

**Charakterisierung einer Glutathion
unabhängigen Nitrosoguanidin-Resistenz in
*Saccharomyces cerevisiae***

Diplomarbeit im Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Daniel Börgel

Frankfurt am Main

November 2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2 DNA-Alkylierung	2
1.3 Glutathion-Auxotrophie und die Fähigkeit, ohne Glutathion zu leben	6
1.4 Zielsetzung	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Material.....	8
2.1.1 Puffer und Lösungen	8
2.1.2 Hefe- und Bakteriennährmedien.....	11
2.1.3 Chemikalien und Enzyme.....	16
2.1.4 Geräte	18
2.1.5 Stämme	19
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Stammhaltung	23
2.2.2 Transformation von Hefen und Bakterien.....	23
2.2.2.1 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nach der Lithiumacetat-Methode.....	23

2.2.2.2	Elektrotransformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.2.2.3	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	24
2.2.2.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	25
2.2.3	Plasmidpräparation	25
2.2.3.1	Schnelle Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	25
2.2.3.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit dem „Qiagen Plasmid Mini Kit“	26
2.2.3.3	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit dem „Qiagen Plasmid Midi Kit“	27
2.2.3.4	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit dem „Eppendorf Plasmid Mini Kit“ ...	28
2.2.4	DNA-Restriktion mit Endonukleasen	29
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.2.6	DNA-Isolation aus Agarosegelen mit dem „Qiagen Gel Extraction Kit“	30
2.2.7	DNA-Ligation	31
2.2.8	DNA-Fällung.....	32
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.10	Aufreinigung eines PCR-Produkts mit dem „Qiagen PCR Purification Kit“	34
2.2.11	Blau-Weiß-Selektion bei <i>E. coli</i> -Transformanten.....	34
2.2.12	Selektion MNNG-sensibler Genbanktransformanten.....	35
2.2.13	Plasmidverlust.....	36
2.2.14	Agardiffusionstest.....	36
2.2.15	Tropftitertest	37
2.2.16	MNNG-Überlebenskurve	37
2.2.17	GSH-Schnelltest zur Identifikation von <i>gsh1</i> -Mutanten	38

2.2.18	Kreuzung haploider Hefestämme	39
2.2.19	Tetradenanalyse.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Klonierung des <i>RNG1</i> -Gens mit Hilfe einer Hefegenbank	40
3.1.1	Isolation und Charakterisierung MNNG-sensibler Genbanktransformanten.....	40
3.1.2	Charakterisierung des Plasmids pB6	46
3.1.3	Untersuchung der Überexpression einzelner Gene des Plasmids pB6.....	58
3.2	MNNG-Überlebenskurve bei Überexpression von <i>SNG1</i>	62
3.3	Untersuchung der Methionin-Auxotrophie einer <i>gsh1Δ; lwg1-1</i> -Mutante	64
3.4	Untersuchung der Cadmium-Sensibilität einer <i>lwg1-1</i> -Mutante	70
4	Diskussion.....	73
4.1	Klonierung des <i>RNG1</i> -Gens	73
4.2	Heterogenes Wachstum durch die Überexpression des ORFs <i>YLR112w</i> alleine oder zusammen mit dem ORF <i>YLR111w</i>	80
4.3	Die Überexpression von <i>SNG1</i> in einer <i>gsh1Δ; rng1-1</i> -Doppelmutante verstärkt die Resistenz gegen MNNG.....	81
4.4	Ein <i>ero1Δ</i> -Stamm kann durch die Disruption des <i>GSH1</i> -Gens am Leben gehalten werden	82
4.5	Der Zusammenhang der Methionin-Auxotrophie einer <i>gsh1Δ; lwg1-1</i> - Doppelmutante mit GSH-Mangel.....	84
4.6	Eine unbekannt Mutation sorgt in den Stämmen Q3 und Q4 für die Cadmium-Sensibilität	86
5	Zusammenfassung	88

6 Ausblick	89
Literaturverzeichnis	X
Anhang.....	XVII
Plasmide	XVII
Sequenz des Bereichs zwischen den ORFs <i>YLR111w</i> und <i>YLR112w</i> ...	XXVII
Ergebnisse der Tetradenanalysen	XXVII
Danksagung.....	XXXI
Eidesstattliche Erklärung	XXXIII

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: MNNG, ein DNA-alkylierendes Mutagen.....	2
ABBILDUNG 3.1: Die Entstehung der verwendeten Stämme.....	40
ABBILDUNG 3.2: Die verwendeten Stämme im Agardiffusionstest gegen MNNG	41
ABBILDUNG 3.3: Auf MNNG-haltiges Medium aufgetropfte Transformanten	42
ABBILDUNG 3.4: Die Transformante B6 zeigte nach Plasmidverlust im Agardiffusionstest gegen MNNG wieder eine Hyperresistenz, die dem ursprünglichen Stamm <i>Q2rng1</i> entsprach.....	44
ABBILDUNG 3.5: Restriktionskarte des Plasmids pB6.....	47
ABBILDUNG 3.6: Der auf dem Plasmid pB6 enthaltene Passagier und die daraus gebildeten Subklone.....	53
ABBILDUNG 3.7: Der Stamm <i>Q2rng1</i> zeigte im Tropftiterstest eine erhöhte Sensibilität gegen „Congo red“	55
ABBILDUNG 3.8: Die <i>ccw12</i> -Disruptante zeigte die in der Literatur beschriebenen Sensibilitäten gegen CCW und "Congo red" ...	57
ABBILDUNG 3.9: Der Stamm <i>Q2rng1 ura⁻</i> zeigte nach Transformation mit dem „multi copy“ Plasmid pB6-O ein heterogenes Wachstum der erhaltenen Transformanten.....	58
ABBILDUNG 3.10: Der Stamm <i>Q2rng1 ura⁻ x pB6-O</i> verliert, im Gegensatz zum Stamm <i>Q2rng1 ura⁻ x pRS424</i> bevorzugt das Plasmid	60
ABBILDUNG 3.11: Die Überexpression von <i>SNG1</i> in dem Stamm <i>Q2rng1 ura⁻</i> führte zu einer weiteren Verstärkung der Hyperresistenz gegen MNNG	63
ABBILDUNG 3.12: Das Überleben der Stämme <i>Q1 x YEp24</i> , <i>Q1 x pEH705</i> , <i>Q2rng1 ura⁻ x YEp24</i> und <i>Q2rng1 ura⁻ x pEH705</i> bei Inkubation mit MNNG.....	64
ABBILDUNG 3.13: Der Stamm <i>Y10000 gsh1Δ; cfa⁺</i> wuchs trotz des <i>cfa⁺</i> -Phänotyps nicht in Abwesenheit von Methionin	68
ABBILDUNG 3.14: Der Stamm <i>Y26531'-39C-</i> bildete nach Transformation mit einem Gemisch aus den Plasmiden pRS313 und pMG139 keine Kolonien auf SynCo-Leu+GSH-Medium, welches auf das Tragen des Plasmids pMG139 selektierte.....	69
ABBILDUNG 3.15: Das plasmidgebundene Tragen des <i>GSH1</i> -Gens führte im Stamm Q3 zu einer leichten Sensibilisierung gegen Cadmium.....	72
ABBILDUNG 4.1: Der Passagier des Plasmids pB6 mit dem LTR und <i>SNR6</i>	76
ABBILDUNG 4.2: Übersicht über die GSH- und Protein-Disulfidbrücken-Bildung im ER	83
ABBILDUNG 4.3: Der Transsulfurationsstoffwechselweg.....	85
ABBILDUNG I: Restriktionskarte des Plasmids pB6- <i>PvuII</i> Δ	XVIII
ABBILDUNG II: Restriktionskarte des Plasmids pB6-A	XIX
ABBILDUNG III: Restriktionskarte des Plasmids pB6-D.....	XIX
ABBILDUNG IV: Restriktionskarte des Plasmids pB6-E	XX
ABBILDUNG V: Restriktionskarte des Plasmids pB6-H.....	XX
ABBILDUNG VI: Restriktionskarte des Plasmids pB6-I.....	XXI
ABBILDUNG VII: Restriktionskarte des Plasmids pB6-J.....	XXI

ABBILDUNG VIII: Restriktionskarte des Plasmids pB6-K	XXII
ABBILDUNG IX: Restriktionskarte des Plasmids pB6-L.....	XXII
ABBILDUNG X: Restriktionskarte des Plasmids pB6-M.....	XXIII
ABBILDUNG XI: Restriktionskarte des Plasmids pB6-N.....	XXIII
ABBILDUNG XII: Restriktionskarte des Plasmids pB6-O.....	XXIV
ABBILDUNG XIII: Restriktionskarte des Plasmids pB6-P	XXIV
ABBILDUNG XIV: Restriktionskarte des Plasmids pB6-Q.....	XXV
ABBILDUNG XV: Restriktionskarte des Plasmids pB6-R.....	XXV
ABBILDUNG XVI: Restriktionskarte des Plasmids pB6-S	XXVI
ABBILDUNG XVII: Restriktionskarte des Plasmids pB6-T	XXVI

Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.1:	PCR-Ansätze für <i>Taq</i> und <i>Pwo</i> -Polymerase	33
TABELLE 2.2:	Verwendete Testsubstanzen für Agardiffusionstests	36
TABELLE 3.1:	Konstruktion und Auswertung der Subklone	49
TABELLE I:	Sporen des Diplonten DB5460.....	XXVII
TABELLE II:	Sporen des Diplonten Y26531'.....	XXVIII

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-Triphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	„complementary DNA“
cfa	„colony forming ability“: beschreibt die Fähigkeit ohne GSH Kolonien bilden zu können
CHO	„chinese hamster ovary“
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Farad
Fa.	Firma
GSH	Glutathion
h	Stunden
inkl.	inklusive
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
MCS	„multiple cloning site“
µl	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _i	anorganisches Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
s	Sekunden

Tab.	Tabelle
u	„unit“
u.a.	unter anderem
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
WT	Wildtyp
YEPD	„yeast extract peptone dextrose“
YEPG	„yeast extract peptone glycerin“
z.B.	zum Beispiel
ZT	Zimmertemperatur (ca. 20°C)

1 Einleitung

1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* aus der Familie der Saccharomycetaceae wird phylogenetisch der Ordnung der Ascomycetes (Schlauchpilze) zugeordnet. Diese werden mit den Basidiomyceten zu den höheren Pilzen zusammengefasst.

Die natürlichen Habitate von Hefen sind aquatische und feuchte Standorte, darunter auch Pflanzensäfte und Tiergewebe; *S. cerevisiae* zum Beispiel kommt in der Natur auf Früchten und im Boden vor.

Die Mehrzahl der Hefen reproduzieren sich asexuell durch einfache Zellteilung oder durch das Abschnüren einer Knospe von der Mutterzelle.

Diploide Hefezellen können unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel Nährstoffmangel, sporulieren, wobei sie einen Ascus mit vier haploiden Ascosporen ausbilden. Bei diesen Sporen unterscheidet man zwischen den beiden Paarungstypen **a** und α . Nur zwei Haplonten unterschiedlichen Paarungstyps können wieder zu einer diploiden Zelle verschmelzen.

Als Energiequelle nutzt *S. cerevisiae* bevorzugt Glukose, die über die Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt wird. Unter anaeroben Bedingungen wird das entstandene Pyruvat zu Ethanol vergoren. Unter aeroben Bedingungen wird dieses, wie auch Laktat, Ethanol und Glyzerin, mit Hilfe der Atmung in den Mitochondrien weiter verwertet. Als alternative Energiequellen zu Glukose können auch Galaktose, Sukrose und Maltose dienen. Dies ist jedoch nur in Zellen mit intakten Mitochondrien („grande“) möglich; nicht in Zellen, in denen Teile oder das gesamte mitochondriale Genom verloren gingen („petite“).

Aufgrund der leichten Kultivierbarkeit und Handhabung, wie z.B. der kurzen Verdopplungszeit von ca. 90 Minuten, ist der einzellige Hefepilz *S. cerevisiae* zum Modellorganismus für molekulargenetische Untersuchungen an Eukaryoten geworden. Zudem ist er wohl einer der genetisch und biochemisch bestuntersuchteten Organismen. Ein weiterer Vorteil besteht in dem Vorliegen der kompletten Sequenz des Genoms, welches mit $1,3 \cdot 10^7$ Basenpaaren (bp),

verteilt auf 16 linearen Chromosomen mit einer Größe von jeweils ca. 200 bis 2200 kbp, nur etwa das 3fache von *E. coli* ausmacht.

1.2 DNA-Alkylierung

Eine Alkylierung der DNA kann „spontan“ erfolgen oder durch alkylierende Chemikalien. Die „spontane“ Alkylierung von DNA-Nukleotiden erfolgt am häufigsten durch eine nicht-enzymatische Übertragung von Methyl-Gruppen aus S-Adenosyl-L-methionin, dem Cofaktor vieler normaler Methylierungsreaktionen in der Zelle. Alkylierende Chemikalien hingegen sind Mutagene, die teilweise erst nach ihrer Aktivierung, als reaktive Stoffwechselprodukte, DNA-Schäden hervorrufen. Hierzu gehören Alkyl-Sulfate wie z.B. Dimethylsulfat, Methylmethansulfonat und Ethylmethansulfonat, sowie N-nitroso-Verbindungen wie z.B. Dimethylnitrosamin, N-Methyl-N-nitrosoharnstoff und N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) (Abb. 1.1).

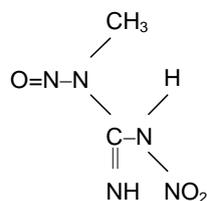


Abbildung 1.1: MNNG, ein DNA-alkylierendes Mutagen.

Veränderungen der DNA-Nukleotide erfolgen an allen Positionen, die einer chemischen Methylierung oder Ethylierung zugänglich sind. Zu den häufigsten Reaktionsprodukten zählen 7-Alkylguanin und 3-Alkyladenin.

Neben der „error-free repair“ wird zwischen zwei Konsequenzen der DNA-Alkylierung unterschieden: der direkten und der indirekten Mutagenese. Direkte Mutationen entstehen durch veränderte Paarungseigenschaften methylierter Nukleotide. Die Modifikation von Guanin zu O⁶-Methylguanin ermöglicht die Basenpaarung mit Thymin, wobei die Methylierung von Thymin zu O⁴-Methylthymin die Basenpaarung mit Guanin ermöglicht. Einen wichtigen Anteil bei der Reparatur dieser Mutationen spielt die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, welche nicht nur die Methyl-Gruppe von alkylierten Guanin-Resten, sondern auch von alkylierten Thymin-Resten und von alkylierten Phos-

phaten entfernt. Hierbei wird die Methyl-Gruppe auf das Enzym übertragen, welches dadurch inaktiviert, und die Base somit wieder hergestellt wird. Indirekte Mutationen können sich im Zuge von Reparaturprozessen nach Alkylierung eines Nukleotids ausbilden. Dies geschieht etwa durch die Erkennung des alkylierten Nukleotids als DNA-fremd durch die DNA-Glykosylase und das nachfolgende Ausschwenken des Nukleotids aus dem Verband der Doppelhelix und das Lösen der glykosidischen Bindung. Als Ergebnis entsteht eine Apurin- oder Apyrimidin-Stelle (AP-Stelle). Wird diese nicht schnell genug repariert, kann es bei der Replikation zum Überspringen der AP-Stelle und somit zur Deletion eines Nukleotids im synthetisierten Strang führen. Kommt es jedoch zum Einbau eines Nukleotids gegenüber einer AP-Stelle wird vermehrt ein Adenin-Nukleotid herangezogen, was zur Transition eines GC- zu einem AT-Basenpaar führen kann (Knippers, 2001).

Die Aktivierung von MNNG zu einem reaktiven Stoffwechselprodukt erfolgt durch die Reaktion mit einer Thiolgruppe, wie sie in der Zelle z.B. als freies Cystein oder in gebundener Form als Glutathion (GSH) vorkommt. Hierbei wird durch einen nukleophilen Angriff der Thiolgruppe am MNNG die Freisetzung der Methylgruppe bewirkt, welche ihrerseits nukleophil die Nukleotide der DNA angreift (Süssmuth und Lingens, 1969; Lawley und Thatcher, 1970).

Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, die zu einer Hyperresistenz gegen MNNG führen können: eine verringerte Aktivierung des MNNGs, die verstärkte Reparatur methylierter DNA, sowie ein vermehrter Export des Mutagens bzw. eine verbesserte Entgiftung der Zelle. Diese Mechanismen können sowohl durch Mutationen, als auch durch die Überexpression bestimmter Gene erzielt werden.

In *S. cerevisiae* sind einige Mutationen bekannt, die eine Hyperresistenz gegen MNNG auslösen. So führt die Senkung der Glutathionkonzentration in der Zelle zu einer Hyperresistenz gegen MNNG aufgrund der verminderten Aktivierung des Mutagens (Mohn et al., 1983; Kistler et al., 1986). Die Senkung der GSH-Konzentration geht auf den Ausfall des *GSH1*-Gens zurück, welches die γ -Glutamylcystein-Synthetase kodiert. Dieses Enzym katalysiert den ersten von zwei Schritten, die zur Synthese von GSH nötig sind. Da das hierbei entstehende Zwischenprodukt γ -Glutamylcystein bereits die Fähigkeit besitzt, MNNG zu aktivieren, bewirkt ein Ausfall des zweiten Gens des GSH-Synthese-

Weges, *GSH2*, keine Hyperresistenz gegen MNNG (Meister und Anderson, 1983).

Durch Mutagenese eines *gsh1Δ*-Stammes konnten zwei Klone isoliert werden, die eine noch größere Resistenz gegen MNNG aufwiesen, als bereits der Ausgangsstamm zeigte. Da zum Zeitpunkt dieses Versuchs nur eine Mutation (*gsh1Δ*) bekannt war, die zu einer verstärkten Resistenz gegen MNNG führte und die Mutagenese eines Wildtyps nur zur Isolation von *gsh1*-Mutanten führte, wurde eine *gsh1Δ*-Mutante als Ausgangspunkt für die Mutagenese verwendet, die der Suche seltener Mutationen diene, welche zu einer Hyperresistenz gegen MNNG führten. Bezeichnet wurden die entsprechenden Mutationen mit *rng1-1* und *rng2-1* („resistance to nitrosoguanidine“). Die eine Mutation (*rng1-1*) erwies sich als semi-dominant wohingegen die andere Mutation (*rng2-2*) als dominant bestimmt wurde. Zudem wurden einige Sensibilitäten der Mutanten entdeckt: eine Lithium- und eine Cadmium-Sensibilität beider Mutanten, sowie eine zusätzliche Temperatur- (37°C), Wasserstoffperoxid- und Nystatin-Sensibilität der *rng1-1*-Mutante (Aljazzar, 2002).

Die DNA-Photolyase bindet und repariert Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere, welche durch ultraviolettes Licht induziert werden. Zusätzlich bindet sie in *S. cerevisiae* an die DNA, die z.B. durch MNNG beschädigt wurde. Mutationen im *PHR1*-Gen, welches die DNA-Photolyase kodiert, führen zu einer Resistenz gegen MNNG. D.h. die Bindung der DNA-Photolyase an die DNA, die durch ultraviolettes Licht geschädigt wurde, unterstützt das Überleben der Zelle. Die Bindung an die DNA, die durch MNNG geschädigt wurde, schadet dieser hingegen. Vermutlich lässt sich dies durch das Verhindern der Anbindung des Nukleotid-Exzisions-Reparatursystems an die entsprechende, durch MNNG geschädigte Stelle der DNA erklären (Fox et al., 1994).

Das dem Mismatch-Reparatur-System angehörende MutS-Protein besitzt in *S. cerevisiae* fünf kernkodierte Homologe: *MSH2*, 3 und 6, welche an der Mismatch-Reparatur vegetativer und meiotischer Zellen beteiligt sind, und *MSH4* und 5, die zur erleichterten Ausbildung von Crossovern homologer Bereiche während der Meiose dienen, jedoch keine Funktion bei der Mismatch-Reparatur vegetativer oder meiotischer Zellen ausüben (Pochart et al., 1997). Eine mutierte Form des *MSH5*-Gens (*msh5-14*) ist jedoch vermutlich fähig, die

Mutation von Guanin zu O⁶-Methylguanin zu reparieren, was zur Ausprägung einer MNNG-Resistenz führt (Bawa und Xiao, 1997).

Zudem sind weitere Gene bekannt, die bei ihrer Überexpression zu einer Hyperresistenz gegen MNNG in *S. cerevisiae* führen.

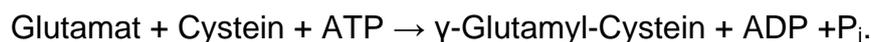
Die Überexpression des *SNQ3/YAP1*-Gens führt neben einer Hyperresistenz gegen MNNG auch zu Hyperresistenzen gegen 4-Nitroquinolin-N-oxid, Trenimon, Cycloheximid und Sulfometuron Methyl (Hertle et al., 1991). Als Transkriptions-Aktivator für Gene, die in allgemeine oder spezielle Entgiftungsvorgänge eingebunden sind, können folgende Mechanismen die Hyperresistenz gegen MNNG erklären: (1) eine verstärkte Entgiftung durch die Anregung des MNNG-Exports, oder (2) die Anregung der DNA-Reparatur. Die erhöhte GSH-Synthese bei der Überexpression von *SNQ3/YAP1* schließt eine verringerte MNNG-Aktivierung durch GSH aus (Grey und Brendel, 1994).

Eine Hyperresistenz gegen MNNG, die vermutlich auf den vermehrten Export des Mutagens zurückgeht, liegt bei Überexpression von *SNG1* („sensitivity to nitrosoguanidine“) vor. Das durch *SNG1* kodierte Protein besitzt sieben potentielle Membran-durchspannende Domänen, was vermuten lässt, dass es sich hierbei um ein Membran-gebundenes Protein handelt. Die Überexpression von *SNG1* führt in *S. cerevisiae*, ohne Beeinflussung von GSH-Gehalt und DNA-Reparatur, zu einer Hyperresistenz gegen MNNG (Grey et al., 1995).

Zusätzlich zu Mutationen in *S. cerevisiae* ist auch eine Veränderung in einem menschlichen Gen bekannt, die zu einer Hyperresistenz gegen MNNG führen kann. Ein dem menschlichen *lamp-2*-Gen, welches ein lysosomales Membranprotein kodiert, partiell identisches humanes Gen, erzeugt in CHO-Zellen eine Resistenz gegen die alkylierenden Mutagene MNNG und N-Methyl-N-nitrosos-harnstoff. Die Expression der menschlichen cDNA wird jedoch nicht durch eine MNNG-Behandlung induziert und führt ebenso wenig zu einer verstärkten DNA-Reparatur (Fritz et al., 1993).

1.3 Glutathion-Auxotrophie und die Fähigkeit, ohne Glutathion zu leben

Das Tripeptid Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin), bestehend aus den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin, spielt direkt oder indirekt eine wesentliche Rolle bei der Synthese von Proteinen und DNA, bei Transportvorgängen, bei Enzym-Aktivitäten, bei Stoffwechsel- und bei Entgiftungsprozessen. Die hochreaktive Thiol-Gruppe, das sehr niedrige Redox-Potential von ca. -240 bis -250 mV und die hohe intrazelluläre Konzentration von bis zu 10 mM machen es zu einem zellulären Redox-Puffer. An der intrazellulären Synthese von GSH sind zwei aufeinanderfolgende Reaktionen beteiligt. Die γ -Glutamylcystein-Synthetase, kodiert durch *GSH1*, synthetisiert unter ATP-Verbrauch folgende Kondensation:



Im zweiten Schritt der GSH-Synthese kommt es, wiederum unter ATP-Verbrauch, zu folgender Umsetzung durch die Glutathion-Synthetase, kodiert durch *GSH2* (Meister und Anderson, 1983):



Die Disruption des *GSH1*-Gens verhindert die Bildung des Dipeptids γ -Glutamyl-Cystein und führt zur Ausprägung einer GSH-Auxotrophie. Da die Aufnahme von GSH in die Zelle kein Problem darstellt, kann diese Auxotrophie durch Zugabe von GSH supplementiert werden (Grant et al., 1996). Bleibt die Gabe von GSH aus, wird der apoptotische Zelltod eingeleitet (Madeo et al., 1999). Zudem führt eine Disruption von *GSH1* zu einer Sensibilisierung von *S. cerevisiae* gegen Wasserstoffperoxid und Cadmium (Stephen und Jamieson, 1996), sowie gegen tert-Butylhydroperoxid (Grant et al., 1996). Zusätzlich zeigt sich eine erhöhte Resistenz gegen MNNG (siehe 1.2 „DNA Alkylierung“).

Der Austausch einer einzelnen Base im *PRO2*-Gen, dem zweiten Gen des Prolin-Biosynthese-Stoffwechselweges, ermöglicht einer *gsh1 Δ* -Mutante das Leben ohne Gabe von GSH. Die mutierte Form der γ -Glutamylphosphat-Reduktase, kodiert durch *PRO2*, führt über einen noch unbekanntem Weg zur Synthese geringster Mengen an GSH und stellt den wohl einzigen Suppressor

für die GSH-Auxotrophie in Hefe dar (Spector et al., 2001). Eine *gsh1-Δ1; pro2-1*-Doppelmutante zeigt ein stark verlangsamtes Wachstum ohne GSH und keinerlei Wachstum ohne die Gabe von Methionin, sowie eine erhöhte Sensibilität gegen Cadmium (Schmidt, 1997¹).

1.4 Zielsetzung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Klonierung des *RNG1*-Gens mittels einer auf dem „single copy“-Plasmid YCp50 basierenden Genbank. Eine Klonierung von *RNG2* konnte aufgrund der Dominanz der entsprechenden Mutation (*rng2-1*) nicht durch Zuhilfenahme einer Genbank erfolgen.

Daneben wurde zur näheren Charakterisierung von *SNG1* eine Überlebenskurve verschiedener Stämme, die das Gen *SNG1* als Passagier auf dem „multi copy“ Vektor YEp24 enthielten, unter Einwirkung von MNNG angefertigt.

Weitere Ziele dieser Arbeit lagen in der Untersuchung der Cadmium-Sensibilitäten einer *lwg1-1-* (bzw. *pro2-*) Mutante und einer *gsh1Δ; lwg1-1*-Doppelmutante.

Außerdem sollte der mögliche Zusammenhang mit der, in einer *gsh1Δ; lwg1-1*-Doppelmutante vorgefundenen Methionin-Auxotrophie, überprüft werden.

¹ Die in dieser Dissertation beschriebene Mutation *lwg1-1* (living without glutathione) wurde als ein Allel von *pro2* identifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Lösungen

Ampicillin-Stammlösung

25 mg Ampicillin in 1 ml destilliertem Wasser lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C aufbewahren

„Calcofluor white“-Lösung (CCW)

5 mM in destilliertem Wasser, bei 4°C aufbewahren

CdCl_2 -Lösung

1 bzw. 3 mg/ml in destilliertem Wasser

„Congo red“-Lösung

2,4 mg/ml in destilliertem Wasser, bei 4°C aufbewahren

CTAB-Lösung (Cethyl-Trimethyl-Ammoniumbromid)

5% (w/v) CTAB in destilliertem Wasser lösen, sterilfiltrieren und bei 30°C aufbewahren

EDTA-Stammlösung (Di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat)

18,61 g $\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen, mit NaOH auf pH 8,0 einstellen

Ethanol

70% in destilliertem Wasser

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid pro 1 ml destilliertem Wasser lösen, dunkel aufbewahren

Glutathion-Stammlösung (GSH)

200 mg reduziertes Glutathion mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen, sterilfiltrieren

Glycerin-Lösung (10%)

100 ml Glycerin mit 900 ml destilliertem Wasser auffüllen, autoklavieren

Hefe-Puffer

3,55 g KH_2PO_4

7,275 g Na_2HPO_4

mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren

HEPES-Puffer

1 M, pH 7,3 in destilliertem Wasser, sterilfiltrieren

IPTG-Lösung

0,8 M in destilliertem Wasser, sterilfiltrieren, bei 4°C aufbewahren

Ladepuffer für Agarosegele (6x)

0,25% Bromphenolblau

30% Glycerin

in destilliertem Wasser

Lithium Acetat

100 mM bzw. 1 M in destilliertem Wasser

Lysozym-Lösung

25 mg Lysozym in 1 ml destilliertem Wasser lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C aufbewahren

Menadion-Lösung

5 mg/ml in destilliertem Wasser, bei 4°C aufbewahren

MNNG-Lösung (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin)

0,68 M in Aceton, bei -20°C aufbewahren

NaCl-Lösung

1,2 M Natriumchlorid in destilliertem Wasser, autoklavieren

PEG

PEG₄₀₀₀ 40%-ig in 1 M LiAc

Phosphatpuffer-Saline (PPS)

7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3 g KH_2PO_4

4 g NaCl

mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren

RNase A-Lösung

10 mM Tris-HCl , pH 7,5

15 mM NaCl

10 mg/ml RNase A

aufkochen, sterilfiltrieren, bei -20°C aufbewahren

Sorbitol-Lösung

1 M Sorbitol in destilliertem Wasser, autoklavieren

STET-Puffer

8% (w/v) Saccharose

50 mM EDTA

50 mM Tris-HCl , pH 8,0

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 0,1% (v/v) Triton X-100.

TBE-Puffer (10x)

180 mM Tris-HCl , pH 8,0

180 mM Borsäure

4 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl , pH 7,5

1 mM EDTA, pH 8,0

tert-Butylhydroperoxid-Lösung (t-BOOH)

0,7% in destilliertem Wasser

Tris-HCl

60,55 g Tris

460 ml destilliertes Wasser

mit HCl auf pH 7,5 einstellen und mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen

X-Gal-Lösung (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid)

1 mg X-Gal in 100 µl N,N-Dimethylformamid (DMF), bei –20°C aufbewahren

2.1.2 Hefe- und Bakteriennährmedien

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* und *E. coli* auf festen Nährböden wurden folgende Medien, nach Sterilisation durch Autoklavieren, verwendet. Bei der Herstellung von Flüssigmedien wurde kein Agar zugegeben.

