyo
- Jia, X., Xiao, W. (2003). Compromised DNA repair enhances sensitivity of the yeast RNR3-lacZ genotoxicity testing system.
Toxicol. Sci. **75**: 82-88
- Jia, X., Zhu, Y., Xiao, W. (2002). A stable and sensitive genotoxic testing system based on DNA damage induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutat. Res. **519**: 83-92
- Judd, S. R., Petes, T. D. (1988). Physical lengths of meiotic and mitotic gene conversion tracts in *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics **118**: 401-410
- Kern, R., Zimmermann F. (1978). The influence of defects in excision and error prone repair on spontaneous and induced mitotic recombination and mutation in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. Gen. Genet. **161**: 81-88
- Knight, A. W., Keenan, P. O., Goddard, N.J., Fielden, P. R., Walmsley, R. M. (2004). A yeast-based cytotoxicity and genotoxicity assay for environmental monitoring using novel portable instrumentation.
J. Environ. Minit. **6**: 71-79
- Knippers, R. (1997). Molekulare Genetik.
Georg Thime Verlag: Stuttgart, New York
- Kunz, B. A., Haynes, R. H. (1982). DNA repair and the genetic effects of thymidylate stress in yeast.
Mutat. Res. **93**: 353-375

- Lee, G. S.-F., Savage, E. A., Ritzel, R. G., von Borstel, R. C. (1988). The base-alteration spectrum of spontaneous and ultraviolet radiation-induced forward mutations in the *URA3* locus of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Gen. Genet. **214**: 396-404
- Madden, S. L., Creasy, C. L., Srinivas, V., Fawcett, W., Bergman, L. W. (1988). Structure and expression of the PHO80 gene of *Saccharomyces cerevisiae*.
Nucleic Acids Res. **16**: 2625-2637
- Manivasakam, P., Weber, S. C., McElver, J., Schiestl, R. H. (1995). Micro-homology mediated PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*.
Nucleic Acids Res. **23**: 2799-2800
- Manney, T. R. (1964 a). Action of a super-suppressor in yeast in relation to allelic mapping and complementation.
Genetics **50**: 109-121
- Manney, T. R. (1964 b). Tryptophan synthetase mutants of yeast: Action of a super-suppressor in relation to allelic mapping and complementation.
Thesis, Berkeley
- Marquardt, H., Zimmermann, F. K., Schwaier, R. (1964). Die Wirkung krebsauslösender Nitrosamine und Nitrosamide auf das ad6-45 Rückmutationssystem von *Saccharomyces cerevisiae*.
Z. Vererbungsl. **95**: 82-96
- Meyhack, B., Bjava, W., Rudolph, H., Hinnen, A. (1982). Two yeast acid-phosphatase structural genes are the result of a tandem duplication and show different degree of homology in their promotor and coding sequences.
EMBO J. **1**: 675-680
- Miozzari, G., Niederberger, P., Hütter, R. (1977). Action of tryptophan analogues in *Saccharomyces cerevisiae*.
Arch. Microbiol. **115**: 307-316
- Mortimer, R. K., Contopoulou, C. R., King I. S. (1992). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. Edition 11.
Yeast **8**: 817-902
- Moshinsky, D. J., Wogan, G. N. (1997). UV-induced mutagenesis of human *p53* in a vector replicated in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 2266-2271
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H. (1985). Evaluation of the new system (*umu* test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens.
Mutat. Res. **147**: 219-229
- Parry, J. M., Tweats, D. J., Al-Mossawi, M. A. J. (1976). Monitoring the marine environment for mutagens.
Nature (Lond.) **264**: 538-540

- Parry, J. M., Zimmermann, F. K. (1976). The detection of monosomic colonies produced by mitotic chromosome non-disjunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutat. Res. **36**: 49-66
- Pena, A., Clemente, S. M., Borbolla, M., Carrasco, N., Uribe, S. (1980). Multiple interactions of ethidium bromide with yeast cells.
Arch. Biochem. Biophys. **201**: 420-428
- Pieper, R. O. (1998). Cellular response to methylation damage. In: J. A. Nickoloff and M. F. Hoekstra (eds.), DNA Damage and Repair
Totowa, NJ: Humana Press **2**: 33-49
- Plewa, M. J., Gentile, J. M. (1976). Mutagenicity of atrazine: A maize-microbe bioassay.
Mutat. Res. **38**: 287-292
- Poli, P., Buschini, A., Candi, A., Rossi, C. (1999). Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochrome P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutagenesis **14**: 233-238
- Prunell, A., Kopecka, H., Strauss, f., Bernardi, G. (1977). The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. V. Genome evolution.
J. Mol. Biol. **110**: 17-47
- Ramel, C. (1989). The nature of spontaneous mutations.
Mutat. Res. **212**: 33-42
- Resnick, M. A., Game, J. c., Stasiewicz, S. (1983). Genetic effects of UV irradiation on excision-proficient and -deficient yeast during meiosis.
Genetics **104**: 603-618
- Roman, H. (1955). A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast.
C. R. Lab. Carlsberg Ser. Physiol. **26**: 299-314
- Rose, M.D., Winston, F., Hieter, P. (1990). Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual.
Cold Spring Harbor; New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual.
2nd ed.
Cold Spring Harbor laboratory press; New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**(12): 5463-7
- Schiestl, R. H. (1989). Non-mutagenic carcinogens induce intrachromosomal recombination in yeast.
Nature **337**: 285-288

- Schiestl, R. H., Aubrecht, J., Yap, W. Y., Kondikonda, S., Sidhom, S. (1997). Polychlorinated biphenyls and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induce intra-chromosomal recombination in vitro and in vivo.
Cancer Res. **57**: 4378-4383
- Schiestl, R. H., Gietz, R.D., Mehta, R. D., Hastings, P. J. (1989). Carcinogens induce intrachromosomal recombination in yeast.
Carcinogenesis **10**: 1445-1455
- Schiestl, R. H., Igarashi, S., Hastings, P. J. (1988). Analysis of the Mechanism for Reversion of a Disrupted Gene.
Genetics **119**: 237-247
- Schürch, A., Miozari, J., Hütter, R. (1974). Regulation of tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mode of action of 5-methyltryptophan and 5-methyltryptophan-sensitive mutants.
J. Bacteriol. **117**: 1131-1140
- Seiler, J. P. (1975). Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds.
Mutat. Res. **32**: 151-168
- Simmon, V. F. (1979). In vitro assays for recombinogenic activity of chemical carcinogens and related compounds with *Saccharomyces cerevisiae* D3.
J. Natl. Cancer. Inst. **62**:901-910
- Singer, V. L., Lawlor, T. E., Yue, S. (1999). Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella / mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test).
Mutat. Res. **439**: 37-47
- Skala, J., Kotylak, Z. (1984). Protoplastfusion in *Saccharomyces cerevisiae*.
Acta Microbiol. Pol. **33**: 25-35
- Snyder, L., Champness, W. (2003). Molecular genetics of bacteria.
Washington, D. C.: ASM Press
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. **98**: 503-517
- Srb, A. M. (1955). Spontaneous and chemically-induced mutations giving rise to canavanine resistance in yeast.
C. R. Lab. Carlsberg Ser. Physiol. **26**: 263-380.
- Styles, J. A., Garner, R. (1974). Benzimidazolecarbamate methyl ester-evaluation of its effects *in vivo* and *in vitro*.
Mutat. Res. **26**: 177-187
- Tan, T. L. R., Kanaar, R., Wyman, C. (2003). Rad54; A Jack of all trades in homologous recombination.
DNA Repair **2**: 787-794

