

# **Der Zusammenhang zwischen Aneuploidie und Alterung im Modellsystem Hefe**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
**Markus Langen**  
aus Attendorn

Düsseldorf, November 2011

Aus dem Institut für Mikrobiologie,  
Lehrstuhl für funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. U. Fleig  
Koreferent: Prof. Dr. J. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung:

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>12</b>
<b>Summary .....</b>	<b>14</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Die Auswirkungen von Aneuploidie auf den Menschen.....</b>	<b>17</b>
1.1.1 Aneuploidie-Syndrome .....	17
1.1.2 Neurodegenerative Erkrankungen .....	19
1.1.3 Krebserkrankungen .....	20
<b>1.2 Die Zunahme von Aneuploidie im Alter .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Alterung als Folge von Aneuploidie .....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Alterung als Folge von Aneuploidie in <i>S. cerevisiae</i> .....	26
<b>1.4 Der Chromosomenzyklus und die Entstehung von Aneuploidie am Beispiel der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>28</b>
1.4.1 Der Chromosomenzyklus .....	29
1.4.2 Die Entstehung von Aneuploidie durch Fehler im Chromosomenzyklus .....	31
<b>1.5 Die Hefe als Modellsystem für Alterung .....</b>	<b>34</b>
1.5.1 Replikative Alterung.....	35
1.5.2 Chronologische Alterung .....	36
1.5.3 Replikative und chronologische Alterung im Vergleich.....	37
<b>1.6 Werkzeuge zur Aufklärung des Zusammenhangs von Aneuploidie und Alterung in <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i> .....</b>	<b>39</b>
1.6.1 Artificielle Hefechromosomen (YACs) als zusätzliche exogene Chromosomen in <i>S. cerevisiae</i> .....	39
1.6.2 Ein Minichromosom als zusätzliches endogenes Chromosom in <i>S. pombe</i> .....	40
<b>1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>42</b>

---

<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>43</b>
<b>2.1 Chemikalien.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 Geräte .....</b>	<b>44</b>
<b>2.3 Antikörper.....</b>	<b>44</b>
<b>2.4 Enzyme .....</b>	<b>44</b>
<b>2.5 Kits .....</b>	<b>45</b>
<b>2.6 Sonstige Materialien .....</b>	<b>45</b>
<b>2.7 Stämme.....</b>	<b>45</b>
2.7.1 <i>S. pombe</i> Stämme.....	45
2.7.1.1 Ausgangsstämme.....	45
2.7.1.2 Hergestellte Stämme .....	45
2.7.2 <i>S. cerevisiae</i> Stämme.....	47
2.7.2.1 Ausgangsstämme.....	47
2.7.2.2 Hergestellte Stämme .....	47
<b>2.8 Plasmide .....</b>	<b>49</b>
<b>2.9 Synthetische Oligonukleotide .....</b>	<b>49</b>
<b>2.10 Medien und Wachstumsbedingungen .....</b>	<b>53</b>
2.10.1 <i>S. pombe</i> .....	53
2.10.2 <i>S. cerevisiae</i> .....	56
2.10.3 Serielle Tropftestanalysen .....	57
<b>2.11 DNA Grundtechniken.....</b>	<b>58</b>
2.11.1 Präparation von Nukleinsäuren.....	58
2.11.2 DNA Fällung .....	58
2.11.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	59
2.11.3.1 <i>Taq</i> -DNA-Polymerase PCR .....	59
2.11.3.2 „PCR auf Zellen“ .....	59
2.11.3.3 <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase PCR .....	60
<b>2.12 Hefemethoden .....</b>	<b>60</b>
2.12.1 Isolation genomischer <i>S. pombe</i> DNA für die Pulsfeldgelelektrophorese.....	60
2.12.2 Isolation genomischer <i>S. cerevisiae</i> DNA für die Pulsfeldgelelektrophorese.....	62
2.12.3 Auftrennung von Chromosomen mittels Pulsfeldgelelektrophorese .....	63
2.12.4 Southern Blot Analyse .....	65

2.12.5	Transformation .....	68
2.12.5.1	Transformation von <i>S. pombe</i> .....	68
2.12.5.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	69
2.12.6	Homologe Rekombination .....	70
2.12.6.1	Deletion großer chromosomaler Bereiche in <i>S. pombe</i> .....	70
2.12.6.2	Hetero- und homozygote Deletion von ORFs in <i>S. cerevisiae</i> .....	71
2.12.7	Paarung von <i>S. pombe</i> Stämmen.....	72
2.12.7.1	„Random spore“ Analyse .....	73
2.12.7.2	Tetradenanalyse.....	73
2.12.7.3	Genotypbestimmung .....	74
2.12.8	Paarung von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen.....	74
2.12.8.1	Paarungstypwechsel .....	74
2.12.8.2	Kreuzung, Sporulation und Tetradenanalyse .....	75
<b>2.13</b>	<b>Alterungsexperimente .....</b>	<b>76</b>
2.13.1	Bestimmung der chronologischen Lebensspanne von <i>S. pombe</i> .....	76
2.13.2	Bestimmung der replikativen Lebensspanne von <i>S. cerevisiae</i> .....	78
2.13.3	Isolation replikativ gealterter Hefezellen mittels Biotinylierung und paramagnetischer Sortierung .....	79
<b>2.14</b>	<b>Bestimmung chromosomaler Stabilität.....</b>	<b>82</b>
2.14.1	Bestimmung der chromosomalen Stabilität mit Hilfe des YAC ( <i>ade2-101/SUP11</i> )-Systems .....	82
2.14.2	Bestimmung der Verlustrate des endogenen Chr. III (Quantitativer Paarungsversuch) .....	83
<b>2.15</b>	<b>Mikroskopie.....</b>	<b>85</b>
2.15.1	Untersuchung der Sortierungseffizienz von biotinylierten Zellen.....	85
2.15.2	Calcofluor Weiß Färbung von Knospungsnarben .....	85
2.15.3	Immunofluoreszenz .....	86
<b>2.16</b>	<b>Signifikanztests.....</b>	<b>86</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>87</b>
<b>3.1</b>	<b>Der Zusammenhang zwischen replikativer Alterung und Chromosomeninstabilität in <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>87</b>
3.1.1	Nachweis der Isolation alter Mutterzellen mittels Biotinylierungs- und Knospungsnarben-Analyse.....	89

---

3.1.2	Replikatives Altern führt zu einer linearen Abnahme in der Genauigkeit der Chromosomenweitergabe.....	91
3.1.3	Der Einfluss einzelner Prozesse des Chromosomenzyklus auf den Anstieg der Chromosomeninstabilität mit dem replikativen Alter.....	93
3.1.3.1	Der Spindelkontrollpunkt .....	94
3.1.3.2	Das Kinetochor.....	97
3.1.3.3	Die Verknüpfung der mitotischen Spindel mit dem Kinetochor.....	99
3.1.3.4	Die Kohäsion.....	101
3.1.3.5	Der Spindelpolkkörper.....	102
3.1.3.6	Die Chromosomenreplikation .....	103
3.1.4	Verlust des endogenen Chromosoms III bei Mutanten im Vergleich zum Wildtyp .....	105
3.1.5	Es besteht eine Korrelation zwischen replikativer Lebensspanne und dem Auftreten von Chromosomeninstabilität.....	107
3.1.6	Die Fehlfunktion einzelner Komponenten des Chromosomenzyklus erklärt nicht vollständig die Ursache der unpräzisen Chromosomenweitergabe mit dem Alter .....	109
<b>3.2</b>	<b>Die Auswirkungen exogener Chromosomen auf die replikative Alterung von <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>111</b>
3.2.1	Die Anwesenheit eines bestimmten YACs verkürzt die RLS haploider <i>S. cerevisiae</i> Zellen um 30 % und verringert die Stressresistenz.....	111
3.2.2	Die Anwesenheit eines YACs verkürzt nicht die RLS eines diploiden Hefestamms .....	112
3.2.3	Die Anwesenheit von zwei YACs hat keinen Einfluss auf die RLS diploider <i>S. cerevisiae</i> Zellen .....	113
3.2.4	Die Expression des YAC-Markergens <i>SUP11</i> verringert die Stressresistenz und RLS.....	115
3.2.6	Die Expression des <i>ochre</i> -Suppressorgens <i>SUP11</i> verringert Stressresistenz und RLS unabhängig von Adeninprototrophie .....	119
3.2.7	Der Einfluss der Expression von <i>SUP11</i> auf die RLS haploider Zellen mit wildtypischem <i>ADE2</i> Gen .....	121
<b>3.3</b>	<b>Der Einfluss eines endogenen Minichromosoms auf die Alterung von <i>S. pombe</i>.....</b>	<b>123</b>
3.3.1	Das endogene Minichromosom Ch16 verursacht erhöhte Stresssensitivität....	123
3.3.2	Die Anwesenheit von Ch16 beeinflusst nicht die Genauigkeit der Chromosom I Segregation.....	124

3.3.3	Die Präsenz des Minichromosoms Ch16 verlängert die chronologische Lebensspanne.....	125
3.3.4	Ein spezifischer Bereich von Ch16 vermittelt die Lebensverlängerung .....	128
3.3.4.1	Verkürzte Minichromosomvarianten verursachen erhöhte Stresssensitivität .....	129
3.3.4.2	Der chromosomale Bereich für ein längeres Leben ist auf dem rechten Arm des Minichromosoms Ch16 lokalisiert .....	130
3.3.4.3	Eingrenzung des lebensverlängernden Bereichs mit Hilfe neuer Minichromosomvarianten.....	131
3.3.4.3.1	Adeninauxotrophie hat keinen Einfluss auf die CLS .....	133
3.3.4.3.2	Die Expression der zweiten Kopie des Spindelkontrollpunktgens <i>bub1</i> <sup>+</sup> verlängert nicht die CLS.....	133
3.3.4.3.3	Verkürzungen des Minichromosoms um 16 und 33 Kbp beeinflussen nicht die CLS .....	134
3.3.4.3.4	Der Bereich, dessen Anwesenheit die CLS verlängert, befindet sich in einem Chromosomenabschnitt von 106 Kbp.....	135
3.3.4.3.5	Eingrenzung des lebensverlängernden Bereichs auf 27 Kbp.....	137
3.3.4.3.6	Ein Bereich mit drei Genen hat einen Effekt auf die Verlängerung der CLS ..	138
3.3.4.3.7	Der <i>cig1</i> <sup>+</sup> ORF vermittelt Langlebigkeit.....	140
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>142</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Anstieg von Aneuploidie mit zunehmendem Alter in <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>142</b>
4.1.1	Ein Testsystem zur Überprüfung der Aneuploidie in alternden Zellen.....	142
4.1.2	Die Chromosomeninstabilität nimmt mit dem replikativen Alter der Hefezelle linear zu.....	143
4.1.3	Chromosomenverlust ist die Hauptursache für Aneuploidie und ihre Zunahme im Alter.....	145
4.1.4	Mehrere Prozesse im Zellzyklus sind für die Zunahme von Aneuploidie mit dem replikativen Alter verantwortlich .....	147
4.1.4.1	Die Auswirkungen heterozygoter Deletionen von Genen des Chromosomenzyklus .....	148
4.1.4.2	Die Auswirkungen homozygoter Deletionen von Genen des Chromosomenzyklus .....	149
4.1.4.3	Chromosomenfehlverteilungen in Deletionsmutanten.....	150
<b>4.2</b>	<b>Der Einfluss exogener Chromosomen (YAC) auf die replikative Lebensspanne von <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>152</b>

---

4.2.1	Die Expression von <i>SUP11</i> auf dem YAC verkürzt die RLS und erhöht die Stresssensitivität eines haploiden Hefestamms .....	152
4.2.2	Warum beeinflusst die Expression von <i>SUP11</i> die RLS und Stresssensitivität haploider, nicht jedoch diploider Zellen? .....	154
4.2.3	Die Anwesenheit bestimmter YACs <i>per se</i> hat keinen Einfluss auf die RLS oder Stresssensitivität .....	155
<b>4.3</b>	<b>Ein endogenes Minichromosom verlängert die chronologische Lebensspanne in <i>S. pombe</i> .....</b>	<b>158</b>
4.3.1	Aneuploidie als Überlebensvorteil? .....	159
4.3.2	Die mögliche Rolle von <i>cig1</i> <sup>+</sup> bei der Verlängerung der CLS .....	160
4.3.3	Mehrere Gene auf Ch16 oder epigenetische Faktoren vermitteln eine Verlängerung der CLS .....	162
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>165</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>179</b>
6.1	Zusätzliche Abbildungen und Tabellen .....	179
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	182
6.3	Tabellenverzeichnis .....	185
	Danksagung .....	186
	Erklärung .....	187

---

## Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletion
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
ble	Phleomycin
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
ca.	circa
CF	Chromosomenfragment
CFU	Kolonien bildende Einheiten („ <u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nits“)
Ch16	Minichromosom Ch16
CHEF	„ <u>C</u> lamped <u>H</u> omogeneous <u>E</u> lectrical <u>F</u> ield“
Chr.	Chromosom
CL	Chromosomenverlust („ <u>C</u> hromosome <u>L</u> oss“)
CLS	chronologische Lebensspanne
d	Tag
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
d.h.	das heißt
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMM	Edinburgh Minimalmedium ( <i>S. pombe</i> )
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid

---

g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	Guanosin
G	Generation
G1	Gap 1-Phase des Zellzyklus
G2	Gap 2-Phase des Zellzyklus
G418	Geneticin-Disulfat
GFP	„ <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein“
h	Stunde/n
His	Histidin
i. d. R.	in der Regel
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
Kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
LMP	niedrig-schmelzend („ <u>L</u> ow <u>M</u> elting <u>P</u> oint“)
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung („ <u>M</u> agnetic <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting“)
mal	„ <u>m</u> inichromosome <u>a</u> ltered <u>l</u> oss“
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
M-Phase	Teilungsphase
n	Anzahl
ND	Chromosomenfehlverteilung („ <u>N</u> on- <u>D</u> isjunction“)
ng	Nanogramm

---

nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offenes Leseraster („ <u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>E</u> rame“)
PBS	physiologischer Phosphatpuffer ( <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
R	Resistenz
RLS	replikative Lebensspanne
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute)
RT	Raumtemperatur
s. o.	siehe oben
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SD	Minimalmedium ( <i>S. cerevisiae</i> )
Sek.	Sekunde/n
sog.	sogenannt
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SPK	Spindel-Pol-Körper
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBZ	Thiabendazol
U	„unit/s“
ü/N	über Nacht
Ura	Uracil
UV-Licht	ultraviolette Licht
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
YAC	artifizielles Hefechromosom ( <u>Y</u> east <u>A</u> rtificial <u>C</u> hromosome)
YE5S	Vollmedium ( <i>S. pombe</i> )
YPD	Vollmedium ( <i>S. cerevisiae</i> )
z. B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Die Genauigkeit der Chromosomenweitergabe an die Folgezelle ist für das Überleben einer Zelle/eines Organismus essentiell und wird durch die präzise Regulation komplexer Prozesse des Chromosomenzyklus gewährleistet. Fehler bei der Duplikation und der Segregation genetischen Materials in proliferierenden Zellen führen häufig zu Aneuploidie, dem Zugewinn oder Verlust ganzer Chromosomen. Eine nachteilige Auswirkung von Aneuploidie wurde in zahlreichen Studien belegt: Sie wird mit einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Krebsarten wie dem Gebärmutterhalskrebs in Verbindung gebracht. Aneuploide Zellen wurden ebenfalls vermehrt in den Organen alter Organismen nachgewiesen. Durch Aneuploidie kann zudem auf bisher nicht verstandene Weise der Alterungsprozess, beispielsweise bei der Trisomie 21, beschleunigt werden. Trotz des offensichtlichen Zusammenhangs von Alterung und Aneuploidie existierte bislang kein System, mit dem direkt der Anstieg von Fehlern in der Chromosomenweitergabe in alternden Zellen gezeigt werden konnte.