Hefe-Vollmedium (YEPD)

20 g	Bacto-Pepton
20 g	Glukose
16 g	Agar
5 g	Hefe-Extrakt

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

Synthetisches Vollmedium für Hefe (SynCo)

20 g	Glukose
16 g	Agar
5 g	Ammoniumsulfat
3,4 g	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren und Stickstoffquelle)

mit demineralisiertem Wasser auf 986,5 ml auffüllen, Zugabe von 3,5 ml 1 N NaOH, nach dem Autoklavieren werden 10 ml der Aminosäure- und Basen-Stammlösung und für GSH-auxotrophe Stämme zusätzlich 10 ml der GSH-Stammlösung zugegeben

Aminosäure- und Basen-Stammlösung

400 mg	Adenin
400 mg	L-Arginin
400 mg	L-Histidin
600 mg	L-Leucin
600 mg	L-Lysin
400 mg	DL-Methionin
400 mg	L-Tryptophan
400 mg	Uracil

mit demineralisiertem Wasser auf 200 ml auffüllen und sterilfiltrieren, in Selektionsmedien entfällt die entsprechende Aminosäure bzw. Base, z.B. „SynCo-ura“: Medium ohne Uracil

Präsporulationsmedium für Hefe (PSM)

23 g	Bacto-Nutrient-Agar
50 g	Glukose
5 g	Agar
10 g	Hefe-Extrakt

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

Sporulationsmedium für Hefe (KAc-Medium)

9,8 g	Kaliumacetat
2,5 g	Hefe-Extrakt
1 g	Glukose
16 g	Agar

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

Hefe-Selektionsmedium für atmungskompetente Zellen (YEPG)

20 g	Bacto-Pepton
23,8 ml	Glyzerin
16 g	Agar
5 g	Hefe-Extrakt

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

Genitacin-haltiges [200 mg/l] Vollmedium für Hefe zur Selektion Genitacin-resistenter Stämme

20 g	Bacto-Pepton
20 g	Glukose
16 g	Agar
5 g	Hefe-Extrakt

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen, autoklavieren, Zugabe von 200 mg Genitacinsulfat (G418)

LiCl-haltiges [250 mM] Vollmedium für Hefe zur Bestimmung der Lithium-Sensibilität

20 g	Bacto-Pepton
20 g	Glukose
16 g	Agar
5 g	Hefe-Extrakt
10,6 g	LiCl

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

„Calcofluor white“-haltiges [20 / 40 µM] Vollmedium für Hefe zur Bestimmung der CCW-Sensibilität

20 g	Bacto-Pepton
20 g	Glukose
16 g	Agar
5 g	Hefe-Extrakt

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen, autoklavieren, Zugabe von 4 ml (20 µM-Endkonz.) bzw. 8 ml (40 µM-Endkonz.) CCW-Lösung [5 mM]

„Congo red“-haltiges [19 µg/ml] Vollmedium für Hefe zur Bestimmung der „Congo red“-Sensibilität

20 g	Bacto-Pepton
20 g	Glukose
16 g	Agar
5 g	Hefe-Extrakt

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen, 200 µl der „Congo red“-Lösung [2,4 mg/ml] werden auf eine Agarplatte (25 ml) aufgespatelt

MNNG-haltiges [0,102 mM] Selektionsmedium für Hefe zur Negativ-Selektion
MNNG-sensibler Transformanten

20 g Glukose

16 g Agar

5 g Ammoniumsulfat

3,4 g Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren und Stickstoffquelle)

mit demineralisiertem Wasser auf 975 ml auffüllen, Zugabe von 3,5 ml
1 N NaOH, nach dem Autoklavieren werden 10 ml Aminosäure- und Basen-
Stammlösung ohne Uracil und 10 ml GSH-Stammlösung zugegeben, nach Ab-
kühlung auf 50°C werden 150 µl der MNNG-Lösung [0,68 M] zugegeben

5-„Fluor-Orotic-Acid“ (5-FOA)-haltiges Medium zur Selektion von Uracil-
auxotrophen Hefe-Stämmen

40 g Glukose

36 g Agar

5 g Ammoniumsulfat

3,4 g Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren und Stickstoffquelle)

mit demineralisiertem Wasser auf 967 ml auffüllen, Zugabe von 3,5 ml
1 N NaOH, nach dem Autoklavieren werden 20 ml der jeweiligen Aminosäure-
und Basen-Stammlösung, 1 g 5-FOA und für GSH-auxotrophe Stämme zu-
sätzlich 10 ml GSH-Stammlösung zugegeben

Vollmedium für *E. coli* (LB-Medium)

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefe-Extrakt

10 g Natriumchlorid

16 g Agar

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen und mit 1 N NaOH auf pH 7,5
einstellen

E. coli-Vollmedium zur Selektion auf Ampicillin-Resistenz (LB-Ampicillin)

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	Natriumchlorid
16 g	Agar

mit demineralisiertem Wasser auf 996 ml auffüllen und mit 1 N NaOH auf pH 7,5 einstellen, nach dem Autoklavieren mit 4 ml Ampicillin-Stammlösung [25 mg/ml] versetzen

E. coli-Vollmedium für „Blau-Weiß-Selektion“ (LB-X-Gal)

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	Natriumchlorid
16 g	Agar

mit demineralisiertem Wasser auf 992 ml auffüllen und mit 1 N NaOH auf pH 7,5 einstellen, nach dem Autoklavieren mit 4 ml Ampicillin-Stammlösung [25 mg/ml], 40 mg X-Gal in 4 ml N,N-Dimethylformamid (DMF) und 4 ml IPTG-Lösung [0,8 M] versetzen

Elektrotransformationsmedium für E. coli (GYT-Medium)

10%	Glyzerin
0,125%	Hefe-Extrakt
0,25%	Trypton

in demineralisiertem Wasser, sterilfiltrieren

Regenerationsmedium für E.coli zur Expression der Antibiotikaresistenz nach Elektrotransformation (SOC-Medium)

5 g	Hefe-Extrakt
20 g	Bacto-Trypton
0,584 g	NaCl
0,186 g	KCl ₂
0,952 g	MgCl ₂
4 g	Glukose
2,46 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O

mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Agar	Fa. Difco
Agarose	Fa. Difco
Aminosäuren	Fa. Merck
Ammoniumsulfat	Fa. AppliChem
Ampicillin	Fa. Gerbu
Bacto-Nutrient-Agar	Fa. Gibco
Bacto-Pepton	Fa. Gibco
Bacto-Trypton	Fa. Gibco
BIOTAQ Red DNA Polymerase und Inkubationspuffer	Fa. Bioline
Borsäure	Fa. Roth
Bromphenolblau	Fa. Serva
CCW („Calcofluor white“)	Fa. Sigma
CdCl ₂ (Cadmiumchlorid)	Fa. Sigma
„Congo red“	Fa. Sigma
CTAB (Cethyl-Trimethyl-Ammoniumbromid)	Fa. Sigma
DMF (N,N-Dimethylformamid)	Fa. Sigma
EDTA (Di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat)	Fa. Merck
Ethanol	Klinik-Apotheke
Ethidiumbromid	Fa. Sigma
„Gene Ruler 1 kb DNA Ladder“	Fa. MBI Fermentas
Geniticinsulfat (G418)	Fa. Gibco
β-Glucoronidase	Fa. Sigma
Glyzerin	Fa. Roth
GSH (Glutathion)	Fa. US Biological
HCl (Salzsäure)	Fa. Merck
HEPES-Puffer	Fa. Gibco
IPTG	Fa. Sigma
Isopropanol	Fa. Merck
KAc (Kaliumacetat)	Fa. Merck
KCl ₂ (Kaliumchlorid)	Fa. Merck
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	Fa. Merck

Ladepuffer für Agarosegele	Fa. MBI Fermentas
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker	Fa. MBI Fermentas
LiAc (Lithiumacetat)	Fa. Merck
LiCl (Lithiumchlorid)	Fa. Roth
Lysozym	Fa. Sigma
Menadion	Fa. Sigma
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Fa. Merck
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Magnesiumsulfat)	Fa. Merck
MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin)	Fa. Sigma
NaCl (Natriumchlorid)	Fa. Riedel deHaen
Na ₂ HPO ₄ (Di-Natriumhydrogenphosphat)	Fa. Merck
NaH ₂ PO ₄ (Natriumhydrogenphosphat)	Fa. Merck
NaOH (Natriumhydroxid)	Fa. Merck
PEG ₄₀₀₀ (Polyethylenglycol)	Fa. Fluka
<i>Pwo</i> -Polymerase	Fa. peqlab
QIAprep Midiprep Kit	Fa. QIAgen
QIAprep Miniprep Kit	Fa. QIAgen
QIAquick Gel Extraction Kit	Fa. QIAgen
QIAquick PCR Purification Kit	Fa. QIAgen
Restriktionsendonukleasen und Inkubationspuffer	Fa. MBI Fermentas, Fa. Böhlinger Mannheim, Fa. New England Bio- labs
RNase A	Fa. Sigma
Saccharose	Fa. Roth
Sorbitol	Fa. Merck
T4 DNA Ligase und Inkubationspuffer	Fa. MBI Fermentas
(CH ₃) ₃ COOH; t-BOOH (tert-Butylhydroperoxid)	Fa. Merck
Tris-HCl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Fa. Roth
Triton-X-100	Fa. Sigma
Yeast Extrakt	Fa. Gibco
Yeast Nitrogen Base	Fa. US Biological

X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid)	Fa. Bachem
Zymolyase	Fa. US Biological

2.1.4 Geräte

Autoklav	Fa. Wolf
Eismaschine	Fa. Scotsman
Elektrophoresekammern	Fa. peqlab
Elektroporationsgerät	Fa. BioRad
Exsikkator	Fa. Glaswerk Wertheim
Feinwaage	Fa. Scaltec
Kühlbrüter	Fa. Rubarth & Co.
Kühlschrank (4°C, -20°C)	Fa. Bosch
Kühltruhe (-70°C)	Fa. Kryotec
Laminar Flow	Fa. Prettl, Fa. Gelman
Mikromanipulator	Fa. Waechter
Mikroskop	Fa. Zeiss
pH-Meter	Fa. Knick GmbH
Pipetten	Fa. Eppendorf Fa. Gilson
Reaktionsgefäßmischer	Fa. Heidolph
Spannungsgeber für Gelelektrophorese	Fa. Pharmacia
Spektralphotometer	Fa. Varian DMS 90
Thermocycler	Fa. Eppendorf
Thermomixer	Fa. Eppendorf
Transilluminator	Fa. UVP Inc.
UV-Handlampe	Fa. Original Hanau Fluotest
UV-Lampe	Fa. Vilber LOURMAT
Videokamera	Fa. Sony

Waage	Fa. Mettler, P1210
Wasserbad	Fa. Köttermann
Wasserbadschüttler	Fa. New Brunswick
Zentrifugen	Fa. Beckmann, J2-21M/E Fa. Eppendorf, 5402 Fa. Sigma, 2K15 und 202MK

2.1.5 Stämme

Saccharomyces cerevisiae (Referenz²)

Haploide Hefe-Stämme

- Q1* (YPH98) *Mat a; lys2-1; ade2-101; leu2-Δ1; trp1-Δ1; ura3-52; rho⁰*
- Q2* *Mat a; lys2-1; ade2-101; leu2-Δ1; trp1-Δ1; ura3-52; gsh1::URA3; rho⁰*
- Q2 *ura*⁻* *Mat a; lys2-1; ade2-101; leu2-Δ1; trp1-Δ1; ura3-52; gsh1::ura3; rho⁰*
- Q2*rng1** *Mat a; lys2-1; ade2-101; leu2-Δ1; trp1-Δ1; ura3-52; gsh1::URA3; rng1-1; rho⁰*
- Q2*rng1 ura*⁻* *Mat a; lys2-1; ade2-101; leu2-Δ1; trp1-Δ1; ura3-52; gsh1::ura3; rng1-1; rho⁰*
- Q2*rng2** *Mat a; lys2-1; ade2-101; leu2-Δ1; trp1-Δ1; ura3-52; gsh1::URA3; rng2-1; rho⁰*
- Q3* *Mat a; lys2-1; ade2-101; leu2-Δ1; trp1-Δ1; ura3-52; gsh1::URA3; lwg1-1; rho⁰*
- Q4* *Mat a; lys2-1; ade2-101; leu2-Δ1; trp1-Δ1; ura3-52; lwg1-1; rho⁰*

² - = cfa⁻, + = cfa⁺

Referenz: * Grey; » Aljazzar; ‡ Elledge; § Euroscarf; ¶ diese Arbeit; || Henriques; ** Lawrence

- Y202[‡] *Mat a; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; can1-100*
 - Y00000[§] *Mat a; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; met15-Δ0*
 - Y10000[§] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; lys2-Δ0*
 - Y10000 *gsh1Δ*[¶] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; lys2-Δ0; gsh1::URA3*
 - Y10000 *gsh1Δ*^{+¶} *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; lys2-Δ0; gsh1::URA3; lwg1*
 - Y11620[§] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; lys2-Δ0; pro2::kanMX4*
 - Y11620 *gsh1Δ*[¶] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; lys2-Δ0; pro2::kanMX4; gsh1::URA3*
 - Y12718[§] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; lys2-Δ0; rex3::kanMX4*
 - Y12719[§] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; lys2-Δ0; YLR108c::kanMX4*
 - Y12720[§] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; lys2-Δ0; ahp1::kanMX4*
 - Y17107[§] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; lys2-Δ0; ccw12::kanMX4*
 - Y26531'-11B[¶] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; gsh1::URA3; cfa⁻; rho⁻*
 - Y26531'-12B[¶] *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; cfa⁺; rho⁺*
 - Y26531'-39C^{-¶} *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; ero1::kanMX4; gsh1::URA3; cfa⁻; rho⁻*
 - Y26531'-39C^{+¶} *Mat α; his3-Δ1; leu2-Δ0; ura3-Δ0; ero1::kanMX4; gsh1::URA3; lwg1; cfa⁺; rho⁻*
 - N123^{||} *Mat a; his1*
 - CL1289-3A^{**} *Mat α; arg4-17; his4-38; ilv1-92; met1; rev6-1*
-

Diploide Hefe-Stämme

- Q2 x Y10000[¶]
- Q2*rng1* x Y10000[¶]
- Q2 x Y12718[¶]
- Q2*rng1* x Y12718[¶]
- Q2*rng1*/pB6 x Y12718[¶]
- Q2 x Y12719[¶]
- Q2*rng1* x Y12719[¶]
- Q2*rng1*/pB6 x Y12719[¶]
- Q2 x Y12720[¶]
- Q2*rng1* x Y12720[¶]
- Q2*rng1*/pB6 x Y12720[¶]
- Q2 x Y17107[¶]
- Q2*rng1* x Y17107[¶]
- Q2*rng1*/pB6 x Y17107[¶]
- Q1 x Y10000 *gsh1*Δ[¶]
- Q2 x Y10000 *gsh1*Δ[¶]
- Q3 x Y10000 *gsh1*Δ[¶]
- Q1 x Y11620[¶]
- Q2 x Y11620[¶]
- Q3 x Y11620[¶]
- Q4 x Y11620[¶]
- Q3 x Y11620 *gsh1*Δ[¶]
- DB5460 (Q3 x Y10000 *gsh1*Δ)[¶]
- Y26531[§] *Mat a/α; his3-Δ1/his3-Δ1; leu2-Δ0/leu2-Δ0;*
 lys2-Δ0/LYS2; MET15/met15-Δ0;
 ura3-Δ0/ura3-Δ0; ero1::kanMX4/ERO1
- Y26531'[¶] *Mat a/α; his3-Δ1/his3-Δ1; leu2-Δ0/leu2-Δ0;*
 lys2-Δ0/LYS2; MET15/met15-Δ0;
 ura3-Δ0/ura3-Δ0; ero1::kanMX4/ERO1;
 gsh1::URA3/GSH1
- Q1 x Y26531'-11B[¶]

- Q2 x Y26531'-11B^{fl}
- Q3 x Y26531'-11B^{fl}
- Q4 x Y26531'-11B^{fl}
- Q1 x Y26531'-12B^{fl}
- Q2 x Y26531'-12B^{fl}
- Q3 x Y26531'-12B^{fl}
- Q4 x Y26531'-12B^{fl}
- Q1 x Y26531'-39C^{+fl}
- Q2 x Y26531'-39C^{+fl}
- Q3 x Y26531'-39C^{+fl}
- Q4 x Y26531'-39C^{+fl}
- MG5312*

Mat a/Mat α; ade2-101/ade2-101;

LEU2/leu2-Δ1; LYS2/lys2-801; TRP1/trp1-Δ1;

TRP5/trp5-a; ura3-52/ura3-52;

gsh1-Δ1::URA3/gsh1-Δ1::URA3

E.coli (K12)

- DH5α *F' endA1; hsdR17; supE44; λ⁻ thi-1; recA1; gyrA96; relA1; Δ(lacZYA-argF); U169; Φ80/lacZΔM15*
- KC8 *hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lacΔX74, strA, galU,K*
- XL10 *Tet^rΔ (mcrA); 183Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr); 173 endA1; supE44; thi-1; recA1; gyrA96; relA1; lacHte [F' proAB; lac^qZΔM15; Tn10 (Tet^r); Amy Cam^r]^a*

2.2 Methoden

2.2.1 Stammhaltung

Zur Kultivierung und Aufbewahrung von *Saccharomyces cerevisiae* wurden YEPD-Platten verwendet. Plasmid-tragende Hefestämme wurden auf synthetischem Kompletmedium (SynCo) ohne die für die Plasmid-Stabilität erforderliche Aminosäure oder Base kultiviert. Die Platten wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Dauerkulturen wurden in YEPD-Flüssigmedium mit 40%-igem Glycerin bei –70°C gelagert.

E. coli wurde auf LB-Platten kultiviert und aufbewahrt. Plasmid-tragende Stämme wurden auf LB-Platten mit Ampicillin kultiviert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und die anschließende Lagerung bei 4°C. Für Dauerkulturen wurden die Stämme in flüssigem LB-Medium mit 40%-igem Glycerin bei –70°C aufbewahrt.

2.2.2 Transformation von Hefen und Bakterien

Unter Transformation versteht man die Übertragung fremder DNA in einen Wirtsorganismus. Um eine hohe Anzahl transformierter Zellen zu erzielen, müssen sich die Zellen in einem bestimmten physiologischen Zustand befinden, der Kompetenz. Dieser Zustand wird erreicht, indem die Zellen mit bestimmten Agenzien (z.B. LiAc bei Hefe) oder durch Elektroporation behandelt werden. Bei der Elektroporation werden die Zellen kurzzeitig einem starken elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch vermutlich Poren in der Zellmembran entstehen, die ein Eindringen, der Plasmid-DNA in das Innere der Zelle zulassen.

2.2.2.1 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* nach der Lithiumacetat-Methode

(Gietz et al., 1992, modifiziert)

Hierfür wurden 100 ml YEPD-Medium mit Zellen inokuliert und über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert bis ein Titer von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 5 min und

4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml 100 mM LiAc aufgenommen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 12000 rpm für 1 min bei 4°C und das anschließende Einstellen des Titors auf $2 \cdot 10^9$ Zellen/ml mit 100 mM LiAc. Die kompetenten Zellen wurden daraufhin zu je 50 µl aliquotiert und mit folgenden Agenzien versetzt: 300 µl PEG₄₀₀₀ (40%), 5 µl einzelsträngiger „Carrier“-DNA (nur bei Gendisruption; „salmon sperm“ [10 mg/ml]) und 1 µg DNA. Das Reaktionsgefäß wurde invertiert und zunächst für 30 min bei 30°C und anschließend für 15 min bei 42°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 4 s bei 9000 rpm und das Aufnehmen der Zellen in 400 µl TE-Puffer. Hiervon wurden einmal 100 µl und einmal 300 µl auf Selektivmedien ausgespatelt und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.2.2 Elektrotransformation von *Saccharomyces cerevisiae*

(Grey und Brendel, 1995, modifiziert)

Bei dieser Methode wurden die Zellen zu Beginn mit einer sterilen Impföse von einer YEPD-Platte aufgenommen und in 1 ml 1 M Sorbitol + 20 mM HEPES-Puffer suspendiert. Die Suspension wurde gemischt und anschließend bei ZT für 2 s bei 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren verworfen und das Sediment in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Hier von wurden 40 µl in eine sterile, gekühlte Elektroporationsküvette überführt. 200 - 1000 ng DNA in bis zu 5 µl TE-Puffer oder destilliertem Wasser wurden zugegeben und gemischt. Die Küvette wurde außen von Kondenswasser befreit und ein Puls von 1,5 kV, 200 Ω, 25 µF ausgelöst. Anschließend wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette 1 ml 1 M Sorbitol + 20 mM HEPES-Puffer zugegeben, Aliquots der transformierten Zellen auf einem Selektivmedium ausgespatelt und diese für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.2.3 Elektrotransformation von *E. coli*

(Tung und Chow, 1995)

Zu Beginn wurden 100 ml vorgewärmten LB-Mediums mit einer ÜNK 1%-ig inokuliert und bei 37°C unter guter Belüftung bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert.

Nach Erreichen dieser Zelldichte wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 g für 15 min bei 4°C sedimentiert, zweimal mit 50 ml eiskaltem 10% Glycerin gewaschen und in einem Endvolumen von 0,2 ml eiskaltem GYT resuspendiert.

Die somit erhaltenen 500-fach aufkonzentrierten elektrokompetenten Zellen wurden zu je 40 µl aliquotiert und bei –70°C gelagert oder direkt zur Elektroporation verwendet.

Hierzu wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl DNA (200 – 1000 ng) versetzt und in eine vorgekühlte sterile Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV. Anschließend wurde 1 ml SOC-Medium hinzugegeben und die Suspension für 45 min bei 37°C inkubiert, um die Expression der Ampicillin-Resistenz zu ermöglichen. Aliquots der Zellen wurden abschließend auf LB-Ampicillin-Platten aufgespatelt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.2.4 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

(Sambrook et al., 1989, modifiziert)

100 µl kompetenter Zellen wurden für diese Methode mit 200 – 1000 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschock-Behandlung für 90 s bei 42°C. Nach einer darauffolgenden Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen bei 37°C für 45 min inkubiert. Anschließend wurden Aliquots auf LB-Ampicillin-Platten ausgespatelt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Plasmidpräparation

2.2.3.1 Schnelle Plasmidpräparation aus *E. coli*

(Del Sal et al., 1988, modifiziert)

Bei dieser Methode wurden 1,5 ml LB-Amp-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag bei 13000 rpm für 30 s sedimentiert und in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 8 µl Lysozym-Lösung wurde die Probe ge-

mischt und 3-5 min bei ZT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 45 s bei 100°C und darauffolgend eine Sedimentation der erhaltenen Zelltrümmer bei 13000 rpm für 10 min. Nach Entfernung des Sediments mit einem sterilen Zahnstocher wurden 10 µl CTAB hinzugefügt und der Ansatz gemischt. Nachfolgend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und nach Verwerfen des Überstandes wurde die gefällte Plasmid-DNA in 250 µl NaCl [1,2 M] gelöst und mit 750 µl eiskaltem 95%-igem Ethanol gefällt. Die Probe wurde gemischt und die DNA anschließend bei 13000 rpm für 10 min sedimentiert. Zur Entfernung der restlichen Salze wurden 750 µl eiskaltes 70%-iges Ethanol hinzugegeben und der Ansatz wurde Lösen des Sediments erneut bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA im Exsikkator getrocknet, anschließend in 20 - 50 µl H₂O resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem „Qiagen Plasmid Mini Kit“

Mit Hilfe dieses „Kits“ werden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Eine Anionenaustausch-Säule bindet die Plasmid-DNA an die Säulenmatrix. Andere Zellbestandteile werden durch die dem „Kit“ beiliegenden Lösungen entfernt. Eluiert wird die DNA mittels destilliertem Wasser oder EB-Puffer.

Zu Beginn wurden 1,5 ml LB-Amp-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die ÜNK für 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Nachfolgend wurden 250 µl Puffer P2 hinzugegeben und das Reaktionsgefäß invertiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer N3 und erneutem Invertieren erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm. Der erhaltene Überstand wurde auf eine QIAprep Säule gegeben, welche anschließend für 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Es folgte ein Waschen der Säule durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und anschließender Zentrifugation für 60 s bei 13000 rpm. Zur vollständigen Entfernung des restlichen Waschpuffers wurde eine erneute Zentrifugation für 60 s bei 13000 rpm angeschlossen. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl Puffer EB. Nach Inkubation für 1 min wurde abschließend für 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert.

2.2.3.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem „Qiagen Plasmid Midi Kit“

Das Isolationsprinzip entspricht dem des „Qiagen Plasmid Mini Kits“. Nach der Elution der DNA von der Säule wurde die DNA jedoch zusätzlich mit Isopropanol gefällt.

2-5 ml LB-Amp-Medium wurden hierfür mit einer Einzelkolonie inokuliert und für 8 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Starter-Kultur wurde $1/500$ bis $1/1000$ verdünnt, indem 50 ml LB-Amp-Medium inokuliert wurde und bei 37°C für 12-16 h bei 300 rpm inkubiert wurde. Das Sedimentieren der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 6000 g für 15 min bei 4°C. Anschließend wurde das Sediment in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 4 ml Puffer P2 (Lysis-Puffer) wurde das Reaktionsgefäß invertiert und bei ZT für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 4 ml Puffer P3 (Neutralisations-Puffer) zugegeben und das Reaktionsgefäß erneut invertiert. Das entstandene Lysat wurde in ein Filtergefäß überführt und für 10 min bei ZT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Lysat zur Entfernung von Proteinen, genomischer DNA und Detergenzien gefiltert. Das somit gereinigte Lysat wurde daraufhin auf eine Säule gegeben, welche zuvor mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert wurde. Nach dem Binden der DNA an die Säule wurde diese mit 2 x 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 5 ml Puffer QF. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt und bei 15000 g für 30 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren verworfen. Es folgte das Waschen des DNA-Sediments mit 2 ml 70%-igem Ethanol und anschließender Zentrifugation bei 15000 g für 30 min. Der Überstand wurde erneut dekantiert. Abschließend wurde das Sediment für 5-10 min an der Luft getrocknet und in 200 µl TE-Puffer gelöst.

Mit Hilfe dieser Methode wurden aus 100 ml Bakterien-Kultur ca. 100 µg Plasmid-DNA isoliert.

2.2.3.4 Isolation von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* mit dem „Eppendorf Plasmid Mini Kit“

Das Isolationsprinzip entspricht dem des „Qiagen Plasmid Mini Kits“. Da es sich um die Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe handelt, wurde die Versuchsanleitung dahingehend verändert, dass zusätzlich Zymolyase für den Zellaufschluss verwendet wurde.

Zu Beginn wurden 5 ml YEPD-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert, indem 1,5 ml der Kultur für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 100 µl Lösung I resuspendiert. Zur Auflösung der Zellwand wurden 10 µl Zymolyase hinzugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die vollständige Lyse der Zellen wurde durch die Zugabe von 100 µl der Lösung II und anschließendem Invertieren des Reaktionsgefäßes erzielt. Nachfolgend wurde das Zell-Lysat durch die Zugabe von 100 µl der Lösung III und schnell folgendes Invertieren neutralisiert. Zur Abtrennung der Zellwand und der gefällten Proteine wurde für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in eine Zentrifugationssäule überführt. Anschließend erfolgte das Binden der Plasmid-DNA, indem 450 µl der DNA Bindungs Matrix zum Überstand hinzugegeben wurde und das Reaktionsgefäß invertiert wurde. Zur Reinigung der gebundenen Plasmid-DNA wurde erneut für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Eine weitere Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 400 µl verdünnter Reinigungs-Lösung und anschließendem leichten Schütteln. Anschließend wurde zweimal für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und jeweils das Filtrat verworfen. Das Eluieren der DNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl H₂O direkt auf die DNA Bindungs Matrix und vorsichtiges Mischen, gefolgt von einem abschließenden Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13000 rpm.

2.2.4 DNA-Restriktion mit Endonukleasen

Die Analyse von Plasmiden und die Gewinnung bestimmter DNA-Fragmente erforderte die DNA-Restriktion mithilfe von Endonukleasen.

Ansatz für analytische Zwecke:

- 2 – 8 µl gelöste DNA (500 ng - 1 µg)
- 1 µl 10x Restriktionspuffer
- 1 µl RNase A (nur bei DNA, die durch die „Schnelle Plasmidpräparation“ (siehe 2.2.3.1) gewonnen wurde, notwendig)
- 1 µl Restriktionsendonuklease [1 u/µl]
- auf 10 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt
- für 1 – 2 Stunden bei der für die Restriktionsendonuklease angegebenen Temperatur inkubiert

Ansatz für präparative Zwecke:

- 50 µl DNA (5 – 10 µg)
- 20 µl 10x Restriktionspuffer
- 20 µl RNase A (nur bei DNA, die durch die „Schnelle Plasmidpräparation“ (siehe 2.2.3.1) gewonnen wurde, notwendig)
- 5 µl Restriktionsendonuklease [1 u/µl]
- auf 200 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt
- für 2 – 4 Stunden oder über Nacht bei der für die Restriktionsendonuklease angegebenen Temperatur inkubiert

Eine Restriktion mit zwei Enzymen wurde in einem Inkubationspuffer durchgeführt, der für beide Enzyme eine Aktivität von mindestens 50% zuließ.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

(Sambrook et al., 1989, modifiziert)

Diese Methode dient der Größenbestimmung und der Reinigung von DNA-Fragmenten, sowie der Abschätzung, der in einer Lösung vorliegenden DNA-Menge. Hierzu wird die DNA ihrer Größe entsprechend in einer Agarosegelmatrix durch Anlegen einer Spannung elektrophoretisch aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle ist dabei umgekehrt pro-

portional zum Logarithmus ihrer relativen Molekülmasse. Durch gleichzeitiges Auftrennen eines Größen-Standards, können Fragmente unbekannter Größe einer Größe zugeordnet werden. Um die DNA im Agarosegel sichtbar zu machen, wird der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid verwendet, der bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert.

Entsprechend der DNA-Fragmentgröße wurden stets 0,7%-ige Agarosegele hergestellt, in denen Fragmente von 0,8 – 10 kbp effizient aufgetrennt werden konnten. Hierzu wurden 540 mg Agarose in 85 ml TBE durch Aufkochen über der Bunsenbrennerflamme zum Schmelzen gebracht und nach Abkühlung auf ca. 50°C mit 4,25 µl Ethidiumbromid versetzt. Diese Lösung wurde in einen Plexiglasblock mit einem Geltaschenkamm gegossen. Nach Abschluss der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Agarosegel mit TBE-Puffer (+50 µl/l Ethidiumbromid) überschichtet. Die aufzutragenden Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen des 6x Ladepuffers versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Durch das Anlegen einer Spannung von 100 – 120 V wurde die Elektrophorese gestartet. Nach ca. 1 – 1,5 Stunden wurde die vollständige Auftrennung der Proben erreicht.