- Toh-e, A., Ueda, Y., Kakimoto, S.I., Oshima, Y. (1973). Isolation and characterisation of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Bacteriol. **113**: 727-738
- Toyn J. H., Gunyuzlu P.L., White W. H., Thompson L. A., Hollis G. F. (2000). A counterselection for the tryptophan pathway in yeast: 5-fluoroanthranilic acid resistance.
Yeast **16**: 553-560
- Turner, J. V., Ward, A. D., Freeman, C. G. (1978). The mutagenic screening of fourteen imidazo compounds using a modified Ames' test.
Mutat. Res. **57**: 135-139
- Vincent, A., Petes, T. T. (1989). Mitotic and meiotic gene conversion of Ty elements and other insertions in *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics **122**: 759
- Vindelov, L. L., Christensen, I. J., Nissen, N. I. (1983). A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for cytometric DNA-analysis.
Cytometry **3**: 232-237
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*.
Yeast **10**: 1793-1808
- Wach, A. (1996). PCR-Synthesis of Marker Cassettes with Long Flanking Homology Regions for Gene Disruptions in *S. cerevisiae*.
Yeast **12**: 259-265
- Walmsley, R. M., Billinton, N., Heyer, W.-D. (1997). Green fluorescent protein as a reporter for the DNA damage-induced gene RAD54 in *Saccharomyces cerevisiae*.
Yeast **13**: 1535-1545
- Walmsley, R. M., Keenan, P. (2000). The Eukaryote Alternative: advantages of using yeasts in place of bacteria in microbial biosensor development.
Biotechnol. Bioprocess Eng. **5**: 387-394
- Waring, M. J. (1981). DNA modification and cancer.
Ann. Rev. Biochem. **50**: 159-192
- Wheeler, S. L., Khalsa, G. J., Nickoloff, J. A. (1999). PCR Alone is insufficient for identifying structural modifications to yeast chromosomes.
BioTechniques **26**: 238-240
- Whittaker, P. A., Hammond, R. C., Luha, A. A. (1972). Mechanism of mitochondrial mutation in yeast.
Nature New Biol. **238**: 266-268

- Whittaker, S. G., Zimmermann, F. K., Dicus, B., Piegorsch, W. w., Fogel, S., Resnick, M. A. (1989). Detection of induced mitotic chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* – an inelaboratory study.
Mutat. Res. **224**: 31-78
- Wilhelm, J., Pingoud, A., Hahn, M. (2003). Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes.
Nucleic Acids Res. **31**: e56
- Wood, J. S. (1982). Genetic effects of methyl benzimidazole-2-yl-carbamate on *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. And Cell. Biol. **9**: 1064-1079
- Yanish-Peron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**: 103
- Yao, R., Zhang, Z., An, X., Bucci, B., Perlstein, D. L., Stubbe, J., Huang, M. (2003). Subcellular localisation of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**: 6628-6633
- Zimmermann, F.K., Kern, R., Rasenberger, H. (1975). A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation.
Mutat. Res. **28**: 381-388
- Zimmermann, F. K., Mayer, V. W., Scheel, I., Resnick, M. A. (1985). Acetone, methyl ethyl ketone, ethyl acetate, acetonitrile and other polar aprotic solvents are strong inducers of aneuploidy in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutat. Res. **149**: 339-351
- Zimmermann, F. K., Mohr, A. (1992). Formaldehyde, glyoxal, urethane, methyl carbamate, 2,3-butanedione, 2,3-hexanedione, ethyl acrylate, dibromoacetonitrile and 2-hydroxypropionitrile induce chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutat. Res. **270**: 151-166
- Zimmermann, F. K., Schwaier, R., Laer v., U. (1966). Mitotic recombination induced in *Saccharomyces cerevisiae* with nitrous acid, diethylsulfate and carcinogenic, alkylating nitrosamides.
Z. Vererbungsl.: **98**: 230-246
- Zimmermann, F. K., Schwaier, R. (1967). Induction of mitotic gene conversion with nitrous acid, 1-Methyl-3-Nitro-1-nitrosoguanidine and other alkylating agents in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. Gen. Genet. **100**:63-76
- Zimmermann, F. K. (1971). Induction of mitotic gene conversion by mutagens.
Mutat. Res. **11**: 327-337

- Zimmermann, F. K. (1973). A yeast strain for visual screening for the two reciprocal products of mitotic crossing-over.
Mutat. Res. **21**: 263-269
- Zimmermann, F. K. (1975). Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutat. Res. **31**: 71-86
- Zimmermann, F. K. (1983). Mutagenicity screening with fungal systems.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **407**: 186-196
- Zimmermann, F. K. (1984). Mutagenicity Testing with *Saccharomyces cerevisiae*.
bga-Schriften **3**: 225-241

8 Anhang

8.1 Sequenzierung der PCR-Amplifikate 1 und 2

Tabelle 8-1: Basenfolge der Sequenzierungen der PCR Produkte der Primer 5'-128c-NP mit URA/L-raus (Amplifikat 1) und kan1 mit 3'-129c-NP (Amplifikat 2) am Template der genomischen DNA von HAN