Ich habe ein System entwickelt, mit dem der Verlust eines artifiziellen Chromosoms (YAC) in einem diploiden *S. cerevisiae* Hefestamm mit Hilfe eines YAC-kodierten Testsystems durch Änderung der Koloniefarbe sichtbar gemacht werden kann. Hefen wurden nach ihrem replikativen Alter, das die Anzahl durchgeführter Zellteilungen beschreibt, sortiert und das Segregationsverhalten des YACs in diesen Zellen analysiert. 5 von  $10^4$  jungen Zellen mit einem Alter von 1-3 Teilungen zeigten einen Fehler bei der Weitergabe des YACs. Bei sehr alten Zellen war dieser Wert um den Faktor 4 erhöht. Die Zunahme von Aneuploidie mit steigendem Alter war linear. Es gelang erstmals *in vivo* nachzuweisen, dass ein linearer Anstieg von Fehlern bei der Chromosomenweitergabe Aneuploidie im Alter verursacht.

Als nächstes wurde untersucht, ob der Anstieg von Aneuploidie mit dem Alter auf den Funktionsverlust eines Prozesses im Chromosomenzyklus zurückzuführen ist. Dazu wurden mehrere diploide Hefestämme generiert, in denen jeweils ein Gen hetero- und/oder homozygot deletiert wurde, dessen Genprodukt eine Funktion in der Replikation, Kohäsion, dem Spindelaufbau, der Kinetochor-Mikrotubulusverknüpfung oder dem Spindelkontrollpunkt innehat. Mit dem YAC-System wurde gezeigt, dass in den homozygot deletierten Stämmen eine um den Faktor 8 bis 28 erhöhte Aneuploidie gegenüber dem Wildtyp auftrat, am stärksten betroffen war der Stamm ohne das Mikrotubulus-bindende Protein Bim1. Der relative lineare Anstieg der Chromosomeninstabilität mit dem Alter unterschied sich jedoch in den generierten Stämmen nicht vom Wildtyp. Das deutet darauf hin, dass die Fehlfunktion eines einzelnen Prozesses diesen Anstieg nicht auslöst.

Im zweiten Teil meiner Arbeit bin ich der Frage nachgegangen, ob die Anwesenheit eines zusätzlichen Chromosoms verkürzend auf die replikative Lebensspanne einer Hefezelle wirkt. Hierbei zeigte sich, dass die Anwesenheit eines YACs, das zu 97 % aus Human-DNA besteht, keinen negativen Einfluss auf die replikative Lebensspanne ausübt. Somit wirkt sich eine Erhöhung der Chromosomenzahl um bis zu 6 % nicht *per se* nachteilig auf die Lebensspanne aus. Allerdings konnte ich zeigen, dass bei Anwesenheit eines bestimmten Gens auf dem YAC, nämlich dem tRNA<sub>TYR</sub> kodierenden Gen *SUP11*, die replikative Lebensspanne haploider, nicht jedoch diploider Hefezellen um 30 % reduziert wird. Ein durch ein YAC vermittelter Gendosiseffekt kann demnach die replikative Lebensspanne verkürzen.

In diesem Zusammenhang wurde in der Spaltheefe *S. pombe* der Effekt eines zusätzlichen Chromosoms mit 165 *S. pombe* Genen auf die Lebensspanne untersucht. Es stellte sich überraschenderweise heraus, dass durch dieses Chromosom die chronologische Lebensspanne, die das Überleben in einer sich nicht teilenden Kultur beschreibt, gegenüber einem euploiden Kontrollstamm reproduzierbar verdoppelt wurde. Durch 13 experimentell aufwendige Deletionsanalysen konnte ich einen 27 Kbp großen Bereich auf dem rechten Arm des Chromosoms kartieren, dessen Fehlen die lebensverlängernde Wirkung aufhebt. Dieser Bereich wurde auf einen Abschnitt mit drei Genen eingegrenzt, deren kodierte Genprodukte, zu denen das im Zellzyklus benötigte Zyklin Cig1p zählt, lebensverlängernd wirken könnten. Es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Aneuploidie einen Überlebensvorteil bewirken kann.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass (i) ein linearer Zusammenhang zwischen Aneuploidie und replikativer Alterung besteht, (ii) Aneuploidie die replikative Alterung gendosisabhängig beschleunigen und (iii) die chronologische Alterung verlangsamen kann.

---

## Summary

The fidelity of chromosome transmission from one generation to the next is essential for the survival of a cell/an organism and is assured by the precise regulation of the chromosome cycle. In proliferating cells, mistakes during the replication and the segregation of the genetic material can result in aneuploidy, which is defined as the gain or loss of whole chromosomes. The consequences of aneuploidy are manifold: aneuploidy is linked to a large number of neurodegenerative diseases and cancers such as Alzheimer's disease and cervical carcinomas, respectively. An increased number of aneuploid cells is also present in the organs of aged organisms. Furthermore, aneuploidy appears to cause an acceleration of the aging process by mechanisms which are not well understood. For example patients with trisomy 21 show premature aging phenotypes such as vascular diseases or cataracts. Despite the obvious connection between aneuploidy and aging, no system existed which could quantify chromosome transmission fidelity in aging cells.

I have used a system which allows to visualize the loss of a yeast artificial chromosome (YAC) in a diploid *S. cerevisiae* yeast strain by changes in the colony color. Cells carrying such a YAC were sorted according to their replicative age, which describes the number of divisions a cell has undergone. The segregation behavior of the YAC was then analyzed in these cells. 5 out of  $10^4$  young cells with an age of 1-3 divisions showed a failure in YAC transmission. In very old cells, this value was 4 times higher. The increase of aneuploidy with growing age was linear. I was thus able to show for the first time *in vivo* that a linear increase of chromosome transmission infidelity causes age-related aneuploidy.

Next, I analyzed whether the increase of aneuploidy with age is due to a loss of the function of a specific process in the chromosome cycle. Therefore, several diploid yeast strains were generated in which single genes encoding proteins involved in replication, cohesion, spindle assembly, kinetochore function, the kinetochore-microtubule attachment or the spindle assembly checkpoint, were deleted hetero- or homozygously. With the aid of the YAC-system I showed that in the homozygous deletion strains aneuploidy was increased by the factor of 8 to 28 in comparison to the wildtype strain. The strongest effect was observed in the strain lacking the microtubule-binding protein Bim1p. However, the relative linear increase of chromosomal instability of all mutant strains was comparable to the wildtype strain. This indicates that the increase in chromosome instability with age is not due to the malfunction of a single process.

The second part of my work deals with the question whether the presence of an additional chromosome has an effect on the lifespan of a yeast cells. I showed that the presence of

a YAC, which consists of 97 % human DNA, has no effect on the replicative lifespan implying that the increase in chromosome number by 6 % has no adverse effect on lifespan *per se*. However, a specific gene present on the YAC, namely the tRNA<sub>TYR</sub> coding gene *SUP11*, shortens the replicative lifespan exclusively in haploid yeast cells by 30 %. Hence, a YAC mediated gene dosage effect can shorten the replicative lifespan.

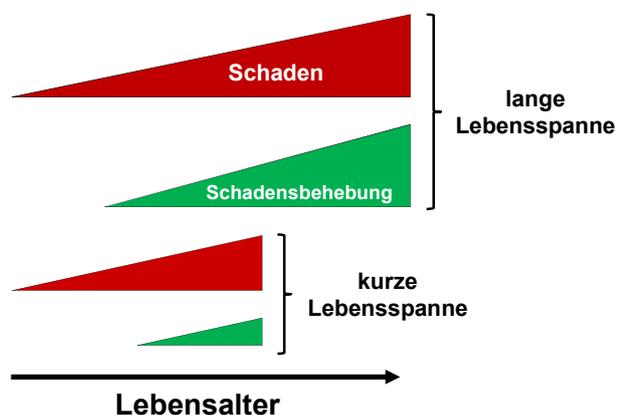
In this context, I also analyzed the effect of an additional chromosome on the lifespan of the fission yeast *S. pombe*. This chromosome called Ch16 carries 165 *S. pombe* genes. Surprisingly, the chronological lifespan, which describes the survival of a cell in a non-dividing state, was doubled in the Ch16 carrying strain in comparison to a euploid control strain. By performing 13 extensive deletion analyses, I identified a 27 kbp region on the right arm of the Ch16 chromosome which mediates the life prolonging effect. The life prolonging region was further narrowed down to a segment containing three genes. One of the encoded gene products, namely the cell cycle cyclin Cig1p, promotes an extension of the lifespan. Thus, aneuploidy can be beneficial for cell survival.

In summary the results obtained show that (i) there is a linear connection between an increase in aneuploidy and replicative age, (ii) aneuploidy can accelerate replicative aging via a gene dosage effect and (iii) aneuploidy can also decelerate chronological aging via a gene dosage effect.

# 1 Einleitung

Die Frage nach den Ursachen der Alterung und wie dieser Prozess verlangsamt werden kann fasziniert die Menschheit seit jeher. So wurde bereits vor etwa 4000 Jahren im babylonischen Gilgamesch-Epos dessen vergebliche Suche nach der Unsterblichkeit geschildert. Eine gemeingültig akzeptierte Definition des Alterns wurde bis heute nicht festgelegt, doch im Allgemeinen wird mit dem Alterungsprozess der fortschreitende und nicht umkehrbare Funktionsverlust eines Organismus bezeichnet, der mit einer Erhöhung des Sterberisikos einhergeht. Die Schwierigkeit, diesen hochkomplexen und bislang nur unzureichend verstandenen Prozess einfach zu definieren, liegt darin begründet, dass jede der zahlreichen Alterungstheorien immer nur einzelne Aspekte des Alterns erklären kann (Medvedev 1990).

Eine der umfassendsten Alterungstheorien besagt, dass Altern durch intrinsische und extrinsische Faktoren hervorgerufen wird, die Zellmoleküle wie die DNA und Proteine schädigen und die Genexpression verändern (Kirkwood und Austad 2000; Semsei 2000; Kourtis und Tavernarakis 2011). Es wird vermutet, dass die Lebensspanne eines Organismus durch dessen Fähigkeit bestimmt wird, mit der ein im Laufe des Lebens unausweichlich akkumulierender Schaden behoben werden kann (Guarente 1997; Johnson *et al.* 1999) (Abb. 1-1).



**Abb. 1-1 Der mögliche Zusammenhang zwischen Schadensakkumulation und Lebensspanne.**

Schematische Darstellung der Theorie, dass die Lebensspanne dadurch bestimmt wird, wie ein mit dem Lebensalter unausweichlich akkumulierender Schaden (rot) durch Zell- oder Organismus-eigene Mechanismen behoben werden kann. Eine effiziente Schadensbehebung (grün) resultiert in einer langen Lebensspanne (oben), während eine fehlerhafte oder zu geringe Antwort auf Schaden die Lebensspanne verkürzt (unten). (modifizierte Darstellung nach (Guarente 1997)).

Lange ist bekannt, dass Alterung und das Auftreten von Aneuploidie, die den Gewinn oder Verlust ganzer Chromosomen bezeichnet, zusammenhängen (Jacobs *et al.* 1961). Auf welche Weise Aneuploidie und Alterung sich gegenseitig beeinflussen ist jedoch bis heute weitestgehend unverstanden. Es wird vermutet, dass durch Aneuploidie Änderungen in der Zellphysiologie hervorgerufen werden, welche die Fitness einer Zelle/eines

Organismus senken und sich nachteilig auf die Mechanismen der Schadensbehebung auswirken.

Im Folgenden werden zunächst bekannte Auswirkungen von Aneuploidie auf den Menschen dargestellt. Im Anschluss wird der aktuelle Wissensstand zu den Zusammenhängen zwischen Aneuploidie und Alterung erläutert sowie der Ansatz, mit dem in der vorliegenden Arbeit mit den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* als Modellorganismen diese Zusammenhänge weiter aufgeklärt wurden.

## 1.1 Die Auswirkungen von Aneuploidie auf den Menschen

Die genomische Stabilität wird durch die präzise Verdopplung und Verteilung der Schwesterchromatiden auf die Folgezellen in der Meiose und Mitose gewährleistet und ist essentiell für das Überleben einer Zelle. Fehler in dieser fein abgestimmten Maschinerie können zu chromosomalen Instabilitäten wie der Aneuploidie führen, die dramatische Folgen für den Organismus haben kann (Jaspersen und Winey 2004; Cimini und Degrossi 2005). Zahlreiche Erkrankungen sind eng mit dem Auftreten von Aneuploidie verknüpft. An dieser Stelle erfolgt ein Überblick über häufige Geburtsdefekte und Krankheiten, die im Fokus aktueller Forschungen stehen.

### 1.1.1 Aneuploidie-Syndrome

Entsteht durch eine Fehlverteilung von Chromosomen in der Meiose eine aneuploide Zelle, so ist der aus ihr heranwachsende menschliche Organismus bis auf wenige Ausnahmen nicht lebensfähig. Innerhalb der ersten 15 Schwangerschaftswochen sind etwa 50 % der auftretenden spontanen Fehlgeburten auf eine abweichende Chromosomenzahl zurückzuführen (Hassold et al. 1980). Die Hälfte dieser Fehlgeburten wird dabei durch Trisomien, dem dreifachen statt zweifachen Vorliegen eines Chromosoms in einem diploiden Organismus, ausgelöst.

Eine häufig auftretendes Aneuploidie-Syndrom, das aus einer Nicht-Trennung homologer Chromosomenpaare während der Keimzellenentwicklung resultiert, ist die Trisomie (dreifaches Vorliegen eines Chromosoms) für das Chromosom 21, besser bekannt als das Down-Syndrom. Diese Trisomie tritt bei etwa einer von 750 Geburten auf und wird, obwohl sie generell ein Überleben ermöglicht, als Ursache für 1 von 43 spontanen Fehlgeburten genannt (Hsu 1998). Menschen mit dieser Behinderung weisen Einschränkungen im kognitiven Bereich sowie eine abnorme Organentwicklung

insbesondere des Herzens auf (Rehder 1981; Petersen und Mikkelsen 2000; Roubertoux und Kerdelhue 2006).