2.2.6 DNA-Isolation aus Agarosegelen mit dem „Qiagen Gel Extraction Kit“

Die zu eluierende DNA wurde, nach einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.5) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Anschließend wurde das 3-fache Volumen Puffer QG hinzugegeben (100 mg entsprechen 100 µl) und die Agarose für 10 min bei 50°C unter gelegentlichem Mischen gelöst. Nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurde der Ansatz erneut gemischt und auf eine Siliziumgelmatrix gegeben. Zum Binden der DNA an die Matrix wurde der Ansatz bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Lysat wurde anschließend verworfen und die DNA mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min und dem Verwerfen des Lysats wurde die DNA durch die Zugabe von 50 µl Puffer EB eluiert. Dies geschah durch die Veränderung des

pH-Werts und des Salzgehalts und somit der adsorptiven Eigenschaften der Siliziumgelmatrix.

2.2.7 DNA-Ligation

Die DNA-Ligation diente der Konstruktion neuer Plasmide durch kovalente Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem linearisierten Vektor. Die hierzu verwendete T4 DNA-Ligase ist in der Lage DNA-Moleküle unter ATP-Verbrauch mit jeweils überhängenden („sticky“) Enden und mit jeweils glatten („blunt“) Enden unter Bildung von Phosphodiestergruppen miteinander zu verbinden.

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in einen linearisierten Vektor wurde die isolierte Fragment-DNA im Überschuss zugegeben.

Ligationsansatz für die Klonierung eines Fragments in einen Vektor:

- 18,5 µl Fragment-DNA
- 2 µl Vektor-DNA
- 2,5 µl 10x Ligasepuffer
- 2 µl Ligase
- Inkubation für 1 – 2 Stunden bei 22°C oder über Nacht bei 16°C

Des Weiteren wurde die DNA-Ligation für die Religation eines Vektors nach dem Entfernen eines DNA-Fragments durch die Restriktion mit einer Endonuklease angewendet.

Religationsansatz:

- gefällte DNA
- 2 µl 10x Ligasepuffer
- 2 µl Ligase
- 2 µl PEG (nur bei glatten Enden)
- mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt
- Inkubation über Nacht bei 16°C

2.2.8 DNA-Fällung

Zur Entfernung störender Salze und kleinerer DNA-Fragmente aus einer DNA-Lösung wurde eine DNA-Fällung durchgeführt. Hierzu wurden 1,2 M NaCl bis zu einer Konzentration von 0,2 M zu der DNA-Lösung gegeben und mit 0,6 - 1 Volumen Isopropanol versetzt. Anschließend wurde die DNA bei 14000 rpm für 30 min bei 4°C sedimentiert und nach Abnehmen des Überstandes mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und die DNA im Exsikkator getrocknet.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen mittels einer hitzestabilen Polymerase. Hierbei bestimmen kurze DNA-Fragmente, sogenannte „Primer“, welche Sequenz der „Template“-DNA amplifiziert wird. Unter geeigneten Bedingungen können somit in kurzer Zeit viele Kopien des gewünschten Fragments synthetisiert werden.

In dieser Arbeit wurde die PCR verwendet, um die auf Chromosom XII des Hefe-Genoms liegenden, benachbarten ORFs *YLR111w* und *YLR112w* sowohl getrennt voneinander, als auch zusammen auf einem Fragment liegend, zu amplifizieren.

Zur Amplifizierung des ORFs *YLR111w* inklusive Promotor und „künstlich“ erzeugten *Bam*HI-Schnittstellen wurden folgende „Primer“ verwendet:

- „Forward-Primer“: 5'-CG GGATCC AGTGTTTAAGCGAATGACAGA-3'
- „Reverse-Primer“: 5'-CG GGATCC TTAGTCCAAAAGGGGCAGTT-3'

Der ORF *YLR112w* inklusive Promotor und „künstlich“ erzeugten *Bam*HI-Schnittstellen wurde mit Hilfe dieser „Primer“ vervielfältigt:

- „Forward-Primer“: 5'-CG GGATCC AATTCCCGCATCTGGAATCT-3'
- „Reverse-Primer“: 5'-CG GGATCC CGATAGTTGTAGTTTTCCCTG-3'

Die Amplifikation eines großen, beide benachbarten ORFs enthaltenden Fragments (Abb. 3.6), erfolgte durch Verwendung des „Forward-Primers“ für den ORF *YLR111w* und des „Reverse-Primers“ für den ORF *YLR112w*.

Es wurden drei Ansätze mit jeweils unterschiedlicher $MgCl_2$ -Konzentration und zur Kontrolle ein Ansatz ohne „Template“-DNA verwendet:

Tabelle 2.1: PCR-Ansätze für *Taq* und *Pwo*-Polymerase

MgCl₂ [mM]	1,5	2,0	4,0	1,5
MgCl₂ [50 mM]	1,5 µl	2,0 µl	4,0 µl	1,5 µl
10x-Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
„Template“ (pB6)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	-
dNTPs [50 mM]	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
„Forward-Primer“ [100 pmol/µl]	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl
„Reverse-Primer“ [100 pmol/µl]	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl
<i>Taq</i>- bzw. <i>Pwo</i>-Polymerase	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
destilliertes Wasser	36,8 µl	36,3 µl	34,3 µl	37,3 µl

Folgende Programme wurden verwendet, um die ORFs mittels der *Taq*-Polymerase zu amplifizieren:

1. Einleitende Strangtrennung: 3 min bei 95°C
2. Strangtrennung: 2 min bei 95°C
3. Hybridisierung der „Primer“: 2 min bei 62°C (*YLR111w*)
2 min bei 63°C (*YLR112w* bzw. *YLR111w* und *YLR112w* zusammen)
4. DNA-Synthese: 1 min bei 72°C
5. 34-malige Wiederholung der Schritte 2-4
6. Abschließende DNA-Synthese: 15 min bei 72°C

Die Amplifikation der ORFs *YLR111w* bzw. *YLR112w* mittels der *Pwo*-Polymerase erfolgte über folgendes Programm:

1. Einleitende Strangtrennung: 3 min bei 95°C
2. Strangtrennung: 2 min bei 95°C
3. Hybridisierung der „Primer“: 2 min bei 63°C
4. DNA-Synthese: 2 min bei 70°C
5. 34-malige Wiederholung der Schritte 2-4
6. Abschließende DNA-Synthese: 15 min bei 70°C

2.2.10 Aufreinigung eines PCR-Produkts mit dem „Qiagen PCR Purification Kit“

Um ein mittels PCR amplifiziertes DNA-Fragments von „Primern“, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen aufzureinigen wurde dieses „Kit“ verwendet.

5 Volumen Puffer PB wurden zu einem Volumen der PCR-Reaktion gegeben und gemischt. Zum Binden der DNA wurde der Ansatz auf eine Säule gegeben und bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Lysat wurde verworfen und die DNA mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und zweimalig bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl Puffer EB.

2.2.11 Blau-Weiß-Selektion bei *E. coli*-Transformanten

Diese Selektionsmethode dient der Unterscheidung plasmidhaltiger Stämme mit einem Passagier in der „Multiple Cloning Site“ (MCS) von Stämmen ohne Passagier. Hierzu wird ein *E. coli*-Stamm mit der genomischen Information für den carboxyterminalen Bereich der β -Galaktosidase und ein Vektor mit der Information für den aminoterminalen Bereich der β -Galaktosidase benötigt. Letzterer beinhaltet die MCS, was bei Einfügen eines Passagiers in diesen Bereich zur Zerstörung der Information für den aminoterminalen Bereich der β -Galaktosidase führt. Ein Vektor ohne Passagier ermöglicht dagegen durch α -Komplementation die Synthese funktioneller β -Galaktosidase-Proteine. Dies führt auf einem X-Gal-haltigen Medium zur Blaufärbung der entsprechenden Kolonie durch die Umsetzung von X-Gal zum blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo. Somit ist eine Unterscheidung der weißen, passagier-tragenden Klone von den blauen Klonen, die nur das Plasmid ohne Passagier enthalten, möglich.

In dieser Arbeit wurden jeweils 100 µl X-Gal [10 mg/ml] auf einer LB-Amp-Platte ausgespatelt.

2.2.12 Selektion MNNG-sensibler Genbanktransformanten

Als Hefegenbank wird eine Sammlung willkürlich klonierter DNA-Fragmente bezeichnet, die zusammengenommen das gesamte Hefegenom repräsentieren. Gewonnen wird diese Genbank durch Fragmentierung des Hefegenoms mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease, worauf ein Einbau dieser DNA-Fragmente in Klonierungsvektoren folgt.

Gelangt nach der Transformation der zu untersuchenden Mutante das, die Mutation komplementierende Gen in die Zelle, wird die erhaltene Transformante nicht mehr den für die Mutante spezifischen Phänotyp aufweisen. Nach der Isolation und Vermehrung des entsprechenden Genbank-Vektors dient die Sequenzierung der Identifikation des enthaltenen DNA-Fragments.

Zur Klonierung des *RNG1*-Gens wurde der gegen MNNG hyperresistente Stamm *Q2rng1* mit einer Hefegenbank transformiert. Bei Transformation des Stammes mit dem *RNG1*-Gen wurde erwartet, dass es bei der entsprechenden Transformante zu einer Sensibilisierung auf das Niveau des bereits MNNG-resistenten Stammes Q2 kommt. Als Kontrolle diente bei dieser Negativ-Selektion somit der in Bezug auf *Q2rng1* elterliche Stamm Q2.

Einzelkolonien der Transformationsplatte wurden mit Zahnstochern in je 50 µl Hefe-Puffer in einer Mikrotiterplatte suspendiert. Von diesen Suspensionen wurden je 10 µl auf eine Selektivplatte mit MNNG (SynCo -ura + GSH + 0,102 mM MNNG) und auf eine Kontrollplatte ohne MNNG aufgetropft. Als Kontrolle wurde auf jeder Platte ein Suspensionstropfen des Stammes Q2 mitgeführt. Die Inkubation erfolgte für 3-4 Tage bei 30°C.

Die MNNG-Konzentration wurde so gewählt, dass der resistente Stamm Q2 im Gegensatz zum hyperresistenten Stamm *Q2rng1* nicht wachsen konnte. Somit wurden gesuchte Klone an ihrem fehlenden Wachstum auf den Selektivplatten erkannt werden. Zur Bestätigung des positiven Befundes wurden die möglichen positiven Klone von der Kontrollplatte vereinzelt und einem Agardiffusionstest gegen MNNG unterzogen (siehe 2.2.14 „Agardiffusionstest“).

2.2.13 Plasmidverlust

Um zu überprüfen, ob ein beobachteter Phänotyp eines plasmidtragenden Stammes tatsächlich durch das enthaltene Plasmid vermittelt wurde, oder auf einen genomischen Defekt zurückgeht, wurde ein Plasmidverlust eingeleitet. Hierzu wurde der entsprechende Stamm in 20 ml flüssigem YEPD-Medium angeimpft und 3 Tage bei 30°C schüttelnd unselektiv vermehrt. Die erhaltene stationäre Kultur wurde auf einen Titer von 10^3 Zellen/ml eingestellt und 100 µl dieser Suspension auf einer YEPD-Platte ausplattiert. Nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 30°C wurden die erhaltenen Kolonien mittels der Samtstempel-Technik von YEPD-Platten auf das entsprechende Selektivmedium überstempelt. Die Kolonien, die das Plasmid verloren hatten, zeigten kein Wachstum auf dem Selektivmedium, so dass die entsprechenden Kolonien von der YEPD-Platte verwendet werden konnten.

2.2.14 Agardiffusionstest

(Ruhland et al., 1981)

Mit Hilfe dieser Methode wurden Hefestämme auf ihre Sensibilität gegenüber verschiedenen Chemikalien getestet.

Die Vorzucht aller zu vergleichender Stämme erfolgte auf synthetischem Medium, um mögliche Sensibilitäten bzw. Resistenzen durch unterschiedliche Vorzuchten auszuschließen.

Es wurden Suspensionen in 100 µl Hefe-Puffer (+ 20 mM EDTA für flockulierende Stämme) mit einem Titer von ca. 10^8 Zellen/ml erstellt. Die erhaltenen Suspensionen wurden auf SynCo-Platten radial ausgestrichen und in die Mitte der Agarplatten ein Loch gestanzt, in welches 200 µl des entsprechenden Giftes eingesetzt wurden.

Tabelle 2.2: Verwendete Testsubstanzen für Agardiffusionstests

Testsubstanz	Konzentration
Cadmiumchlorid	0,05 bzw. 1 bzw. 3 mg/ml
Menadion	5 mg/ml
MNNG	2,43 bzw. 4,86 mM bzw. 6,80 mM
t-BOOH	0,7%

Die Größe des Hemmhofes (Entfernung des Wuchsrasens vom eingestanzten Loch) eines Stammes wurde als Maß für die Resistenz bzw. Sensibilität gewertet. Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C (siehe beispielhaft Abb. 3.2).

2.2.15 Tropftitertest

Der Tropftitertest diente der Untersuchung von Hefe-Stämmen auf Sensibilitäten gegenüber verschiedenen Chemikalien.

Von den zu untersuchenden Hefestämmen wurden Suspensionen gleichen Titors in Hefe-Puffer (+ 20 mM EDTA für flockulierende Stämme) hergestellt. Um eine Vergleichbarkeit der Stämme untereinander zu gewährleisten, wurden diese auf gleiche Art vorgezogen. Die erstellten Suspensionen mit einem Titer von $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml wurden in 10^{-1} -Schritten bis zu einem Titer von $1 \cdot 10^3$ Zellen/ml verdünnt und von jeder Verdünnung 5 oder 10 μ l in einer Reihe auf eine Petrischale mit festem Medium aufgetropft. Zur Bestimmung von Sensibilitäten wurde dem Medium vor dem Gießen eine definierte Menge eines Giftes beigemischt. Zur Bestimmung einer Temperatur-Sensibilität wurden die beimpften Platten bei einer bestimmten Temperatur inkubiert. Als Kontrolle für die Zelldichte der untersuchten Stämme diente eine entsprechend beimpfte Platte ohne Gift, die bei 30°C inkubiert wurde (siehe beispielhaft Abb. 3.7).

2.2.16 MNNG-Überlebenskurve

Überlebenskurven wurden sowohl erstellt, um den Effekt der Sensibilisierung des Stammes *Q2rng1 ura⁻* durch das Tragen des Plasmids pB6 gegen MNNG darzustellen; als auch, um die Überexpression von *SNG1* auf einem „multi-copy“-Plasmid in den Stämmen Q1 und *Q2rng1* in Bezug auf das Überleben unter Inkubation mit MNNG zu untersuchen. Hierzu wurden die zu untersuchenden Stämme selektiv in SynCo-ura+GSH über Nacht bis zu einem Titer von ca. $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml (exponentielle Wachstumsphase) vorgezogen. Anschließend erfolgte das Sedimentieren der Zellen durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 15 min bei 4°C und das Einstellen des Titors mit Hefe-Puffer (+ 20 mM EDTA für flockulierende Stämme) auf $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Je 1 ml der er-

stellten Suspensionen wurde für 30 min bei 30°C mit verschiedenen Konzentrationen MNNG und als Kontrolle ohne MNNG inkubiert und anschließend adäquate Verdünnungen auf YEPD ausplattiert. Das Auszählen der Kolonien erfolgte nach dreitägiger Inkubation bei 30°C.

Zur Bestimmung des Überlebens wurde ein Quotient aus Zelltitern mit Gift-Behandlung zu Zelltitern ohne Giftbehandlung gebildet und graphisch gegen die MNNG-Konzentration aufgetragen.

2.2.17 GSH-Schnelltest zur Identifikation von *gsh1*-Mutanten

(Schmidt et al., 1996, modifiziert)

Dieser Test basiert auf dem Bedarf eines GSH-auxotrophen Stammes, GSH von außen aufzunehmen, um auf einem synthetischem Medium ohne GSH-Quelle zu überleben. Ein GSH-prototropher Stamm ermöglicht hierbei dem GSH-auxotrophen Tester-Stamm das Wachstum durch die Abgabe von GSH in das Medium, wodurch sich um den GSH-prototrophen Stamm ein Wachstumshof aus GSH-auxotrophen Zellen bildet.

Zur Herstellung der Indikatorplatten wurde der GSH-Tester-Stamm MG5312 (*gsh1-Δ1::URA3/ gsh1-Δ1::URA3*) über Nacht auf SynCo-Medium ohne GSH vorgezogen. Von einer in Hefe-Puffer erstellten Suspension des GSH-Tester-Stammes mit einem Titer von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml wurden 200 µl in ein auf 40°C vorgewärmtes Weichagarröhrchen überführt. Anschließend wurde der Weichagar mit dem GSH-Tester-Stamm auf einer SynCo-Platte ohne GSH verteilt. Nach Verfestigung des Weichagars wurden 5 µl einer $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml enthaltenden Suspension der zu untersuchenden Stämme aufgetropft, wobei als Positivkontrollen die Suspension eines GSH-prototrophen Stammes und eine 0,2 mg/ml-haltige GSH-Lösung dienten, von denen ebenfalls 5 µl aufgetropft wurden. Die Platte wurde abschließend 3 Tage bei 30°C inkubiert und die Größe des Wachstumshofes des Tester-Stammes um die aufgetropften Suspensionen bestimmt, welcher eine Indikator für die ins Medium abgegebene GSH-Menge und somit als Nachweis für eine intakte GSH-Synthese diente.

2.2.18 Kreuzung haploider Hefestämme

Zur Herstellung diploider Hefestämme wurden zwei haploide Stämme mit den unterschiedlichen Paarungstypen Mat **a** und Mat α auf einer YEPD-Platte vermischt. Nach eintägiger Inkubation bei 30°C wurde von der Kreuzungsstelle abgeimpftes Zellmaterial auf einem Selektivmedium vereinzelt, welches nur diploiden Zellen und nicht den beiden Kreuzungspartnern das Wachstum ermöglicht. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C wurden ausgewählte Einzelkolonien auf KAc-Medium überstrichen und nach 3 – 5 Tagen Inkubation bei 30°C mikroskopisch auf die Bildung von Asci untersucht, um sicherzugehen, dass es sich bei den erhaltenen Einzelkolonien um Diplonten handelte.

2.2.19 Tetradenanalyse

Die Erstellung haploider Hefe-Stämme einer bestimmten Zusammensetzung elterlicher Allele, sowie die Tetradenanalyse wurden durch Sporulation und anschließende Mikromanipulation erzielt. Hierzu wurde der zu untersuchende diploide Stamm für einen Tag bei 30°C auf PSM-Platten inkubiert und nachfolgend dünn auf KAc-Medium überimpft. Auf diesem für *S. cerevisiae* sehr nährstoffarmen Medium, sporuliert der Diplont nach etwa 3 – 5 Tagen Inkubation bei 30°C, so dass aus den fertig ausgebildeten Asci vier Sporen isoliert werden konnten. Die Trennung der Sporen voneinander erfolgte mittels Mikromanipulation, bei der zunächst Zellmaterial in β -Glucuronidase-Lösung suspendiert und für 15 min bei 30°C inkubiert wurde. Durch Zugabe von 200 μ l sterilem destilliertem Wasser wurde der Zellwand-Verdau durch die β -Glucuronidase verlangsamt und die erhaltene Suspension auf eine dünne Agarosegel-Schicht aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurden nun die vier einzelnen, zu einem Ascus gehörenden Sporen mit Hilfe einer beweglichen Glasnadel aufgenommen und in einer Reihe auf dem Medium abgelegt. Die Agarosegel-Schicht wurde anschließend auf eine YEPD-Platte aufgelegt und diese bei 30°C inkubiert bis sich Kolonien gebildet hatten. Die nähere Charakterisierung der Sporen erfolgte durch Überimpfen der Sporen auf verschiedene Selektivmedien.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung des *RNG1*-Gens mit Hilfe einer Hefegenbank

3.1.1 Isolation und Charakterisierung MNNG-sensibler Genbanktransformanten

Entstehung und Charakterisierung der verwendeten Stämme

Die zwei Hefestämme *Q2rng1* und *Q2rng2* zeigten gegenüber ihrem isogenen Wildtyp Q2 eine größere Resistenz gegen MNNG. Entstanden sind diese beiden Stämme durch die Mutagenese des Stammes Q2, der aufgrund seiner fehlenden GSH-Synthese bereits eine Hyperresistenz gegen MNNG aufwies. Eine Übersicht über die Entstehung der verschiedenen Mutanten gibt Abbildung 3.1.

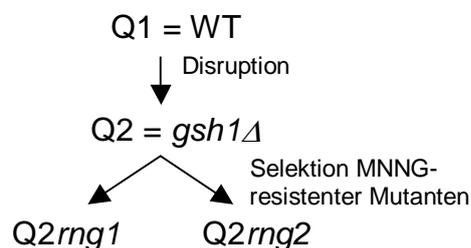


Abbildung 3.1: Die Entstehung der verwendeten Stämme.

Die Resistenzen gegen MNNG der verschiedenen Stämme wurden in einem Agardiffusionstest bestimmt (Abb. 3.2).

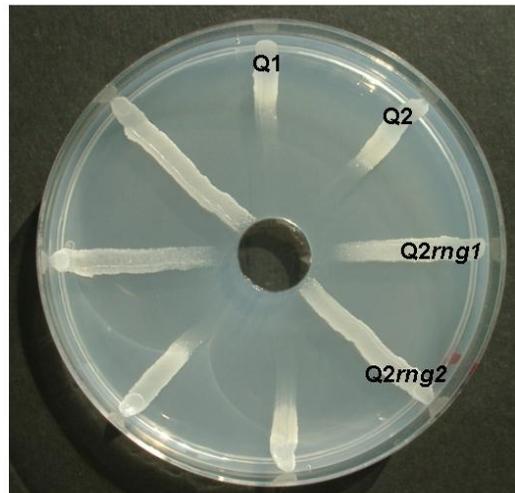


Abbildung 3.2: Die verwendeten Stämme im Agardiffusionstest gegen MNNG [4,86 mM].

Wie erwartet zeigte die *gsh1Δ*-Mutante Q2 im Vergleich zum isogenen Wildtyp Q1 eine Hyperresistenz gegen MNNG, da durch das Fehlen von GSH die Aktivierung von MNNG zu einem reaktiven Stoffwechselprodukt ausblieb. Die aus dem Stamm Q2 entstandene Doppelmutante *Q2rng1* (*gsh1Δ; rng1-1*) wies durch die Zweitmutation eine noch stärkere Hyperresistenz gegen MNNG aus. Die stärkste Hyperresistenz gegen MNNG zeigte jedoch der ebenfalls aus dem Stamm Q2 entstandene Stamm *Q2rng2* (*gsh1Δ; rng2-1*).

Für die Klonierung eines Gens mit Hilfe einer Genbank, die über die Komplementation des zu untersuchenden Phänotyps geführt wird, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Dieser Phänotyp muss auf die Mutation in nur einem Gen zurückgehen und diese Mutation darf nicht dominant sein.

Diese Voraussetzungen waren nur in Bezug auf die Mutation *rng1-1* im MNNG-hyperresistenten Hefe-Stamm *Q2rng1* erfüllt, da diese Mutation semidominant, die Mutation *rng2-1* jedoch dominant ausgeprägt wurde (Aljazzar, 2002).

Der Stamm *Q2rng1* wies neben der MNNG-Hyperresistenz auch noch eine Sensibilität gegen Lithium, 37°C, Cadmium, Wasserstoffperoxid und Nystatin auf. Da nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob diese weiteren Phänotypen auf die Mutation im *RNG1*-Gen zurückgingen (Aljazzar, 2002), wurde eine Negativ-Selektion über den MNNG-Phänotyp durchgeführt.

Negativ-Selektion positiver Transformanten

Zur Klonierung von *RNG1* wurde der im *URA3*-Gen disruptierte Hefe-Stamm *Q2rng1 ura⁻* mit einer, auf dem „single copy“-Vektor YCp50, welcher das *URA3*-

Gen als Selektionsmarker trug, basierenden Hefegenbank transformiert. Die Selektion auf das Tragen eines Vektors erfolgte auf synthetischem Medium ohne Uracil.

Die Untersuchung auf die Komplementation der verstärkten Hyperresistenz gegen MNNG erfolgte über eine Negativ-Selektion. Erwartet wurde, dass die Transformation von *RNG1* in den Stamm *Q2rng1* zur Sensibilisierung gegen MNNG führte. Aufgrund der Semidominanz der Mutation *rng1-1* wurde jedoch keine vollständige Komplementation der verstärkten MNNG-Hyperresistenz erwartet, sondern ein Resistenz-Niveau, das zwischen dem des Stammes *Q2* und dem des Stammes *Q2rng1* liegt.

Die Selektion erfolgte über das Auftropfen von Suspensionen der erhaltenen Transformanten auf MNNG-haltiges Medium und nicht durch Agar-diffusionstests, da über diesen Weg mehr Transformanten in kürzerer Zeit und mit weniger Aufwand getestet werden konnten. Durch Vortests wurden die Zelldichte und die MNNG-Konzentration so eingestellt, dass die Positiv-Kontrolle *Q2* kein Wachstum zeigte, die Negativ-Kontrolle *Q2rng1* jedoch wachsen konnte. Erwartet wurde, dass eine positive Transformante kein Wachstum auf dem MNNG-haltigen Medium aufweist.

Das exakte Vorgehen zur Selektion ist unter 2.2.12 („Selektion MNNG-sensibler Genbanktransformanten“) beschrieben. Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch eine Selektionsplatte.

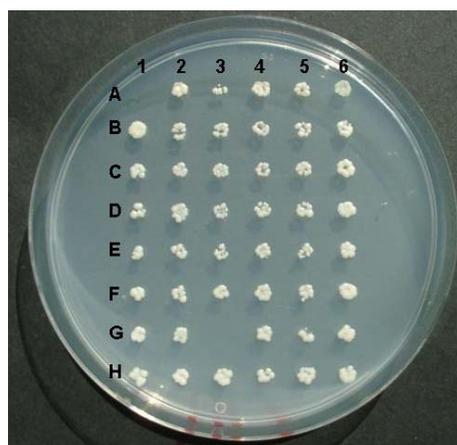


Abbildung 3.3: Auf MNNG-haltiges Medium aufgetropfte Transformanten (A1: Kontroll-Stamm *Q2*; G3: MNNG-sensible Transformante).

Der Test ließ erwarten, dass es zur Klonierung des zu identifizierenden *RNG1*-Gens kommt. Des weiteren könnte es zu einer Sensibilisierung von Trans-

formanten durch die Transformation mit *GSH1* kommen, da der verwendete Stamm neben der Mutation *rng1-1* auch noch die Mutation im *GSH1*-Gen trug, die eine Hyperresistenz gegen MNNG verlieh. Ebenso ist eine Sensibilisierung möglich, die auf das Tragen einer zweiten Kopie eines Gens zurückgeht, was z.B. zum vermehrten Import von MNNG führen würde. Auch kann eine genomische Mutation, unabhängig vom Tragen des Plasmids, zu einer Sensibilisierung führen.

Über diese Selektionsmethode wurden 3950 Transformanten untersucht. Elf wiesen eine Sensibilisierung gegen MNNG auf. Zur Bestätigung der beobachteten Sensibilisierung wurden sensible Klone von der Kontroll-Platte ohne Gift isoliert und vermehrt. Diese wurden in Agardiffusionstests gegen MNNG erneut getestet, um zum einen die Sensibilisierung zu bestätigen und zum anderen einzuordnen, ob das fehlende Wachstum auf dem Selektivmedium tatsächlich auf die gewünschte Sensibilisierung auf ein Niveau zwischen der Sensibilität der Stämme Q2 und *Q2rng1* zurückging. Als Kontrollen dienten hierbei jeweils der Stamm Q2 und der Stamm *Q2rng1 ura⁻* transformiert mit dem leeren YCp50-Vektor. Nur bei vier Transformanten (B6, C9, G3 und G10) ließ sich die gewünschte Sensibilität finden, die anderen wiesen keine reproduzierbare Sensibilisierung gegen MNNG auf.

Tests auf das Vorliegen einer plasmidgebundenen Sensibilisierung

Um sicherzustellen, dass die beobachtete Sensibilisierung der vier Transformanten gegen MNNG auf das Tragen des Plasmids zurückging und nicht etwa auf einer genomischen Mutation basierte, wurde ein Plasmidverlust eingeleitet. Hierzu wurden die Transformanten auf 5-FOA-haltigem Medium vereinzelt, um auf Uracil-auxotrophe und somit plasmidlose Klone zu selektieren. Zusätzlich wurde das Plasmid aus den Transformanten isoliert und in den Hefe-Stamm *Q2rng1 ura⁻* retransformiert. Es zeigte sich nur bei den Transformanten B6 und G3 eine plasmidgebundene Sensibilisierung, da hier nach Verlust des Plasmids die Hyperresistenz eines *Q2rng1*-Stammes wiederkehrte bzw. nach der Retransformation erneut eine Sensibilisierung gegen MNNG eintrat (Abb. 3.4).

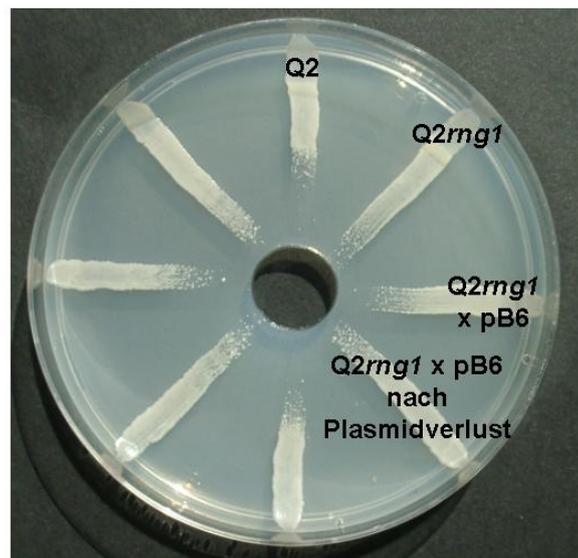


Abbildung 3.4: Die Transformante B6 zeigte nach Plasmidverlust im Agardiffusionstest gegen MNNG [6,80 mM] wieder eine Hyperresistenz, die dem ursprünglichen Stamm *Q2rng1* entsprach.

Die Transformanten C9 und G10 wiesen hingegen noch nach dem Plasmidverlust eine erhöhte Sensibilität gegen MNNG aus. Das lässt darauf schließen, dass die vorgefundene Sensibilisierung in diesen beiden Transformanten auf eine genomische Mutation und nicht auf das Tragen des Plasmids zurückging. Diese Überlegung wurde dadurch erhärtet, dass das jeweilige Plasmid pC9 und pG10 nach der Retransformation in den Stamm *Q2rng1 ura⁻* nicht zu einer Sensibilisierung gegen MNNG führte.