Primer / Amplifikat	Basenfolge der Sequenzierung der Nachweis-Amplifikate
5'-128c-NP / 1	NNCCNANGTTANNTCTCTTAATTTTATCTGTCTTTGATTCTTTTCAGAAAAGTTATGTATTATTCACGA AAAAGTCAATTCGCATCAAAGGTAATAATTTATATAAACTGCTTTAAAATTCATGAACTAGGCA ACTTTTCGAAATGATCTTTTCGAGCATGAAGTTCTTTTATAATAACCTGGTCAAAGCTTTCAATAT ATAATACATTTGGTATTTACGGAAATGAGATGATATACTGGTAGTGCCTAGTCAAGTTCTAATTGCA GTGTAACGCTAGAGCAGACGCTCATCAATAAAATCGAAATTCCTAACTAATGAGATGGAATCGGTAGA AGAATTAATTGAGGGCGGATTACTACCGTTGCTAAATTCGAGTGAAACACAGGAAGACCAGAAAATC CTCATTTTCATCCATATTAACAATAATTTCAAATGTTTATTTGCATTATTTGAAAACCTAGGAAGACAAG CAACGAAACGTTTTTGAAAATTTTGAGTATTTCAATAAAATTTGTAGAGGACTCAGATATTGAAAAAA AGCTACAGCAATTAATACTTGATAAGAAGAGTATTGAGAGGGCANTTTTTTTTTTTTTTTTTTNGGGG ANNNNNNNNNNNNNNNNNNN
URA/L-raus / 1	CNTCNGNCTCTTTTCAGCATAATTCNTGTAGCTTTTTTCAATATCTGAGTCTCTACAAAATTTATT GAAAATACTCAAATTTTCAAAAACGTTTCGTTGCTTGTCTTCCCTAGTTTCAAATAATGCAAATAAA CATTTGAAATTATTGTTAATATGGATGAAATGAGGATTTCTGGTCTTCTGTGTTTCACTCGAATTTA GCAACGGTAGTAATCCGCCCTCAATTAATTCTTACCATTCCATCTATTAGTTGGAATTTTCGATTT TATTGATGAGCGTCTGCTCTAGCGTTACCACTGCAATTAGAACTTGACTAGCGCACTACCAGTATATC ATCTCATTTCCGTAAATACCAATGTATTATATATTGAAAGCTTTTGACCAGGTTATTATAAAAGAAA CTTCATGCTCGAAAAGATCATTTCGAAAAGTTGCCTAGTTTTCATGAAATTTTAAAGCAGTTTATATA AATTTTACCTTTTGATGCGGAATTGACTTTTTCGTGAATAATACATAACTTTTCTGAAAAGAATCAAA GACAGATAAAATTTAAGAGATATTAACATTAGTGAGAAGCATTTTTTTTTTTTTANANAANCCAAAAAN NNNNNNNNNNNNNNNNNN
kan1 / 2	NNCCGCGGGNTCCCCGGCCAGCAGATGNCAGGCCAGAATACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTG CGCAGCTCAGGGCATGATGTGACTGTGCGCCGTACATTTAGCCCATACATCCCATGTATAATCATT TGCATCCATACATTTTGATGGCCGACGGCGCAAGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGC GAGCAGGAAACGCTCCCCTCACAGACGCGTTGAATTGCCCCACGCCGCGCCCTGTAGAGAAAATA TAAAAGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTCATATACTTCTTTAAAATCTTGCTAGGATACA GTTCTCACATCACATCCGAACATAAAACAACCATGGGTAAGGAAAAGACTCACGTTTCGAGGCCGCGA TTAAATTCACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAG GTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGG TAGCGTTGCCAATGATGTTGCGAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTC CGACCATCGAGCATTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGCAAA ACAGCATTCCAGGTATTGGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGT CCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCCTGGTTGNAATTGTCCNTTAAACAGCGATCGCGTATTCGTCTCGCT CAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTGGNTGATGCGAGTGATTTTGATGACNACGTATGGCTGGC TGTTGACAGTCTGGAAGAATGCATAGCTTTGCATCTCNCGGATCATCGCNCTCAGGGATTCTCCTGAN ACTATTTGANAGGGAATANAGTGTTGAGTGANATCGATCCAACGNCAGACTGC
3'-129c-NP / 2	NNNNNNNNCCNTCGAGGAGGAGCGTNNTGAGNNGTTTTGCAATATCGGAACTGCCAATCCAATTTT CCGATAACAGTTAGATATCTGGGATTATTACTACGATGTGGATGAGGGAGTGTTTTATGAAAATAAT AGTCCAGAAAAAGAAAAGCCAGATACAGTGCAGAAGTGAAAGATTGGGCCTAACCTTTGAGAAAAGA TATTCAATAGGCCTCATTCTCAACCAACGCAGTCAACGAAAGTCAGGTAAACTTGGGCCAGAAGCT CTTTTCTTCTTATCGACGAATATCATGATAGTGATACTATCATGAGCGTTTGAGAAGGCTGAATG TTCTTCAGTTGAAAAACCTTCTGGACGCTTTGAAAAGACGAGAAAATCCACCTAATATAGCACTAAA AGATGAATATATCATGTTTTATAAAGATTTTTTCATTTTCCCGGAGTTCTTTGATTATTTTACTGCA TAGTATTGAACTATTGTCTAACTTGGATAATTGTTTATTAGCTTAGGAAACACATGCCAGTTATTTTC CACAGAGCAAATATATTCCCAATTAAGCCAAATATTGGACATTGTTAAAGAGCTGTTTCGCATGGTAT CGGTAAGCAGGACAAACATTGAGAAGTTTTTAAACGCTTGTTTGAACTATTCTCCGTTCAAAAATATTA CCCACAGCTCAGTTACACGGTGATAGCATGCCTGCAGGTCAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGAC TCACTATAGGGAGACCGGCAGATCCGCGCCGCATAGGCCACTAGTGATCTGATATCATCGATGAA TTCCAGCTCGTTTTTCGACACTGGATGGCGGCGTTAGTATCGAATCGACAGCAGTATAGCGACCAGCA TTCACATACGATTGACGCATGATATTCTTCTGCGCACTTAACTTCGCATCTGGGCAGATGATGTGCG AGGCGAAAAAATATAAATCACGCTAACATTTGATTAATAAGAACACCTANNNNNAAAAANAAN NTTNNACNNNCNNNC