Die zwei weiteren lebensfähigen autosomalen Aneuploidien, die Trisomie 13 (Patau-Syndrom) und die Trisomie 18 (Edwards-Syndrom), treten etwa 4-10 mal seltener auf als die Trisomie 21 und führen zu schwerwiegenden Defekten in der körperlichen Entwicklung eines Kindes, insbesondere zu Herzfehlern, und gehen meist mit einer sehr kurzen Lebenserwartung einher (Scarborough *et al.* 1982; Embleton *et al.* 1996; Shaw 2008). Von den menschlichen Autosomen tragen die genannten Chromosomen die wenigsten Gene. Die Folgen der Trisomie-Syndrome und die Tatsache, dass Trisomien der übrigen Autosomen nicht lebensfähig sind, werden auf den nachteiligen Effekt einer erhöhten Gendosis zurückgeführt (Antonarakis *et al.* 2004; Gardiner 2004; FitzPatrick 2005; Kahlem 2006; Torres *et al.* 2008).

Die meisten gonosomalen Aneuploidien hingegen sind lebensfähig: Die drei trisomisch gonosomalen Syndrome sind das Klinefelter-Syndrom, das durch das Vorliegen von zwei X-Chromosomen und einem Y-Chromosom gekennzeichnet ist (Karyotyp: 47,XXY) sowie die phänotypisch unauffälligen Trisomien Triplo-X-Syndrom (Karyotyp: 47,XXX) und Diplo-Y-Syndrom (Karyotyp: 47,XYY). Merkmale des Klinefelter-Syndroms sind vorwiegend Muskelschwäche im Kleinkindalter, Unfruchtbarkeit sowie eine überdurchschnittliche Körpergröße mit ungewöhnlich langen Extremitäten (Visootsak und Graham 2006). Frauen mit dem Triplo-X-Syndrom können ebenfalls größer als der Durchschnitt sein und zudem ein vorzeitiges Auftreten der Menopause aufweisen, diese Merkmale sind jedoch fakultativ. Bei Männern mit dem Diplo-Y-Syndrom werden häufig, aber nicht zwangsläufig, eine überdurchschnittliche Körpergröße sowie ein erhöhter Testosteronspiegel beobachtet. Die Prävalenz dieser drei Syndrome liegt bei etwa 1 in 1000 Lebendgeburten (Hook 1977).

Das Turner-Syndrom, bei dem lediglich ein X-Chromosom vorliegt (Monosomie X; Karyotyp: 45,X) ist der einzige Fall, bei dem eine Monosomie (das Fehlen eines Chromosoms) im Großteil der Körperzellen ein Überleben ermöglicht. Obwohl bei Vorliegen dieser Monosomie in 98 % der Fälle die Embryonen noch im Mutterleib sterben, haben überlebende Menschen eine normale Lebenserwartung und Intelligenz (Zinn *et al.* 1993). Häufige Kennzeichen dieses Syndroms sind Unfruchtbarkeit sowie Kleinwüchsigkeit (Zinn *et al.* 1993; Zinn und Ross 1998). Die eher milden Auswirkungen einer Aneuploidie des X-Chromosoms sind darauf zurückzuführen, dass in allen Körperzellen lediglich ein X-Chromosom aktiviert ist, während aus jeder weiteren Kopie ein Barr-Körperchen gebildet wird, bei dem die meisten Gene transkriptionell stillgelegt sind (Belmont *et al.* 1986; Cohen und Lee 2002).

### 1.1.2 Neurodegenerative Erkrankungen

Auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit wurden Veränderungen der Chromosomenanzahl beschrieben (Ward *et al.* 1979; Migliore *et al.* 1999; Kingsbury *et al.* 2006; Migliore *et al.* 2011). Menschen mit der Trisomie 21 erkranken ausnahmslos ab einem Alter von durchschnittlich 55 Jahren an der Alzheimer-Krankheit (Olson und Shaw 1969; Hyman 1992; Lott und Head 2005). Für Menschen, die nicht vom Down-Syndrom betroffen sind, wird eine Mosaik-Trisomie (nur ein Teil der Zellen ist trisomisch) für das Chromosom 21, die während mitotischer Zellteilungen im hohen Alter entstehen kann, als mögliche Ursache für die Alzheimer-Krankheit genannt (Potter 1991). Aneuploide Nervenzellen kommen auch im Gehirn gesunder Erwachsener zu etwa 10 % vor, es befinden sich jedoch im Vergleich zu den anderen Chromosomen 5-10 mal mehr Zellen mit einer veränderten Kopienzahl von Chromosom 21 in Gehirnen von Alzheimer Patienten (Rehen *et al.* 2005; Yurov *et al.* 2005; Yurov *et al.* 2007; Iourov *et al.* 2009; Iourov *et al.* 2011). Der genaue Grund für das gemeinsame Auftreten der Alzheimer-Krankheit und einer Trisomie für das Chromosom 21 ist nicht bekannt, vermutet wird aber auch hier ein krankheitsfördernder Gendosiseffekt: Das mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebrachte Amyloid-Vorläuferprotein (APP) ist auf Chromosom 21 kodiert. Die Spaltung von APP kann zur verstärkten Bildung von Beta-Amyloid-Peptiden führen, die aggregieren und sich als neurotoxische Plaques in den Nervenzellen erkrankter Menschen manifestieren (Pearson und Peers 2006). Bei einer Trisomie für das Chromosom 21 wird APP überexprimiert und kann so das Fortschreiten der Krankheit fördern (Slegers *et al.* 2006; Granic *et al.* 2010).

Weitere neurodegenerative Erkrankungen, die mit Aneuploidie in Verbindung gebracht werden, sind die Schizophrenie und Ataxia teleangiectasia (A-T; oder Louis-Bar-Syndrom). Bei Patienten mit der durch zahlreiche Faktoren verursachten Schizophrenie, die durch das Auftreten von Halluzinationen und starker Depression gekennzeichnet ist, wurden erhöhte Raten von Zellen mit abweichender Gonosomenzahl (XXX oder XXY) nachgewiesen (DeLisi *et al.* 1994; Eckstrand *et al.* 2008). A-T zählt zu den durch Chromosomen-Instabilität (CIN) verursachten Krankheiten, die neben Aneuploidie auch den Verlust oder die Vervielfältigung von Chromosomenstücken beschreibt. Charakteristisch für die seltene, autosomal rezessive Krankheit A-T, die durch einen Defekt des für die Chromosomenstabilität benötigten *AT* Gens ausgelöst wird, sind Bewegungsstörungen und ein geschwächtes Immunsystem (McKinnon 2004; Nowak-Wegrzyn *et al.* 2004). Die Fehlfunktion der von *ATM* kodierten Proteinkinase führt unter anderem zur Bildung von 2-5-mal mehr aneuploiden Zellen im Vergleich zum Normalzustand, die vermutlich eine Rolle bei der Neurodegeneration und

der Entstehung häufiger Folgeerkrankungen wie Krebs spielen (McConnell *et al.* 2004; Iourov *et al.* 2009).

### 1.1.3 Krebserkrankungen

Krebs bezeichnet eine bösartige Gewebeneubildung, auch Neoplasie genannt. Die Folgen einer Krebserkrankung sind vielfältig und meist verheerend, da durch invasives Wachstum von Tumoren und der Bildung von Tochtergeschwülsten (Metastasierung) Gewebe und lebenswichtige Organe angegriffen werden können (Poste und Fidler 1980; Gupta und Massague 2006; Chaffer und Weinberg 2011). Laut statistischem Bundesamt war Krebs im Jahr 2010 die zweihäufigste Todesursache in Deutschland. Jeder dritte Europäer erkrankt im Laufe seines Lebens an Krebs (Pressemitteilung 2008). Der Bekämpfung dieser Volkskrankheit kommt demnach eine große Bedeutung zu, und intensive Forschungen in diesem Bereich haben zur Aufklärung der krebsauslösenden Schritte sowie der Krebsentwicklung beigetragen.

Allgemein anerkannt ist die Hypothese, dass für die Entstehung von Krebs eine Abfolge genetischer Veränderungen in einer gesunden Zelle stattfinden muss, die dazu führen, dass die Apoptose, der programmierte Zelltod zur Eliminierung entarteter Zellen, ausgeschaltet und eine unkontrollierte Zellteilung ermöglicht wird (Hanahan und Weinberg 2000). Lange bekannt ist auch, dass CIN eine weit verbreitete Art der genomischen Instabilität in menschlichen Krebszellen darstellt: Der Verlust oder der Zugewinn von Chromosomenstücken sowie ganzer Chromosomen kann dazu führen, dass Krebs unterdrückende Tumorsuppressorgene verloren gehen (Loss of Heterozygosity (LOH)) oder Krebs fördernde Protoonkogene vervielfältigt werden (Dey 2004). Aneuploidie wurde bereits vor etwa 100 Jahren vom deutschen Zoologen Theodor Boveri als möglicher Verursacher von Krebs postuliert (Boveri 1914). Bis heute konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob Aneuploidie eine Ursache oder Konsequenz der Krebserkrankung ist (Weaver und Cleveland 2006; Weaver *et al.* 2007; Chandhok und Pellman 2009).

Die Mehrheit der Forscher schreibt der Aneuploidie eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Tumoren in nahezu allen Krebsarten zu (Holliday 1989; Cahill *et al.* 1999; Sen 2000; Rajagopalan und Lengauer 2004; Duesberg *et al.* 2006; Fang und Zhang 2011). Beispielsweise treten Brust-, Darm-, Epithelial-, Gebärmutterhals- und Prostatakrebs häufig in Zusammenhang mit Aneuploidie auf (Duensing und Munger 2003; Gupta *et al.* 2003; Chieffi *et al.* 2006; Grade *et al.* 2007; Lo *et al.* 2007; Daniel *et al.* 2011; Korzeniewski *et al.* 2011).

Als Verursacher der bei Krebszellen beobachteten abweichenden Chromosomenzahl wurde bereits eine Vielzahl von Faktoren identifiziert. Es handelt sich dabei oftmals um

Proteine, die eine Funktion im mitotischen Spindelkontrollpunkt ausüben (Gemma *et al.* 2000; Ohshima *et al.* 2000; Lee 2003; Lengauer und Wang 2004). Ist die mitotische Spindel gar nicht oder fehlerhaft an die Kinetochore (ein auf dem Zentromerchromatin (Verbindungspunkt der Schwesterchromatiden) assemblierter Multiproteinkomplex) der Schwesterchromatiden angeheftet, so löst der mitotische Spindelkontrollpunkt einen Arrest aus, die der Zelle Zeit gibt, dieses Problem zu beheben (Wassmann und Benezra 2001). Zu den Schlüsselgenen des Spindelkontrollpunkts zählen unter anderem die humanen Gene *BUB1*, *BUBR1* und *MAD2*. Eine reduzierte Expression dieser Gene durch Mutation oder Verlust eines Allels führt zu CIN, aber auch eine Überexpression von *MAD2* kann eine fehlerhafte Chromosomensegregation verursachen (Cahill *et al.* 1998). Das Fehlen einer Kopie des homologen *Mad2* Gens resultiert bei Mäusen in einem erhöhten Risiko der Tumorentstehung (Michel *et al.* 2001). Allerdings wurde in Studien an Mäusen mit defektem Spindelkontrollpunkt nach Verringerung der Proteinmengen von BubR1 bzw. der Spindelkontrollpunkt-komponenten Bub3 und Rae1 zwar eine erhöhte Aneuploidie festgestellt, gegenüber wildtypischen Mäusen konnte jedoch kein Anstieg spontaner Tumorentstehung nachgewiesen werden (Baker *et al.* 2004; Baker *et al.* 2006). Erst die Behandlung mit stark krebserregenden Substanzen führte in Kombination mit verringerter BubR1, Bub3 und/oder Rae1 Menge zur Entstehung von Lungen- und Darmkrebs (Babu *et al.* 2003; Dai *et al.* 2004; Baker *et al.* 2006). Eine vollständige Inaktivierung des Spindelkontrollpunkts durch die Deletion einer seiner Komponenten trägt vermutlich nicht zur Krebsentstehung bei, da dies zu einer so massiven Fehlsegregation führt, dass Krebszellen innerhalb von sechs Generationen sterben (Kops *et al.* 2004).

Die Wichtigkeit der korrekten Verknüpfung der mitotischen Spindelmikrotubuli mit den Chromosomen für die korrekte Segregation wurde durch weitere Befunde untermauert: Die Überexpression der Aurora-B Proteinkinase, einem Protein, das für die Verankerung von mitotischer Spindel und den Schwesterchromatiden benötigt wird, führt zu Aneuploidie und wurde in vielen Tumorgeweben beobachtet (Sorrentino *et al.* 2005; Chieffi *et al.* 2006; Li und Li 2006). Auch Defekte im Aufbau der bipolaren mitotischen Spindel können Aneuploidie verursachen und zur Krebsentstehung beitragen. Sie wurden im Zusammenhang mit einer fehlerhaften Struktur der Zentrosomen, den Mikrotubuli-organisierenden Zentren von Säugerzellen, festgestellt (Lingle und Salisbury 1999; Pihan *et al.* 2003). Zudem kann das am häufigsten mutierte Gen in Kolorektaltumoren, das Tumorsuppressorgen *APC* („Adenomatous-polyposis-coli“), Aneuploidie durch die fehlerhafte Interaktion des defekten APC Proteins mit den Plus-Enden von Kinetochormikrotubuli verursachen (Fodde *et al.* 2001; Green und Kaplan 2003; Tighe *et al.* 2004; Tomonaga und Nomura 2007).

Die dargestellten Zusammenhänge verdeutlichen, welche dramatische Auswirkungen Aneuploidie in der Regel auf den menschlichen Organismus hat. Ein grundlegendes Verständnis der Entstehung von Aneuploidie und den aus Aneuploidie resultierenden Folgen ist entscheidend, um die beschriebenen Erkrankungen behandeln und verhindern zu können.

## 1.2 Die Zunahme von Aneuploidie im Alter

Es existieren zahlreiche Faktoren, die als Merkmal des Alterns aufgeführt werden. Unter anderem gelten beim Menschen die Abnahme der Fruchtbarkeit, Muskelschwund, Gewichtsreduktion, körperliche Beeinträchtigungen, ein Nachlassen der Gedächtnisleistung und das vermehrte Auftreten altersbedingter Krankheiten wie Krebs als Hinweise auf ein fortgeschrittenes Alter (Kirkwood und Austad 2000; Schwartz 2003; Nikolaus und Schreiber 2004). Auch eine Zunahme aneuploider Zellen kennzeichnet den Alterungsprozess (Jacobs *et al.* 1961). Es ist jedoch sehr wenig darüber bekannt, in welcher Geschwindigkeit und auf welche Weise Aneuploidie im Alter zunimmt.