Tests auf die Klonierung des *GSH1*-Gens

Da in dem Stamm *Q2rng1* neben der Mutation im *RNG1*-Gen das *GSH1*-Gen disruptiert vorlag und das Anschalten der GSH-Synthese zu einer Sensibilisierung gegen MNNG führte, wurde näher untersucht, ob die Sensibilisierung der verbliebenen Transformanten B6 und G3 auf das Tragen eines *GSH1*-enthaltenden Plasmids zurückging. Hierzu wurden diese Transformanten mittels eines GSH-Schnelltests auf das Vorhandensein der GSH-Synthese getestet. Da in dem Ausgangsstamm *Q2rng1* das *GSH1*-Gen disruptiert vorlag, würde nur die Transformation mit dem *GSH1*-Gen zum Einschalten der GSH-Synthese führen. Es wies nur die Transformante G3 eine funktionierende GSH-Synthese auf (Daten nicht gezeigt), womit gezeigt wurde, dass die Sensibilisierung der Transformante G3 nicht auf die Transformation mit *RNG1*, sondern auf die Transformation mit *GSH1* zurückging.

Tests auf das Vorliegen einer *rng1*-spezifischen-Sensibilisierung durch pB6

Um sicherzugehen, dass die durch das Plasmid pB6 erfahrene Sensibilisierung gegen MNNG, durch die Komplementation von *rng1-1* ausgelöst wurde und nicht auf eine allgemeine Sensibilisierung zurückging oder in Zusammenhang mit der Disruption des *GSH1*-Gens stand, wurde das Plasmid pB6 in den Wildtyp-Stamm Q1 und die isogene *gsh1Δ*-Mutante (Q2) transformiert. Als Kontrolle wurden die Stämme Q1, Q2 und *Q2rng1 ura⁻* jeweils zusätzlich mit dem leeren YCp50-Vektor transformiert und die erhaltenen Transformanten im Agar-diffusionstest auf ihre Sensibilität gegen MNNG getestet. Im Gegensatz zum Stamm *Q2rng1 ura⁻* zeigten weder der Stamm Q1, noch der Stamm Q2 eine Sensibilisierung gegen MNNG durch das Tragen des Plasmids pB6, wodurch sichergestellt wurde, dass es sich bei der Sensibilisierung um einen *RNG1*-bezogenen Effekt handelte.

Untersuchung auf die Komplementation weiterer Phänotypen einer *rng1-1*-Mutante durch das Plasmid pB6

Der verbliebene Klon B6 wurde zusätzlich, mit Hilfe des Tropftitertests, auf die Komplementation der Lithium- und der 37°C-Sensibilität getestet. Es zeigte sich jedoch, dass das Plasmid pB6 nicht zur Komplementation einer dieser beiden Sensibilitäten führte. Da jedoch nicht sicher festgestellt werden konnte, ob diese im Stamm *Q2rng1* beobachteten Sensibilitäten ebenfalls auf die MNNG-Hyperresistenz auslösende Mutation im *RNG1*-Gen zurückgingen (Aljazzar, 2002), konnte die Klonierung von *RNG1* nicht ausgeschlossen werden.

Überlebenskurve

Zur Quantifizierung der Sensibilisierung des Stammes *Q2rng1 ura⁻* durch das Tragen des Plasmids pB6 gegen MNNG, wurde diese Transformante mittels einer MNNG-Überlebenskurve (siehe 2.2.16 „MNNG-Überlebenskurve“) mit der entsprechenden Transformante mit leerem Vektor (YCp50) verglichen. Nach 30-minütiger Inkubation mit 10 µg/ml MNNG zeigte der Stamm *Q2rng1 ura⁻* transformiert mit dem leeren Vektor YCp50 ein Überleben von 63%. Durch das Tragen des Plasmids pB6 wurde das Überleben dieses Stammes nach Inku-

bation mit MNNG auf 48% gesenkt. Es konnte hiermit der im Agardiffusionstest gezeigte Effekt bestätigt werden.

Für den Klon B6 konnte gezeigt werden, dass die vorgefundene Sensibilisierung gegen MNNG plasmid-gebunden war, nicht auf die Klonierung des *GSH1*-Gens zurückging und *mng1*-spezifisch war. Somit wurde dieses Plasmid weiter untersucht.

3.1.2 Charakterisierung des Plasmids pB6

Mit Hilfe des zuvor in *E. coli* amplifizierten Plasmids wurde der Passagier sequenziert. Ein zuvor durchgeführter Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Pst*I ergab das Vorliegen eines Passagiers mit einer ungefähren Größe von 10 kbp. Ein Sequenzabgleich mit der Hefegenom-Datenbank (<http://mips.gsf.de>) ergab, dass es sich bei dem enthaltenen Passagier um einen 10365 bp großen Bereich des Chromosoms XII handelte (Abb. 3.5).

Hierzu wurden verschiedene Strategien angewendet. Zum einen wurden die gegebenen Restriktionsschnittstellen genutzt, um ein zwischen zwei Schnittstellen liegendes Fragment zu entfernen und den Vektor zu religieren. Zum anderen wurden die Restriktionsschnittstellen genutzt, um bestimmte Fragmente gezielt in einen Vektor umzusetzen. Hierzu wurde der Ausgangsvektor pB6 mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease restringiert, der Restriktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und das gewünschte Fragment nach Ablauf der Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert. Es folgte die Klonierung in einen, mit der gleichen Restriktionsendonuklease geöffneten Vektor („single copy“-Vektor pRS314 bzw. „multi copy“-Vektor pRS424, welche beide das *TRP1*-Gen als Selektionsmarker trugen). Mit diesen Ligationsansätzen wurde daraufhin *E. coli* transformiert und pro Ansatz 12 Transformanten vermehrt, das Plasmid isoliert und der Erfolg der Ligation durch Restriktion mit Restriktionsendonukleasen und anschließende Gelelektrophorese kontrolliert. Mit den neuen Plasmiden wurde der Stamm *Q2rng1* transformiert und die erhaltenen Transformanten im Agardiffusionstest gegen MNNG getestet, indem sie mit den entsprechenden Kontrollen, *Q2rng1 ura⁻* x leerer Vektor (YCp50, pRS314 oder pRS424) und *Q2rng1 ura⁻* x pB6, verglichen wurden. Die konstruierten Plasmide und die sich daraus ergebenden Daten sind in Tabelle 3.1 und in Abbildung 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Konstruktion und Auswertung der Subklone (Es bedeutet: + Sensibilisierung des Stammes Q2rng1 ura⁻ gegen MNNG, - keine Sensibilisierung, * heterogenes Wachstum nach Transformation)

Plasmid	Basis-Vektor	Ausgangsplasmid	Konstruktion des Plasmids	Kontroll-Restriktionsendonukleasen	vollständig enthaltene Gene (inkl. Promotor)	partiell enthaltene Gene	Ergebnis des Agardiffusionstests gegen MNNG
pB6- <i>PvuII</i> Δ	YCp50 „single copy“	pB6	Religation nach <i>PvuII</i> -Restriktion	<i>PvuII</i> , <i>NcoI</i>	<i>REX3</i> , <i>YLR108c</i> , <i>YLR111w</i> , <i>YLR112w</i> , <i>HOG1</i>	<i>AHP1</i> , <i>CCW12</i>	+
pB6-A	pRS314 „single copy“	pB6	Umsetzen des 2408 bp <i>EcoRI</i> -Fragments	<i>EcoRI</i> , <i>PvuII</i> , <i>NcoI</i> , <i>SacI</i>	<i>AHP1</i> , <i>CCW12</i>	<i>YLR108c</i> , <i>YLR111w</i>	-
pB6-D	pRS314 „single copy“	pB6	Umsetzen des 3969 bp <i>Clal</i> -Fragments	<i>Clal</i> , <i>KpnI</i>	<i>AHP1</i> , <i>CCW12</i> , <i>YLR111w</i>	<i>YLR108c</i> , <i>YLR112w</i>	-
pB6-E	pRS314 „single copy“	pB6	Umsetzen des 4742 bp <i>PstI</i> -Fragments	<i>PstI</i> , <i>PvuII</i>	<i>AHP1</i> , <i>CCW12</i> , <i>YLR111w</i> , <i>YLR112w</i>	<i>YLR108c</i> , <i>HOG1</i>	-

Plasmid (pB6-)	Basis-Vektor	Ausgangsplasmid	Konstruktion des Plasmids	Kontroll-Restriktionsendonukleasen	vollständig enthaltene Gene (inkl. Promotor)	partiell enthaltene Gene	Ergebnis des Agardiffusionstests gegen MNNG
pB6-H	pRS314 „single copy“	pB6	Umsetzen des 2621 bp <i>Clal</i> -Fragments	<i>Clal</i> , <i>EcoRI</i>	<i>HOG1</i>	YLR112w	-
pB6-I	pRS424 „multi copy“	pB6	wie pB6-A	<i>PvuII</i> , <i>SacI</i>	<i>AHP1</i> , <i>CCW12</i>	YLR108c, YLR111w	-
pB6-J	pRS424 „multi copy“	pB6	wie pB6-E	<i>PvuII</i> , <i>KpnI</i>	<i>AHP1</i> , <i>CCW12</i> , YLR111w, YLR112w	YLR108c, <i>HOG1</i>	-*
pB6-K	pRS424 „multi copy“	pB6	wie pB6-D	<i>Clal</i> , <i>KpnI</i>	<i>AHP1</i> , <i>CCW12</i> , YLR111w	YLR108c, YLR112w	-*
pB6-L	pRS424 „multi copy“	pB6	wie pB6-H	<i>Clal</i> , <i>EcoRI</i>	<i>HOG1</i>	YLR112w	-

Plasmid (pB6-)	Basis-Vektor	Ausgangsplasmid	Konstruktion des Plasmids	Kontroll-Restriktionsendonukleasen	vollständig enthaltene Gene (inkl. Promotor)	partiell enthaltene Gene	Ergebnis des Agardiffusionstests gegen MNNG
pB6-M	pRS424 „multi copy“	pB6	Umsetzen des 8823 bp-SalI-Fragments	<i>SalI</i> + <i>XhoI</i> , <i>PvuII</i> , <i>SacI</i> , <i>Scal</i> , <i>EcoRI</i>	<i>REX3</i> , <i>YLR108c</i> , <i>AHP1</i> , <i>CCW12</i> , <i>YLR111w</i> , <i>YLR112w</i>	<i>HOG1</i>	*
pB6-N	pRS424 „multi copy“	pB6-M	Religation nach <i>NcoI</i> -Restriktion	<i>KpnI</i> , <i>PvuII</i> , <i>EcoRI</i>	<i>REX3</i> , <i>YLR108c</i>	<i>AHP1</i> , <i>YLR112w</i> , <i>HOG1</i>	-
pB6-O	pRS424 „multi copy“	pB6-M	Religation nach <i>SacI</i> -Restriktion	<i>SacI</i> , <i>Scal</i> , <i>EcoRI</i>	<i>AHP1</i> , <i>CCW12</i> , <i>YLR111w</i> , <i>YLR112w</i>	<i>HOG1</i>	*
pB6-P	pRS424 „multi copy“	pB6-M	Umsetzen des 5093 bp <i>SacI</i> -Fragments	<i>ClaI</i> , <i>PstI</i> , <i>EcoRI</i>	<i>REX3</i> , <i>YLR108c</i>		-

Plasmid (pB6-)	Basis-Vektor	Ausgangsplasmid	Konstruktion des Plasmids	Kontroll-Restriktionsendonukleasen	vollständig enthaltene Gene (inkl. Promotor)	partiell enthaltene Gene	Ergebnis des Agardiffusionstests gegen MNNG
pB6-Q	pRS424 „multi copy“	pB6	Amplifikation des 688 bp großen Fragments mittels PCR	<i>Bam</i> HI, <i>Bss</i> HII	<i>YLR111w</i>		-
pB6-R	pRS424 „multi copy“	pB6	Amplifikation des 888 bp großen Fragments mittels PCR	<i>Bam</i> HI, <i>Nco</i> I	<i>YLR112w</i> (möglicherweise ohne Promotor)		-
pB6-S	pRS424 „multi copy“	pB6	Amplifikation des 1519 bp großen Fragments mittels PCR	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI	<i>YLR111w</i> , <i>YLR112w</i>		-*
pB6-T	pRS314 „single copy“	pB6	wie pB6-S	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI	<i>YLR111w</i> , <i>YLR112w</i>		-

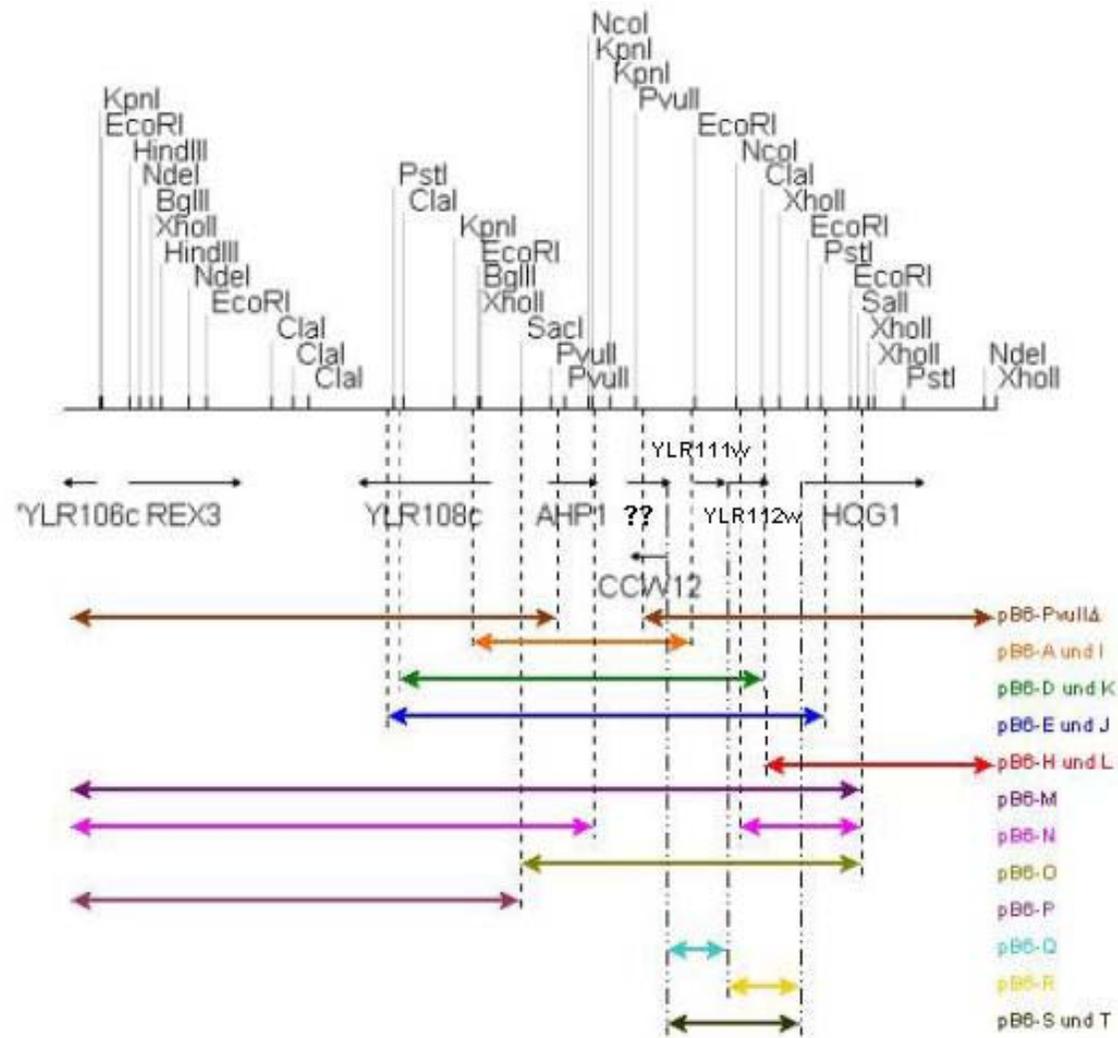


Abbildung 3.6: Der auf dem Plasmid pB6 enthaltene Passagier und die daraus gebildeten Subklone.

Die oben zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass lediglich das Plasmid pB6-*Pvull* Δ im Stamm *Q2rng1* zu einer Sensibilisierung gegen MNNG führte. Da neben den vollständig vorhandenen Genen, die Gene *AHP1* und *CCW12* zumindest partiell auf diesem Passagier enthalten waren, konnte keines dieser Gene als Allel von *RNG1* ausgeschlossen werden. Widersprüchlich hierzu war die Tatsache, dass kein weiterer, erstellter Subklon eine Sensibilisierung gegen MNNG herbeiführen konnte, obwohl jedes der auf dem Plasmid pB6-*Pvull* Δ enthaltenen Gene zumindest einmal vollständig auf einem der weiteren Plasmide vertreten war.

Tests auf weitere Phänotypen des Stammes *Q2rng1*

Da durch das Subklonieren keine Verringerung der Anzahl möglicher *RNG1*-Gene erzielt werden konnte, wurde in der Literatur nach Mutanten-Phänotypen der auf dem Plasmid pB6 enthaltenen Gene gesucht, um den Stamm *Q2rng1* auf die Ausprägung der entsprechenden Phänotypen zu testen.

Lee et al. (1999) beschrieben, dass die Deletion des Gens *AHP1* in *S. cerevisiae* zu einer Sensibilisierung gegen t-BOOH und Cadmium, sowie zu einer erhöhten Resistenz gegen Menadion führt. Der Stamm *Q2rng1* zeigte jedoch im Vergleich mit dem Stamm Q2 im Agardiffusionstest lediglich eine Sensibilisierung gegen Cadmium, jedoch keine weiteren für eine *ahp1*-Disruptante typischen Phänotypen.

Die Deletion des Gens *CCW12* führt in *S. cerevisiae* zu einer verstärkten Sensibilität gegen „Calcofluor white“ (CCW) und „Congo red“ (Mrsa et al., 1999). Beide Stoffe wirken zumeist bei Zellwand-Mutanten sensibilisierend. Im Tropftiterstest wurde somit die Sensibilität des Stammes *Q2rng1* im Vergleich zum Stamm Q2 getestet, wobei sich jedoch zeigte, dass beide Stämme die gleiche Sensibilität gegen CCW aufwiesen. Auf der anderen Seite zeigte der Stamm *Q2rng1* eine Sensibilität gegen „Congo red“ (Abb. 3.7).

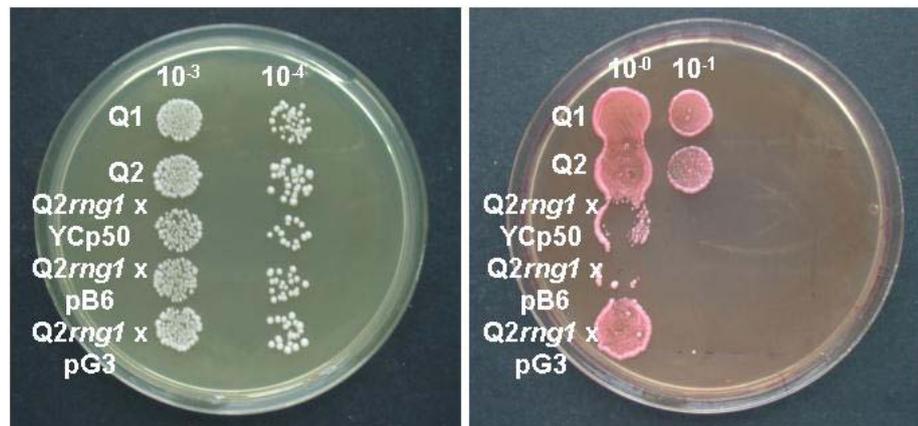


Abbildung 3.7: Der Stamm *Q2rng1* zeigte im Tropftitertest eine erhöhte Sensibilität gegen „Congo red“ (links: Kontrollplatte ohne Gift; rechts: YEPD + 19,2 mg/l „Congo red“).

Es zeigte sich, dass ein Ausfall der GSH-Synthese nicht zu einer Sensibilisierung gegen „Congo red“ führte, da der Stamm Q2 (*gsh1Δ*) im Vergleich zum isogenen Wildtyp Q1 die gleiche Sensibilität aufwies. Die Mutation *rng1-1* führte jedoch zu einer Sensibilisierung (*Q2rng1* ist sensibler als Q2), wobei das Tragen des Plasmids pB6 den Stamm *Q2rng1* nicht resistenter machte. Da die GSH-prototrophe Einfach-Mutante *Q2rng1 x pG3* (enthält plasmid-gebunden das *GSH1*-Gen) immer noch eine, jedoch geringere, Sensibilität aufwies, lässt sich daraus schließen, dass die Sensibilität des Stammes *Q2rng1* gegen „Congo red“ auf die Doppelmutation (*rng1-1* und *gsh1Δ*) zurückging, wobei die Mutation im *RNG1*-Gen hierfür essentiell war. Der Stamm *Q2rng1* zeigte somit nicht alle Phänotypen einer *ccw12*-Disruptante, was die Vermutung nahe legte, dass dieses Gen im Stamm *Q2rng1* nicht disruptiert vorlag.

Neben *CCW12* hat auch das auf dem Passagier vorliegende Gen *HOG1* einen Einfluss auf CCW. Garcia-Rodriguez et al. (2000) isolierten mehrere CCW-resistente Mutanten, die Mutationen im *HOG1*-Gen trugen. Wie oben beschrieben, löst die Mutation *rng1-1* jedoch eine Sensibilisierung und keine erhöhte Resistenz gegen CCW aus, was zeigte, dass der Stamm *Q2rng1* keine der beschriebenen Mutationen im *HOG1*-Gen trug.

Für das Gen *REX3* und die ORFs *YLR108c*, *YLR111w* sowie *YLR112w* wurden in der Literatur keine, bzw. keine im Rahmen dieser Diplomarbeit zu testenden Phänotypen von Mutanten gefunden.

Da sich die beschriebenen Phänotypen immer auf eine bestimmte Mutation, ob Punktmutation oder Deletion, in dem entsprechenden Gen bezog und nicht sichergestellt war, dass es sich bei der Mutation im *RNG1*-Gen um die gleiche Mutation handelte, konnte die fehlende Übereinstimmung der Phänotypen der beschriebenen *ahp1*-, *ccw12*- sowie der beschriebenen *hog1*-Mutante mit dem der *rng1*-Mutante nicht zum Ausschluss dieser Gene als mögliche *RNG1*-Allele dienen. Zudem könnte der unterschiedliche genetische Hintergrund der beschriebenen Hefe-Stämme und des in dieser Arbeit untersuchten Stammes *Q2rng1* die Ausprägung der Phänotypen beeinflussen.

Komplementationsversuche

Um weiter zu untersuchen, welches der auf dem Plasmid pB6 enthaltenen Gene den Stamm *Q2rng1* gegen MNNG sensibilisierte, wurden Komplementationsversuche durchgeführt. Untersucht wurde somit, ob bestimmte Disruptanten in der Lage waren, die erhöhte MNNG-Hyperresistenz des Stammes *Q2rng1* zu komplementieren. Falls also eine Disruptante nicht in der Lage sein sollte, diese Hyperresistenz zu komplementieren, würde dies nur auf das Vorliegen der gleichen Mutation zurückzuführen sein. Es wurden hierzu Stämme verwendet, bei denen die auf dem Plasmid pB6 enthaltenen Gene *REX3* (Stamm Y12718), *AHP1* (Stamm Y12720) und *CCW12* (Stamm Y17107), sowie des ORFs *YLR108c* (Stamm Y12719) disruptiert vorlagen. Diese Stämme wurden jeweils mit den Stämmen Q2 (als Kontrolle), *Q2rng1* und *Q2rng1* x pB6 gekreuzt und die hieraus erhaltenen Diplonten in Agardiffusions-tests gegen MNNG getestet. Als weitere Kontrollen dienten die Kreuzungen der Stämme Q2 und *Q2rng1* mit dem Wildtyp Y10000. Es zeigte sich, dass die Kreuzung des Stammes *Q2rng1* mit jeder der vier Disruptanten zu einer MNNG-Hyperresistenz führte, die der Hyperresistenz eines Diplonten aus der Kreuzung der Stämme *Q2rng1* mit dem Wildtyp Y10000, entsprach. Die getesteten Disruptanten konnten somit die Hyperresistenz des Stammes *Q2rng1* so weit komplementieren, wie ein Wildtyp es konnte, was die Vermutung zulässt, dass es sich, weder bei *REX3*, noch bei *YLR108c*, noch bei *AHP1*, noch bei *CCW12* um *RNG1* handelte.

Da auch das Fehlen intakter Mitochondrien zu einer Sensibilität gegen MNNG führte (Daten nicht gezeigt), wurden die getesteten Stämme auf ihre Atmungs-

kompetenz untersucht. Hierbei zeigten sich alle Stämme atmungskompetent, womit bei den oben beschriebenen Agardiffusionstests von einheitlichen Voraussetzungen ausgegangen werden konnte.

Um sicherzugehen, dass bei den verwendeten Disruptanten das gewünschte Gen tatsächlich disruptiert vorlag, wurden diese auf die in der Literatur beschriebenen Phänotypen (siehe oben) der entsprechenden Disruptante, getestet.

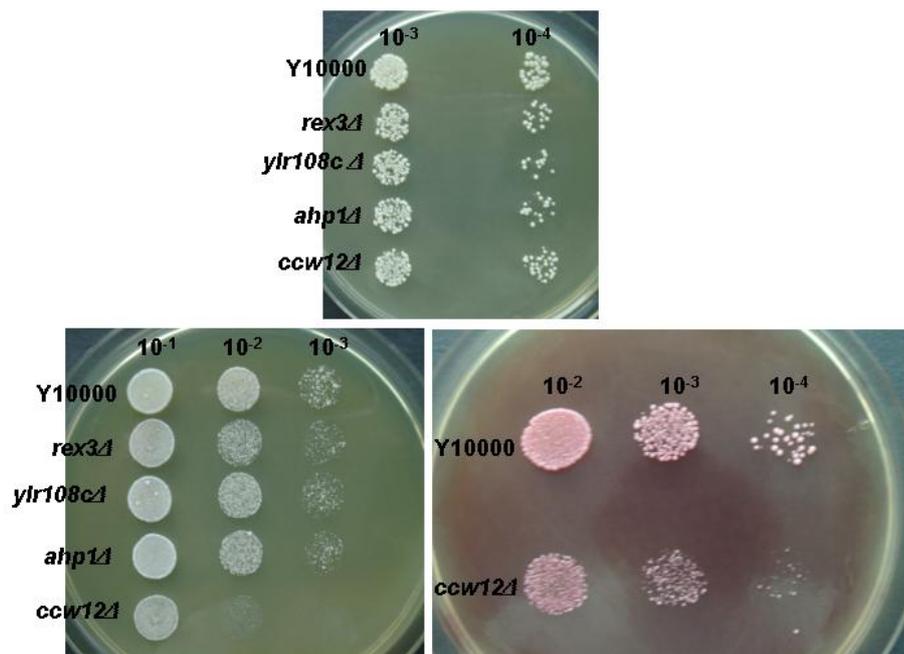


Abbildung 3.8: Die *ccw12*-Disruptante zeigte die in der Literatur beschriebene Sensibilität gegen CCW und „Congo red“ (oben: Kontrollplatte ohne Gift; unten links: YEPD + 40 µM CCW; unten rechts: YEPD + 19,2 mg/l Congo red).

Die in Abb. 3.8 dargestellten Ergebnisse zeigen das Vorhandensein einer CCW- und einer „Congo red“-Sensibilität der *ccw12*-Disruptante, was bestätigte, dass bei diesem Stamm tatsächlich das Gen *CCW12* disruptiert vorlag.

Die *ahp1*-Disruptante zeigte im Vergleich zum isogenen Wildtyp Y10000 eine deutliche Resistenz gegen Cadmium, eine leichte Resistenz gegen Menadion, sowie die gleiche Sensibilität wie der Wildtyp gegen t-BOOH. Beschrieben waren jedoch sowohl eine Cadmium-, als auch eine t-BOOH-Sensibilität (Lee et al., 1999). Lediglich die beschriebene Menadion-Resistenz zeigte sich bei dem getesteten Stamm. Es konnte somit nicht davon ausgegangen werden, dass es

sich bei dem, für die Komplementationsversuche eingesetzten Stamm tatsächlich um eine *ahp1*-Disruptante handelte.

Da für die Deletion des Gens *REX3* und des ORFs *YLR108c* keine im Rahmen dieser Diplomarbeit durchführbaren Tests, bzw. keine Phänotypen in *S. cerevisiae* bekannt waren, konnten diese beiden verwendeten Disruptanten auf diese Weise nicht auf das tatsächliche Vorliegen der Disruption getestet werden. Es konnten somit nur zwei der vier verwendeten Disruptanten überprüft werden.

3.1.3 Untersuchung der Überexpression einzelner Gene des Plasmids pB6

Bei Erstellung der Subklone wurden auch einzelne Fragmente des auf dem Plasmid pB6 enthaltenen Passagiers in den „multi copy“ Vektor pRS424 ligiert. Hierbei zeigte sich nach Transformation des Stammes *Q2rng1 ura⁻* mit den Plasmiden pB6-J, -K, -M, -O und -S (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.6) ein heterogenes Wachstum der erhaltenen Transformanten (siehe Abb. 3.9).

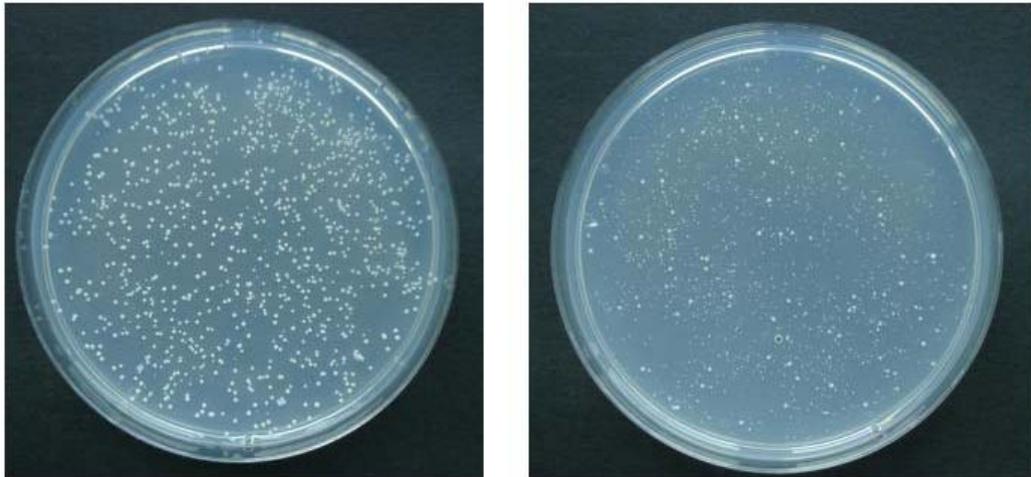


Abbildung 3.9: Der Stamm *Q2rng1 ura⁻* zeigte nach Transformation mit dem „multi copy“ Plasmid pB6-O ein heterogenes Wachstum der erhaltenen Transformanten (rechts). Das linke Bild zeigt das gewöhnliche Wachstum nach Transformation des Stammes *Q2rng1 ura⁻* mit einem „multi copy“ Plasmid (hier pB6-P). Es wurden jeweils 100 µl des Transformationsansatzes auf SynCo-Trp+GSH-Medium aufgespatelt.