8.2 Ergebnisse der Real-time PCR

Tabelle 8-2: Ergebnisse der Real-time PCR

Sample Name	Primer	C _t	Quantity	Mittelwert	Stdabw.	Kan/Ade2	Stdabw. Kan/Ade	Trp1/Ade2	Stdabw. Kan/Ade
Std.	Ade2		20,00	16,67					
Std.	Kan		10,00	17,47					
Std.	Trp1		10,00	17,46					
NTC	Ade2	34,49	0,00						
NTC	Kan	26,60	0,02						
NTC	Trp1	34,23	0,00						
Std.	Ade2		2,00	20,04					
Std.	Kan		1,00	20,99					
Std.	Trp1		1,00	20,98					
Std.	Ade2		0,20	23,95					
Std.	Kan		0,10	24,83					
Std.	Trp1		0,10	24,72					
Std.	Ade2		0,02	26,79					
Std.	Kan		0,01	27,59					
Std.	Trp1		0,01	27,49					
Std.	Ade2		0,00	30,21					
Std.	Kan		0,00	29,81					
Std.	Trp1		0,00	30,48					
FP4	Ade2	18,99	4,44	4,85	0,29	0,53	0,03	0,70	0,05
FP4	Ade2	18,90	4,72						
FP4	Ade2	18,85	4,88						
FP4	Ade2	18,78	5,13						
FP4	Ade2	18,79	5,10						
FP4	Kan	19,84	2,47	2,57	0,07				
FP4	Kan	19,76	2,62						
FP4	Kan	19,82	2,51						
FP4	Kan	19,77	2,59						
FP4	Kan	19,75	2,64						
FP4	Trp1	19,14	3,63	3,38	0,17				
FP4	Trp1	19,23	3,40						
FP4	Trp1	19,34	3,16						
FP4	Trp1	19,23	3,41						
FP4	Trp1	19,27	3,32						
FP8	Ade2	18,63	5,69	5,51	0,33	0,44	0,07	0,61	0,04
FP8	Ade2	18,72	5,35						
FP8	Ade2	18,61	5,77						
FP8	Ade2	18,62	5,73						
FP8	Ade2	18,81	5,01						
FP8	Kan	19,70	2,74	2,43	0,37				
FP8	Kan	19,65	2,85						
FP8	Kan	19,85	2,44						
FP8	Kan	20,08	2,06						
FP8	Kan	20,08	2,06						
FP8	Trp1	19,26	3,36	3,34	0,08				
FP8	Trp1	19,29	3,28						
FP8	Trp1	19,25	3,38						

Sample Name	Primer	C _t	Quantity	Mittelwert	Stdabw.	Kan/Ade2	Stdabw. Kan/Ade	Trp1/Ade2	Stdabw. Kan/Ade
FP8	Trp1	19,23	3,43						
FP8	Trp1	19,31	3,24						

FP: Fusionsprodukt; Primer-Paar: Ade2: 5'-TM-Ade2 mit 3'-TM-Ade2; kan: 5'-TM-kan mit 3'-TM-kan; Trp1: 5'-TM-Trp1 mit 3'-TM-Trp1; Ct: counts; Template Menge*: wurde am Standard errechnet; ADE: ADE2 Template; TRP: TRP1 Template; Stdabw.: Standardabweichung; Std.: Standard (vorgegebene Templatekonzentration)

8.3 Behandlung der Testerstämme HAN und DAN mit den Modellsubstanzen und UV

8.3.1 MNNG

Tabelle 8-3: Inaktivierung des Stammes DAN mit unterschiedlichen Konzentrationen von MNNG

Konzentration MNNG μM	Überlebende in %	Titer
0	100	$1,8 \times 10^6$
50	83	$1,5 \times 10^6$
100	61	$1,1 \times 10^6$
250	37	$6,7 \times 10^5$
500	14	$2,6 \times 10^5$
1000	12	$2,2 \times 10^5$
2500	3,1	$5,6 \times 10^4$

Tabelle 8-4: Anzahl selektierter Kolonien nach MNNG-Behandlung 1

Kontrolle	Titer $\times 10^7$	5-FOA-MM	5-FOA-SM
DAN1	12,0	131 pro 1 ml	358 / 408 pro 0,2 ml
DAN2	9,6	83 pro 1 ml	261 / 295 pro 0,2 ml
DAN3	6,7	90 pro 1 ml	211 / 258 pro 0,2 ml
MNNG			
DAN1	5,8	224 / 249 pro 0,05 ml	654 / 592 pro 0,05 ml
DAN2	4,9	124 / 113 pro 0,05 ml	446 / 454 pro 0,05 ml
DAN3	3,6	65/87 pro 0,05 ml	508 / 474 pro 0,05 ml

Da die Platten nach MNNG-Mutagenese nicht stempelbar waren wurden je 4 Masterplatten pro Klon angefertigt, indem die Kolonien auf YEP übertragen wurden und auf die unterschiedlichen Minimalmedien gestempelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-5 dargestellt.

Tabelle 8-5: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach MNNG-Behandlung 1

Kontrolle	YNB+Ura	YNB+Ade +Ura	YNB+Ade +Ura+G418	YNB+Ade +Ura+His	YNB+Ade +Ura+His+Trp
DAN1 Platte 1	34	74	67	355	355
DAN1 Platte 2	39	83	76	404	404
DAN2 Platte 1	23	55	48	257	258
DAN2 Platte 2	32	53	52	289	289
DAN3 Platte 1	18	40	35	209	210
DAN3 Platte 2	21	51	46	258	258
MNNG					
DAN1	134	158	148	176	176
DAN2	129	157	153	187	187
DAN3	97	131	129	176	176

Tabelle 8-6: Anzahl selektierter Kolonien MNNG-Behandlung 2

Kontrolle	Titer x 10 ⁷	5-FAA	5-FOA-SM
DAN1	13,0	5 / 6 pro 0,2 ml	128 / 122 pro 0,05 ml
DAN2	8,75	5 / 4 pro 0,2 ml	65 / 85 pro 0,05 ml
DAN3	8,75	0 / 2 pro 0,2 ml	83 / 96 pro 0,05 ml
MNNG			
DAN1	11,0	10 / 3 pro 0,1 ml	31 / 48 pro 0,005 ml
DAN2	3,35	1 / 2 pro 0,1 ml	23 / 22 pro 0,005 ml
DAN3	3,8	4 / 1 pro 0,1 ml	25 / 21 pro 0,005 ml

Tabelle 8-7: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach MNNG-Behandlung 2

Kontrolle	YNB+Ura	YNB+Ura+G418	YNB+Ade+Ura	YNB+Ade+Ura+G418	YNB+Ade+Ura+His	YNB+Ade+Ura+His+Trp
DAN1 Platte 1	4	4	15	13	128	128
DAN1 Platte 2	5	3	17	16	122	122
DAN2 Platte 1	1	1	12	9	65	65
DAN2 Platte 2	3	3	8	8	85	85
DAN3 Platte 1	4	4	11	10	83	83
DAN3 Platte 2	10	6	22	22	96	96
MNNG						
DAN1 Platte 1	17	17	21	20	31	31
DAN1 Platte 2	25	23	31	29	48	48
DAN2 Platte 1	14	13	18	16	23	23
DAN2 Platte 2	12	11	18	13	22	22
DAN3 Platte 1	21	20	23	20	25	25
DAN3 Platte 2	11	10	14	14	21	21

8.3.2 UV

Tabelle 8-9: Anzahl selektierter Kolonien nach UV-Behandlung 1

Kontrolle	Titer x 10 ⁷	5-FOA-SM
DAN1	15,1	214 / 125 pro 0,1 ml
DAN2	14,2	223 / 214 pro 0,1 ml
DAN3	10,1	154 / 164 pro 0,1 ml
UV		
DAN1	8,0	81 / 95 pro 0,01 ml
DAN2	3,35	166 / 229 pro 0,01 ml
DAN3	3,95	219 / 189 pro 0,01 ml