Der Großteil der Studien zu diesem Thema konzentriert sich auf die Frage, warum es beim Menschen mit steigendem Alter zu einer Zunahme von aneuploiden Keimzellen und dadurch zu dem erhöhten Risiko einer Fehlgeburt kommt. Während etwa bei der Hefe *S. cerevisiae* die meiotische Chromosomenfehlverteilung ein sehr seltenes Ereignis darstellt (1 aus 10.000 (Sears *et al.* 1992)), ist dieser Wert bei Säugetieren deutlich höher: Bei Mäusen finden sich etwa 1-2 % aneuploide befruchtete Eizellen (Bond und Chandley 1983). Mit 10 bis 30 % weist der Mensch die mit Abstand höchste Rate von Abweichungen in der Chromosomenzahl auf, meist handelt es sich dabei um Mono- oder Trisomien in befruchteten Eizellen (Hassold und Hunt 2001). Dabei korreliert das Auftreten von Aneuploidie bei der Befruchtung der Eizelle stark mit dem zunehmenden Alter der Frau (Penrose 1933). Das Risiko für eine trisomische Schwangerschaft (einschließlich Fehlgeburten) liegt bei einer 20-jährigen noch bei etwa 3 %, steigert sich ab einem Alter von 35 Jahren exponentiell und erreicht drastische 35 % mit einem Alter von ca. 40 Jahren (Hassold und Hunt 2001). Zytologische Studien zeigten, dass das Auftreten der Trisomie 21 zu 80 % auf aneuploide mütterliche Keimzellen zurückzuführen ist (Juberg und Mowrey 1983; Hassold *et al.* 1984). Ein im Alter zunehmend fehlerhafter Spindelkontrollpunkt wurde lange Zeit als mögliche Ursache der meiotischen Aneuploidie im Alter angenommen, dessen grundsätzliche Beteiligung an deren Entstehung konnte jedoch kürzlich im Mausmodell widerlegt werden (Jones 2008; Pan *et al.* 2008; Duncan *et al.* 2009). In alternden Oozyten der Taufliege *D. melanogaster* wurde ein zunehmender Funktionsverlust der Zentrosomen und eine Fehlbildung des Mikrotubuli-Zytoskeletts nachgewiesen, doch auch die Integrität des Zytoskeletts scheint nur eine untergeordnete

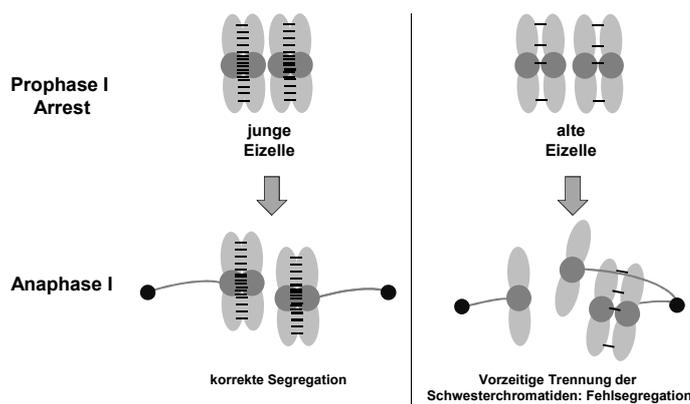
Rolle bei der hauptsächlich während der ersten Reifeteilung entstehenden Aneuploidie zu spielen (Schatten *et al.* 1999; Hunt und Hassold 2002; Duncan *et al.* 2009; Miao *et al.* 2009).

Es wurde schon lange vermutet, dass in erster Linie eine Besonderheit bei der Bildung von der weiblichen Keimzellen die erhöhte Aneuploidie im Alter verursacht: Bereits vor der Geburt werden bei einem weiblichen Fötus sämtliche Eizellen durch die Initiation der Meiose angelegt. Die Meiose wird jedoch nicht komplett durchlaufen, sondern arretiert jahrelang in der Prophase der ersten Reifeteilung bis in der geschlechtsreifen Frau monatlich der Eisprung stattfindet (Bickel 2005). Erst dann kommt es zur Trennung der homologen Chromosomen in der Anaphase I. Entscheidend für die akkurate Segregation der Chromosomenpaare ist deren Biorientierung zu den entgegengesetzten Zellpolen, die von der vor dem Arrest etablierten Kohäsion (das Zusammenhalten der Schwesterchromatiden durch Kohäsionproteinkomplexe) an der Zentromer-Region der Schwesterchromatiden abhängt (Watanabe 2005). Auf welche Weise die Kohäsion während des jahrelangen Arrests aufrechterhalten und überprüft wird, ist nicht bekannt (Chiang *et al.* 2010). Durch Versuche mit genetisch manipulierten Mäusen, die Kohäsionsdefekte aufweisen, und *D. melanogaster* Oozyten gewonnene experimentelle Daten deuteten darauf hin, dass die Kohäsion mit dem Alter abnimmt (Hodges *et al.* 2005; Subramanian und Bickel 2008; Subramanian und Bickel 2009). Doch erst kürzlich wurde in wildtypischen Mäusen der experimentelle Beweis erbracht, dass sich die Menge des Kohäsionsproteins Rec8 an den Schwesterchromatiden arretierter Eizellen mit zunehmendem Alter verringert und dadurch deren Abstand voneinander zunimmt (Abb. 1-2) (Chiang *et al.* 2010). Die verringerte Kohäsion und eine dadurch ermöglichte vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden begünstigt die Entstehung aneuploider Eizellen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Kalorienrestriktion - eine verringerte Nährstoffzufuhr, die in zahlreichen Modellorganismen lebensverlängernd wirkt - die Entstehung aneuploider Eizellen in alten Mäusen verhindert (Selesniemi *et al.* 2011).

Obwohl schon lange bekannt ist, dass auch bei nicht-meiotischen Zellen das Auftreten von Aneuploidie mit der Zunahme des Alters korreliert, existieren bislang sehr wenige Studien, die sich mit den zugrunde liegenden Mechanismen und der kausalen Verknüpfung auseinandersetzen. Der Zusammenhang wurde selbst bei den intensiv untersuchten Alterskrankheiten lediglich deskriptiv dargestellt.

Zu den häufigsten Alterskrankheiten, die mit einer erhöhten Aneuploidie assoziiert werden, zählen Krebs und die Alzheimer-Krankheit (Ward *et al.* 1979; Newell *et al.* 1989; Hanahan und Weinberg 2000). Ab einem mittleren Alter von 40 Jahren steigt mit jedem weiteren Lebensjahr die Wahrscheinlichkeit, an einer Form von Krebs zu erkranken,

exponentiell an (DePinho 2000). Die Alzheimer-Krankheit, bei der als ein Merkmal ein erhöhter Anteil aneuploider Nervenzellen im Gehirn zählt, tritt gewöhnlicherweise erst ab einem Alter von 65 Jahren auf (Ferri *et al.* 2005; Iourov *et al.* 2009). Es wurde gezeigt, dass Alzheimer Patienten eine erhöhte Anzahl von Mundschleimhautzellen mit Tri- und Monosomien für die Chromosomen 17 und 21 aufweisen, die mit dem Alter weiter ansteigen (Thomas und Fenech 2008). Es ist nach wie vor unklar, ob die im Alter verstärkt beobachtete Aneuploidie eine Konsequenz oder Voraussetzung für Krebs oder die Alzheimer-Krankheit darstellt (Weaver und Cleveland 2006).



**Abb. 1-2 Eine verringerte Kohäsion verursacht Aneuploidie in alten Eizellen.**

Schematische Darstellung der Kohäsion und Segregation von Schwesterchromatiden in der Meiose I: Eizellen arretieren schon vor der Geburt in der Prophase I (oben links), wo die Kohäsionskomplexe (schwarze Striche) die Verbindung zweier Schwesterchromatiden (hellgrau, mit Zentromer (dunkelgrau)) jahrelang aufrecht erhalten, damit die homologen Chromosomen kurz vor der Ovulation in der Anaphase I mit

Hilfe der meiotischen Spindel (graue Linien) gleichmäßig zu den gegenüberliegenden Spindelpolen (schwarzer Kreis, Zentrosom) gezogen werden können (unten links). In alten Eizellen lässt die Effizienz der Kohäsion nach (oben rechts), die Schwesterchromatiden können sich dadurch vorzeitig trennen und es kommt vermehrt zu Chromosomenfehlverteilungen (unten rechts), wodurch aneuploide Eizellen entstehen.

Eine Polyploidisierung, die die Vervielfachung des gesamten Chromosomensatzes beschreibt, wurde vermehrt in sich entwickelnden Speiseröhrentumoren, in alternden Leberzellen und *in vitro* in seneszenten Endothel- und Fibroblastenzellen beobachtet (Kudryavtsev *et al.* 1993; Galipeau *et al.* 1996; Wagner *et al.* 2001; Smogorzewska und de Lange 2002). Polyploidie, insbesondere Tetraploidie, entsteht in erster Linie unter pathologischen Bedingungen, führt aufgrund ihrer Instabilität häufig zu Aneuploidie und scheint die Fitness eines Organismus zu reduzieren (Storchova und Pellman 2004).

Eine unabhängig von Krankheiten steigende Aneuploidie im Alter bei Männern und Frauen wurde erstmals im Jahr 1961 beschrieben (Jacobs *et al.* 1961). Aus Blut gewonnene Metaphasenzellen von 247 Frauen und Männern verschiedenen Alters zeigten in einer Karyotypanalyse in erster Linie einen steigenden Anteil von Hypodiploidie (verringerte Chromosomenzahl) insbesondere der Gonosomen mit zunehmenden Alter (Jacobs *et al.* 1963). Zahlreiche nachfolgende Studien, bei denen die Ploidie von Leukozyten verschiedenster Bevölkerungsgruppen untersucht wurde, bestätigten diesen Befund (Hamerton *et al.* 1965; Sandberg *et al.* 1967; Neurath *et al.* 1970; Mattevi und

Salzano 1975). Auch autosomale Aneuploidien traten vermehrt im Alter auf, die Häufigkeit für die einzelnen Chromosomen korrelierte dabei negativ mit deren Länge (Neurath *et al.* 1970). In all diesen Studien wurde jedoch nur eine geringe Anzahl von Stichproben untersucht. Zudem handelte es sich um Querschnittsstudien: Die Erhöhung von Aneuploidie wurde nicht in Individuen belegt, die über einen längeren Zeitraum untersucht wurden, sondern zu einem Zeitpunkt anhand verschiedener Personen unterschiedlichen Alters. Bis heute existieren lediglich zwei Längsschnittstudien, die die Zunahme von Aneuploidie über einen längeren Zeitraum auch in Individuen belegen (Jarvik *et al.* 1976; Mukherjee und Thomas 1997). In der neueren Studie wurde gezeigt, dass Aneuploidie häufiger in Hautfibroblastenzellen auftritt, die sich in der Interphase (nicht teilende Zellen) befinden, als in mitotischen Metaphasezellen (Mukherjee und Thomas 1997). Auch in vaskulären Endothelzellen wurde eine Zunahme von Aneuploidie beobachtet (Querschnittsstudie: (Aviv *et al.* 2001)). Eine Zunahme aneuploider Nervenzellen mit dem Alter wurde lange als Auslöser neurodegenerativer Erkrankungen vermutet, doch dies nachzuweisen ist schwierig. Das Gehirn besteht während seiner Entwicklung zu 30-35 % aus aneuploiden Zellen, deren Anteil jedoch durch Apoptose allmählich abnimmt und im voll entwickelten, hauptsächlich postmitotischen Erwachsenen Gehirn nur noch 10 % beträgt, dabei aber nicht stabil bleibt (Yurov *et al.* 2009; Faggioli *et al.* 2011). Unklarheit herrscht bislang über die molekularen Mechanismen, die zu Abweichungen in der Chromosomenzahl mit zunehmendem Alter führen, und es existiert kein System, mit dem der Zugewinn oder der Verlust von Chromosomen in sich teilenden, alternden Zellen direkt gezeigt werden konnte.

### 1.3 Alterung als Folge von Aneuploidie

Es wird bereits seit Jahrzehnten vermutet, dass Aneuploidie Alterung hervorrufen kann (Martin *et al.* 1985; Johnson *et al.* 1999). Tatsächlich stützen viele Beobachtungen diese Vermutung. So wird beispielsweise die Trisomie 21 mit vorzeitiger Alterung assoziiert (Martin 1978; Scarbrough *et al.* 1982). Menschen mit dem Down-Syndrom zeigen früh Alterungsmerkmale wie Haarausfall, Amyloidose, Herzkreislaufprobleme und eine frühzeitige Erkrankung an Alzheimer (Smith und Berg 1976; Martin 1978). Der medizinische Fortschritt hat jedoch dazu geführt, dass die Lebenserwartung von durchschnittlich 9 Jahren (1929) auf über 55 Jahre (2000) angestiegen ist (Smith und Berg 1976; Finesilver 2002; Glasson *et al.* 2002). Die Alterungsphänotypen werden unter anderem auf eine nachlassende Effizienz der DNA-Reparaturmaschinerie zurückgeführt, aber auch die durch das zusätzliche Chromosom erhöhte Gendosis wird für die Alterungsbeschleunigung insbesondere beim Down-Syndrom verantwortlich gemacht (Raji und Rao 1998; FitzPatrick 2005). Eine neue Studie weist darauf hin, dass die

Gendosis in trisomischen Mäusen mit dem humanen Chromosom 21 bereits in der frühen Gehirnentwicklung zu einer abnormen Neurogenese führt (Wang *et al.* 2011).

In der Maus wurde auch ein Zusammenhang zwischen Aneuploidie, die durch einen defekten Spindelkontrollpunkt hervorgerufen wurde, und vorzeitiger Organismusalterung nachgewiesen. Dort bewirkte eine Verringerung des Spindelkontrollpunktproteins BubR1 auf 10 % der wildtypischen Menge durch eine Mutation im *Bub1b* Gen massive Defekte in der Chromosomensegregation, die in einem vermehrten Auftreten von Aneuploidie resultierte (Baker *et al.* 2004). Die Mäuse wiesen neben einer verkürzten Lebensspanne zahlreiche Merkmale vorzeitiger Alterung wie verringerte Wundheilung, grauen Star und einen geringen Körperfettanteil auf. Auch in wildtypischen Mäusen wurde in vielen Gewebearten wie Milz, Hoden und Eierstöcken eine verringerte Expression von BubR1 und eine damit einhergehende Aneuploidie im Alter festgestellt, was auf eine Beteiligung von BubR1 am normalen Alterungsprozess schließen ließ. Allerdings zeigte eine neuere Studie, dass Mäuse, denen je eine Kopie der Spindelkontrollpunktgene Bub3 und Rae1 fehlt, trotz einer schon im sehr jungen Alter deutlich höheren Aneuploidie wesentlich länger leben als Mäuse mit verringerter BubR1 Menge und auch Kennzeichen vorzeitiger Seneszenz (Gewichtsverlust/grauer Star) erst spät entwickeln (Baker *et al.* 2006). Die durch einen defekten Spindelkontrollpunkt verursachte Aneuploidie muss demnach nicht zwangsläufig zu vorzeitiger Seneszenz führen.