Charakteristisch für das heterogene Wachstum war das Ausbilden deutlich kleinerer Kolonien, sowie das glasige Erscheinungsbild der größeren Kolonien. In dieser Gruppe der heterogen wachsenden Transformanten gab es zudem einige, die bereits nach Überstreichen von der Transformationsplatte auf ein neues Selektivmedium keinerlei Wachstum mehr zeigten (*Q2rng1 ura⁻* x pB6-M bzw. O). Andere Transformanten zeigten erst nach zweimaligem Überstreichen keinerlei Wachstum mehr (*Q2rng1 ura⁻* x pB6-J bzw. K) und weitere Transformanten zeigten keinerlei Absterben nach mehrmaligem Überstreichen (*Q2rng1 ura⁻* x pB6-S). Das Hauptaugenmerk wurde somit auf das einheitlich vorgefundene heterogene Wachstum der Transformanten nach Transformation mit den Plasmiden pB6-J, -K, -M, -O und -S gelegt.

Charakterisierung des heterogenen Wachstums

Zur näheren Charakterisierung des heterogenen Wachstums durch pRS424-Derivate wurde untersucht, ob eine heterogen wachsende Transformante schneller ihr Plasmid verliert, als eine gewöhnlich wachsende Transformante. Exemplarisch wurde hierzu bei den Stämmen *Q2rng1*, transformiert mit den Plasmiden pB6-O bzw. dem leeren Vektor pRS424, welche beide das *TRP1*-Gen als Selektionsmarker enthielten, die Plasmid-Stabilität unter nicht

selektiven Bedingungen getestet. Keine der auf YEPD-Platten angewachsenen 542 überstempelten Kolonien des Stammes *Q2rng1* x pB6-O war nach dem Überstempeln auf Plasmidträger-selektierende Agarplatten (SynCo-Trp+GSH) angewachsen, was einem Plasmidverlust von 100% entsprach. Im Gegensatz hierzu konnte nur bei 72% (377 von 522) der Kolonien des Stammes *Q2rng1 ura⁻* x pRS424 nach Übertragen der angewachsenen Klone auf das Selektivmedium, kein Wachstum mehr festgestellt werden (Abb. 3.10).

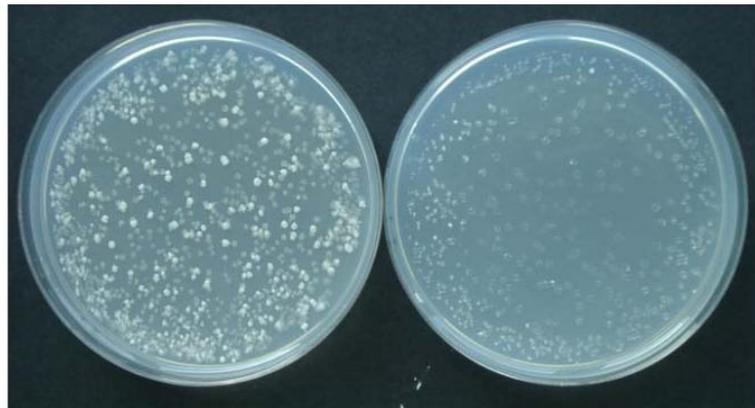


Abbildung 3.10: Der Stamm *Q2rng1 ura⁻* x pB6-O (rechts) verliert, im Gegensatz zum Stamm *Q2rng1 ura⁻* x pRS424 (links) bevorzugt das Plasmid.

Dies zeigt, dass alle auf YEPD-Medium angewachsenen Kolonien des Stammes *Q2rng1* x pB6-O anwachsen konnten, weil sie ihr heterogenes Wachstum verursachendes Plasmid verloren hatten.

Des Weiteren wurde eine mikroskopische Untersuchung der heterogen wachsenden Transformanten durchgeführt, um festzustellen, ob diese möglicherweise aufgrund des Arretierens in einer bestimmten Phase des Zellzyklus deutlich kleinere Kolonien ausbildeten. Es wurden jedoch Zellen in allen Phasen des Zellzyklus aufgefunden, wodurch ein Defekt im Zellzyklus aufgrund der Überexpression eines bestimmten Gens eher unwahrscheinlich erschien.

Um weitergehend zu untersuchen, ob das heterogene Wachstum aufgrund der Überexpression eines bestimmten Gens mit der im Stamm *Q2rng1 ura⁻* vorliegenden Mutation im *RNG1*- oder im *GSH1*-Gen zusammenhing, wurden der Wildtyp Q1 und die isogene *gsh1Δ*-Mutante Q2 mit dem Plasmid pB6-M transformiert. In beiden Fällen zeigte sich auf den Transformationsplatten ein heterogenes Koloniewachstum, was bedeutete, dass keine der beiden Mutationen Voraussetzung für das heterogene Wachstum war. Da sich der, in den drei ge-

testeten Stämmen Q1, Q2 und Q2*rng1 ura⁻* vorliegende genetische Hintergrund entsprach, wurde ein weiterer Wildtyp (Y202) mit einem anderen genetischen Hintergrund getestet. Da sich auch hier nach Transformation mit dem Plasmid pB6-M ein heterogenes Koloniewachstum der enthaltenen Transformanten zeigte, konnte das durch die Plasmide pB6-J, -K, -M, -O und -S hervorgerufene heterogene Wachstum als unabhängig von der genetischen Konstitution bestimmt werden.

Identifikation des heterogenen Wachstums auslösenden ORFs

Ein Vergleich der auf diesen Plasmiden enthaltenen Passagiere (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.6) zeigte, dass alle fünf Plasmide nur einen kleinen gemeinsamen Bereich aufwiesen, der die ORFs *YLR111w* und *YLR112w* enthielt. Um sicherzustellen, ob das heterogene Wachstum auf die Überexpression eines der beiden, oder beider ORFs zurückging, wurden beide ORFs sowohl getrennt voneinander, als auch zusammen, mit Hilfe der *Taq*-Polymerase amplifiziert (siehe 2.2.9 „Polymerase-Kettenreaktion (PCR)“). Anhand der künstlich erzeugten *Bam*HI-Schnittstellen wurden die PCR-Produkte in den Vektor pRS424 ligiert, die erhaltenen Vektoren (pB6-Q mit dem ORF *YLR111w*, pB6-R mit dem ORF *YLR112w* und pB6-S mit den beiden ORFs zusammen als Passagier) mittels *E. coli* amplifiziert und nach Kontrollen mit Restriktionsendonukleasen der Stamm Q2*rng1 ura⁻* transformiert. Nur die Transformation mit dem Plasmid pB6-S führte zu einem heterogenen Wachstum der Transformanten. Um auszuschließen, dass das Ausbleiben des heterogenen Wachstums nach Transformation mit den beiden anderen Plasmiden auf einen Fehler der *Taq*-Polymerase bei der Amplifikation eines der beiden ORFs zurückging, wurden beide ORFs zusätzlich mit der *Pwo*-Polymerase amplifiziert, welche im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine „proofreading“-Funktion besaß. Hierdurch wurden jedoch die zuvor gewonnen Ergebnisse bestätigt. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass das heterogene Wachstum durch die Überexpression des ORFs *YLR111w* ausgelöst wurde. Im Falle des ORFs *YLR112w* konnte nicht sichergestellt werden, dass der vollständige Promotor mit dem ORF amplifiziert wurde, da die „Primer“ hier „sehr eng“ gewählt wurden (siehe Abbildung 3.6). Es lässt sich somit nicht ausschließen, dass das Ausbleiben des heterogenen Wachstums auf das Fehlen von Teilen des Promotors zurückging.

Da die beiden ORFs nur durch 71 bp voneinander getrennt vorlagen und beide auf dem gleichen Strang positioniert vorlagen, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es sich bei den ORFs *YLR111w* und *YLR112w* um einen einzelnen ORF handelte. Um diesen möglichen Sequenzierfehler auszuschließen, wurde das Ende des ORFs *YLR111w* sequenziert und auf das Vorhandensein des Stop-Codons TGA untersucht (Sequenz siehe Anhang). Es zeigte sich, dass es sich bei den ORFs *YLR111w* und *YLR112w* tatsächlich um zwei ORFs handelte. Das bedeutet, dass das heterogene Wachstum entweder durch die Überexpression des ORFs *YLR112w* oder durch die Überexpression der ORFs *YLR111w* und *YLR112w* zusammen ausgelöst wurde.

3.2 MNNG-Überlebenskurve bei Überexpression von *SNG1*

Grey et al. (1995) beschrieben, dass die Überexpression von *SNG1* in Wildtyp-Hefe-Stämmen und in verschiedenen DNA-Reparatur-defizienten Mutanten zu einer Hyperresistenz gegen MNNG führte. Auch in der bereits gegen MNNG hyperresistenten *gsh1Δ*-Mutante konnte durch die Überexpression von *SNG1* eine weitere Verstärkung der Hyperresistenz herbeigeführt werden. Es stellte sich die Frage, ob es sich bei *RNG1* möglicherweise um ein fehlreguliertes und somit überexprimiertes *SNG1*-Gen handelte.

Zur näheren Charakterisierung von *SNG1* und *rng1-1* wurde die Überexpression von *SNG1* in der, im Vergleich zu einer *gsh1Δ*-Mutante noch MNNG-resistenteren Doppelmutante *Q2rng1 ura⁻* (*gsh1Δ*; *rng1-1*), zunächst anhand von Agardiffusionstests gegen MNNG untersucht. Es wurden hierzu die Stämme *Q2rng1 ura⁻* und der isogene Wildtyp Q1, jeweils mit dem *SNG1* tragenden „multi copy“ Plasmid pEH705 transformiert und in Agardiffusionstests mit den beiden MNNG-hyperresistenten Stämmen Q2 und *Q2rng2* verglichen. Beleuchtet wurde hiermit, ob die Überexpression von *SNG1* auch in einem *rng1-1*-Stamm zu einer Verstärkung der Hyperresistenz führte. Der Vergleich mit dem Stamm *Q2rng2* sollte klären, ob es möglich war die Resistenz dieses Stammes gegen MNNG noch zu übertreffen (Abb.3.11).

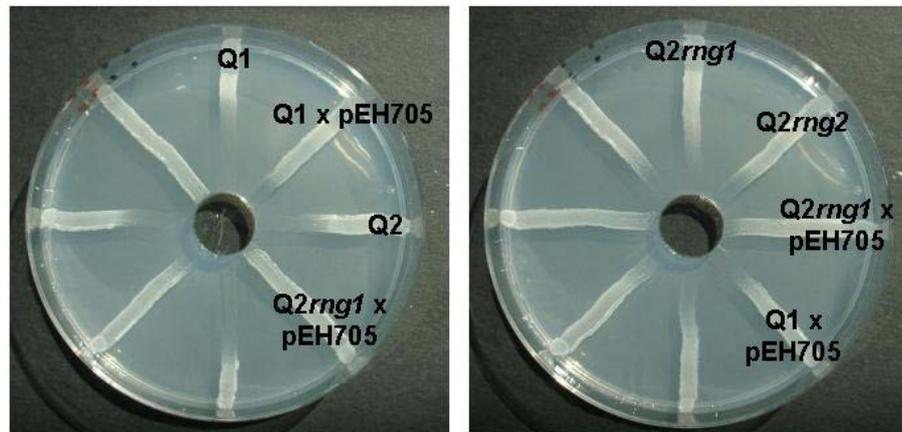


Abbildung 3.11: Die Überexpression von *SNG1* in dem Stamm *Q2rng1 ura⁻* führte zu einer weiteren Verstärkung der Hyperresistenz gegen MNNG (Agardiffusionstests mit 6,80 mM MNNG).

Die Abbildung 3.11 zeigt, dass sowohl der Wildtyp Q1, als auch die Doppelmutante *Q2rng1 ura⁻* durch die Überexpression von *SNG1* eine verstärkte Resistenz gegen MNNG erfuhren. Der Wildtyp Q1 zeigte sich durch das Tragen des Plasmids pEH705 sogar resistenter als die *gsh1Δ*-Mutante Q2. Auch die Doppelmutante *Q2rng1 ura⁻* konnte durch das Tragen des Plasmids pEH705 den Resistenzgrad gegen MNNG des Stammes *Q2rng2* übersteigen. Der Stamm *Q2rng2* konnte nicht auf das Tragen des Plasmids pEH705, welches das *URA3*-Gen als Selektionsmarker enthielt, selektiert werden, da dieser Stamm ein intaktes *URA3*-Gen enthielt.

Zur Quantifizierung des Überlebens bei einer MNNG-Behandlung wurde mit den Stämmen Q1 und *Q2rng1 ura⁻*, welche jeweils transformiert mit dem *SNG1*-tragenden Plasmid pEH705 und dem entsprechenden leeren Vektor YEp24 verwendet wurden, eine Überlebenskurve erstellt (siehe 2.2.16 „MNNG-Überlebenskurve“). Das Ergebnis der Überlebenskurve ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

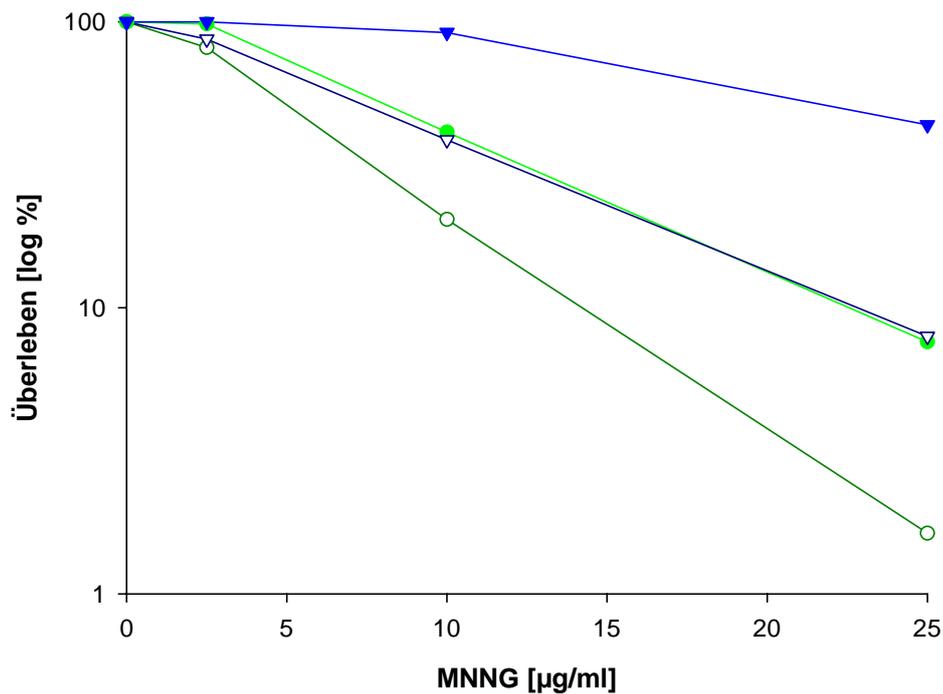


Abbildung 3.12: Das Überleben der Stämme Q1 x YEp24 (leere dunkelgrüne Kreise), Q1 x pEH705 (ausgefüllte grüne Kreise), Q2rng1 ura⁻ x YEp24 (leere dunkelblaue Dreiecke) und Q2rng1 ura⁻ x pEH705 (ausgefüllte blaue Dreiecke) bei Inkubation mit MNNG.

Die graphische Darstellung zeigt eine deutliche Verstärkung der Resistenz gegen MNNG beider Stämme durch die Überexpression des *SNG1*-Gens. Im Falle des Stammes Q1 wurde diese Resistenz sogar auf das Niveau der Doppelmutante Q2rng1 ura⁻ angehoben. Es zeigte sich somit eine Additivität der Resistenzen gegen MNNG aus der Überexpression des Gens *SNG1* und der Mutation *rng1-1*. Es ist daher unwahrscheinlich, dass es sich bei *rng1-1* um ein fehlreguliertes und somit überexprimiertes *SNG1*-Gen handelte.

3.3 Untersuchung der Methionin-Auxotrophie einer *gsh1Δ*; *lwg1-1*-Mutante

Die aus der *gsh1Δ*-Mutante (Q2) entstandene *gsh1Δ*; *lwg1-1*³-Doppelmutante (Q3) zeigte eine extreme Wachstumsverlangsamung in Abwesenheit von Methionin (Schmidt, 1997). Durch die Gabe von GSH wird diese Methionin-

³ *lwg1-1* ist ein Allel von *pro2*.

Auxotrophie supplementiert, da GSH als Quelle für Schwefelaminosäuren dient (Elskens et al., 1991). Der Eltern-Stamm Q2 zeigte ebenfalls kein Wachstum in Abwesenheit von Methionin. Da dieser aber, im Gegensatz zum Stamm Q3, *cfa*⁻ war, d.h. keine Kolonien ohne das Vorhandensein von GSH im Medium bilden konnte, war das Ausbleiben des Wachstums auf einem Medium ohne Methionin und ohne GSH zunächst auf die GSH-Auxotrophie zurückzuführen. Durch die Gabe von GSH wurde auch diesem Stamm das Wachstum ohne Methionin ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die im Stamm Q3 vorgefundene Methionin-Auxotrophie auf eine der beiden bekannten Mutationen oder eine dritte Mutation, welche möglicherweise bereits im Eltern-Stamm vorlag, zurückging.

Untersuchung der Rolle von *lwg1* bei der Methionin-Auxotrophie

Zunächst wurde getestet, ob die Methionin-Auxotrophie auf die Mutation im *LWG1*-Gen zurückging. Hierzu wurde zunächst eine *pro2*-Disruptante (Y11620) auf das Wachstum ohne Methionin getestet. Dieser Stamm zeigte ein Wildtyp-ähnliches Wachstum ohne Methionin. Da jedoch nicht auszuschließen war, dass die Disruption von *LWG1* und die Mutation *lwg1-1* zu unterschiedlichen Phänotypen führte, wurde untersucht, ob es durch Kreuzung einer *pro2Δ*-Mutante mit dem Stamm Q3 zur Komplementation der Methionin-Auxotrophie kommt. Voraussetzung für das Testen der Diplonten auf das Vorliegen einer Methionin-Auxotrophie, war das Fehlen einer funktionierenden GSH-Synthese. Da die im Stamm Q3 vorliegende *gsh1Δ*-Mutation rezessiv war, musste in dem entsprechenden Kreuzungspartner (Y11620) das *GSH1* Gen disruptiert werden. Der aus der Kreuzung der Stämme Q3 x Y11620 *gsh1Δ* entstandene Diplont wies keine Methionin-Auxotrophie auf, was zeigt, dass es trotz des Vorliegens der Disruption des *PRO2*-Gens zur Komplementation der im Stamm Q3 vorliegenden Methionin-Auxotrophie kam.

Um nun zu untersuchen, ob die Methionin-Auxotrophie mit der Mutation im *LWG1*-Gen gekoppelt war, wurde der Stamm Q3 mit einer *gsh1Δ*-Mutante gekreuzt. Der erhaltene Diplont DB5460 war aufgrund der homozygot vorliegenden *gsh1Δ*-Mutation und der Komplementation der *lwg1-1*-Mutation GSH-auxotroph. Nach der Sporulation des Diplonten konnten 36 Sporen analysiert

werden, von denen 20 einen cfa^+ - (*gsh1Δ; lwg1-1*) und 16 einen cfa^- - (*gsh1Δ; LWG1*) Phänotyp zeigten (detaillierte Auflistung der Ergebnisse im Anhang in Tab. I). Von diesen 20 Sporen, die aufgrund des Tragens der *lwg1-1*-Mutation auch in Abwesenheit von GSH Kolonien bilden konnten, war keine Spore befähigt ohne Methionin im Medium zu wachsen. Dies zeigt, dass die Methionin-Auxotrophie mit der Mutation im *LWG1*-Gen gekoppelt war, jedoch nicht auf sie zurückging.

Untersuchung auf das Vorliegen einer Mutation im *ERO1*-Gen

Da *lwg1* als Auslöser für die Methionin-Auxotrophie ausgeschlossen werden konnte, wurde untersucht, ob diese Auxotrophie auf die Mutation in einem dritten Gen neben *LWG1* und *GSH1* zurückging. Die im Stamm Q3 vorliegende Mutation im *GSH1*-Gen führte zur Senkung der Reduktionsmittel-Konzentration in der Zelle. Zur Wiederherstellung des für die Zelle notwendigen Gleichgewichts zwischen Reduktions- und Oxidationsmitteln wäre eine Mutation in einem Gen, welches die Oxidationsmittel-Konzentration stabilisiert, bevorzugt. In diese Gruppe gehört das durch *ERO1* kodierte Glykoprotein Ero1. Es sorgt für die Mobilisierung der für die Bildung von Disulfid-Brücken notwendigen Oxidations-Äquivalente im ER (Frand und Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998) und ist damit ein bevorzugtes Ziel für eine Folge-Mutation in einer *gsh1Δ*-Mutante. Es wurde deshalb untersucht, ob die im Stamm Q3 vorgefundene Methionin-Auxotrophie auf eine Mutation im *ERO1*-Gen zurückging.

Verwendet wurde hierzu der heterozygot im *ERO1*-Gen disruptierte diploide Stamm Y26531. Zur Komplementationsanalyse mit dem Stamm Q3 musste hieraus ein *ero1Δ; gsh1Δ; lwg1-1*-Haplont gewonnen werden. Da die Disruption des *ERO1*-Gens in Hefe jedoch letal ist (Frand und Kaiser, 1998), das zusätzliche Ausschalten der GSH-Synthese aber womöglich durch Senken des Reduktionsmittel-Pools zum Überleben führen könnte, wurde der Diplont Y26531 zunächst heterozygot im *GSH1*-Gen disruptiert. Nach der Disruption wurde der nun erhaltene Stamm Y26531' auf KAc-Medium übertragen. Nach der Sporulation wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators einzelne Sporen isoliert und auf das Tragen der *ero1Δ*-Mutation untersucht (detaillierte Auflistung der Ergebnisse im Anhang in Tab. II). Es bestätigte sich hierbei, dass die Disruption von *ERO1* letal war, in Kombination mit der Disruption von *GSH1* jedoch

zum Überleben führte, da keine *ero1Δ*-Sporen gefunden wurden, die eine funktionierende GSH-Synthese aufwiesen (zur näheren Charakterisierung der *ero1Δ; gsh1Δ*-Doppelmutanten siehe unten).

Die erhaltenen haploiden *ero1Δ; gsh1Δ*-Doppelmutanten wiesen aufgrund der fehlenden GSH-Synthese einen *cfa*⁻-Phänotyp auf und konnten somit nicht direkt für die Kreuzung mit dem Stamm Q3 verwendet werden, da der resultierende Diplont ebenfalls *cfa*⁻ wäre und somit nicht auf das Vorhandensein einer Methionin-Auxotrophie getestet werden könnte. Zur Konstruktion eines *ero1Δ; gsh1Δ*-Stammes mit der Fähigkeit, ohne GSH Kolonien bilden zu können, wurde die Spore Y26531'-39C⁻ (*ero1Δ; gsh1Δ*) auf synthetischem Medium ohne GSH ausplattiert. Nach mehrtägiger Inkubation bei 30°C konnten Klone isoliert werden, die zum Wachstum ohne GSH befähigt waren. Da Mutationen im *LWG1*-Gen die einzigen Suppressoren der GSH-Auxotrophie in Hefe sind (Spector et al., 2001), war zu erwarten, dass der aus der Kreuzung von Y26531'-39C⁺ (*cfa*⁺ durch *lwg1*) mit dem Stamm Q3 entstehende Diplont ohne die Gabe von GSH überleben kann. Dies bestätigte sich nach der Kreuzung der beiden Stämme. Der Test auf das Wachstum ohne Methionin ergab, dass der erhaltene Diplont Methionin auxotroph war. Es konnte somit gezeigt werden, dass ein *ero1Δ; gsh1Δ; lwg1*-Stamm die Methionin-Auxotrophie des Stammes Q3 nicht komplementieren konnte. Um auszuschließen, dass der getestete diploide Stamm aufgrund der homozygot vorliegenden Disruption des *GSH1*-Gens nicht ohne die Gabe von Methionin wachsen konnte, wurde der im *GSH1*-Gen disruptierte Wildtyp Y10000 zur Akkumulation einer *lwg1*-Mutation auf synthetischem Medium ohne GSH ausplattiert und die erhaltenen Klone auf das Vorliegen einer Methionin-Auxotrophie getestet (Abb. 3.13).

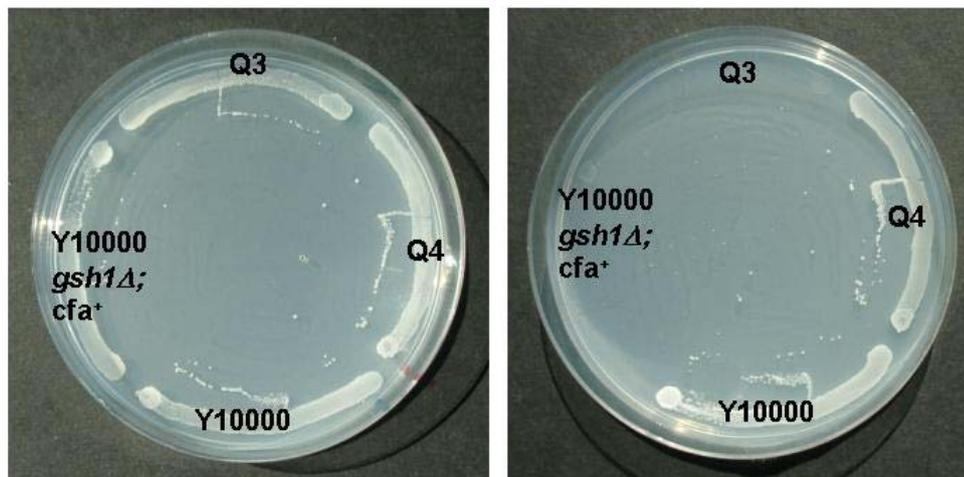


Abbildung 3.13: Der Stamm Y10000 *gsh1Δ*; *cfa*⁺ wuchs trotz des *cfa*⁺-Phänotyps (links: SynCo) nicht in Abwesenheit von Methionin (rechts: SynCo-Met).

Die Abbildung 3.13 zeigt die Methionin-Auxotrophie der Stämme Q3 und Y10000 *gsh1Δ*; *cfa*⁺, da beide trotz der Fähigkeit, ohne GSH Kolonien bilden zu können, nicht auf synthetischem Medium ohne Methionin wuchsen, wohingegen der Wildtyp Y10000 auf beiden Medien Kolonien bildete. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Methionin-Auxotrophie nicht auf einen Defekt im *ERO1*-Gen zurückging, sondern vermutlich auf die fehlende GSH-Synthese.

Charakterisierung einer *ero1Δ*; *gsh1Δ*-Doppelmutante

Wie oben beschrieben ist es möglich, einen im *ERO1*-Gen disruptierten Stamm durch das Ausschalten der GSH-Synthese am Leben zu halten. Eine solche *ero1Δ*; *gsh1Δ*-Doppelmutante zeigte jedoch ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamtes Wachstum auf YEPD. Da vermutet wurde, dass das Überleben einer *ero1Δ*-Mutante auf die Senkung des Reduktionsmittel-Pools zurückging, wurde untersucht, ob das Wachstum auf einem Medium mit geringerer GSH-Konzentration eine Wildtyp-ähnliche Geschwindigkeit annehmen konnte. Es wurde hierfür eine GSH-Konzentration gewählt, die es einer *gsh1Δ*-Mutante gerade noch ermöglichte zu wachsen [0,8 µg/ml GSH]. Es zeigte sich jedoch auch hier ein deutlich verlangsamtes Wachstum.

Um zu bestätigen, dass das erneute Einschalten der GSH-Synthese in einem *ero1Δ*-Stamm letal war, wurde die Spore Y26531'-39C' (*ero1Δ*; *gsh1Δ*) mit dem *GSH1*-Gen tragenden Plasmid pMG139 transformiert. Diese Transformation erfolgte als Gemisch zusammen mit dem leeren Vektor pRS313, um sicher-

zugehen, dass überhaupt eine Transformierbarkeit des Stammes vorlag. Nach der Transformation wurden Aliquots auf einem Selektivmedium für das Tragen des Plasmids pMG139 (SynCo-Leu+GSH) und auf das Tragen des leeren Vektors pRS313 (SynCo-His+GSH) ausplattiert. Als weitere Kontrolle wurde mit der Spore Y26531'-11B (*ERO1*; *gsh1* Δ) ebenso vorgegangen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.14 dargestellt.

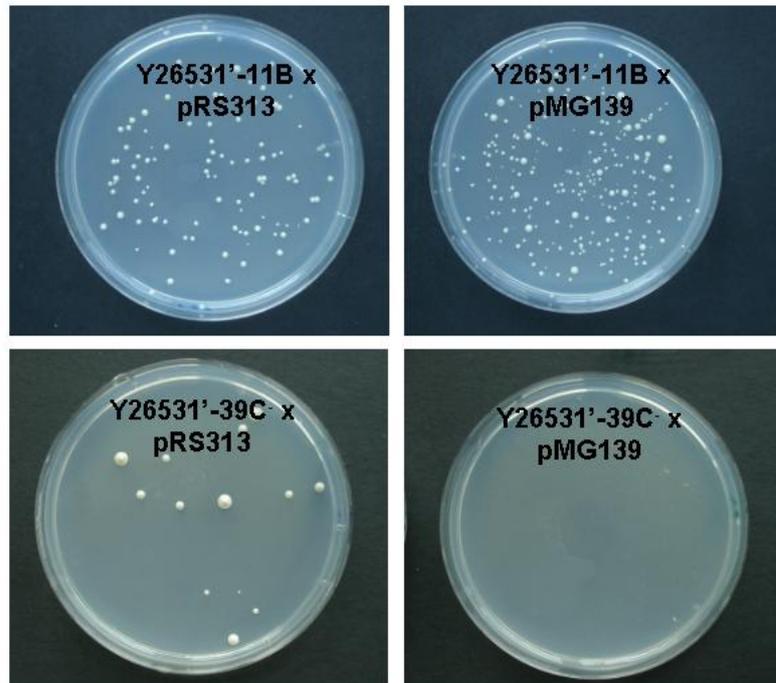


Abbildung 3.14: Der Stamm Y26531'-39C bildete nach Transformation mit einem Gemisch aus den Plasmiden pRS313 und pMG139 keine Kolonien auf SynCo-Leu+GSH-Medium, welches auf das Tragen des Plasmids pMG139 selektierte (unten rechts).