Tabelle 8-10: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach UV-Behandlung 1

Kontrolle	YNB+Ura	YNB+Ura+G418	YNB+Ade+Ura	YNB+Ade+Ura+G418	YNB+Ade+Ura+His	YNB+Ade+Ura+His+Trp
DAN1 Platte 1	19	18	30	21	214	214
DAN1 Platte 2	15	14	23	16	125	125
DAN2 Platte 1	15	15	39	15	223	223
DAN2 Platte 2	11	11	36	11	214	214
DAN3 Platte 1	15	14	31	14	154	154
DAN3 Platte 2	14	14	24	14	146	146
UV						
DAN1 Platte 1	37	37	52	48	95	95
DAN1 Platte 2	43	45	50	45	81	81
DAN2 Platte 1	108	111	136	111	229	229
DAN2 Platte 2	96	102	124	103	166	166
DAN3 Platte 1	112	116	142	116	219	219
DAN3 Platte 2	101	107	128	107	186	186

Tabelle 8-11: Anzahl selektierter Kolonien nach UV-Behandlung 2

Kontrolle	Titer x 10 ⁷	5-FAA	5-FOA-SM
DAN1	8,5	9 / 11 pro 0,1 ml	107 / 75 pro 0,1 ml
DAN2	6,25	3 / 4 pro 0,1 ml	92 / 90 pro 0,1 ml
DAN3	5,1	14 / 15 pro 0,1 ml	78 / 69 pro 0,1 ml
UV			
DAN1	1,75	6 / 6 pro 0,05 ml	389 / 387 pro 0,05 ml
DAN2	1,73	1 / 3 pro 0,05 ml	334 / 331 pro 0,05 ml
DAN3	1,05	2 / 0 pro 0,05 ml	164 / 185 pro 0,05 ml

Tabelle 8-12: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach UV-Behandlung 2

Kontrolle	YNB+Ura	YNB+Ura+G418	YNB+Ade+Ura	YNB+Ade+Ura+G418	YNB+Ade+Ura+His	YNB+Ade+Ura+His+Trp
DAN1 Platte 1	9	9	13	13	106	106
DAN1 Platte 2	9	9	19	19	75	75
DAN2 Platte 1	11	11	19	19	87	88
DAN2 Platte 2	6	6	16	16	78	85
DAN3 Platte 1	4	4	13	13	76	76
DAN3 Platte 2	4	4	16	16	68	68
UV						
DAN1 Platte 1	177	150	187	150	389	389
DAN1 Platte 2	193	170	217	170	387	387
DAN2 Platte 1	166	135	166	135	334	334
DAN2 Platte 2	189	169	206	169	331	331
DAN3 Platte 1	85	80	88	80	164	164
DAN3 Platte 2	106	104	114	92	185	185

8.3.3 EB

Tabelle 8-13: Anzahl selektierter Kolonien nach EB-Behandlung 1

Kontrolle	Titer x 10 ⁷	5-FOA-MM	5-FOA-SM
DAN1	5,0	70 / 69 pro 1 ml	125 / 135 pro 0,1 ml
DAN2	3,25	70 / 67 pro 1 ml	94 / 115 pro 0,1 ml
DAN3	3,65	65 / 71 pro 1 ml	99 / 110 pro 0,1 ml
EB			
DAN1	1,85	5 / 6 pro 0,2 ml	9 / 13 pro 0,03 ml
DAN2	0,85	2 / 1 pro 0,2 ml	10 / 7 pro 0,03 ml
DAN3	1,05	4 / 1 pro 0,2 ml	16 / 10 pro 0,03 ml

Tabelle 8-14: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach EB-Behandlung 1

Kontrolle	YNB+Ura	YNB+Ade+Ura	YNB+Ade+Ura+G418	YNB+Ade+Ura+His	YNB+Ade+Ura+His+Trp
DAN1 Platte 1	10	26	26	135	135
DAN1 Platte 2	11	24	24	122	122
DAN2 Platte 1	15	25	25	106	106
DAN2 Platte 2	5	14	14	89	89
DAN3 Platte 1	6	20	20	92	92
DAN3 Platte 2	8	15	13	96	96
EB					
DAN1 Platte 1	1	1	1	9	9
DAN1 Platte 2	1	1	1	12	13
DAN2 Platte 1	0	2	2	10	10
DAN2 Platte 2	0	1	1	10	10
DAN3 Platte 1	0	0	0	16	16
DAN3 Platte 2	0	1	1	10	10

Tabelle 8-15: Anzahl selektierter Kolonien nach EB-Behandlung 2

Kontrolle	Titer x 10 ⁷	5-FAA	5-FOA-SM
DAN1	9,28	9 pro 0,05 ml	109 / 96 pro 0,05 ml
DAN2	8,23	12 pro 0,05 ml	74 / 86 pro 0,05 ml
DAN3	8,88	9 pro 0,05 ml	79 / 91 pro 0,05 ml
EB			
DAN1	11,25	9 pro 0,05 ml	94 / 75 pro 0,05 ml
DAN2	9,28	10 pro 0,05 ml	69 / 68 pro 0,05 ml
DAN3	7,53	5 pro 0,05 ml	78 / 58 pro 0,05 ml

Tabelle 8-16: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach EB-Behandlung 2

Kontrolle	YNB+Ura	YNB+Ura+G418	YNB+Ade+Ura	YNB+Ade+Ura+G418	YNB+Ade+Ura+His	YNB+Ade+Ura+His+Trp
DAN1 Platte 1	11	4	17	4	109	109
DAN1 Platte 2	8	2	16	2	96	96
DAN2 Platte 1	4	2	13	2	74	74
DAN2 Platte 2	6	2	13	2	86	86
DAN3 Platte 1	6	1	17	1	79	79
DAN3 Platte 2	8	3	14	3	91	91
EB						
DAN1 Platte 1	7	1	14	1	94	94
DAN1 Platte 2	5	0	9	0	73	73
DAN2 Platte 1	4	2	13	2	69	69
DAN2 Platte 2	5	2	12	2	68	68
DAN3 Platte 1	8	2	12	2	78	78
DAN3 Platte 2	5	2	7	2	58	58