Zusammengefasst wird angenommen, dass mit zunehmendem Alter unausweichlich auftretende irreparable Schäden - beispielsweise an Genen des für die Chromosomensegregation essentiellen Spindelkontrollpunkts - dazu führen, dass vermehrt aneuploide Zellen durch Fehler im Zellzyklus entstehen. Das durch den Chromosomengewinn oder Verlust veränderte Proteom in diesen Zellen könnte dabei die Zellfitness verringern und die Geschwindigkeit des Alterungsprozesses beeinflussen.

### 1.3.1 Alterung als Folge von Aneuploidie in *S. cerevisiae*

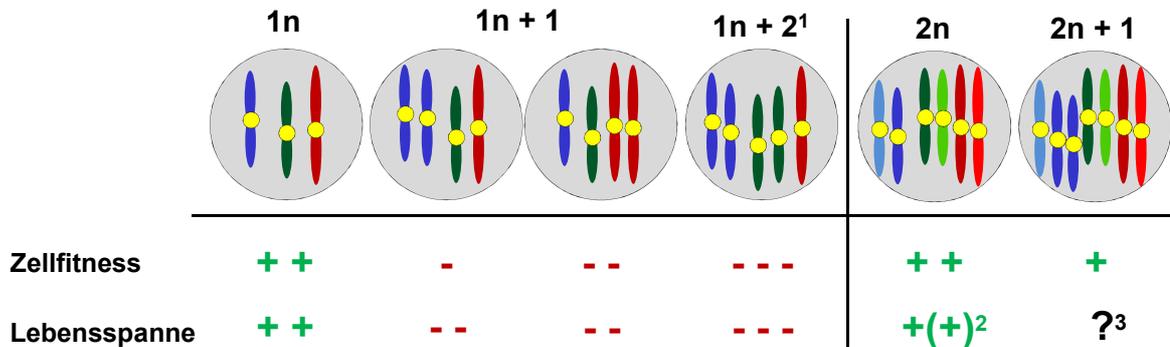
Der einzellige Ascomycet *S. cerevisiae* gilt wie auch die Spaltheefe *S. pombe* seit Jahrzehnten als hervorragender Modellorganismus zur Erforschung von Prozessen, die zu genomischer Instabilität führen können. Dazu zählen die DNA Reparatur und Replikation, die Mitose und die Meiose (Bartlett und Nurse 1990; Balasubramanian *et al.* 2004). Viele der in den Hefen identifizierten Komponenten des Zellzyklus sind evolutionär hochkonserviert und finden sich auch im Menschen wieder.

In der Hefe *S. cerevisiae* wurde wie bei höheren Eukaryoten ein Zusammenhang zwischen einer abweichenden Chromosomenzahl und einer Lebensverkürzung nachgewiesen. So haben bereits Genomduplikationen, die nicht unter die Definition von

Aneuploidie fallen und als weniger schädlich gelten (Torres *et al.* 2007), einen nachteiligen Effekt auf die Lebensspanne: Isogene polyploide Hefezellen, die einen 2-, 3- oder 4-fach erhöhten Chromosomensatz enthalten, zeigen keine Wachstumsdefekte. Sie altern jedoch in der stationären Phase, in der keine Teilung stattfindet, schneller als haploide ( $1n$ ) Zellen (Abb. 1-3) (Andalis *et al.* 2004). Dabei verringern höhere Ploidiestufen die Lebensspanne stärker. Die Expression von  $>150$  Genen in der stationären Phase unterscheidet sich bei tetraploiden Hefezellen deutlich von haploiden Zellen. Zudem führt Tetraploidie zu einem 1000-fach erhöhten Chromosomenverlust und somit zur Generierung aneuploider Zellen (Mayer und Aguilera 1990; Andalis *et al.* 2004). Die Auswirkung von Aneuploidie auf die Zellphysiologie wurde in haploiden *S. cerevisiae* Zellen untersucht, die disomisch für ein oder mehrere Hefechromosomen waren (Torres *et al.* 2007). Bis auf zwei Ausnahmen (Disomien für Chr. II und XV) zeigten alle aneuploiden Stämme eine verkürzte Lebensspanne in der stationären Phase. Über 90 % der Gene auf dem jeweils zusätzlichen Chromosom wurden verstärkt exprimiert, was zu einem veränderten Proteom (Gesamtheit aller Proteine) führte. Es wird angenommen, dass dadurch die beobachteten Phänotypen wie Kurzlebigkeit, erhöhte Sensitivität gegenüber Proteinsynthese-Inhibitoren und Zellzyklusdefekte verursacht werden. Teilweise wiesen auch Gene auf den nicht disomischen Chromosomen eine veränderte Expression auf, und diese Veränderung konnte durch die Anwesenheit von zusätzlichen artifiziellen Chromosomen, die aus nicht kodierender Maus- oder Human-DNA bestehen (YACs), nachgestellt werden. Auch in der Spaltheife *S. pombe* zeigten haploide Zellen bereits durch die Anwesenheit eines zusätzlichen kurzen Chromosoms (Minichromosom) ohne Protein kodierende Sequenzen eine erhöhte Expression bestimmter in Telomernähe lokalisierter Gene auf den übrigen Chromosomen (Chikashige *et al.* 2007). Demnach reicht bereits das Vorliegen zusätzlicher DNA aus, um den Zellmetabolismus zu verändern.

Aneuploidien wirkten sich in haploiden *S. cerevisiae* Zellen umso schwerwiegender auf die Zellen aus, je größer das zusätzliche Chromosom ist bzw. je mehr Disomien vorliegen (Abb. 1-3) (Torres *et al.* 2007). Es wird vermutet, dass in diploiden Hefezellen der Verlust eines Chromosoms weniger toleriert wird als der Zugewinn von Chromosomen, was durch eine schwer zu kompensierende reduzierte Proteinmenge begründet wird (Papp *et al.* 2003; Deutschbauer *et al.* 2005; Torres *et al.* 2008). In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass ein diploider Stamm durchaus jedes der 16 Chromosomen verlieren und überleben kann (Reid *et al.* 2008). Allerdings folgt auf den Verlust bei den meisten  $2n-1$  Stämmen eine Endoreduplikation eines kompletten Chromosoms, so dass der Stamm wieder diploid wird.

Offen sind die Fragen, welche Prozesse im Zellzyklus mit zunehmendem Alter Aneuploidie hervorrufen und ob Aneuploidie *per se* ausreicht, um Alterung zu beschleunigen. Es ist denkbar, dass erst eine bestimmte Gendosisveränderung zu vorzeitiger Alterung führt. Die Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* stellen aufgrund ihrer einfachen Handhabung und Konserviertheit des gut aufgeklärten Chromosomenzyklus ein hervorragendes System dar, um diese Fragen gezielt beantworten zu können.



**Abb. 1-3 Die Auswirkungen von Aneuploidie auf Fitness und Lebensspanne von *S. cerevisiae*.**

Schematisch dargestellt sind haploide ( $1n$ ) und diploide ( $2n$ ) Zellen, die 0, 1 oder 2 zusätzliche Chromosomen (blau, grün und rot; gelb: Kinetochor) tragen. Die Auswirkungen der jeweiligen Ploidie auf Zellfitness und Lebensspanne sind mit (+) und (-) Zeichen angegeben: (++) normale Fitness/Lebensspanne; (+) leicht verringert; (-) verringert; (--) deutlich verringert; (---) stark verringert. Das Vorliegen einer Disomie (blaues bzw. rotes Chromosom) in haploiden ( $1n + 1$ ) bzw. einer Trisomie (blaues Chromosom) in diploiden Zellen ( $2n + 1$ ) verringert die Fitness (und Lebensspanne in haploiden Zellen), wobei haploide Zellen stärker betroffen sind. Die Disomie eines großen Chromosoms (rot) in haploiden Zellen wirkt sich schädlicher auf die Fitness aus als Disomien kleiner Chromosomen (blau). Mehrere Disomien ( $1n + 2$ ) bewirken eine weitere Verringerung der Fitness und Lebensspanne verglichen mit einzelnen Disomien ( $1n + 1$ ) oder der Verdopplung des haploiden Chromosomensatzes ( $2n$ ). Soweit nicht anders angegeben, beruhen die Angaben auf (Torres *et al.* 2007).

<sup>1</sup>In den meisten Fällen führten zwei Disomien (*S. cerevisiae*) zum sofortigen Tod der Zellen.

<sup>2</sup>Eine leichte Verringerung der Lebensspanne diploider gegenüber haploiden Zellen wurde in (Andalis *et al.* 2004) beschrieben.

<sup>3</sup>Beim Menschen gehen lebensfähige Trisomien mit einer verkürzten Lebensspanne einher, für *S. cerevisiae* sind die Auswirkungen nicht bekannt (Smith und Berg 1976; Pai *et al.* 2003).

## 1.4 Der Chromosomenzyklus und die Entstehung von Aneuploidie am Beispiel der Hefe *S. cerevisiae*

Der Prozess der Alterung und der Zellzyklus sind eng miteinander verknüpft. Um die Entstehung von Aneuploidie zu verhindern, muss die präzise Duplikation und Segregation der Chromosomen gewährleistet sein. Diese Prozesse sind im Chromosomenzyklus über den Replikations- und Kohäsionszyklus sowie dem Spindelkontrollpunkt miteinander gekoppelt (Blow und Tanaka 2005). Die Abläufe sind hochkomplex, dabei aber konserviert und in ähnlicher Form in allen höheren Eukaryoten zu finden. Vorrangig am Beispiel der Hefe *S. cerevisiae* wird in einer für diese Arbeit relevanten Übersicht dargestellt, wie die Chromosomen repliziert und segregiert werden und welche Fehler in diesen Prozessen zur Entstehung von Aneuploidie führen können.

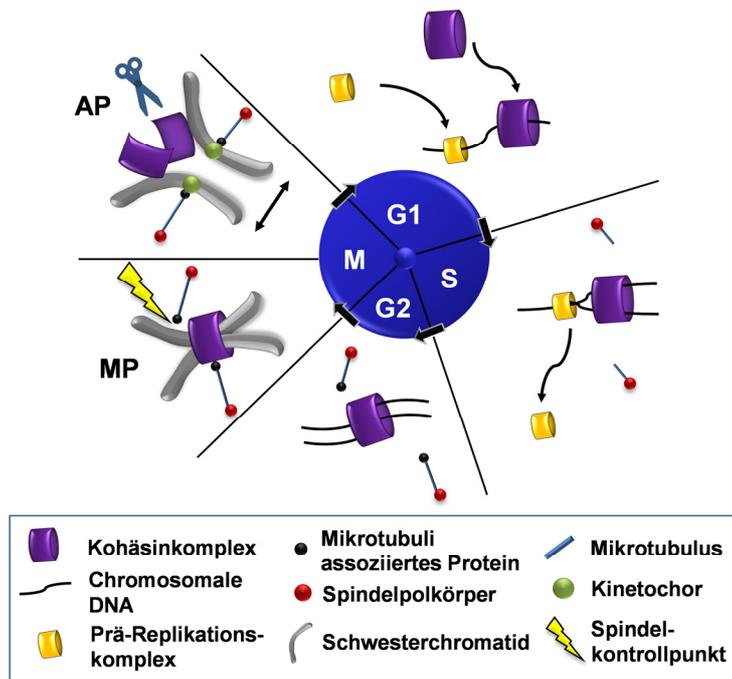
### 1.4.1 Der Chromosomenzyklus

Der Chromosomenzyklus ist in den Zellzyklus eingebettet, der sich in die G1-, S-, G2- und M-Phase gliedert (Abb. 1-4). Die Übergänge zwischen den Zellzyklusphasen werden von einer Zyklin-abhängigen Kinase (CDK) und der Ubiquitin-Ligase APC/C („Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome“) reguliert (Nasmyth 1993; Zachariae *et al.* 1996).

Der Chromosomenzyklus von *S. cerevisiae* beginnt in der frühen G1-Phase mit dem ersten Schritt des Replikationszyklus, in der der Prä-Replikationskomplex an die Replikationsursprünge des Chromatins assoziiert (Diffley 2004; Blow und Dutta 2005). Ein wichtiger Bestandteil des Prä-Replikationskomplexes ist das Mcm2-7 Hexamer (Cocker *et al.* 1996; Devault *et al.* 2002). Dieses besteht aus den sechs essentiellen Proteinen Mcm2p bis Mcm7p, die als ringförmiger Komplex an den DNA Strang binden und die DNA Replikation initialisieren (Tye 1999). Das Mcm2-7 Hexamer wandert während der S-Phase entlang der Replikationsgabel und ist damit direkt an der Duplikation der DNA beteiligt (Biswas-Fiss *et al.* 2005). Die Phosphorylierung des Prä-Replikationskomplexes in der S-Phase durch die verstärkte Aktivität von CDKs bewirkt dessen Dissoziation von der DNA und verhindert eine erneute Bindung an Replikationsursprünge, so dass DNA-Abschnitte nicht mehrfach repliziert werden (Nguyen *et al.* 2001).

Der Kohäsinkomplex bindet in der späten G1 Phase in der Nähe der Prä-Replikationskomplexe (Michaelis *et al.* 1997; Suter *et al.* 2004). Das V-förmige Heterodimer Smc1p-Smc3p bildet mit zwei weiteren Kohäsinen einen geschlossenen Ring, der in der späten G1-Phase insbesondere an der Zentromerregion der Chromosomen assoziiert (Guacci *et al.* 1997; Strunnikov und Jessberger 1999). Die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden wird während der S-Phase etabliert (Uhlmann und Nasmyth 1998). Der Kohäsinkomplex ist dabei neben weiteren Faktoren für die Ausbildung der Kohäsion unerlässlich. Eine Protease wird zu Beginn der Anaphase indirekt durch APC/C aktiviert und öffnet den Kohäsinsring, womit die Kohäsion aufgelöst wird (Ciosk *et al.* 1998).

Die Assemblierung der mitotischen Spindel ausgehend von den Spindelpolkkörpern (SPK), den Mikrotubuli organisierenden Zentren, beginnt in *S. cerevisiae* in der S-Phase, in *S. pombe* jedoch erst zu Beginn der Mitose (Byers und Goetsch 1974; Hagan und Hyams 1988). Der SPK entspricht dem Zentrosom höherer Eukaryoten und besteht aus drei Platten, einer äußeren und inneren zur Assoziation mit den zytoplasmatischen bzw. Kernmikrotubuli und einer zentralen Platte zur Verankerung in der Membran. Nahezu alle der 18 bislang identifizierten Komponenten des *S. cerevisiae* SPK sind essentiell, beispielsweise ein Protein der äußeren Platte, Spc97p, das einen Teil des Mikrotubuli generierenden, hochkonservierten  $\gamma$ -Tubulin-Komplex bildet (Knop und Schiebel 1997; Vinh *et al.* 2002; Jaspersen und Winey 2004).