Es zeigte sich, dass eine *ero1* Δ ; *gsh1* Δ -Doppelmutante transformierbar war, da Transformanten gefunden wurden, die den leeren Vektor pRS313 trugen (Abb. 3.14, unten links). Zudem wurde bestätigt, dass das Einschalten der GSH-Synthese in einem *ero1* Δ -Stamm letal war, weil keine Doppelmutanten isoliert werden konnten, die das *GSH1*-enthaltende Plasmid pMG139 trugen (Abb. 3.14, unten rechts), obwohl ausreichend DNA in die Transformation eingesetzt wurde (Abb. 3.14, oben rechts).

3.4 Untersuchung der Cadmium-Sensibilität einer *lwg1-1*-Mutante

GSH spielt eine wesentliche Rolle bei Entgiftungsprozessen, die durch Schwermetalle ausgelöst wurden (Deneke, 2000). So zeigte sich, dass der Ausfall der GSH-Synthese in *S. cerevisiae* zu einer Sensibilität gegen Cadmium führte (Stephen und Jamieson, 1996). Die *gsh1Δ; lwg1-1*-Doppelmutante Q3, entstanden aus einer solchen *gsh1Δ*-Mutante (Stamm Q2), wies eine noch weiter verstärkte Sensibilität gegen Cadmium auf, welche im Stamm Q4 (*GSH1; lwg1-1*), entstanden aus dem Stamm Q3 durch Gentherapie des *GSH1*-Gens, noch weiter erhöht war (Schmidt, 1997).

Untersuchung des Einflusses von *lwg1* auf die Cadmium-Sensibilität

Näher untersucht wurde in dieser Arbeit die gesteigerte Cadmium-Sensibilität der Stämme Q3 und Q4. Hierzu wurde zunächst beleuchtet, ob diese auf die Mutation im *LWG1*-Gen zurückging. Dies erfolgte durch Komplementationsanalysen, indem der Wildtyp Q1 und die Mutanten Q2, Q3 und Q4 mit der *pro2Δ*-Mutante Y11620 gekreuzt wurden und die erhaltenen Diplonten in Agar-diffusionstests auf ihre Sensibilität gegen Cadmium getestet wurden. Es zeigte sich bei allen vier Diplonten eine Wildtyp-Resistenz gegen Cadmium, womit gezeigt wurde, dass eine *pro2Δ*-Mutante die Sensibilität einer *lwg1-1*-Mutante gegen Cadmium komplementieren konnte. Da es sich bei *lwg1-1* um ein Allel von *PRO2* handelt, war somit eher unwahrscheinlich, dass die Cadmium-Sensibilität auf die Mutation im *LWG1*-Gen zurückging.

Beleuchtung des möglichen Zusammenhangs einer Mutation im *ERO1*-Gen mit der Cadmium-Sensibilität

Auch in Bezug auf die Cadmium-Sensibilität der Stämme Q3 und Q4 war eine weitere, unbekannt Mutation als Auslöser in Betracht zu ziehen. Da auch hier eine Mutation im *ERO1*-Gen bevorzugt wäre (siehe 3.3 „Untersuchung der Methionin-Auxotrophie einer *gsh1Δ; lwg1-1*-Mutante“), wurden die beiden Stämme auf das Vorliegen einer Mutation im *ERO1*-Gen untersucht. Hierzu wurden die Stämme Q1 bis Q4 jeweils mit den, aus der Tetradenanalyse des Diplonten Y26531' gewonnenen Sporen Y26531'-11B (*ERO1; gsh1Δ*), -12B

(*ERO1*; *GSH1*) und -39C (*ero1Δ*; *gsh1Δ*) (siehe 3.3 „Untersuchung der Methionin-Auxotrophie einer *gsh1Δ*; *lwg1-1*-Mutante“ und Tab. II im Anhang) gekreuzt. Die erhaltenen Diplonten wurden in Agardiffusionstests gegen Cadmium auf ihre Sensibilität getestet. Es zeigte sich, dass nur bei Vorliegen eines homozygoten *gsh1Δ*-Genotyps eine erhöhte Sensibilität gegen Cadmium vorlag, was auf die fehlende Entgiftung durch GSH zurückzuführen war. Das Vorliegen des *ero1Δ*-Genotyps im Kreuzungspartner Y26531'-39C der Stämme Q3 und Q4 führte jedoch nicht zu einer verstärkten Sensibilität gegen Cadmium. Somit konnte eine Mutation im *ERO1*-Gen als Ursache für die erhöhte Cadmium-Sensibilität der Stämme Q3 und Q4 ausgeschlossen werden.

Untersuchung des Einflusses der GSH-Synthese auf die Cadmium-Sensibilität

Da der Stamm Q4, entstanden aus dem Stamm Q3 durch Gentherapie von *GSH1*, eine im Vergleich zu seinem Eltern-Stamm verstärkte Sensibilität gegen Cadmium aufwies, wurde weiter untersucht inwiefern dies auf das Einschalten der GSH-Synthese zurückging. Es wurde deshalb der Stamm Q3 mit dem *GSH1*-Gen tragenden Plasmid pMG139, welches in der Lage war die GSH-Auxotrophie einer *gsh1Δ*-Mutante zu komplementieren, transformiert, um in dem Stamm Q3 die GSH-Synthese wieder einzuschalten. Als Kontrolle wurde zusätzlich mit dem entsprechenden leeren Vektor pRS315 transformiert und die erhaltenen Transformanten in Agardiffusionstests gegen Cadmium mit den Stämmen Q3 und Q4 auf ihre Sensibilität verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

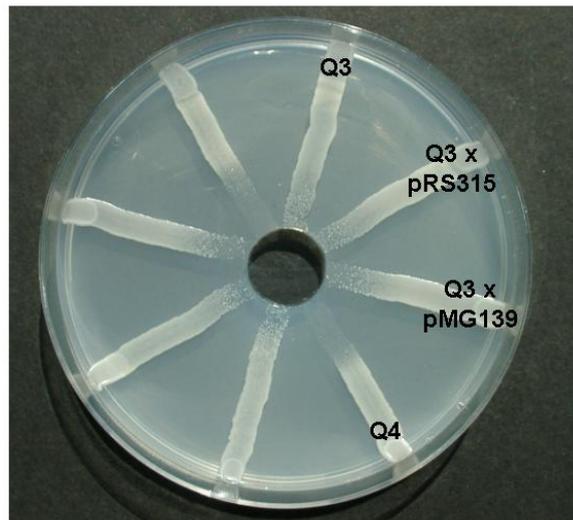


Abbildung 3.15: Das plasmidgebundene Tragen des *GSH1*-Gens führte im Stamm Q3 zu einer leichten Sensibilisierung gegen Cadmium (Agardiffusionstest mit 0,05 mg/ml CdCl_2).

Es zeigte sich jedoch nur eine leichte Sensibilisierung des Stammes Q3 durch das Tragen des Plasmids pMG139 gegen Cadmium, wobei diese erzeugte Sensibilität nicht an die des Stammes Q4 heranreichte. Daraus ließ sich schließen, dass die verstärkte Sensibilität des Stammes Q4 gegen Cadmium nicht nur ein Effekt der wieder funktionierenden GSH-Synthese war.

4 Diskussion

4.1 Klonierung des *RNG1*-Gens

Die Mutation *rng1-1* vermittelte eine Hyperresistenz gegen MNNG. Mögliche Mechanismen, die diese Hyperresistenz hervorriefen, sind ein verstärkter Export bzw. ein verringerter Import von MNNG. Denkbar ist ebenfalls eine verminderte Aktivierung von MNNG zu einem reaktiven Stoffwechselprodukt, sowie eine verbesserte Reparatur von alkylierten Nukleotiden.

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pB6 isoliert, welches die MNNG-Hyperresistenz, die durch die Mutation *rng1-1* ausgelöst wurde, zum Teil komplementierte. Dies entsprach der Erwartung bei Klonierung des *RNG1*-Gens, da sich die Mutation *rng1-1* semi-dominant ausprägte und somit nicht vollständig komplementiert werden konnte. Der Passagier des Plasmids pB6 enthielt auf einer Größe von 10365 bp zehn ORFs. Es war jedoch nicht möglich, diesen Effekt einem bestimmten, auf dem Passagier enthaltenen ORF zuzuordnen, obwohl die Sensibilisierung durch Plasmidverlust und mehrfache Retransformation in verschiedene Einzelkolonien eindeutig auf das Plasmid pB6 zurückzuführen war und auch als *rng1*-spezifisch bestimmt werden konnte.

Subklonierung des Passagiers des Plasmids pB6

Durch die Subklonierung konnten 17 Klone erzeugt werden, von denen lediglich einer eine Sensibilität gegen MNNG aufwies. Das in diesem Klon enthaltene Plasmid pB6-*PvuII*Δ besaß neben den partiell vorliegenden Genen *AHP1* und *CCW12* alle weiteren Gene vollständig und ließ somit keinen Ausschluss einzelner Gene als Allele von *RNG1* zu. Widersprüchlich hierzu zeigte sich jedoch, dass keines der anderen 16 Plasmide eine Sensibilität hervorrief, obwohl jedes der auf dem Plasmid pB6 enthaltenen Gene mehrfach und vollständig auf verschiedenen Passagieren enthalten war. Der ORF *YLR111w* war auf sieben, die Gene *AHP1* und *CCW12* jeweils auf sechs, der ORF *YLR112w* auf vier und der ORF *YLR108c*, sowie die Gene *REX3* und *HOG1* jeweils auf zwei Passagieren vertreten.

Auch die Hypothese, dass zwei Gene für die Komplementation notwendig waren, die eventuell gemeinsam über einen divergenten Promotor reguliert

wurden, konnte verworfen werden. Diese Möglichkeit ist für den ORF *YLR108c* und das Gen *AHP1* denkbar, welche jedoch beide vollständig auf dem Plasmid pB6-N vorlagen (Abb. 3.6), welches nicht zur Komplementation der MNNG Hyperresistenz führte. Ebenso könnte ein divergenter Promotor zwischen dem Gen *CCW12* und dem ORF *YLR111w* vorliegen. Beide Elemente befanden sich jedoch zusammen auf den Plasmiden pB6-D, E, J und K, welche allesamt keine Sensibilisierung des Stammes *Q2rng1* gegen MNNG hervorriefen.

Eine Fehlerquelle in der Subklonierung bestand eventuell in der fehlerhaften Erstellung der Plasmide. Da die gewünschte Erstellung jedoch durch mindestens zwei und bis zu fünf Restriktionsmuster bestätigt wurde, ist dies als Fehlerquelle eher unwahrscheinlich. Zudem konnten Gene auch durch überlappende Subklone mehrfach als Allel von *RNG1* ausgeschlossen werden (siehe oben).

Da zur Amplifikation der erstellten Plasmide *E. coli*-Stämme verwendet wurden, die nicht zur homologen Rekombination befähigt waren, konnte ein Umbau der Plasmide während der Amplifikation ausgeschlossen werden.

Das Tragen eines Plasmids wurde in dem Stamm *Q2rng1 ura⁻* über die Komplementation der Uracil-Auxotrophie (*URA3* bei YCp50) bzw. der Tryptophan-Auxotrophie (*TRP1* bei pRS314 und pRS424) überprüft. Beide Gene lagen im Stamm *Q2rng1 ura⁻* disruptiert vor, so dass eine Reversion des Markers ausgeschlossen war. Zudem sind keinerlei Suppressor-Mutationen in der Literatur beschrieben, die einer *ura3⁻* bzw. *trp1*-Mutante das Wachstum ohne Uracil bzw. Tryptophan ermöglichen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die nach der Transformation auf dem Selektivmedium erhaltenen Kolonien tatsächlich Plasmidträger waren. Zudem wurden die Ergebnisse nach jeder Hefe-Transformation durch die Untersuchung mehrerer Transformanten bestätigt.

Komplementationsanalysen

Für Komplementationsanalysen wurden Disruptanten in den Genen *REX3*, *AHP1* und *CCW12*, sowie in dem ORF *YLR108c* des Projekts „EUROSCARF“ verwendet. Jede dieser Disruptanten war in der Lage, die MNNG-Hyperresistenz des Stammes *Q2rng1* zu komplementieren, was vermuten lässt, dass keines dieser Gene ein Allel von *RNG1* ist. Fraglich blieb jedoch, ob die verwendeten Disruptanten tatsächlich die gewünschte Disruption enthielten, da nur zwei dieser Disruptanten getestet werden konnten, wovon nur die *ccw12*-Dis-

ruptante die in der Literatur beschriebenen Phänotypen zeigte. Bei der *ahp1*-Disruptante wichen diese Phänotypen von denen in der Literatur beschriebenen ab. Dies könnte einerseits auf die unterschiedliche genetische Konstitution der verglichenen Stämme zurückgehen, was zu verschiedenen Ausprägungen der Phänotypen führte. Andererseits wäre denkbar, dass die in der Literatur beschriebenen Phänotypen nicht auf die entsprechende Mutation zurückgingen oder die in dieser Arbeit verwendete Disruptante nicht in dem gewünschten Gen disruptiert vorlag. Für die *rex3*-Disruptante wurden keine im Rahmen dieser Diplomarbeit zu untersuchenden Phänotypen in der Literatur gefunden. Phänotypen für die Disruption des ORFs *YLR108c* wurden bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. Es muss sich somit noch eine Untersuchung über das Vorliegen der gewünschten Disruption in den verwendeten Disruptanten anschließen, um die Gene *REX3*, *AHP1* und *CCW12*, sowie den ORF *YLR108c* als *RNG1*-Allele ausschließen zu können. Dies könnte einerseits über die Amplifikation des fraglichen disruptierten Bereichs mittels PCR und die anschließende Sequenzierung erreicht werden. Andererseits könnte diese Kontrolle anhand klassischer Genetik getroffen werden. Hierzu könnte die verwendete Disruptante (disruptiert durch *kanMX4*) mit einem Stamm, der eine Disruption im gleichen Gen trägt, aber einen anderen Paarungstyp besitzt und durch einen anderen Marker disruptiert vorliegt (z.B. *URA3*), gekreuzt werden. Nach Sporulation und anschließender Tetradenanalyse dürften keine Sporen zu finden sein, die sowohl Genitacin-resistent, als auch Uracil-prototroph sind, falls die Disruption im gleichen Gen vorlag. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

Im Zuge der Untersuchung der verschiedenen Phänotypen konnte eine Sensibilität gegen „Congo red“ des Stammes *Q2rng1* festgestellt werden, die jedoch nicht durch das Plasmid pB6 komplementiert wurde. Dies lässt vermuten, dass diese Sensibilität auf die gleiche Mutation zurückging, die im Stamm *Q2rng1* zu einer Sensibilität gegen Lithium und 37°C führte, welche ebenfalls nicht durch das Plasmid pB6 komplementiert wurde. Da „Congo red“ in die Zellwand-Biogenese eingreift und meistens in Zellwand-Mutanten vorliegt (Kopecka und Gabriel, 1992), lässt sich eine weitere Mutation im Stamm *Q2rng1* vermuten, die ein Gen, involviert in die Zellwand-Synthese, betraf.

Die auf dem Plasmid pB6 enthaltenen genetischen Elemente

Da auch auf dem einzigen *rng1-1* komplementierenden Plasmid pB6-*PvuII*Δ alle Gene, zumindest partiell enthalten waren, konnte keines der auf dem Plasmid pB6 vorliegenden Gene als Allel von *RNG1* ausgeschlossen werden. Das partielle Vorliegen der Gene *AHP1* und *CCW12* auf dem Plasmid pB6-*PvuII*Δ ließ die Übereinstimmung mit *RNG1* jedoch eher unwahrscheinlich erscheinen. Eine genauere Untersuchung des in dem Plasmid pB6 enthaltenen Teils des Hefe-Genoms zeigte zusätzlich das Vorhandensein eines „long terminal repeats“ (LTR) und einer kleinen Kern-Ribonukleinsäure (snRNA), kodiert durch *SNR6* (Abb. 4.1).

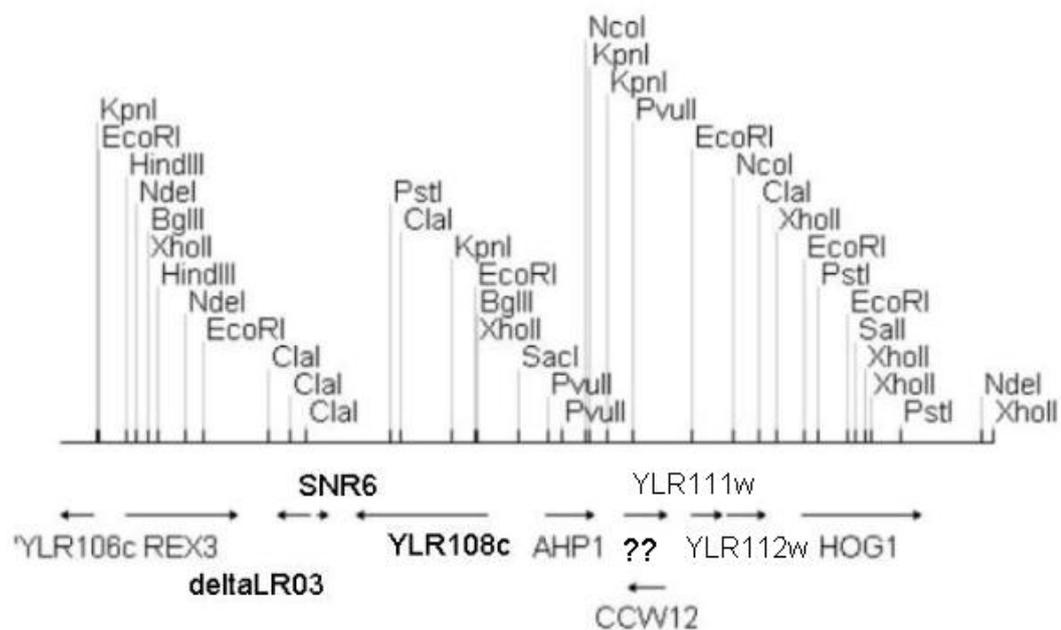


Abbildung 4.1: Der Passagier des Plasmids pB6 mit dem LTR (*deltaLR03*) und *SNR6* („??“ bezeichnet keinen tatsächlichen ORF).

Das 112 Nukleotide große *SNR6*-Gen kodiert für eine snRNA, die mit spezifischen Proteinen zum kleinen Kern-Ribonukleoproteinpartikel U6 (U6 snRNP) assoziiert ist. Dieses U6 snRNP ist als Bestandteil des Spleißosoms speziell für die Katalyse des Spleißens der mRNA-Vorstufen zuständig (Stryer, 1999). Es ist denkbar, dass eine Mutation im *SNR6*-Gen zu einer veränderten Assoziation zum U6 snRNP führt, wodurch das Spleißen eines Gens, welches für den Import von MNNG zuständig ist, ausbleibt, so dass kein Import von MNNG mehr in die Zelle stattfinden kann. Ebenso könnte ein fehlerhaftes Spleißen eines oder mehrerer Gene ausgelöst werden, was wiederum zu einer verringerten

Aktivierung von MNNG führen würde, sowie zu einer verbesserten DNA-Reparatur, oder einer verbesserten Entgiftung.

LTRs sind Bestandteile von Retrotransposons. Diesen „verstümmelten“ Retroviren fehlen Gene für essentielle Bestandteile der Virushülle, sowie das Gen für die RNA-abhängige DNA-Polymerase. Gut untersuchte Vertreter der Retrotransposons in Hefe sind die TY-Elemente (Knippers, 2001). Ein Zusammenhang zur Ausprägung einer Hyperresistenz gegen MNNG bei einer Mutation in einem LTR ist in der Literatur bisher nicht beschrieben, was erklären würde warum es durch Passagiere, die den LTR enthielten, nicht zur Komplementation der MNNG-Hyperresistenz gekommen war.

Auf dem Passagier des Plasmids pB6 waren weiterhin die ORFs *YLR106c*, *YLR108c*, *YLR111w* und *YLR112w* enthalten. Da nur 3% des ORFs *YLR106c* auf dem Passagier vorlagen, wird dieser ORF in der weiteren Analyse außer Betracht gelassen.

Der ORF *YLR108c* besitzt eine Aminoacyl-tRNA-Klasse-II-Synthetase-Signatur, sowie die Charakteristika einer Anheftungsstelle für Lipide der prokaryotischen Membran-Lipoproteine. Zusätzlich enthält dieser ORF vermutlich eine Transmembran-Region (Verhasselt und Volckaert, 1997). Interaktionsstudien mittels des „yeast two-hybrid“-Verfahrens konnten mehrere Protein-Protein-Interaktionspartner aufzeigen. Hierzu gehören u.a. das Protein Soh1, ein möglicherweise akzessorisches Protein für die Transkription; Did4, ein Klasse E-Faktor, der für die vakuoläre Protein-Sortierung und -Endocytose zuständig ist; Apg17, eingebunden in die Autophagie, und Bud7, welches bei der Auswahl der Knospentstelle eine Rolle spielt (Ito et al., 2001). Auch in diesem Fall erscheint ein Zusammenhang mit einer durch eine Mutation ausgelösten Hyperresistenz gegen MNNG unwahrscheinlich.

Der ORF *YLR111w* enthält vermutlich eine eukaryotische RNA-Bindungs-Region (Verhasselt und Volckaert, 1997) und interagiert mit *ARP2* und *ARC40*, welche vermutlich für die Polarität der Zelle eine Rolle spielen (Tong et al., 2001). Anhand dieser vorliegenden Erkenntnisse, lässt sich keinerlei Zusammenhang zu *RNG1* erkennen.

Über den ORF *YLR112w* ist lediglich bekannt, dass die Disruption letal ist. Es könnte sich bei *rng1-1* um ein Allel eines essentiellen Gens handeln, da das

Gen *RNG1* im Stamm *Q2rng1* nicht disruptiert vorliegt und die essentielle Funktion somit möglicherweise nicht vollständig zerstört wurde.

Das Plasmid pB6 enthält zudem die näher charakterisierten Gene *REX3*, *AHP1*, *CCW12* und *HOG1*.

REX3 kodiert für eine 3' – 5'-RNA-Exonuklease, welche für die Reifung der RNA-Untereinheit der RNase MRP benötigt wird (van Hoof et al., 2000). Die RNase MRP ist sowohl für die Bildung von RNA-„Primern“ während der DNA-Replikation in den Mitochondrien zuständig, als auch für das Prozessieren der unreifen 5,8S rRNA (Chu et al., 1994). Denkbar wäre, dass eine Mutation im *REX3*-Gen zu einer veränderten Spezifität der RNA-Exonuklease führt, welche daraufhin bestimmte mRNAs so prozessiert, dass die resultierenden Proteine inaktiv oder derart verändert sind, dass sie eine erhöhte Resistenz gegenüber MNNG bewirken.

Ahp1 ist vermutlich in den Peroxisomen lokalisiert und schützt die Zelle als Alkylhydroperoxid-Reduktase vor oxidativen Schäden, welche speziell durch organische Peroxide hervorgerufen werden. Als Cofaktor benötigt Ahp1 Thio-redoxin (Lee et al., 1999). Ebenso wie bei der Punktmutation *msh5-14* (siehe 1.2 „DNA-Alkylierung“) ist es möglich, dass eine mutierte Form von Ahp1 befähigt ist, neben oxidativen Schäden auch durch MNNG methylierte Nukleotide von ihrer Methyl-Gruppe zu befreien.

CCW12 kodiert für ein kovalent an die Zellwand gebundenes Mannoprotein (Mrsa et al., 1999). Da nicht bekannt ist, auf welchem Weg MNNG in die Zelle gelangt, wäre es denkbar, dass eine mutierte Form von Ccw12 die eventuelle Diffusion von MNNG in die Zelle verlangsamt und somit eine verstärkte Resistenz gegen MNNG auslöst.

Die Hog1-MAP-Kinase ist Bestandteil des Hog1-MAP-Kinase-Weges, welcher bei osmotischem Stress aktiviert wird. Mit der Aktivierung geht die Verwendung anderer Zellwand-Proteine einher. Vorangegangene Studien sprechen jedoch dafür, dass der Hog1-MAP-Kinase-Weg auch bei fehlenden Stressbedingungen für die Bildung der Zellwand benötigt wird (Klis et al., 2002). Auch hier könnte eine Mutation zu einem veränderten Aufbau der Zellwand führen und dadurch ein verlangsamtes Eindringen von MNNG in die Zelle herbeiführen. Ebenso ist denkbar, dass eine veränderte Hog1-Kinase nicht mehr in der Lage ist, bestimmte Proteine zu phosphorylieren, oder ein anderes, in diesem Zusammen-

hang unbekanntes Protein phosphoryliert, welches eine Hyperresistenz gegen MNNG auslöst.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass die Gene *AHP1* und *CCW12* Allele von *RNG1* sind. Da diese beiden Gene nur partiell auf dem einzig komplementierenden Plasmid enthalten waren und sich zudem auf jeweils sechs verschiedenen Plasmiden, die nicht zu einer Komplementation der MNNG-Hyperresistenz führten, befanden. Zusätzlich konnten die verwendeten Disruptanten in diesen Genen eine Komplementation herbeiführen. Übereinstimmend mit einer *ccw12*-Mutante zeigte der Stamm *Q2rng1* jedoch eine Sensibilität gegen „Congo red“ und für beide Gene ist aufgrund ihrer Funktion ein theoretischer Zusammenhang mit einer MNNG-Hyperresistenz denkbar.

Auch für die ORFs *YLR111w* und *YLR112w* ist die Übereinstimmung mit *RNG1* eher unwahrscheinlich, da diese ebenfalls häufig in verschiedenen Subklonen vorlagen, in denen keine Komplementation der MNNG-Hyperresistenz vorlag (*YLR111w* in sieben und *YLR112w* in vier Subklonen). Für eine Übereinstimmung des ORFs *YLR112w* mit *RNG1* spricht jedoch der essentielle Charakter dieses ORFs.

Bei dem ORF *YLR108c*, sowie den Genen *REX3* und *HOG1* besteht die größte Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung mit *RNG1*, da diese jeweils nur auf zwei verschiedenen Plasmiden vertreten waren, die keine Komplementation herbeiführten. Allerdings ließen Komplementationsstudien vermuten, dass es sich weder bei *REX3*, noch bei *YLR108c* um Allele von *RNG1* handelte. Auch *HOG1* schien aufgrund des entgegengesetzten CCW-Phänotyps der Disruptante und des Stammes *Q2rng1* eher als Allel auszuschließen. Aufgrund der Funktion der Gene ist jedoch für *REX3* und *HOG1* ein Zusammenhang mit einer MNNG-Hyperresistenz denkbar.

Auch das *SNR6*-Gen und der LTR waren jeweils nur auf zwei verschiedenen Subklonen enthalten, wobei nur für das *SNR6*-Gen ein Zusammenhang mit einer Hyperresistenz gegen MNNG möglich erscheint.

4.2 Heterogenes Wachstum durch die Überexpression des ORFs *YLR112w* alleine oder zusammen mit dem ORF *YLR111w*

Als ein Nebeneffekt der Subklonierung des Plasmids pB6 konnte festgestellt werden, dass das Tragen des ORFs *YLR112w* alleine oder gemeinsam mit dem ORF *YLR111w* auf einem „multi copy“-Plasmid zu verschlechtertem Wachstum führte. Es wurde gezeigt, dass dies unabhängig vom Genotyp des transformierten Stammes vorzufinden war. Dieses schlechtere Wachstum zeigte sich in einer heterogenen Koloniegröße der Transformanten und dem glasigen Erscheinungsbild der größeren Kolonien.

Da über die beiden fraglichen ORFs sehr wenig bekannt ist (siehe 4.1 „*RNG1*-Klonierung“), lässt sich über den Mechanismus, der zum heterogenen Wachstum der Transformanten führte, nur spekulieren. Als möglicher Auslöser konnte jedoch der ORF *YLR112w* identifiziert werden, da es einerseits unwahrscheinlich war, dass zwei, im Hefegenom direkt benachbarte ORFs zusammen einen Effekt durch ihre Überexpression bewirkten, und andererseits bereits gezeigt wurde, dass der ORF *YLR112w* für *S. cerevisiae* essentiell war. Die Vermutung liegt somit nahe, dass auch die Überexpression dieses ORFs eine Auswirkung auf die Zelle auslöst.

Es wurden bereits einige Gene beschrieben, die überexprimiert zum Tode oder zu heterogenem Wachstum der Zelle führen. Eine große Gruppe dieser Gene sind solche, die für Proteine des Zytoskeletts kodieren (Liu et al., 1992). Ebenfalls zu einem verlangsamten Wachstum oder sogar zum Zellzyklusarrest kommt es bei Überexpression von Genen, die im Zellzyklus und in Stress-Antworten involviert sind. Die Überexpression von Zellzyklus-Genen führt meist zu einem Arretieren der Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus (Espinet et al., 1995). Dies konnte jedoch für die in dieser Arbeit untersuchte Überexpression ausgeschlossen werden. In zwei in der Literatur beschriebenen Studien wurden zusätzliche Gene identifiziert, die überexprimiert zum Tode oder zu heterogenem Wachstum der Zelle führten. Hierzu gehörten u.a. Gene, die in Signaltransduktionswegen und in der Pheromon-Antwort eine Rolle spielen (Akada et al., 1997, Stevenson et al., 2001). In keiner dieser Studien

wurde jedoch der ORF *YLR112w* identifiziert, was entweder auf die Unvollständigkeit der Studien zurückzuführen ist, oder darauf, dass eventuell doch das Zusammenspiel der ORFs *YLR111w* und *YLR112w* der Auslöser des verschlechterten Wachstums ist.

Als eher unwahrscheinlich anzusehen war eine Übereinstimmung des verschlechterten Wachstums auslösenden ORFs mit *RNG1*, da die Plasmide, die das heterogene Wachstum hervorriefen nicht gleichzeitig eine Sensibilität gegen MNNG bewirkten. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Auslösen eines heterogenen Wachstums in allen Hefe-Stämmen auftrat, wohingegen die Sensibilisierung gegen MNNG nur in dem Stamm *Q2rng1* zu finden war.