8.3.4 Benomyl

Tabelle 8-17: Anzahl selektierter Kolonien nach Benomyl-Behandlung 1

Kontrolle	Titer x 10 ⁷	5-FOA-MM	5-FOA-SM
DAN1	13,4	72 / 90 pro 0,5 ml	179 / 205 pro 0,05 ml
DAN2	14,4	90 / 96 pro 0,5 ml	202 / 190 pro 0,05 ml
DAN3	17,6	116 / 106 pro 0,5 ml	243 / 224 pro 0,05 ml
Benomyl			
DAN1	7,55	48 / 52 pro 0,5 ml	204 / 203 pro 0,05 ml
DAN2	8,2	46 / 57 pro 0,5 ml	183 / 206 pro 0,05 ml
DAN3	13,0	98 / 93 pro 0,5 ml	224 / 215 pro 0,05 ml

Tabelle 8-18: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach Benomyl-Behandlung 1

Kontrolle	YNB+Ura	YNB+Ade+Ura	YNB+Ade+Ura+G418	YNB+Ade+Ura+His	YNB+Ade+Ura+His+Trp
DAN1 Platte 1	16	34	31	191	191
DAN1 Platte 2	12	20	20	176	176
DAN2 Platte 1	14	32	30	202	202
DAN2 Platte 2	16	30	28	190	190
DAN3 Platte 1	16	37	31	212	212
DAN3 Platte 2	17	39	39	228	228
Benomyl					
DAN1 Platte 1	14	37	36	203	203
DAN1 Platte 2	14	40	38	201	201
DAN2 Platte 1	18	30	29	183	183
DAN2 Platte 2	11	30	30	204	204
DAN3 Platte 1	13	39	37	215	215
DAN3 Platte 2	23	39	32	223	223

Tabelle 8-19: Anzahl selektierter Kolonien nach Benomyl-Behandlung 2

Kontrolle	Titer x 10 ⁷	5-FAA	5-FOA-SM
DAN1	13,0	5 / 6 pro 0,2 ml	128 / 122 pro 0,05 ml
DAN2	8,75	5 / 4 pro 0,2 ml	65 / 85 pro 0,05 ml
DAN3	8,75	0 / 2 pro 0,2 ml	83 / 96 pro 0,05 ml
Benomyl			
DAN1	12,1	4 / 4 pro 0,1 ml	167 / 139 pro 0,05 ml
DAN2	4,0	5 / 4 pro 0,1 ml	67 / 91 pro 0,05 ml
DAN3	4,2	1 / 0 pro 0,1 ml	81 / 80 pro 0,05 ml

Tabelle 8-20: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach Benomyl-Behandlung 2

Kontrolle	YNB+ Ura	YNB+ Ura+ G418	YNB+ Ade+ Ura	YNB+ Ade+Ura+G418	YNB+ Ade+Ura+His	YNB+Ade+Ura +His+ Trp
DAN1 Platte 1	4	4	15	13	128	128
DAN1 Platte 2	5	3	17	16	122	122
DAN2 Platte 1	1	1	12	9	65	65
DAN2 Platte 2	3	3	8	8	85	85
DAN3 Platte 1	4	4	11	10	83	83
DAN3 Platte 2	10	6	22	22	96	96
Benomyl						
DAN1 Platte 1	13	7	22	16	163	163
DAN1 Platte 2	10	4	26	19	133	133
DAN2 Platte 1	5	5	16	14	67	67
DAN2 Platte 2	3	3	15	15	90	91
DAN3 Platte 1	5	4	14	12	73	73
DAN3 Platte 2	5	3	11	9	80	80

8.3.5 Anilin

Tabelle 8-21: Anzahl selektierter Kolonien nach Anilin-Behandlung 1

Kontrolle	Titer x 10 ⁷	5-FOA-MM	5-FOA-SM
DAN1	6,9	92 / 95 pro 1 ml	114 / 145 pro 0,1 ml
DAN2	8,57	90 / 90 pro 1 ml	112 / 132 pro 0,1 ml
DAN3	13,0	28 / 18 pro 1 ml	162 / 159 pro 0,1 ml
Anilin			
DAN1	4,5	10 / 4 pro 0,1 ml	125 / 103 pro 0,1 ml
DAN2	5,15	5 / 6 pro 0,1 ml	119 / 102 pro 0,1 ml
DAN3	6,75	15 / 19 pro 0,1 ml	133 / 106 pro 0,1 ml

Tabelle 8-22: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach Anilin-Behandlung 1

Kontrolle	YNB+Ura	YNB+Ade +Ura	YNB+Ade +Ura+G418	YNB+Ade +Ura+His	YNB+Ade+Ura +His+Trp
DAN1 Platte 1	14	28	26	144	144
DAN1 Platte 2	8	27	27	114	114
DAN2 Platte 1	14	33	29	126	126
DAN2 Platte 2	10	21	21	109	109
DAN3 Platte 1	15	34	34	162	162
DAN3 Platte 2	24	41	38	154	154
Anilin					
DAN1 Platte 1	7	17	18	125	125
DAN1 Platte 2	6	19	16	100	100
DAN2 Platte 1	11	22	20	119	119
DAN2 Platte 2	9	20	20	100	100
DAN3 Platte 1	16	44	44	132	132
DAN3 Platte 2	17	29	28	106	106

Tabelle 8-23: Anzahl selektierter Kolonien nach Anilin-Behandlung 2

Kontrolle	Titer x 10 ⁷	5-FAA	5-FOA-SM
DAN1	17,25	6 pro 0,05 ml	128 / 131 pro 0,05 ml
DAN2	8,05	20 pro 0,05 ml	85 / 108 pro 0,05 ml
DAN3	8,5	10 pro 0,05 ml	89 / 101 pro 0,05 ml
Anilin			
DAN1	8,4	10 pro 0,05 ml	117 / 98 pro 0,05 ml
DAN2	5,85	5 pro 0,05 ml	100 / 84 pro 0,05 ml
DAN3	4,85	4 pro 0,05 ml	55 / 52 pro 0,05 ml

Tabelle 8-24: Bestimmung des Phänotyps von 5-FOA-SM nach Anilin-Behandlung 2

Kontrolle	YNB+ Ura	YNB+ Ura+ G418	YNB+Ade +Ura	YNB+ Ade+Ura+G418	YNB+ Ade+Ura+His	YNB+Ade +Ura+His+Trp
DAN1 Platte 1	13	4	18	4	126	126
DAN1 Platte 2	8	3	26	4	131	131
DAN2 Platte 1	9	4	14	4	85	85
DAN2 Platte 2	10	3	15	3	108	108
DAN3 Platte 1	9	2	12	2	89	89
DAN3 Platte 2	8	2	13	2	101	101
Anilin						
DAN1 Platte 1	14	5	29	5	117	117
DAN1 Platte 2	11	2	22	3	98	98
DAN2 Platte 1	12	6	17	6	100	100
DAN2 Platte 2	6	0	12	0	84	84
DAN3 Platte 1	5	0	6	0	55	55
DAN3 Platte 2	5	3	15	3	52	52