**Abb. 1-4 Der Chromosomenzyklus in *S. cerevisiae*.**

In der frühen G1-Phase bindet der Prä-Replikationskomplex an die Replikationsursprünge der chromosomalen DNA, gefolgt von dem Kohäsinkomplex in der späten G1-Phase. In der S-Phase werden die Chromosomen repliziert, der Prä-Replikationskomplex dissoziiert von den Chromosomen, während der Kohäsinkomplex die duplizierten Chromatiden über die G2-Phase hinweg bis in die späte Mitose (M) insbesondere im Bereich der Zentromere zusammenhält. Bereits in der S-Phase wird von den gegenüberliegenden Spindelpolkörpern aus die mitotische Spindel, bestehend aus Mikrotubuli, synthetisiert. Über

Mikrotubuli assoziierte Proteine wird in der Metaphase (MP) der Mitose die bipolare Verknüpfung der Spindel mit den Kinetochoren der Schwesterchromatiden vermittelt. Eine fehlerhafte oder unvollständige Verknüpfung löst einen transienten Arrest durch den aktivierten Spindelkontrollpunkt aus, der im Zusammenspiel mit dem Kohäsinkomplex eine vorzeitige Trennung der Chromatiden verhindert. Sind die Chromatiden korrekt mit der Spindel verknüpft, wird der Spindelkontrollpunkt inaktiviert, die Kohäsion durch eine Protease (Separase (Schere)) zu Beginn der Anaphase (AP) gelöst und die Chromosomen werden zu den Zellpolen gezogen.

Die Mikrotubuli der mitotischen Spindel müssen in der Metaphase mit den Schwesterchromatiden verknüpft werden. Dies geschieht auf der Seite der Mikrotubuli über sog. Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs), die präferentiell am Plus-Ende der Mikrotubuli lokalisieren. Dazu zählt das Protein Bim1p, welches die Mikrotubuli Dynamik reguliert und Mitglied der evolutionär konservierten, mit dem Spindelkontrollpunkt interagierenden EB1 Familie ist (Schwartz *et al.* 1997; Tirnauer und Bierer 2000).

Die Verknüpfung auf Seiten der Schwesterchromatiden erfolgt über einen auf dem Zentromer assemblierten Multiproteinkomplex, dem Kinetochor (Tanaka *et al.* 2005). In *S. cerevisiae* enthält dieser Komplex mehr als 70 unterschiedliche Komponenten, die mit dem Zentromerchromatin oder den Mikrotubuli interagieren, oder als Brücke zwischen äußeren und inneren Kinetochorproteinen dienen (McAinsh *et al.* 2003; Meraldi *et al.* 2006). Zu den wichtigsten Brückenproteinen zählen Mcm21p und das essentielle Ame1p, die Bestandteile des sog. COMA Brückenkomplexes darstellen (De Wulf *et al.* 2003).

Proteine des Spindelkontrollpunkts (SKP) werden zu unvollständig oder fehlerhaft verknüpften Kinetochoren rekrutiert und überprüfen die korrekte bipolare Verknüpfung der Kinetochore mit der mitotischen Spindel (Rieder *et al.* 1995; Stern und Murray 2001). Der SKP beinhaltet einen Proteinkomplex, der u.a. aus den Proteinen Mad2p und Bub3p besteht (Li 1999). Bei nicht-biorientierter Verknüpfung löst dieser Proteinkomplex einen

Metaphase-Arrest aus (Amon 1999; Gorbsky 2001). Die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden bleibt durch den Arrest so lange aufrecht erhalten, bis alle Kinetochore korrekt mit der Spindel verknüpft wurden und unter Spannung stehen (Gorbsky 2001; Yu 2002). Durch eine SKP vermittelte Aktivierung des APC/C wird die Kohäsion aufgehoben und die Schwesterchromatiden werden in der Anaphase zu den neu geteilten Zellen segregiert, wo der Chromosomenzyklus von neuem beginnt.

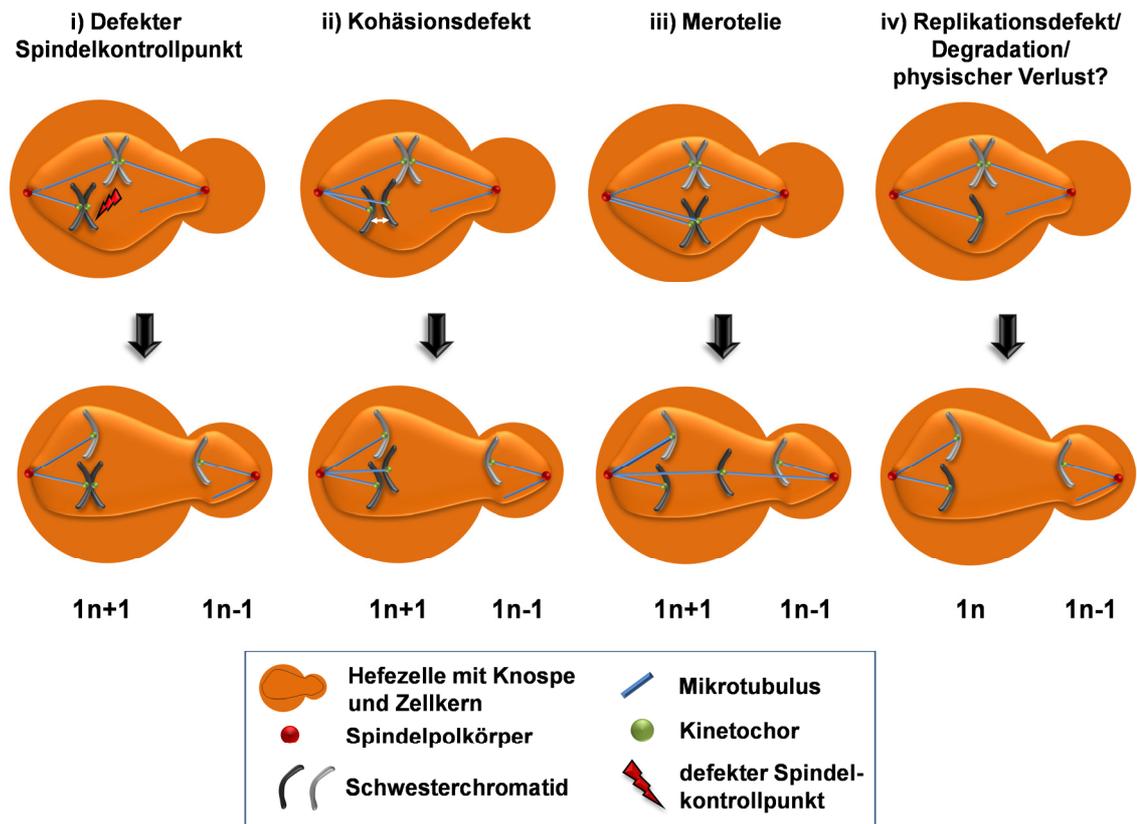
### 1.4.2 Die Entstehung von Aneuploidie durch Fehler im Chromosomenzyklus

Die meisten insbesondere an der Chromosomensegregation beteiligten Komponenten des Chromosomenzyklus können zur Entstehung aneuploider Zellen führen, wenn sie nicht in wildtypischer Form vorliegen.

Ein defekter SKP gilt als ein Hauptverursacher von Aneuploidie. In der Regel bindet in der Metaphase zuerst ein Spindelmikrotubulus an ein Kinetochor der durch Kohäsion verbundenen Schwesterchromatiden, man spricht von einer kurzzeitigen monotelischen Bindung (Abb. 1-5 i)). Durch eine Fehlfunktion des SKP wird ein Arrest verhindert, welcher der Zelle Zeit geben würde, die Verknüpfung vom zweiten Spindelpol zum anderen Schwesterkinetochor zu etablieren (amphitelische Verbindung) (Meraldi *et al.* 2004). Eine dauerhafte monotelische Verknüpfung führt unweigerlich zur Entstehung zweier aneuploider Zellen, da die Schwesterchromatiden gemeinsam zu einem Spindelpol gezogen werden. Dasselbe gilt für eine - aufgrund eines fehlerhaften SKPs nicht gelöste - syntelische Verbindung, bei der beide Schwesterkinetochore mit jeweils einem Mikrotubulus desselben Spindelpols verknüpft werden. In Hefestämmen mit fehlenden SKP Komponenten wie *Mad2* oder *Bub3* wurde eine erhöhte CIN nachgewiesen (Yuen *et al.* 2007; Tsuchiya *et al.* 2011). Eine reduzierte Menge des *Mad2* Proteins führt beispielsweise zu einem Ungleichgewicht des *Mad1p:Mad2p* Verhältnis, wodurch der SKP Arrest bei Chromosomen, die nicht unter Spannung stehen, nicht mehr ausgelöst wird (Barnhart *et al.* 2011).

Eine unzureichende Kohäsion zwischen Schwesterchromatiden kann zu deren vorzeitiger Trennung führen (Abb. 1-5 ii)). Sind die getrennten Schwesterkinetochore mit den Mikrotubuli von nur einem Spindelpol verbunden (syntelische Verknüpfung), kann der SKP dies aufgrund der fehlenden Kohäsion nicht erkennen, was letztlich in einer Fehlsegregation resultiert. In humanen Tumorgeweben wurden somatische Mutationen in Kohäsionsgenen identifiziert, deren Homologe in *S. cerevisiae* CIN induzieren (Spencer *et al.* 1990; Yuen *et al.* 2007; Barber *et al.* 2008). Dazu zählten die Gene nahezu aller Kohäsinkomplexkomponenten, u.a. auch *SMC1*. Es wurde bislang jedoch nicht gezeigt,

auf welche Weise diese Mutationen CIN verursachen. Auch eine Überexpression der Kohäsionsregulatoren Securin und Separase kann CIN hervorrufen, und es wird vermutet, dass die kohäsionsbedingte CIN durch eine vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden kurz nach der Replikation oder durch Fehler in der Chromosomentrennung zu Beginn der Anaphase hervorgerufen wird (Zhang *et al.* 2008; Thompson *et al.* 2010).



**Abb. 1-5 Mögliche Wege zur Entstehung von Aneuploidie in *S. cerevisiae*.**

Schematische Darstellung häufiger Ursachen für die Entstehung von Aneuploidie in *S. cerevisiae*. Oben: Metaphasezellen, bei denen die Kinetochor-Mikrotubulus Verknüpfung etabliert wird. Darunter: In der Anaphase werden die Chromosomen auf Mutter- und zukünftige Tochterzelle verteilt. i) Ein defekter Spindelkontrollpunkt kann dazu führen, dass eine monotelische (von einem Spindelpol ausgehend) Verknüpfung eines der beiden Schwesterkinetochore (dunkelgrau) mit einem Mikrotubulus nicht korrigiert wird. Beide Schwesterchromatiden werden dadurch zu einem Pol gezogen, so dass zwei aneuploide Folgezellen ( $1n+1$  bzw.  $1n-1$ ) entstehen. ii) Eine geschwächte Kohäsion zwischen den Zentromeren der Schwesterchromatiden kann deren vorzeitige Trennung verursachen (weißer Doppelpfeil). Ohne Kohäsion zwischen den getrennten Chromatiden wird der Spindelkontrollpunkt nicht aktiv und die Verknüpfung beider Schwesterkinetochore mit jeweils einem Mikrotubulus des linken Spindelpols (Syntelie) wird nicht korrigiert. Es kommt zu einer Fehlsegregation. iii) Bei einer Merotelie ist ein Kinetochor der Schwesterchromatiden fälschlicherweise mit Mikrotubuli beider Spindelpole verbunden. Wird diese doppelte Verknüpfung nicht aufgelöst, kommt es in der Anaphase zu einer verzögerten Segregation dieses Chromatids („Lagging Chromosome“) und dadurch häufig zu einer Fehlverteilung. iv) Auch der komplette Verlust eines Chromosoms führt zu Aneuploidie: Wird ein Chromosom nicht repliziert oder geht auf andere Weise nach der Replikation (Degradation/physischer Verlust) verloren, so entsteht durch die Zellteilung eine euploide ( $1n$ ) und eine aneuploide Zelle ( $1n-1$ ).

Eine merotelische Verknüpfung, bei der ein Schwesterkinetochor fälschlicherweise mit Mikrotubuli beider Spindelpole verknüpft wird, kann bei ausbleibender Korrektur in einer

Fehlsegregation resultieren (Abb. 1-5 iii)) (Tanaka *et al.* 2005). Die Verknüpfung eines Kinetochors mit beiden Spindelpolen und die dadurch entstehende Zugkraft von zwei Seiten können dazu führen, dass dieses Chromatid (zurückbleibendes Chromatid oder „Lagging Chromosome“) in der Anaphase langsamer als die korrekt verknüpften Chromosomen segregiert wird. Merotelische Verknüpfungen werden früh in der Mitose ausgebildet und führen nicht zu einer Aktivierung des SKP, sondern werden im Normalfall durch die Aurora B Kinase aufgelöst und können korrigiert werden (Cimini *et al.* 2004; Knowlton *et al.* 2006; Cimini 2008). Als mögliche Auslöser merotelisch verursachter Aneuploidie gelten zahlreiche Faktoren wie eine fehlgebildete Chromatinstruktur besonders im Zentromerbereich, eine vorzeitige Trennung von Schwesterchromatiden durch fehlende Kohäsion, eine erhöhte Anzahl von SPKs, inhibierte Aurora B Aktivität, oder fehlende/fehllokalisierte Proteine der Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfung (z.B. der EB1 Familie) (Cimini *et al.* 2006; DeLuca *et al.* 2006; Draviam *et al.* 2006; Cimini 2007; Cimini 2008). Die starke Korrelation zwischen dem gleichzeitigen Auftreten von zurückbleibenden Chromatiden und einer hohen Rate von Fehlsegregationen deutet darauf hin, dass merotelisch verknüpfte Chromosomen fehlverteilt werden und CIN verursachen (Cimini *et al.* 2001; Bakhoun *et al.* 2009; Bakhoun *et al.* 2009). Tatsächlich werden die langsam segregierenden Chromatiden jedoch in der Regel zum korrekten Zellpol gezogen und sind lediglich ein Hinweis auf generelle Defekte in der Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfung (z.B. Syntelie) in humanen Zellen (Thompson und Compton 2011).

In Hefezellen werden häufig Chromosomenverluste beobachtet, die nicht auf einer Fehlsegregation (2:0 Segregation) beruhen (Abb. 1-5 iv)). Diploide *S. cerevisiae* Zellen sind im Gegensatz zum Menschen vergleichsweise tolerant gegenüber Monosomien ( $2n-1$ ) (Reid *et al.* 2008). Wie es zu dem Verlust eines kompletten Chromosoms (1:0 Segregation) in *S. cerevisiae* kommt, ist nicht hinreichend geklärt, denkbar sind eine ausbleibende oder fehlerhafte Replikation, ein Abbau oder ein physischer Verlust des Chromosoms (Hieter *et al.* 1985). Eine Rolle könnten Gene des DNA-Schadenkontrollpunkts und der Rekombinationsreparatur in der S-Phase spielen, deren Fehlfunktion im Gegensatz zu Genen des G<sub>2</sub>/M-Phase Kontrollpunkts erhöhten Chromosomenverlust hervorruft (Klein 2001). Teilweise werden diese Gene auch für die Integrität der Telomere benötigt. Fehlende Telomere führen zum Verlust des betroffenen Chromosoms innerhalb weniger Zellteilungen (Sandell und Zakian 1993; McCulley und Petes 2010). Kürzlich wurde gezeigt, dass auch Aneuploidie selbst einen erhöhten Chromosomenverlust auslösen kann (Sheltzer *et al.* 2011).