4.3 Die Überexpression von *SNG1* in einer *gsh1Δ*; *rng1-1*-Doppelmutante verstärkt die Resistenz gegen MNNG

Es konnte gezeigt werden, dass sich die durch die Überexpression von *SNG1* hervorgerufene Resistenz gegen MNNG zu der bereits vorhandenen Hyperresistenz einer *gsh1Δ*; *rng1-1*-Doppelmutante hinzuaddierte. Somit konnte neben dem Zusammenhang von *SNG1* mit der DNA-Reparatur und dem GSH-Pool (Grey et al., 1995) auch ausgeschlossen werden, dass sich *RNG1* und *SNG1* entsprechen. Denkbar gewesen wäre, dass es sich bei *rng1-1* um ein fehlreguliertes und somit überexprimiertes *SNG1*-Allel handelte, welches somit eine MNNG-Hyperresistenz hervorrief. Die Additivität dieser beiden Resistenzen lässt diese Hypothese jedoch unwahrscheinlich erscheinen. Es bleibt somit die Vermutung, dass das durch *SNG1* kodierte 547 Aminosäuren große, vermutlich Membran-gebundene Protein durch einen verstärkten Export von MNNG zu einer Hyperresistenz gegen dieses führte.

4.4 Ein *ero1Δ*-Stamm kann durch die Disruption des *GSH1*-Gens am Leben gehalten werden

Das durch *ERO1* kodierte Glykoprotein Ero1 ist mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) assoziiert. Es sorgt für die Mobilisierung der, für die Bildung von Disulfid-Brücken notwendigen Oxidations-Äquivalente im ER (Frand und Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998). Die Disruption des *ERO1*-Gens ist in *S. cerevisiae* letal, wohingegen eine *ero1-1*-Mutante überlebt, aber einen deutlich abgesenkten „Pool“ an Oxidations-Äquivalenten, welche für die Proteinfaltung im ER benötigt werden, aufweist. Zusätzlich zeigt diese Mutante eine Sensibilität bei Temperaturen über 36°C und eine verstärkte Sensibilität gegen reduziertes „Dithiothreitol“ (DTT), einem Reduktionsmittel, das durch die Zellmembran eindringt und die Protein-Oxidation im ER blockiert. Die Gabe von Diamid hingegen, einem Oxidationsmittel, welches ebenfalls durch die Membran eindringt und für die Bildung von Disulfidbrücken benötigt wird, supprimiert die Temperatur-Sensibilität einer *ero1-1*-Mutante (Frand und Kaiser, 1998). Ebenso führt die Deletion des *GSH1*-Gens in der *ero1-1*-Mutante zum Verlust der Temperatur-Sensibilität (Cuozzo und Kaiser, 1999). Die Überexpression von *ERO1* führt hingegen zu einer Resistenz gegen DTT (Pollard et al., 1998).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein bestimmtes Gleichgewicht zwischen Oxidationsmitteln, mobilisiert durch Ero1, und Reduktionsmitteln, wie z.B. GSH, in der Zelle notwendig ist, was vermuten lässt, dass eine Mutation in einer *gsh1Δ*-Mutante bevorzugt auf die Senkung des Oxidationsmittel-Pools zielt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde untersucht, ob die in den Stämmen Q3 (*gsh1Δ; lwg1-1*) und Q4 (*GSH1, lwg1-1*) vorgefundene Methionin-Auxotrophie bzw. Cadmium-Sensibilität auf eine Mutation im *ERO1*-Gen zurückgeht (siehe 4.5 „Der Zusammenhang der Methionin-Auxotrophie einer *gsh1Δ; lwg1-1*-Doppelmutante mit GSH-Mangel“ und 4.6 „Eine unbekannte Mutation sorgt in den Stämmen Q3 und Q4 für die Cadmium-Sensibilität“). Im Zuge dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Überleben einer *ero1Δ*-Mutante in Kombination mit der Disruption des *GSH1*-Gens möglich war, da die Disruption des *GSH1*-Gens zum Überleben eines *ero1Δ*-Stammes führte, wohingegen das

Einschalten der GSH-Synthese in einem solchen Stamm letal wirkte. Diese überlebende *ero1Δ*, *gsh1Δ*-Doppelmutante zeigte jedoch ein deutlich verlangsames Wachstum.

Der Zusammenhang von Ero1 und GSH ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

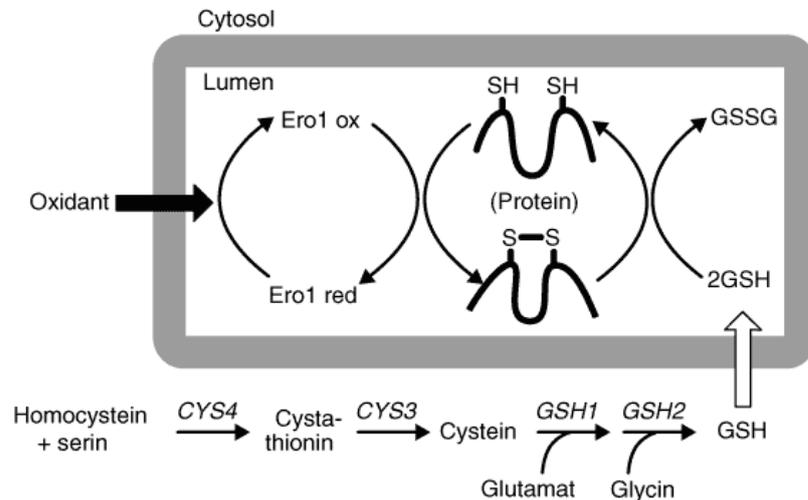


Abbildung 4.2: Übersicht über die GSH- und Protein-Disulfidbrücken-Bildung im ER (Cuozzo und Kaiser, 1999).

Das in der ER-Membran befindliche Ero1-Protein sorgt für die Mobilisierung der Oxidationsäquivalente. Die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) beschleunigt die Bildung und das korrekte Einfügen der Disulfidbrücken (nicht gezeigt). GSH wird im Cytosol gebildet und gelangt über die ER-Membran in das ER-Lumen und reduziert dort die Disulfidbrücken von Proteinen. Demnach könnte die Aufgabe von GSH in der Reduktion der oxidierten PDI liegen, wodurch das Protein für die weitere Bildung von Disulfidbrücken regeneriert würde. Zusätzlich ist denkbar, dass GSH inkorrekte und relativ instabile Disulfidbrücken direkt reduziert und dadurch die Genauigkeit der Disulfidbrücken-Bildung erhöht (Cuozzo und Kaiser, 1999).

Der komplette Ausfall von *ERO1* bei einer funktionierenden GSH-Synthese könnte ein Ansteigen des Reduktionsmittel-Pools im ER auslösen und dadurch zum stetigen Reduzieren neu gebildeter, korrekter Disulfidbrücken führen. Dies würde eine Akkumulation falsch gefalteter Proteine hervorrufen und somit zum Tod der Zelle führen. Das Ausschalten der GSH-Synthese würde unter diesen Bedingungen erneut ein Redox-Gleichgewicht einstellen und eine verlangsamte Proteinfaltung im ER möglich machen, was das Überleben der Zelle gewährleisten würde. Voraussetzung für diese Hypothese ist die Mobilisierung geringer

Mengen an Oxidationsäquivalenten zur Aufrechterhaltung der Disulfidbrücken-Bildung über einen Ero1-unabhängigen „Bypass“. Das Fehlen von GSH bei der Synthese von Proteinen und DNA, bei Transportvorgängen, bei Enzym-Aktivitäten, bei Stoffwechsel- und Entgiftungsprozessen, sowie die ver-langsamte Proteinfaltung würden somit zu dem beobachteten deutlich ver-langsamten Wachstum führen.

4.5 Der Zusammenhang der Methionin-Auxotrophie einer *gsh1Δ*; *lwg1-1*-Doppelmutante mit GSH-Mangel

Die Untersuchung der Methionin-Auxotrophie des Stammes Q3 (*gsh1Δ*; *lwg1-1*) zeigte, dass die Mutation im *lwg1*-Gen nicht der Auslöser für diese Auxotrophie war. Dies erfolgte über einen Komplementationsversuch mit einer *pro2*-Disruptante, die zunächst im *GSH1*-Gen disruptiert wurde, um die Grundlage eines homozygoten *gsh1Δ*-Diplonten zur Untersuchung der Methionin-Auxotrophie zu schaffen. Die fehlende Komplementation des *cfa*⁺-Phänotyps zeigte das tatsächliche Vorliegen einer homozygoten Mutation im *LWG1* bzw. *PRO2*-Gen und die Methionin-Prototrophie des erhaltenen Diplonten das Fehlen des Zusammenhangs zwischen *lwg1* und der Methionin-Auxotrophie.

Da *lwg1* als Auslöser für die Methionin-Auxotrophie ausgeschlossen werden konnte, wurde näher untersucht, ob eine Mutation im *ERO1*-Gen diese Auxotrophie auslöst, da eine solche Mutation in einem *gsh1Δ*-Stamm möglicherweise bevorzugt auftreten würde (siehe 4.4 „Ein *ero1Δ*-Stamm kann durch die Disruption des *GSH1*-Gens am Leben gehalten werden“). Zur Komplementationsanalyse mit dem Stamm Q3 musste ein *ero1Δ*-Stamm konstruiert werden, in dem das *GSH1*-Gen disruptiert vorlag, um das Überleben des Stammes zu sichern. Zusätzlich musste dieser Stamm eine *lwg1*-Mutation tragen, um dem resultierenden Diplonten das Wachstum ohne GSH zu ermöglichen und somit eine Untersuchung auf das Wachstum ohne Methionin durchführbar zu machen. Die fehlende Komplementation der Methionin-Auxotrophie bei Kreuzung des Stammes Q3 mit einer *gsh1Δ*; *ero1Δ*; *lwg1*-Mutante, konnte jedoch

nicht ganz ausschließen, dass eine Mutation im *ERO1*-Gen die Methionin-Auxotrophie herbeigeführt hatte, da diese ebenso auf das homozygote Vorliegen der Disruption des *GSH1*-Gens zurückführbar war. Die Erstellung eines Wildtyps anderer genetischer Konstitution, der im *GSH1*-Gen disruptiert wurde und eine *lwg1*-Mutation akkumulierte, zeigte ebenfalls kein Wachstum ohne die Gabe von Methionin. Daraus lässt sich jedoch nicht zwangsläufig schließen, dass die fehlende GSH-Synthese Auslöser für die Methionin-Auxotrophie war, da diese Doppel-Mutante ebenfalls eine dritte Mutation tragen konnte, die aufgrund des Vorliegens der *gsh1Δ*-Mutation ebenfalls im *ERO1*-Gen zu finden sein konnte.

Es liegt jedoch ein Zusammenhang der Methionin-Auxotrophie mit der fehlenden GSH-Synthese weitaus näher, wie Abbildung 4.3 zeigt.

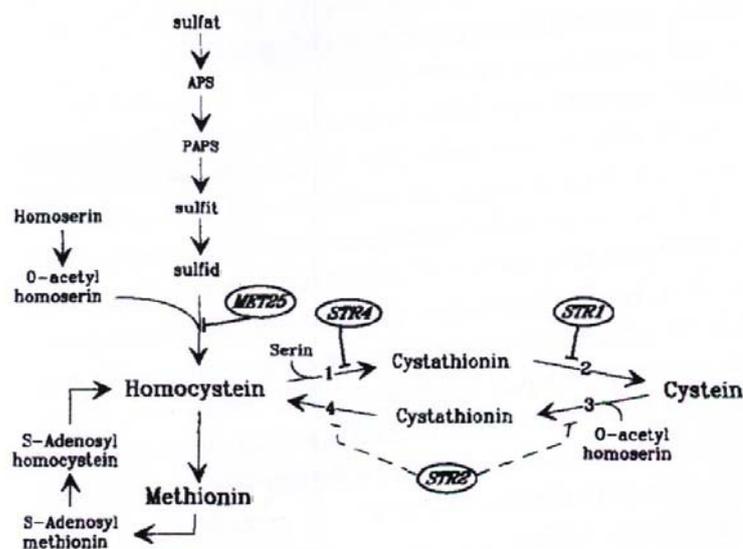


Abbildung 4.3: Der Transsulfurationsstoffwechselweg (Cherest und Surdin-Kerjan, 1992).

Das Schwefelatom von Sulfid, welches aus der assimilatorischen Sulfat-reduktion von Sulfat gewonnen wurde, wird in das aus Cystein synthetisierte C4-Rückgrat von Cystathionin eingebaut. Das daraus entstandene Homocystein dient dann als Vorstufe für Methionin.

Da GSH eine wesentliche Speicherform von Cystein darstellt, lässt dies die Vermutung zu, dass ein Ausfall der GSH-Synthese zum Absinken der Cystein-Konzentration führt. Dies wiederum könnte dazu führen, dass Cystein nicht mehr als Substrat für die Methionin-Biosynthese zur Verfügung steht, woraus eine Methionin-Auxotrophie entstehen würde. Gestützt wird diese Hypothese

durch die Supplementierbarkeit der Methionin-Auxotrophie des Stammes Q3 durch Cystein (Ergebnis nicht gezeigt).

Es lässt sich daraus zusammenfassend schließen, dass die Methionin-Auxotrophie nicht auf *lwg1* zurückging, sondern mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit auf die fehlende GSH-Synthese.

4.6 Eine unbekannt Mutation sorgt in den Stämmen Q3 und Q4 für die Cadmium-Sensibilität

Da die Stämme Q3 (*gsh1Δ; lwg1-1*) und Q4 (*GSH1; lwg1-1*) eine Sensibilität gegenüber Cadmium zeigten (wobei der Stamm Q4 sensibler war, als der Stamm Q3) und die Gemeinsamkeit dieser beiden Stämme in der *lwg1*-Mutation lag, wurde untersucht ob diese Mutation der Auslöser für die Sensibilität war. Durch Komplementationsstudien konnte *lwg1-1* als Grund für die Cadmium-Sensibilität ausgeschlossen werden. Da jedoch ebenfalls eine Mutation im *ERO1*-Gen vorliegen könnte (siehe 4.4 „Ein *ero1Δ*-Stamm kann durch die Disruption des *GSH1*-Gens am Leben gehalten werden“), wurde die Komplementation der Cadmium-Sensibilität durch eine *ero1Δ; gsh1Δ*-Mutante getestet. Durch die gezeigte Komplementation konnte eine Mutation im *ERO1*-Gen als Auslöser für die Cadmium-Sensibilität ausgeschlossen werden.

Gezeigt wurde zusätzlich, dass das plasmidgebundene Einschalten der GSH-Synthese im Stamm Q3 zu einer leichten Sensibilisierung gegenüber Cadmium führte, welche jedoch nicht das Niveau der Sensibilität des Stammes Q4 gegen Cadmium erreichte. Sollte dieser Unterschied in der Sensibilität nicht auf den Unterschied zwischen dem plasmid-gebundenem und dem genomischen Tragen des *GSH1*-Gens zurückgehen, lässt sich daraus schließen, dass eine weitere Mutation im Stamm Q4 zu der beobachteten Cadmium-Sensibilität führte. Ebenso war von einer weiteren Mutation im Stamm Q3 auszugehen, da dieser im Vergleich zum Eltern-Stamm Q2 (*gsh1Δ*) ebenfalls eine erhöhte Sensibilität gegen Cadmium aufwies (Ergebnis nicht gezeigt) und die zusätzlich enthaltene Mutation im *LWG1*-Gen als Auslöser ausgeschlossen wurde (siehe oben).

Cadmium schädigt die Zelle durch das Induzieren von oxidativem Stress (Brennan und Schiestl, 1996) und durch das Inhibieren der „Mismatch“-Reparatur (Jin et al., 2003). Da insbesondere GSH an dem Schutz der Zelle vor oxidativen Schäden beteiligt ist, erscheint eine Sensibilisierung gegen Cadmium aufgrund des Einschaltens der GSH-Synthese widersprüchlich. Für die Cadmium-induzierte Expression des *GSH1*-Gens wird jedoch ein funktionierendes Netzwerk der Regulation bei der Synthese von schwefelhaltigen Aminosäuren benötigt (Dormer et al., 2000). Da die Methionin-Auxotrophie des Stammes Q3 nicht sicher auf die fehlende GSH-Synthese zurückzuführen war (siehe 4.5 „Der Zusammenhang der Methionin-Auxotrophie einer *gsh1Δ; lwg1-1*-Doppelmutante mit dem GSH-Mangel“), konnte ebenso eine fehlerhafte Regulation der Methionin-Biosynthese vorliegen. Diese könnte wiederum ebenfalls das Ausbleiben einer erhöhten Cadmium-Resistenz des Stammes Q3 beim Tragen des plasmidgebundenen *GSH1*-Gens erklären, jedoch nicht die vorgefundene Sensibilisierung gegen Cadmium. Die Verstärkung der Sensibilität gegen Cadmium lässt sich somit nur durch eine weitere Mutation erklären. Mögliche Ansatzpunkte sind eine erhöhte Aufnahme von Cadmium in die Zelle durch z.B. eine mutierte Form des Zink-Transporters Zrt1, welcher für die Cadmium-Aufnahme zuständig ist (Gomes et al., 2002). Ebenso ist eine fehlerhafte Entgiftung durch den „yeast cadmium factor“ (Ycf1) denkbar, der Magnesium- und ATP-abhängig für den Transport von Cadmium, gebunden an GSH, in die Vakuole sorgt (Li et al., 1997).

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte das Plasmid pB6 isoliert werden, das die MNNG-Hyperresistenz einer *rng1-1*-Mutante komplementierte. Das komplementierende Gen dieses Plasmids konnte jedoch weder über 17 Subklone noch über Komplementationsanalysen identifiziert werden.

Die Sensibilität gegen „Congo red“ konnte als ein weiterer Phänotyp des Stammes Q2*rng1* bestimmt werden.

Es wurden im Zuge der Subklonierung des Plasmids pB6 pRS424-Derivate gefunden, die unabhängig vom genetischen Hintergrund des transformierten Stammes, heterogenes Wachstum verursachten. Zurückzuführen war dies auf die Überexpression des ORFs *YLR112w* alleine oder gemeinsam mit dem ORF *YLR111w*.

Neben der bereits beschriebenen MNNG-Hyperresistenz durch die Überexpression von *SNG1* in Wildtypen, GSH-Mutanten und Reparatur-defizienten Stämmen, konnte auch in dem bereits gegen MNNG hyperresistenten Stamm Q2*rng1* eine Steigerung der Resistenz durch *SNG1* gezeigt werden.

Des Weiteren wurden Anzeichen gefunden, dass die Methionin-Auxotrophie des Stammes Q3 auf die Disruption des *GSH1*-Gens zurückzuführen war.

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die funktionierende GSH-Synthese letal auf eine *ero1Δ*-Mutante wirkte.

Als Auslöser für die Cadmium-Sensibilität der Stämme Q3 und Q4 konnten die bekannten Mutationen dieser Stämme im *GSH1*- und im *LWG1*-Gen ausgeschlossen werden.

6 **Ausblick**

Zur Identifizierung von *RNG1* auf dem isolierten Plasmid müsste noch eine Komplementationsanalyse des Stammes *Q2rng1* mit einer *hog1*- und einer *ylr111w*-Disruptante durchgeführt werden. Zudem könnte das dem Passagier des Plasmid pB6 entsprechende Segment im Genom des Stammes *Q2rng1* sequenziert und durch einen Abgleich mit der Datenbank auf Mutationen hin untersucht werden. Sollte es sich dennoch als nicht möglich herausstellen, das gesuchte Gen auf dem Plasmid pB6 zu identifizieren, könnte über das funktionierende Selektionsverfahren weiter nach sensiblen Genbank-transformanten gesucht werden. Ebenso besteht die Möglichkeit mittels einer Transposon-basierenden Genbank eine neue Mutagenese in einer *gsh1*-Mutante zu starten und nach MNNG hyperresistenten Klonen zu suchen.

Zur Identifikation von *RNG2* könnte aus dem Stamm *Q2rng2* mit der dominanten Mutation *rng2-1* eine Genbank hergestellt werden, um nach der Transformation eine Positiv-Selektion nach hyperresistenten Transformanten durchzuführen.

Um sicherzustellen, ob das beobachtete verschlechterte Wachstum nach Transformation mit pRS424-Derivaten auf die Überexpression des ORFs *YLR112w* alleine oder zusammen mit dem ORF *YLR111w* zurückging, müsste der ORF *YLR112w* inklusive vollständigem Promotor in den Vektor pRS424 ligiert und die daraus entstehenden Transformanten auf verändertes Wachstum hin untersucht werden.

Die Identifikation der Mutation, die zur Cadmium-Sensibilität der Stämme Q3 und Q4 führte, könnte über die Klonierung mit Hilfe eine Genbank oder über Komplementationsanalysen mit Disruptanten, die eine Disruption in den Genen tragen, die in der Cadmium-Entgiftung eine Rolle spielen, durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

Akada R, Yamamoto J, Yamashita I (1997) Screening and identification of yeast sequences that cause growth inhibition when overexpressed. *Mol Gen Genet* 254: 267-274.

Aljazzar R (2002) Klonierung und Charakterisierung von MNNG-resistenten Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.

Bawa S, Xiao W (1997) A mutation in the *MSH5* gene results in alkylation tolerance. *Cancer Res* 57: 2715-2720.

Botstein D, Falco SC, Stewart S, Brannan M, Scherer S, Stinchcomb DT, Struhl K, Davis RW (1979) Sterile host strain (SHY): A eucaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* 8: 17-24.

Brennan RJ, Schiestl RH (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat Res* 356: 171-178.

Cherest H, Surdin-Kerjan Y (1992) Genetic analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: Updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics* 130: 51-58.

Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110: 119-122.

Chu S, Archer RH, Zengel JM, Lindahl L (1994) The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 659-663.

Cuozzo JW, Kaiser CA (1999) Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat Cell Biol* 1: 130-135.

Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C (1988) A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res* 16: 9878.

Deneke SM (2000) Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Reg* 36: 151-180.

Dormer UH, Westwater J, McLaren NF, Kent NA, Mellor J, Jamieson DJ (2000) Cadmium-inducible expression of the yeast *GSH1* gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. *J Biol Chem* 275; 32611-32616.

Elskens MT, Jaspers CJ, Penninckx MJ (1991) Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 137: 637-644.

Espinet C, de la Torre MA, Aldea M, Herrero E (1995) An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest. *Yeast* 11: 25-32.

Fox ME, Feldman BJ, Chu G (1994) A novel role for DNA photolyase: binding to DNA damaged by drugs is associated with enhanced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 8071-8077.

Frand AR, Kaiser CA (1998) The *ERO1* gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1: 161-170.

Fritz G, Dosch J, Thielmann HW, Kaina B (1993) Molecular and cellular characterization of Mex⁻ /methylation-resistant phenotype; Gene and cDNA cloning serum dependence, and tumor suppression of transfectant strains. *J Biol Chem* 268: 21102-21112.

Garcia-Rodriguez LJ, Duran A, Roncero C (2000) Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J Bacteriol* 182: 2428-2437.

Gietz D, St. Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20: 1425.

Gomes DS, Fragoso LC, Riger CJ, Panek AD, Eleutherio EC (2002) Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1573: 21-25.

Grant CM, MacIver FH, Dawes IW (1996) Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29: 511-515.

Grey M, Brendel M (1994) Overexpression of the *SNQ3/YAP1* gene confers hyper-resistance to nitrosoguanidine in *Saccharomyces cerevisiae* via a glutathione-independent mechanism. *Curr Genet* 25: 469-471.

Grey M, Brendel M (1995) Ten-Minute Electrotransformation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth in Mol Biol* 47: 269-272.

Grey M, Pich CT, Haase E, Brendel M (1995) *SNG1* – a new gene involved in nitrosoguanidine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 346: 207-214.

Hertle K, Haase E, Brendel M (1991) The *SNQ3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals. *Curr Genet* 19: 429-433.

Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4569-4574.

Jin YH, Clark AB, Slebos RJC, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, Resnick MA, Gordenin DA (2003) Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* 34: 326-329.

Kistler M, Summer KH, Eckard F (1986) Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 173: 117-120.

Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 26: 239-256.

Knippers R (2001) *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag, Stuttgart / New York.

Kopecka M, Gabriel M (1992) The influence of congo red on the cell wall and (1-3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 158: 115-126.

Lawley PD, Thatcher CJ (1970) Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. The influence of cellular thiol concentrations on the extent of methylation and the 6-oxygen atom of guanine as a site of methylation. *Biochem J* 116: 693-707.

Lee J, Spector D, Godon C, Labarre J, Toledano MB (1999) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J Biol Chem* 274: 4537-4544.

Li Z-S, Lu Y-P, Zhen R-G, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 42-47.

Liu H, Krizek J, Bretscher A (1992) Construction of a *GAL1*-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. *Genetics* 132: 665-673.

Madeo F, Fröhlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Fröhlich K-U (1999) Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145: 757-767.

Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.

Mohn G, de Kniiff P, Baars F (1983) Cellular glutathione content and sensitivity to alkyl-nitrosoguanidine-induced lethality and mutagenesis in *Escherichia coli* K12. *Mutat Res* 111: 25-31.

Mrsa V, Ecker M, Strahl-Bolsinger S, Nimtz M, Lehle L, Tanner W (1999) Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181:3076-3086.

Pochart P, Woltering D, Hollingsworth NM (1997) Conserved properties between functionally distinct MutS homologs in Yeast. *J Biol Chem* 272: 30345-30349.

Pollard MG, Travers KJ, Weissman JS (1998) Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1: 171-182.

Rose MD, Novick P, Thomas JH, Botstein D, Fink GR (1987) *Saccharomyces cerevisiae* plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* 60: 237-243.

Ruhland AR, Haase E, Siede W, Brendel M (1981) Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. *Mol Gen Genet* 181: 346-351.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schmidt M (1997) *Glutathion-abhängige Mutagen-Resistenzen in der Bäckerhefe*. Dissertation im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.

Schmidt M, Grey M, Brendel M (1996) A microbiological assay for the quantitative determination of glutathione. *BioTechniques* 21: 881-886.

Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27.

Spector D, Labarre J, Toledano MB (2001) A genetic investigation of the essential role of glutathione; Mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast. *J Biol Chem* 276: 7011-7016.

Stephen DWS, Jamieson DJ (1996) Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 141: 207-212.

Stevenson LF, Kennedy BK, Harlow E (2001) A large scale overexpression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies previously uncharacterized cell cycle genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3946-3951.

Stryer L (1999) *Biochemie*. Spektrum Akad Verlag, Heidelberg / Berlin / Oxford.

Süssmuth R, Lingens F (1969) Zum Wirkungsmechanismus von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG) bei der Mutationsauslösung; Beständigkeit des NNMG, Beziehungen zwischen Mutationsrate und Aufnahme des Mutagens durch die Zelle und Förderung der Methylierung durch Sulfhydrylgruppen in Abhängigkeit vom pH-Wert. *Z Naturforsch* 24b: 903-910.

Tong AHY, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Pagé N, Robinson M, Raghizadeh S, Hogue CWV, Bussey H, Andrews B, Tyers M, Boone C (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294: 2364-2368.

Tung WL, Chow KC (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trens Genet* 11: 126-129.

van Hoof A, Lennertz P, Parker R (2000) Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5,8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J* 19: 1357-1365.

Verhasselt P, Volckaert G (1997) Sequence analysis of a 37,6 kbp cosmid clone from the right arm of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII, carrying *YAP3*, *HOG1*, *SNR6*, tRNA-Arg3 and 23 new open reading frames, among which several homologies to proteins involved in cell division control and to mammalian growth factors and other animal proteins are found. *Yeast* 13:241-250.

Anhang

Plasmide

YCp50 (Rose et al., 1987)

Dieser Vektor ist ein „single copy“-Pendelvektor. Er liegt somit bis zur Replikation in der Hefezelle in nur einer Kopie vor. Er besitzt einen *E. coli*-ori und eine Hefe-*ARS1*-, sowie eine *CEN4*-Region. Die Selektion in *E. coli* erfolgt über das Ampicillin- und das Tetracyclin-Resistenzgen. Zur Selektion in *S. cerevisiae* enthält der Vektor das *URA3*-Gen.

Die Genbank zur Klonierung des *RNG1*-Gens basierte auf diesem Vektor.

YEp24 (Botstein et al., 1979)

Bei diesem Vektor handelt es sich um einen „multi copy“-Pendelvektor, der sowohl in *E. coli*, als auch in *S. cerevisiae* repliziert wird. Er liegt in 10 – 40-facher Kopienzahl in der Hefe vor. Die Selektion erfolgt in *E. coli* über ein Ampicillin- und ein Tetracyclin- Resistenzgen und in *S. cerevisiae* über das *URA3*-Gen.

pRS314 und pRS315 (Sikorski und Hieter, 1989)

Diese beiden Vektoren sind „single copy“-Pendelvektoren. Sie besitzen einen *E. coli*-ori und eine Hefe-*ARS1*- und eine *CEN4*-Region und liegen somit bis zur Replikation in der Hefezelle in nur einer Kopie vor. Die Selektion in *E. coli* erfolgt über ein Ampicillin-Resistenzgen, zur Selektion in *S. cerevisiae* enthält pRS314 das *TRP1*-Gen und pRS315 das *LEU2*-Gen. Beide Vektoren enthalten das aminoternale Ende der β -Galaktosidase und ermöglichen somit die Blau-Weiß-Selektion (siehe 2.2.11).

pRS424 (Christianson et al., 1992)

Bei diesem Vektor handelt es sich um einen „multi copy“-Pendelvektor mit einem *E. coli*-ori und dem Hefe-2 μ m-Replikationsstartpunkt. Er liegt somit in 10 – 40-facher Kopienzahl in der Hefe vor. Die Selektion in *E. coli* erfolgt über ein Ampicillin-Resistenzgen, die Selektion in *S. cerevisiae* über das *TRP1*-Gen. Zur Blau-Weiß-Selektion (siehe 2.2.11) ist das aminoternale Ende der β -Galaktosidase enthalten.

pEH705 (Grey et al., 1995)

pEH705 basiert auf dem Vektor YEp24. Er enthält als Passagier das *SNG1*-Gen, welches überexprimiert in *S. cerevisiae* zu einer Hyperresistenz gegen MNNG führt.

pMG132

Dieses *GSH1*-Disruptionsplasmid enthält das *GSH1*-Gen, welches mittels einer Restriktionsendonuklease so entfernt wurde, dass flankierende Sequenzen erhalten blieben. Zwischen diese flankierenden Bereiche wurde mittels einer Ligase das *URA3*-Markergen eingefügt. Zur Disruption des *GSH1*-Gens wurde das Plasmid so linearisiert, dass sich die flankierenden Sequenzen an den Enden des DNA-Stranges befanden.

pMG139

pMG139 basiert auf dem Vektor pRS315. Er enthält als Passagier das *GSH1*-Gen.