8.3.6 Behandlung von HAN mit den Modellsubstanzen und mit UV-Strahlen

Tabelle 8-25: Ergebnisse der Mutagenese von HAN

	Titer x 10 ⁷	YNB+5-FOA+Ura+Trp
Kontrolle	108	12/24 pro 0,05 ml
MNNG	30	17/12 pro 0,005
EB	105	10/18 pro 0,05 ml
Benomyl	76,5	9/15 pro 0,05 ml
Anilin	20,4	10/16 pro 0,05 ml
Kontrolle (UV)	33,9	51 pro 0,2 ml
UV	4,7	141/172 pro 0,01 ml

8.4 Charakterisierung der Lage der *URA3/kanMX4*-Kassette

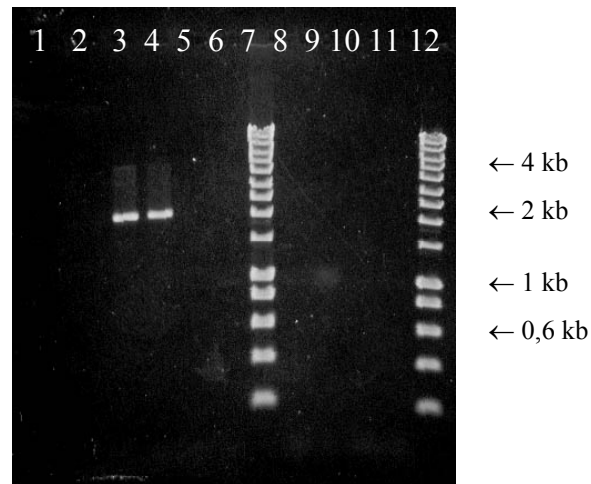


Abbildung 8-1: Gelelektrophoretische Trennung der Amplifikate der Primer *5'-I28c-NP* und *3'-kanL-NP* von *Ura⁻* Klonen 1-10 der MNNG-Mutagenese (**Spur 1-6** und **8-11**); Marker Hyperladder I (**Spur 7** und **12**)

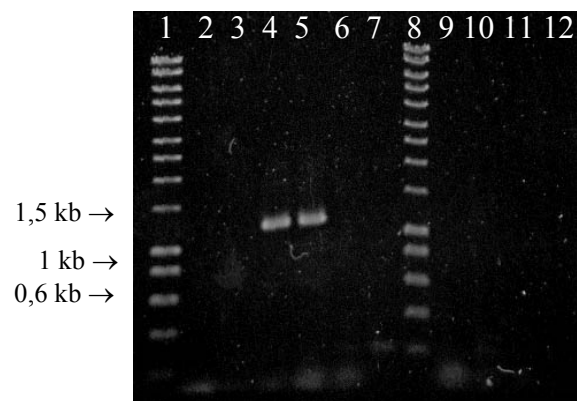


Abbildung 8-2: Gelelektrophoretische Trennung der Amplifikate der Primer *AdeR-raus* und *UraL-raus* von *Ura⁻* Klonen 1-10 der MNNG-Mutagenese (**Spur 2-7** und **9-12**); Marker Hyperladder I (**Spur 1** und **7**)

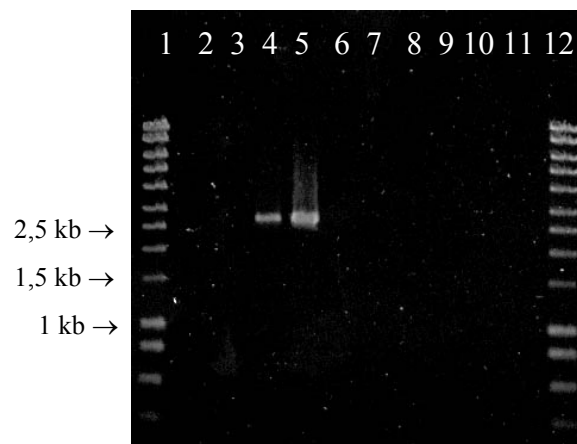


Abbildung 8-3: Gelelektrophoretische Trennung der Amplifikate der Primer *AdeR-raus* und *3'-kanL-NP* von *Ura⁻* Klonen 1-10 der MNNG-Mutagenese (**Spur 2-11**); Marker Hyperladder I (**Spur 1** und **12**)

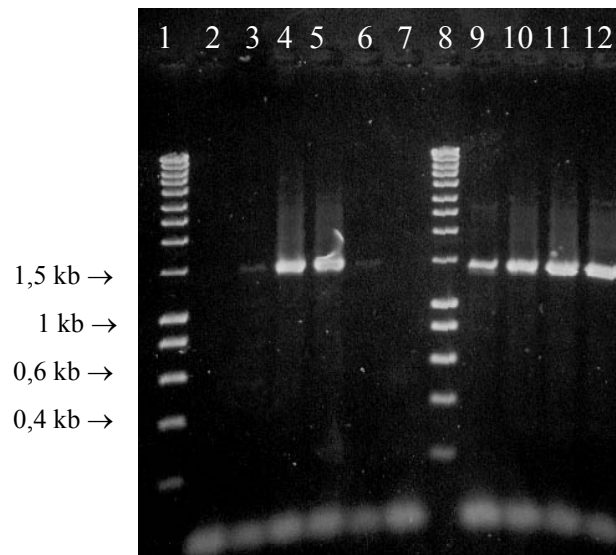


Abbildung 8-4: Gelelektrophoretische Trennung der Amplifikate der Primer *kan 1* und *kan 2* von Ura⁻ Klonen 1-6 der MNNG-Mutagenese (**Spur 2-7**); von DAN1 (**Spur 9**); DAN2 (**Spur 10**); DAN3 (**Spur11**); HAN (**Spur 12**); Marker Hyperladder I (**Spur 1** und **8**); Bei den Ura⁻ Klonen 7-10 waren keine Amplifikate auf dem Agarosegel. Dieses Gel wurde nicht fotografiert.