Wird in einer Zelle ein Schwesterchromatid nicht repliziert oder zwischen Replikation und beendeter Mitose verloren, so erhält in der folgenden Zellteilung lediglich eine der

Folgezellen dieses Chromosom, es entstehen somit eine euploide ( $1n$ ) und eine aneuploide Zelle ( $1n-1$ ).

In welchem Maße Aneuploidie im Alter zunimmt und ob hauptsächlich ein einzelner oder mehrere der hier beschriebenen Prozesse zu ihrer Entstehung im Alter führen, ist nicht bekannt. Mit der Hefe *S. cerevisiae* als Modellsystem für Alterung wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, diese Fragen zu beantworten.

## 1.5 Die Hefe als Modellsystem für Alterung

In der Altersforschung haben sich die Hefen *S. pombe* und insbesondere *S. cerevisiae* bereits seit Jahren als Modellorganismen bewährt (Sinclair *et al.* 1998; Piper 2006; Steinkraus *et al.* 2008; Roux *et al.* 2010). Die unkomplizierte Kultivierung bei einer kurzen Generationszeit, effiziente genetische Manipulation mittels homologer Rekombination, und einfach durchführbare Paarungstechniken qualifizieren diese Hefen sowohl für molekularbiologische als auch klassische genetische Analysen (Botstein und Fink 1988; Zhao und Lieberman 1995).

Obwohl einige Aspekte der Hefealterung spezifisch für diese Organismen sind, haben zahlreiche Studien zur Identifizierung von evolutionär konservierten Genen und Signalwegen geführt, die in anderen Modellorganismen wie dem Fadenwurm, der Taufoliege oder der Maus ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Lebensspanne ausüben (Tissenbaum und Guarente 2002; Smith *et al.* 2008; Kaeberlein 2010). So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass eine verringerte Aktivität des „Target of Rapamycin“ (TOR) Signalwegs, der eine wichtige Rolle bei der Wachstumskontrolle, im Metabolismus und bei der Stressantwort spielt, die Lebensspanne in diesen Organismen verlängert (Kaeberlein *et al.* 2005; Powers *et al.* 2006; Wullschleger *et al.* 2006; Harrison *et al.* 2009; Selman *et al.* 2009; Stanfel *et al.* 2009).

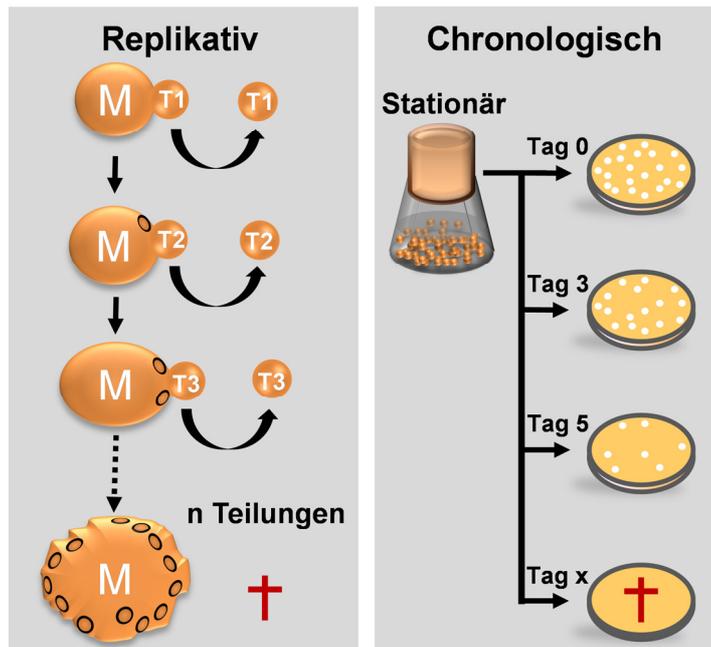
Zwei unterschiedliche Alterungsmodelle wurden in der Hefe etabliert (Abb. 1-6):

1. Replikative Alterung:

Die replikative Lebensspanne (RLS) ist definiert als die Anzahl der Tochterzellen, die eine Mutterzelle generieren kann, bevor sie stirbt (Mortimer und Johnston 1959; Muller *et al.* 1980).

2. Chronologische Alterung:

Die chronologische Lebensspanne (CLS) beschreibt den Zeitraum, den eine Zellpopulation in der stationären Phase, in der keine Zellteilung stattfindet, überleben kann (Longo *et al.* 1996; Fabrizio *et al.* 2001; Fabrizio und Longo 2007).



**Abb. 1-6 Replikative und chronologische Alterung in der Hefe.**

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Alterungsformen in der Hefe. Die replikative Lebensspanne (links) am Beispiel von *S. cerevisiae* Zellen (Kugeln) gibt die Anzahl der Teilungen ( $n$ ) oder Tochterzellen ( $T$ ) an, die eine Mutterzelle ( $M$ ) durchführen bzw. produzieren kann, bevor sie stirbt (Kreuz).

Morphologisch unterscheidet sich in *S. cerevisiae* die Mutter- von der Tochterzelle, die durch Knospung von der Mutter abgeschnürt wird (gebogener Pfeil), in erster Linie durch ihre Größe, die mit jeder Zellteilung weiter zunimmt sowie durch die Zunahme von Knospungsnarben (schwarze

Kreise) und eine faltige, raue Oberfläche im hohen Alter (links unten). Die chronologische Lebensspanne (rechts) beschreibt die Zeitspanne, die eine Zellpopulation in der stationären Phase, in der sich die Zellen nicht teilen, überleben kann. Die Lebensfähigkeit der Zellen (Kugeln) einer stationären Kultur wird über ihre Fähigkeit bestimmt, nach  $x$  Tagen in der stationären Phase wieder in den Zellzyklus eintreten und Kolonien (weiß) unter guten Nährstoffbedingungen (gelbes Nährmedium) bilden zu können. Wird ein festgelegter Prozentwert heranwachsender Kolonien unterschritten, gilt die Kultur als tot (Kreuz).

### 1.5.1 Replikative Alterung

Die RLS wird als Modell für die Lebensspanne proliferierender Zellen in höheren Eukaryoten angesehen. Viele adulte Stammzellen, beispielsweise die Neuroblasten im Gehirn, weisen ebenfalls ein begrenztes replikatives Potential auf (Hayflick und Moorhead 1961; Bergman *et al.* 1996; Lin und Schagat 1997).

Die Bestimmung der RLS in *S. cerevisiae* ist aufgrund der asymmetrischen Zellteilung vergleichsweise einfach. Die asexuelle Zellteilung erfolgt über Knospung, bei der die Mutterzelle eine im Vergleich zu ihrer Größe wesentlich kleinere Knospe (Tochterzelle) ausbildet, die in der Zytokinese abgeschnürt wird und eine Knospungsnarbe auf der Zelloberfläche der Mutter hinterlässt (Abb. 1-6). Neben diesen mikroskopisch sichtbaren Faktoren äußert sich die Asymmetrie auch darin, dass Alterungsfaktoren in der Mutterzelle zurückgehalten werden und dadurch eine Verjüngung der Tochterzelle ermöglichen. Dazu zählen oxidativ beschädigte Proteine, extrachromosomale ringförmige ribosomale DNA Moleküle (ERC), die hefespezifisch mit steigendem replikativen Alter als Ausschnürungen der chromosomalen DNA entstehen, und funktionell beeinträchtigte Mitochondrien (Abb. 1-7) (Sinclair und Guarente 1997; Aguilaniu *et al.* 2003; Erjavec und Nystrom 2007; Ganley *et al.* 2009). Im Falle der ERCs wird die asymmetrische Verteilung durch eine Diffusionsbarriere in der Membran des Zellkerns gewährleistet, die

Segregation der oxidativ beschädigten Proteine wird durch das Aktin-Zytoskelett reguliert und die Mitochondrienverteilung geschieht in Abhängigkeit einer mitochondrialen ATPase (ATP2) (Lai *et al.* 2002; Erjavec und Nystrom 2007; Shcheprova *et al.* 2008). Weitere nur in sehr alten Mutterzellen beobachtete Phänotypen sind erhöhte Konzentrationen von schädlichen Sauerstoffradikalen (ROS; Reactive Oxygen Species) mitochondrialen Ursprungs und Apoptose ähnliche Phänotypen, wie eine Externalisierung des Zellmembranbestandteils Phosphatidylserin und DNA Fragmentierung (Laun *et al.* 2001) Während die asymmetrische Teilung in *S. cerevisiae* eine eindeutige Unterscheidung zwischen Mutter- und Tochterzelle ermöglicht, ist die Anwendung des replikativen Alterungsmodells auf die Spalthefe *S. pombe* aufgrund der symmetrischen Teilung jedoch äußerst schwierig. Zwar wurde auch in *S. pombe* eine Zytoskelett-abhängige asymmetrische Verteilung oxidativ geschädigter Proteine nachgewiesen, doch die symmetrische Teilung durch Spaltung in der Mitte ermöglicht eine morphologische Unterscheidung zwischen einer Ursprungs- und Folgezelle anhand der Größe erst nach einigen Teilungen (Barker und Walmsley 1999; Erjavec *et al.* 2008).

## 1.5.2 Chronologische Alterung

Das Überleben in der stationären Phase entspricht im Wesentlichen ausdifferenzierten postmitotischen (nicht teilend) Zellen in den Geweben höherer Eukaryoten, mit einem wichtigen Unterschied: postmitotische menschliche Zellen sind metabolisch sehr aktiv und erfüllen zahlreiche Aufgaben für den Organismus, während Hefezellen aus Gründen des Nährstoffmangels postmitotisch werden und die Metabolismusaktivität auf ein geringes Maß reduzieren müssen. Nur in stationären Hefezellen spielt daher der Umgang mit fehlenden Nährstoffen und dem dadurch entstehenden Stress eine zentrale Rolle für das Überleben (Sinclair *et al.* 1998; Laun *et al.* 2006; Piper 2006; Kaeberlein 2010). Das Modell der chronologischen Alterung lässt sich sehr gut auf beide Hefespezies anwenden, wobei es in *S. pombe* erst seit wenigen Jahren Anwendung findet (Roux *et al.* 2006). Die Zahl der chronologischen Alterungsstudien in der Spalthefe nimmt jedoch stetig zu (Übersicht in: (Roux *et al.* 2010)).

Hefezellen, die in die stationäre Phase eintreten, durchlaufen einen Prozess genetisch kontrollierter Veränderungen, beispielsweise eine Umgestaltung der Zellwand oder die Speicherung von Kohlenhydraten in Form von Glykogen und Trehalose, die nötig sind, um Stresseinflüsse unter Nährstoffmangel zu überleben. Die einsetzende chronologische Alterung ist durch eine Zunahme zellulärer Schäden über die Zeit gekennzeichnet (Abb. 1-7) (Arcangioli und Ben Hassine 2009). Mit steigendem Alter häufen sich oxidativ geschädigte Proteine und mitochondriale Schäden an, zudem wird die Glucose des

Mediums zu Ethanol fermentiert und anschließend in toxische Essigsäure umgewandelt, die als ein Hauptverursacher einer beschleunigten chronologischen Alterung in *S. cerevisiae* identifiziert wurde (Burtner *et al.* 2009; Kaeberlein 2010).

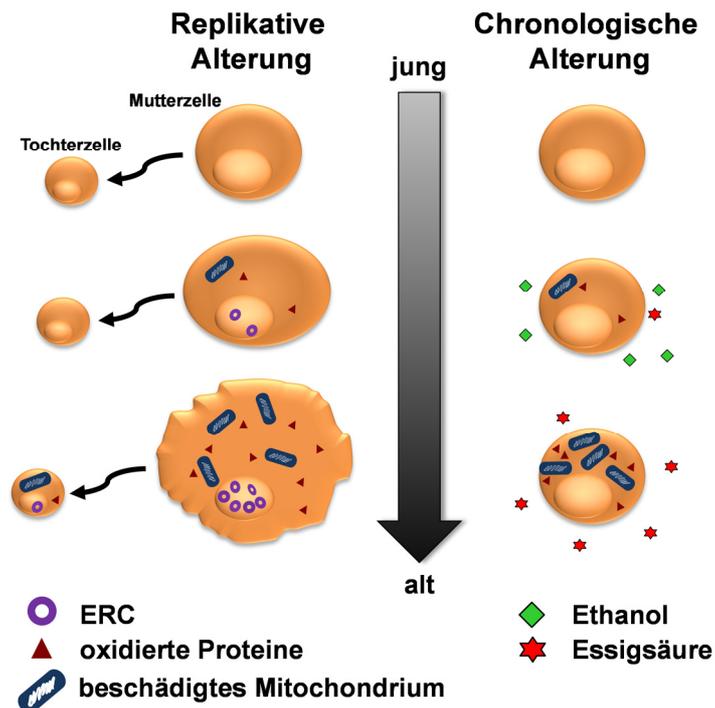
Für *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass sich eine stationäre Kultur aus sog. ruhenden und nicht-ruhenden Zellen zusammensetzt (Allen *et al.* 2006). Die ruhenden Zellen entstehen erst während der letzten Teilung vor Eintritt in die stationäre Phase und gelten als eine Subpopulation von Tochterzellen, da sie noch keine Knospen ausgebildet haben. Sie weisen eine größere Dichte, Stressresistenz und eine längere Lebensspanne auf als die heterogenen nicht-ruhenden Zellen, die im großen Maße ROS akkumulieren und schneller die Apoptose einleiten (Li *et al.* 2009). Die Proteinzusammensetzung in den beiden Populationen unterscheidet sich deutlich, es wird angenommen, dass ruhende Zellen in erster Linie der Erhaltung genomischer Stabilität und Stressresistenz innerhalb der Kultur dienen, während nicht-ruhende Zellen durch genetische Variation eine Anpassung an veränderte Bedingungen ermöglichen und Nährstoffe für die ruhenden Zellen bereitstellen (Aragon *et al.* 2008; Davidson *et al.* 2011). Ob eine Auftrennung in ruhende und nicht-ruhende Zellen auch in einer stationären *S. pombe* Population stattfindet, ist nicht bekannt.

### 1.5.3 Replikative und chronologische Alterung im Vergleich

Die replikative und chronologische Alterung zeigen zum Teil Ähnlichkeiten, wie die Akkumulation beschädigter Proteine und Mitochondrien in Zellen mit steigendem Alter (Abb. 1-7). Zudem weisen chronologisch gealterten Hefezellen, die aus einer stationären Kultur entnommen und auf ihr replikatives Potential hin untersucht werden, gegenüber chronologisch jungen Zellen eine deutlich reduzierte RLS auf. Das deutet auf einen gemeinsamen Alterungsfaktor in den Alterungsmodellen hin (Ashrafi *et al.* 1999; Piper *et al.* 2006).