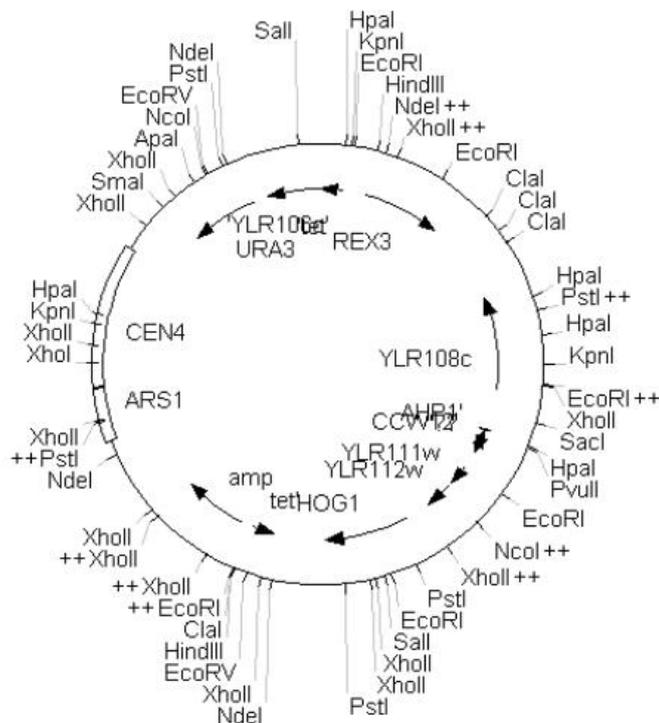
Derivate des Plasmids pB6

Abbildung I: Restriktionskarte des Plasmids pB6-PvuIIΔ.

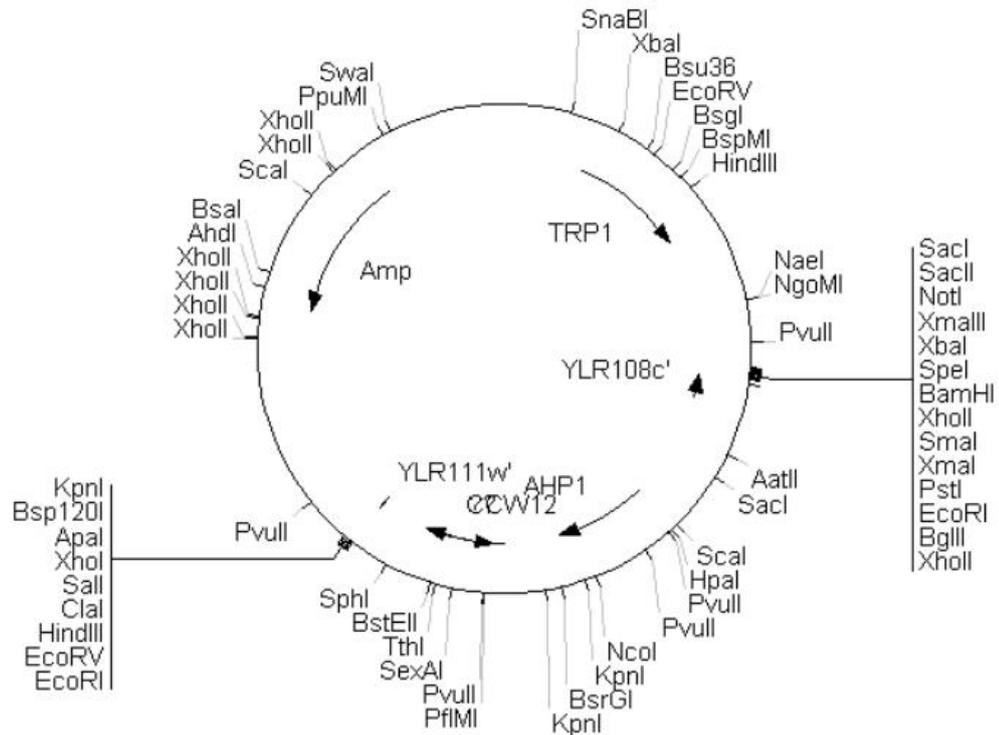


Abbildung II: Restriktionskarte des Plasmids pB6-A.

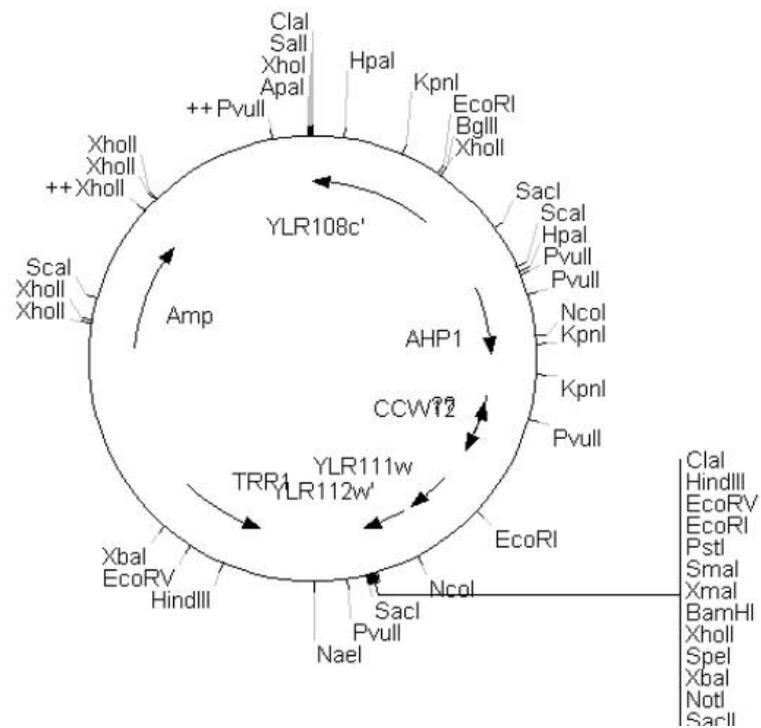


Abbildung III: Restriktionskarte des Plasmids pB6-D.

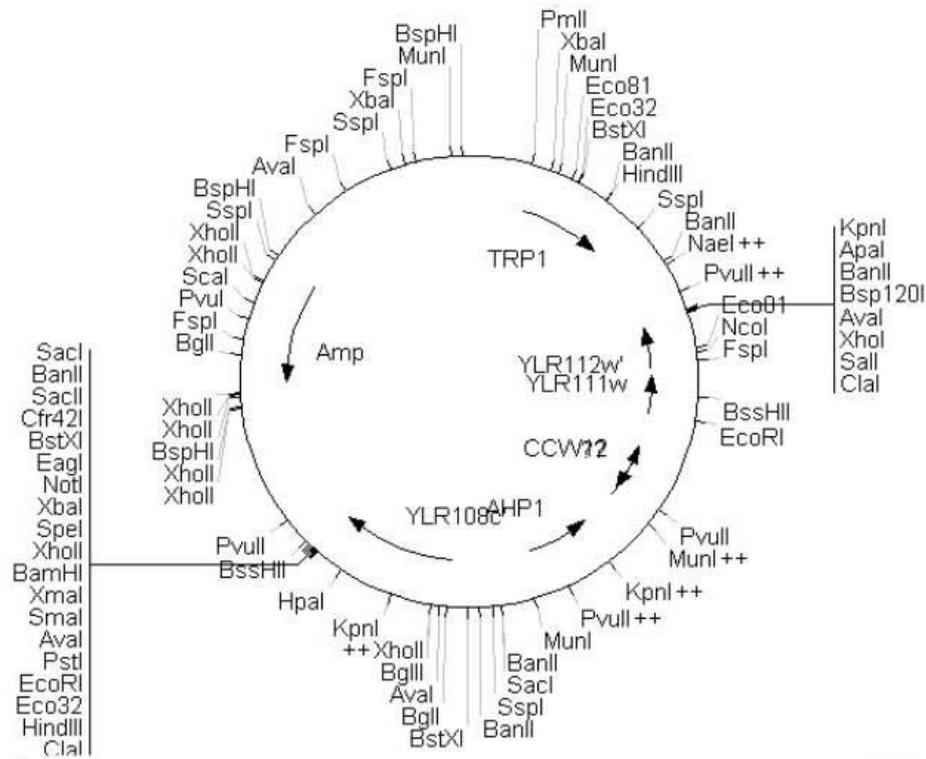


Abbildung VIII: Restriktionskarte des Plasmids pB6-K.

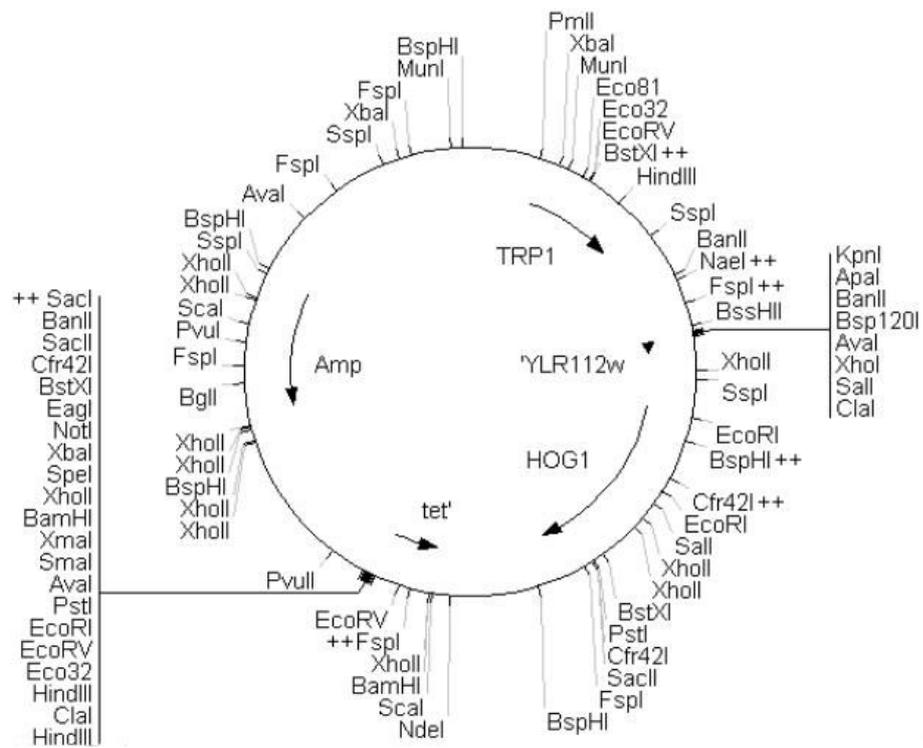


Abbildung XI: Restriktionskarte des Plasmids pB6-L.

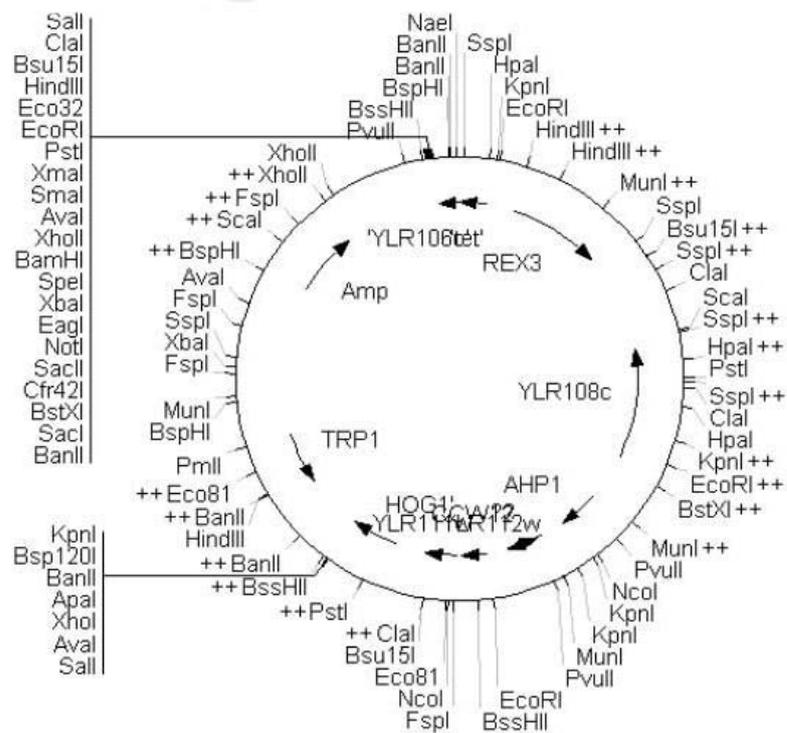


Abbildung X: Restriktionskarte des Plasmids pB6-M.

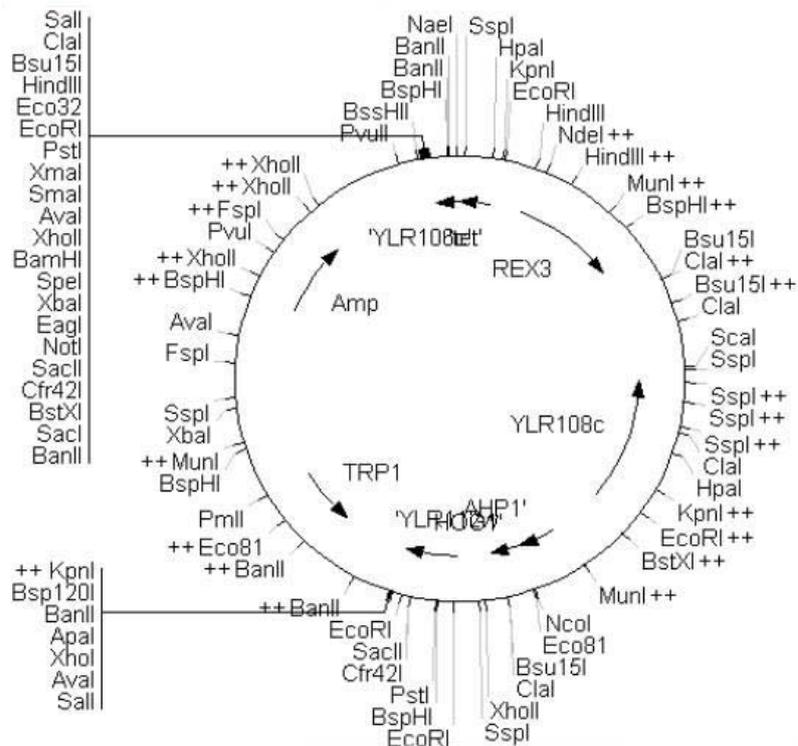


Abbildung XI: Restriktionskarte des Plasmids pB6-N.

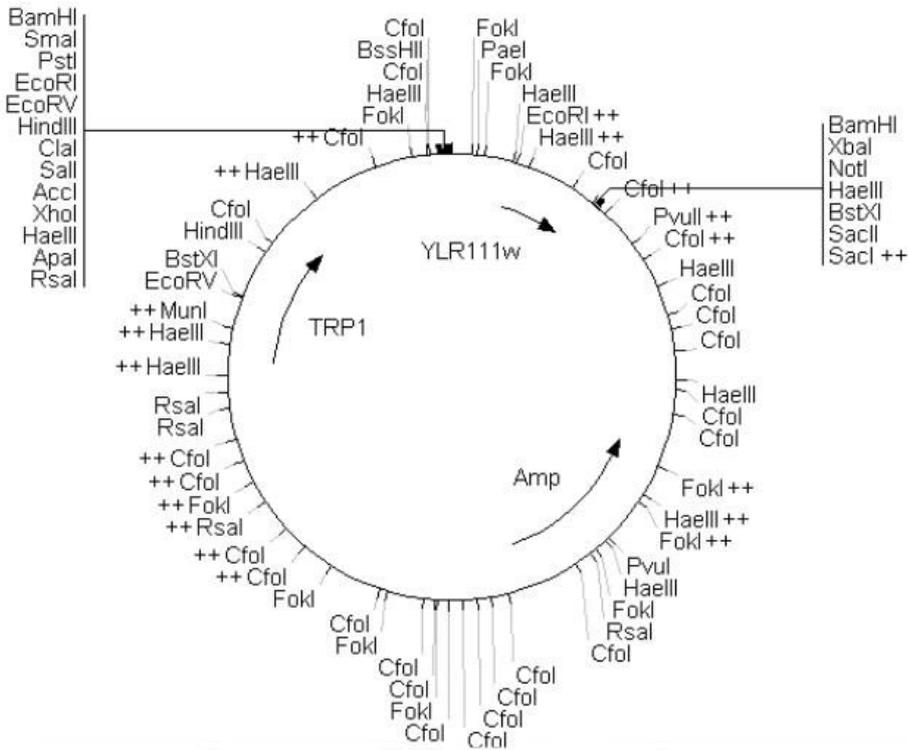


Abbildung XIV: Restriktionskarte des Plasmids pB6-Q.

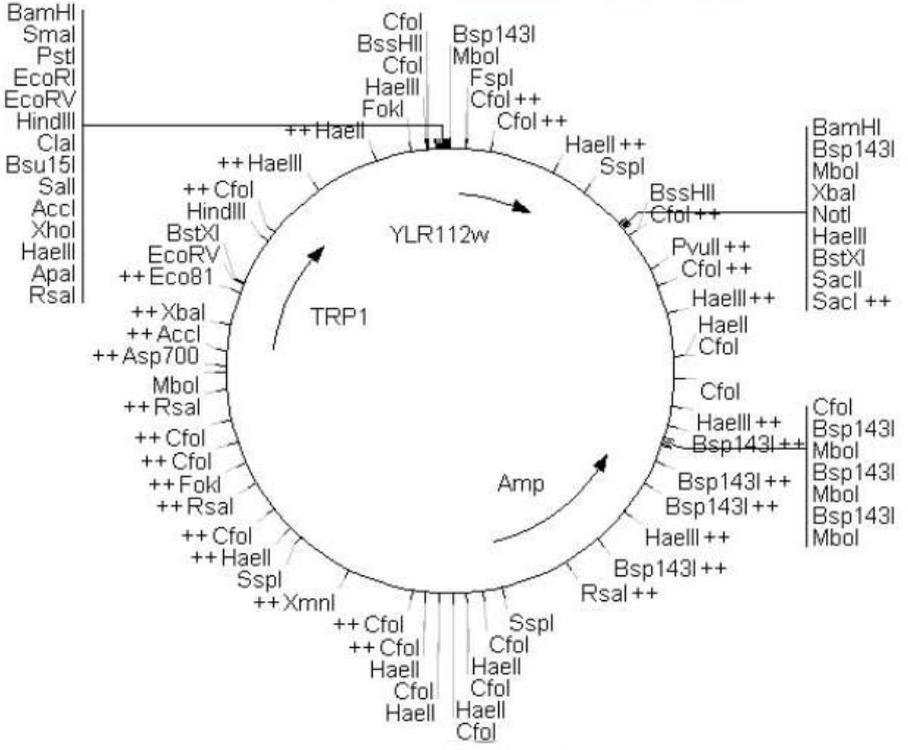


Abbildung XV: Restriktionskarte des Plasmids pB6-R.

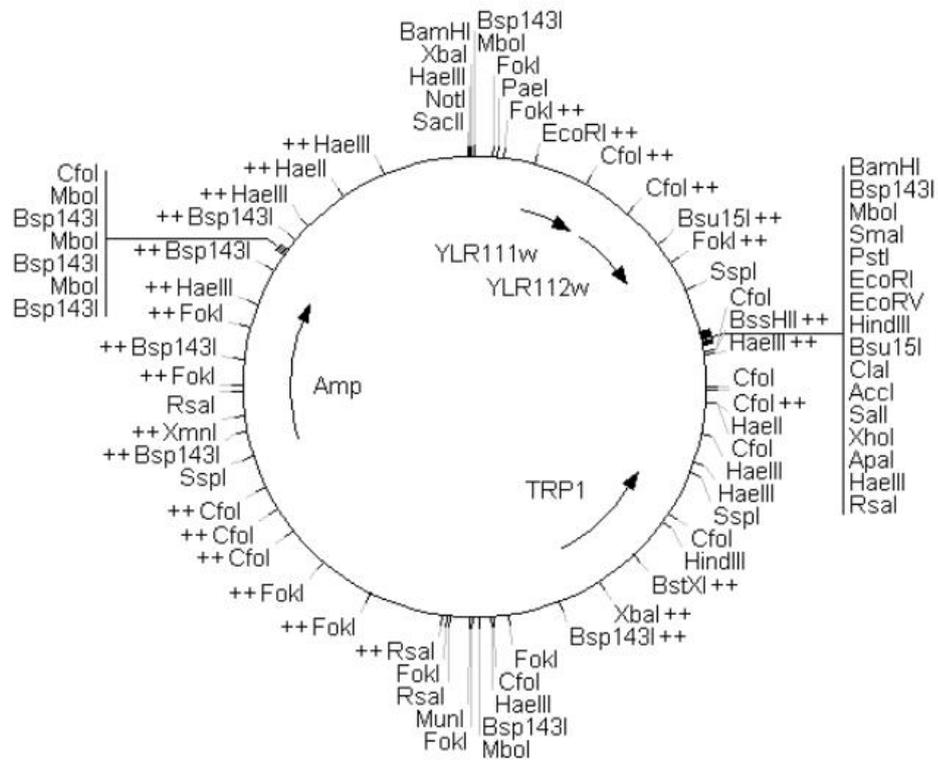


Abbildung XVI: Restriktionskarte des Plasmids pB6-S.

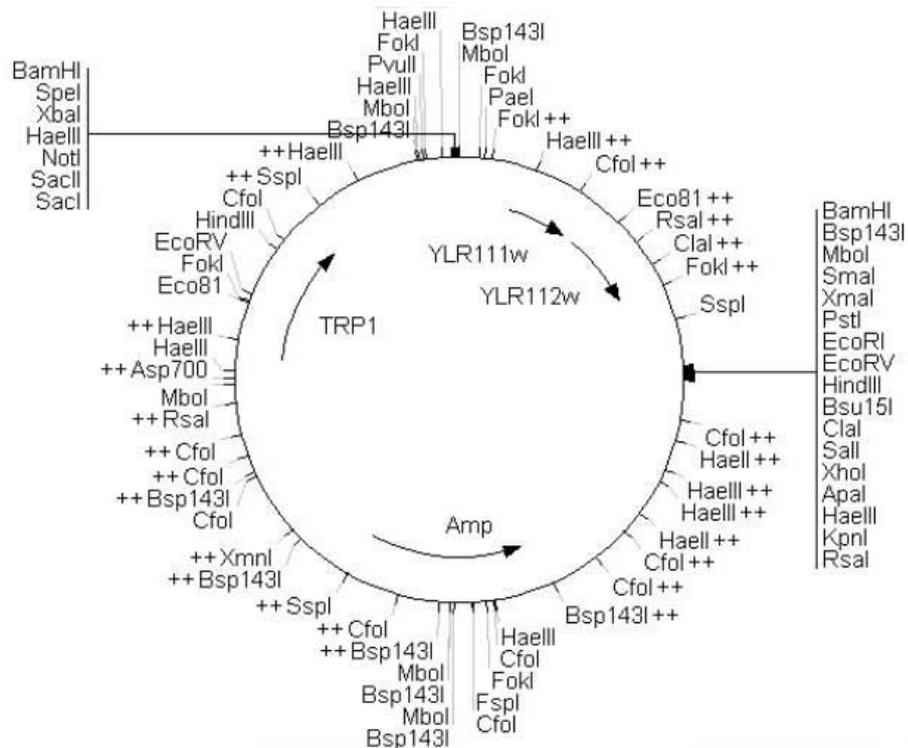


Abbildung XVII: Restriktionskarte des Plasmids pB6-T.

Sequenz des Bereichs zwischen den ORFs *YLR111w* und *YLR112w*

ATAGCATGAAGTATCCGCACACCGCAGCGTTAGTGAGGT**G**AGGGTGGCA
 GCAAGCTAATTCCCGCATCTGGAATCTGAACTGCCCTTTTGGACTAACCG
 TGTGGTTCATGGGTGGGCGAAGTGCGCAACCTGAAGGTTTTCTTTTGCCT
 GTCGGATTTTACATCCGGCGGTAGCGCATGATGCCATGGCTGGCTCCAGA
 TACATCCTCAGGGCACCGCATCTATAATTAGATTGGCGCAACATGGCTGG
 CTGCACTGCTGTCTTCACTTCTTTCTTTTTCCGGCAATGAATGATGTATGTT
 TTGTGGCAAAGGGTCCGCATTGTACCTGTTTACAGTTGAGATTATCGTTT
 TTGGTAGCCCTTCATTACGGCATAACGTATTAAGTTTCTTTTATTTGCTTT
 GCCCTGGTTTAAAAGACAATGTCGATTAAGTTAATTTTAATCGATTGAAG
 GAAATAAGAGGAATAGCGCAAGTTG

Ergebnisse der Tetradenanalysen

Tabelle I: Sporen des Diplonten DB5460

Spore (DB5460-)	Wachstum auf					cfa	„Mating type“
	SynCo - His+GSH	SynCo - Trp+GSH	SynCo -Met	SynCo - Ade+GSH	YEPG		
1A	-	+	-	-	+/-	+	
2A	-	-	-	-	+	+	a
3A	-	+	-	+	+	-	
4A	-	+	-	-	+/-	+	
5A	-	+	-	+	-	-	
6A	-	+	-	+	+	-	
7A	+	-	-	-	-	+	
8A	+	-	-	-	-	+	
9A	-	-	-	-	-	-	
11C	+	-	-	-	+	-	
12A	-	-	-	-	-	+	α
13A	-	+	-	-	+	-	
13B	-	-	-	-	+	-	
14A	+	+	-	-	+	+	α
16A	+	+	-	-	+	+	a
16B	-	+	-	+	+	-	
18A	+	-	-	-	+	-	
19A	+	+	-	-	+	-	
20A	-	-	-	+	+	+	α

21A	-	+	-	+	+	+	a
22B	-	-	-	-	+	-	
22C	-	+	-	+	+	+	a
23B	-	-	-	-	+	+	a
24A	+	+	-	-	+	+	a
25A	-	+	-	-	+	+	α
26A	+	+	-	-	+	-	
26B	-	+	-	+	+	+	a
27A	+	-	-	-	+	-	
27B	-	+	-	+	+	+	a
28A	+	-	-	-	+	+	α
28B	-	+	-	-	+	-	
29A	+	-	-	-	+	+	α
30A	+	-	-	-	+	+	a
30C	-	+	-	+	+	+	α
31A	+	+	-	+	+	-	
31B	-	-	-	-	+	-	

Tabelle II: Sporen des Diploenten Y26531'

Spore (Y26531'-)	Wachstum auf						„Mating type“
	SynCo - Ura+GSH	SynCo - Lys+GSH	SynCo -Met	YPD +Genitacin	YEPG	cfa	
2B	-	-	+	-	+	+	a
4A	-	-	+	-	+	+	α
5A	-	-	-	-	+	+	
5B	-	-	-	-	+	+	α
8A	+	+	-	-	-	-	a
9A	+	+	-	-	-	-	
10A	-	-	+	-	+	+	α
11A	+	-	-	-	-	-	a
11B	+	+	-	-	-	-	α
12B	-	+	+	-	+	+	α
13A	+	-	-	-	-	-	α
14A	+	-	-	-	-	-	α
14B	+	-	-	-	-	-	α
15A	+	+	-	-	-	-	α
16A	-	+	+	-	+	+	
16B	-	+	-	-	+	+	

16C	+	-	-	-	-	-	α
17A	-	+	+	-	+	+	
18A	+	+	-	-	-	-	
18C	+	-	-	-	-	-	a
20A	-	-	+	-	+	+	α
21A	-	+	+	-	+	+	a
21B	-	-	-	-	+	+	α
22A	-	-	-	-	+	+	α
22B	+	-	-	-	-	-	a
23A	-	+	+	-	+	+	a
24A	+	-	-	-	-	-	
25A	-	-	+	-	+	+	a
25B	+	+	-	-	-	-	α
26A	-	+	+	-	+	+	a
27A	+	+	-	-	-	-	α
27B	+	-	-	-	-	-	a
28A	-	+	+	-	+	+	α
28B	+	+	-	-	-	-	α
29A	+	-	-	-	-	-	α
30A	-	+	-	-	+	+	α
30B	-	+	+	-	+	+	a
31A	+			-			
31B	+	-		+	-	-	α
32A	+			-			
32B	+			-			
33B	+			-			
34A	+			-			
34B	-			-			
34C	+			-			
36A	+			-			
36B	+			-	+	-	α
37A	-			-			
37B	+			-			
38A	+			-			
38B	+			-			
39A	-			-			
39B	+			-			
39C	+	+		+	-	-	α
40B	+	-		+	-	-	α

40C	+	+		+	-	-	α
41A	-			-			a
42A	+			-			
43A	-			-			
43B	-			-			
43C	+			+	-	-	a

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit wurde am Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles für die fachliche Betreuung und vielfältige Unterstützung sowie für die Möglichkeit zur selbstständigen Bearbeitung des Themas im ehemaligen Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Martin Brendel.

Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. Jörg Soppa für das Erstellen des Zweitgutachtens der vorliegenden Diplomarbeit.

Herrn Dr. Martin Grey danke ich für die Betreuung meiner Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe, für seine große Geduld, Hilfsbereitschaft und ständige Diskussionsbereitschaft in fachlichen Fragen.

Bei Martin Strauß möchte ich mich für seine fruchtbaren Ratschläge, seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und für die kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Den technischen Assistentinnen Frau Maria Niesen und Frau Maria Markovic danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag, speziell Frau Maria Niesen für die Durchführung der Mikromanipulation.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern ohne deren Unterstützung, nicht nur in finanzieller Hinsicht, und Verständnis mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke außerdem meinem Bruder Dennis, der mir insbesondere beim Layout meiner Diplomarbeit eine große Hilfe war.

Auch meiner langjährigen Freundin Annette Dorn möchte ich für die tatkräftige Unterstützung, die unermüdliche Geduld, den unerschütterlichen Glauben an mich und die unendliche Hilfsbereitschaft ganz herzlich danken.

Nicht mit Dank vergessen möchte ich auch meine Kommilitonen, insbesondere Carolin Fischer, Carolin Güthlein, Eva Kestner, Holger Both, Matthias Kehm und Susanne Hauptmann. Ohne sie hätte das Studium einiges an Spaß, Ablenkung und Motivation verloren.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für Probleme aller Art hatten und mich immer wieder zum Lachen gebracht haben und auf diesem Weg zum Gelingen meines Studiums beigetragen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Diplomarbeit
selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen
Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt am Main, den 10.11.2003

Daniel Börgel