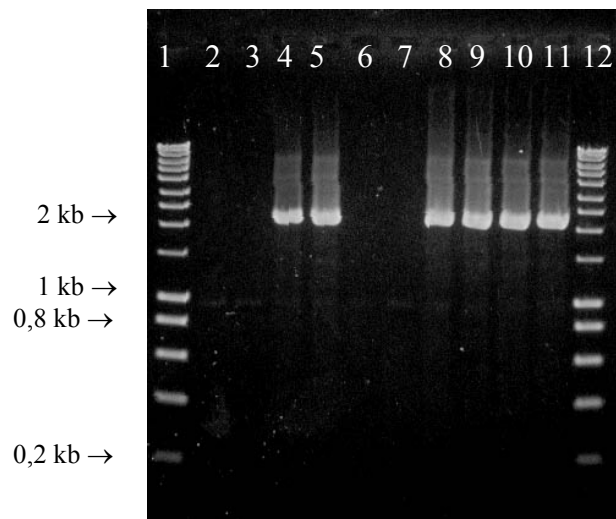


Abbildung 8-5: Gelelektrophoretische Trennung der Amplifikate der Primer 5'-128c-NP und 3'-*kan*-NP von Ura⁻ Klonen 1-6 der MNNG-Mutagenese (**Spur 2-7**); von DAN1 (**Spur 8**); DAN2 (**Spur 9**); DAN3 (**Spur10**); HAN (**Spur 11**); Marker Hyperladder I (**Spur 1** und **12**); Bei den Ura⁻ Klonen 7-10 waren keine Amplifikate auf dem Agarosegel. Dieses Gel wurde nicht fotografiert.

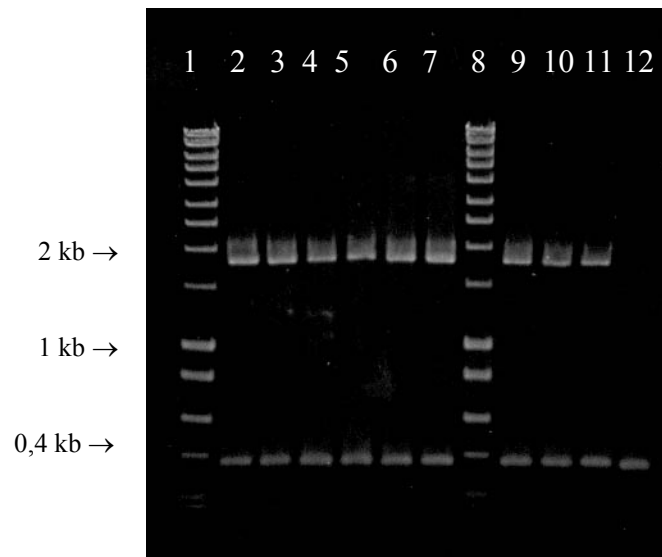


Abbildung 8-6: Gelelektrophoretische Trennung der Amplifikate der Primer 5'-128c-NP und 3'-129c-NP von Ura⁻ Klonen 1-6 der MNNG-Mutagenese (**Spur 2-7**); von DAN1 (**Spur 9**); DAN2 (**Spur 10**); DAN3 (**Spur 11**); HAN (**Spur 12**); Marker Hyperladder I (**Spur 1 und 8**); Bei den Ura⁻ Klonen 7-10 waren jeweils die 1820 bp großen Amplifikate auf dem Agarosegel. Dieses Gel wurde nicht fotografiert.

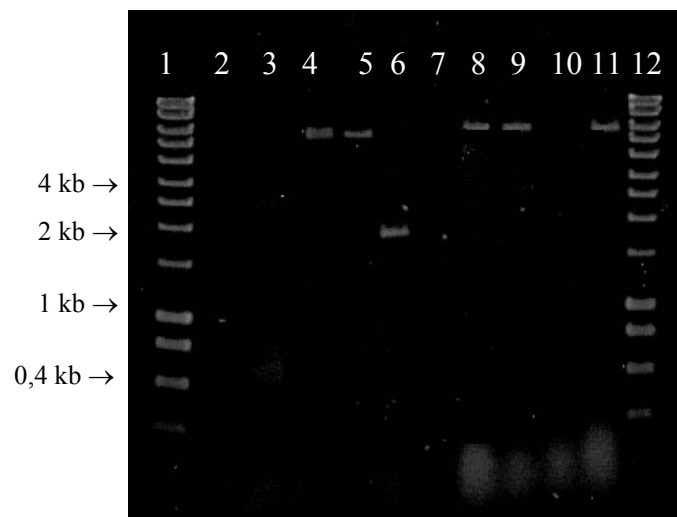


Abbildung 8-7: Gelelektrophoretische Trennung der Amplifikate der Primer 5'-128c-NP und 3'-129c-NP von Ura⁻ Klonen 1-6 der MNNG-Mutagenese (**Spur 2-7**); von DAN1 (**Spur 8**); DAN2 (**Spur 9**); H7 (**Spur 10**); HAN (**Spur 11**); Marker Hyperladder I (**Spur 1 und 12**)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. U. Klinner danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung und stetige Diskussionsbereitschaft. Sein Wissen, sein Interesse, sowie die Zeit und die Geduld, die er dieser Arbeit gewidmet hat, haben es mir ermöglicht diese anzufertigen.

Herrn H. D. Dr. B. Schäfer danke ich für die Übernahme des Korreferates. In erster Linie möchte ich mich aber für die wissenschaftliche Unterstützung bedanken. Seine zahlreichen theoretischen und praktischen Tipps haben einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei dem Institut für Molekulare Genetik (Biologie I) bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung der Real-Time PCR. Mein Dank gilt im Besonderen Rainer Kalamajka und Dr. Christoph Peterhänsel.

Ein großer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts Biologie IV, die immer für eine freundliche Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Vor allem möchte ich mich aber bei Babsi Schruff und Nicole Maaßen bedanken, die neben dem Arbeitsplatz auch Freude, Frust, Erfolg und Misserfolg mit mir geteilt haben. Ulrike Schmitt und Dr. Anja Vomberg haben freundlicherweise das Manuskript auf orthographische und grammatikalische Fehler durchgesehen.

Martin möchte ich einen besonderen Dank aussprechen. Er hat mich mit seiner unendlichen Energie angesteckt, mich immer wieder aufgebaut und mir gezeigt, dass man trotz Strapazen sein Ziel erreichen kann.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihre bedingungslose Unterstützung.

Lebenslauf

Name		Anna Neffgen geb. Kowol
Anschrift		Arensgasse 4b 52078 Aachen
Geburtsdatum/-ort		28.02.73 in Hindenburg
Nationalität		deutsch
Familienstand		verheiratet, 1Kind (geb. 01.04.2002)
Schulbildung	08/80 – 05/83	Grundschule Gleiwitz
	08/83 – 06/84	Grundschule Schalksmühle
	08/84 – 06/93	Gymnasium Aachen
Schulabschluß		Abitur
Berufsausbildung	10/93 – 07/99	Studium der Biologie an der RWTH Aachen Abschluss: Diplom
	09/99 – 09/04	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biologie IV (Mikrobiologie) der RWTH Aachen
	09/99 – 09/04	Anfertigung der Dissertation am Institut für Biologie IV (Mikrobiologie) der RWTH Aachen im Lehr- und Forschungsgebiet Angewandte Mikrobiologie und Genetik bei Prof. Dr. U. Klinner