Grundsätzlich handelt es sich bei den beiden Alterungsformen jedoch um unterschiedliche Vorgänge, was ein Vergleich im großen Maßstab von in Langlebigkeit involvierten Genen zeigte: Lediglich 5 von 573 Stämmen, in denen Gene deletiert wurden, die in Alterungsvorgänge involviert sind (z.B. ein Stamm mit deletiertem *TOR1* (TOR Signalweg)), wiesen in beiden Alterungsmodellen Langlebigkeit auf (Kaeberlein *et al.* 2005; Powers *et al.* 2006). Ein quantitativer Vergleich zwischen dem replikativen und chronologischen Alterungsverlauf dieser langlebigen Deletionsstämmen ließ jedoch keine Korrelation erkennen, was auf unabhängige Mechanismen in der Vermittlung von Langlebigkeit hindeutet (Laun *et al.* 2006). Zudem zeigten 34 der Deletionsmutanten einen gegensätzlichen Effekt auf die beiden Lebensspannen. Beispielsweise verkürzt das

Fehlen von *SIR2*, welches eine Histondeacetylase der konservierten Sirtuinfamilie kodiert, die RLS, während die CLS insbesondere bei gleichzeitiger Reduktion der Kalorienzufuhr verlängert wird (Kaeberlein *et al.* 1999; Fabrizio *et al.* 2005; Kennedy *et al.* 2005). Sir2p reguliert zahlreiche Alterungsprozesse, es verhindert u.a. die Bildung von ERCs in *S. cerevisiae* und ist an der asymmetrischen Verteilung oxidativ geschädigter Proteine sowie der Stressantwort beteiligt (Kaeberlein *et al.* 1999; Fabrizio *et al.* 2005; Erjavec und Nystrom 2007).



**Abb. 1-7 Die Akkumulation von Schäden verursacht replikative und chronologische Alterung in der Hefe.**

Während der replikativen Alterung akkumulieren mit zunehmender Teilungszahl Alterungsfaktoren (ERCs, oxidierte Proteine, beschädigte Mitochondrien) im Zytoplasma und Zellkern (hellbraun) der *S. cerevisiae* Mutterzelle, die nicht an die Tochter vererbt werden (gebogener Pfeil). Erst im sehr hohen replikativen Alter (unten) werden diese Faktoren auch an die Tochterzelle weitergegeben, die dadurch vorzeitig altert. Auch bei der chronologisch alternden Zelle häufen sich oxidierte Proteine und mitochondriale Schäden mit dem Alter an und beeinflussen vermutlich die Lebensspanne. Zusätzlich entsteht durch Fermentation Ethanol im umgebenden Medium, welches in

toxische Essigsäure umgewandelt wird. Diese verkürzt die chronologische Lebensspanne zumindest in *S. cerevisiae*. Modifizierte Abbildung nach (Kaeberlein 2010).

Bis auf die in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Auswirkungen von Polyploidie und Disomien auf die CLS von *S. cerevisiae* war bislang nichts über den Zusammenhang von Aneuploidie und der Alterung in der Hefe bekannt. In dieser Arbeit habe ich durch die Verknüpfung etablierter Aneuploidiesysteme in *S. cerevisiae* und *S. pombe* mit den Modellen der chronologischen und replikativen Alterung diesen Zusammenhang untersucht.

## 1.6 Werkzeuge zur Aufklärung des Zusammenhangs von Aneuploidie und Alterung in *S. cerevisiae* und *S. pombe*

In dieser Arbeit wurden verschiedene Werkzeuge eingesetzt, um die Zusammenhänge zwischen Aneuploidie und RLS sowie CLS aufzuklären. Dabei handelt es sich zum einen um artifizielle Hefechromosomen (YACs) in *S. cerevisiae*, mit deren Hilfe ich die Zunahme von Aneuploidie mit dem replikativen Alter sowie die Auswirkung der Anwesenheit zusätzlicher Chromosomen *per se* (exogene Aneuploidie durch nicht hefeeigene chromosomale DNA) auf die RLS analysiert habe. Zum anderen wurde eine verkürzte Version von Chr. III (Minichromosom Ch16) in *S. pombe* erstmals dazu genutzt, um die Folgen endogener Aneuploidie (hefeeigene chromosomale DNA) auf die CLS der Spalthefe zu untersuchen.

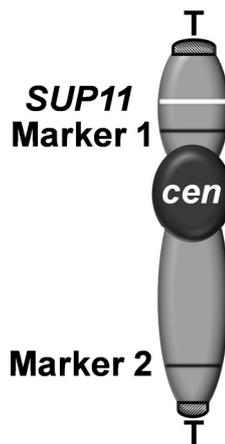
### 1.6.1 Artifizielle Hefechromosomen (YACs) als zusätzliche exogene Chromosomen in *S. cerevisiae*

Künstliche exogene Hefechromosomen werden in *S. cerevisiae* bereits seit Jahrzehnten zur Bestimmung der Chromosomenstabilität genutzt (Murray und Szostak 1983; Hieter *et al.* 1985; Burke *et al.* 1987). Das gilt insbesondere für YACs, die neben Hefeselektionsmarkern einen Replikationsursprung (ARS, „Autonomous Replicating Sequence“) zur Vervielfältigung, ein Hefezentromer (*CEN*) zur effizienten Weitergabe in der Mitose und Meiose und Telomere zum Schutz der Chromosomenenden enthalten (Abb. 1-8). Der Rest des YACs besteht aus humaner oder Maus-DNA (Burke *et al.* 1987). YACs wurden ursprünglich entwickelt, um spezifische Faktoren zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Genauigkeit der meiotischen Segregation nehmen (Sears *et al.* 1992; Sears *et al.* 1995). In einer neueren Studie wurden YACs gezielt genutzt, um den Einfluss von exogener Aneuploidie auf die Zellphysiologie zu bestimmen (vgl. Kap. 1.3) (Torres *et al.* 2007).

Auch zur Analyse mitotischer Chromosomeninstabilität wurden YACs verwendet: Die Verlustrate eines YACs ist in vielen Kinetochormutanten und in haploiden Hefezellen, die disomisch in Bezug auf endogene Chromosomen sind, erhöht (Sheltzer *et al.* 2011).

Zur schnellen visuellen Bestimmung eines Chromosomenverlusts hat sich das *ade2-101/SUP11* System bewährt. Trägt ein haploider, durch die *ade2-101<sup>ochre</sup>* Stopp-Kodonmutation adeninauxotropher Hefestamm ein YAC mit dem *ochre*-Suppressorgen *SUP11* (Abb. 1-8), so vermittelt die von *SUP11* kodierte Suppressor tRNA<sub>TYR</sub> (durch ein

Überlesen des vorzeitigen Stopp-Kodons bei der Translation) Adeninprototrophie, und die Zelle bildet eine weiße Kolonie auf Medium mit limitiertem Adeninzusatz.



**Abb. 1-8 Das künstliche Hefenchromosom (YAC).** Schematische Darstellung eines YACs, bestehend aus Telomeren (T), Zentromer (*cen*), und Selektionsmarkern (Marker 1/2) für die beiden Chromosomenarme. Zusätzlich trägt dieses YAC das *SUP11* tRNA Gen. Der Rest des YACs besteht aus humaner oder Maus-DNA (hellgrau).

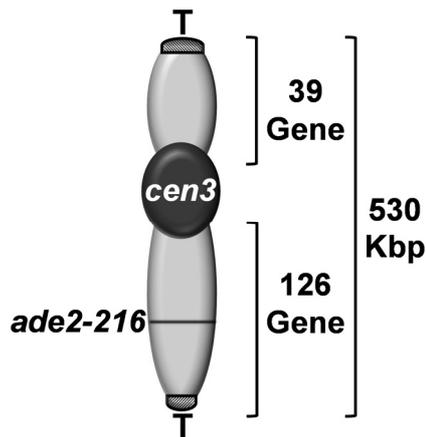
Der Verlust des YACs führt zu Adeninauxotrophie, was durch die Entstehung eines roten Sektors innerhalb einer Kolonie sichtbar wird (Hieter *et al.* 1985). Mit Hilfe dieses Farbsystems wurden zahlreiche Gene identifiziert, die an der Entstehung von genomischer Instabilität und CIN beteiligt sind (Kouprina *et al.* 1988; Spencer *et al.* 1990; Kouprina *et al.* 1993; Ouspenski *et*

*al.* 1999; Yuen *et al.* 2007; Stirling *et al.* 2011). Der Einfluss von YACs auf die Alterung bzw. die Genauigkeit der Weitergabe eines YACs bei zunehmendem Alter der Zelle wurden bislang nicht untersucht.

## 1.6.2 Ein Minichromosom als zusätzliches endogenes Chromosom in *S. pombe*

Die Spaltheefe *S. pombe* enthält drei Chromosomen mit einer Größe zwischen 3,5 und 5,7 Mbp, auf denen etwa 5000 Gene lokalisiert sind. Aneuploidien wirken sich entsprechend schädlich auf die Zellen aus, sowohl Mono- als auch Disomien sind in der Regel letal (Niwa und Yanagida 1985). Nur eine Disomie für das kleinste Chromosom, Chr. III, ist lebensfähig, dabei aber höchst instabil. Durch  $\gamma$ -Bestrahlung eines für Chr. III disomischen Stamms wurde jedoch eine stark verkürzte Version dieses Chromosoms generiert, das Minichromosom Ch16 (Niwa *et al.* 1986).

Bei einer Größe von 530 Kbp enthält es 165 an das Zentromer (*cen3*) angrenzende Gene, von denen über  $\frac{3}{4}$  auf dem längeren rechten Arm des Minichromosoms lokalisiert sind (Abb. 1-9) (Chikashige *et al.* 2007). Als Selektionsmarker dient das *ade2-216* Allel, welches zusammen mit einem *ade2-210* Allel auf Chr. III durch intragene Komplementation Adeninprototrophie vermittelt. Das Minichromosom Ch16 weist eine hohe meiotische und mitotische Stabilität auf, die mitotische Verlustrate liegt bei  $1,5 \times 10^{-4}$  (Fleig *et al.* 1996). Auch kürzere Varianten von Ch16 wurden generiert, sind jedoch meiotisch und mitotisch weniger stabil (Niwa *et al.* 1989).



**Abb. 1-9 Das Mini-chromosom Ch16.**

Schematische Darstellung des Minichromosoms Ch16. Bei einer Länge von 530 Kilobasenpaaren (Kbp) enthält diese verkürzte Version von Chr. III 39 Gene auf dem kurzen und 126 Gene auf dem langen Arm, Telomere (T), ein Zentromer (*cen3*) sowie den Selektionsmarker *ade2-216*.

Da das Minichromosom nicht essentiell ist, wird es in erster Linie genutzt um über dessen Verlust Genen zu identifizieren und Prozesse aufzuklären, die für die Genomstabilität benötigt werden

(Takahashi *et al.* 1994; Fleig *et al.* 1996; Javerzat

*et al.* 1996; Ekwall *et al.* 1999). Dabei hat die Anwesenheit von Ch16 einen großen Einfluss auf den Zellhaushalt: Die Expression der Ch16 kodierten Gene steigt etwa proportional zur vorliegenden Kopienzahl an, und auch die Expression einiger monosomisch vorliegender Gene wird durch die Präsenz des Minichromosoms verändert (Chikashige *et al.* 2007). Die Auswirkungen der durch Ch16 verursachten Aneuploidie auf die Zellphysiologie (insbesondere Stresssensitivität) und auf die chronologische Alterung wurden bislang nicht untersucht.

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den bislang unzureichend verstandenen Zusammenhang zwischen Aneuploidie und Alterung mit Hilfe der Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* als Modellsystem für den Alterungsprozess weiter aufzuklären. Um dies zu erreichen, wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt:

Zum einen sollte mit Hilfe eines neu entwickelten Systems erstmals *in vivo* verfolgt werden, in welchem Maße und auf welche Weise Aneuploidie mit steigendem Alter zunimmt. Dabei sollte die Genauigkeit der Weitergabe eines artifiziellen Chromosoms (YAC) in replikativ alternden, wildtypischen *S. cerevisiae* Zellen direkt während der Zellteilung anhand einer Veränderung der Koloniefarbe bestimmt werden. Durch die Analyse der Chromosomenstabilität in neu generierten Deletionsstämmen des Chromosomenzyklus sollte mit diesem System zudem der Mechanismus identifiziert werden, der die Aneuploidie in alternden Zellen verursacht.

Zum anderen sollte eine Analyse der Lebensspanne von aneuploiden Hefezellen Aufschluss darüber geben, ob die Anwesenheit zusätzlicher Chromosomen nur in Abhängigkeit der dort kodierten Gene einen Einfluss auf die Lebensspanne ausübt.

Dabei sollte einerseits die replikative Lebensspanne von haploiden und diploiden *S. cerevisiae* Stämmen untersucht werden, die ein YAC tragen, welches zu 97 % aus Human-DNA besteht. Dieses YAC erhöht somit in erster Linie die chromosomale Last, nicht aber die Gendosis. Andererseits sollte die Bestimmung der chronologischen Lebensspanne von haploiden *S. pombe* Zellen, die ein zusätzliches Minichromosom mit 165 *S. pombe* eigenen Genen enthalten, den Effekt einer erhöhten Gendosis und einer dadurch veränderten Proteinzusammensetzung auf die Lebensfähigkeit aufklären. Eine weitergehende Analyse sollte dann der Identifizierung von Genen auf diesem Minichromosom dienen, die eine Veränderung der Lebensspanne bewirken können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
$\lambda$ Phagen DNA	MBI Fermentas
Adenin	Roth
Agar	Difco
Agarose: SeaKem LE	Biozym
Ammoniumchlorid "cell culture tested"	Sigma-Aldrich
Bacto Trypton	Difco
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Roth
Calcofluor White	Sigma-Aldrich
Casein Pepton	Difco
Desoxynukleosid-5'-Triphosphat (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	J.T. Baker
DNA Grade Agarose	Bio-Rad
Essigsäure	Riedel-deHaën
Ethanol (96 %)	J.T. Baker
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ )	Roth
Glucose Monohydrat	Roth
Glutaminsäure	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Glyzerin	Roth
Hefe Stickstoffquelle (YNB)	Difco
Hefeextrakt	Difco
Histidin	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Lachssperma DNA	Sigma-Aldrich
Leucin	Roth
Lithiumacetat (LiOAc)	Roth
LMP CHEF Gel Agarose	Bio-Rad
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth
Natriumacetat (NaOAc)	Roth
Natriumcarbonat ( $\text{NaCO}_3$ )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
N-Lauroylsarcosin	Sigma-Aldrich
Pepton	Difco
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Roth
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Scientific
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Tryptophan	Roth
Uracil	Roth
Vectashield (Anti-fade, mounting fluid)	Linaris

## 2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Axiostar Plus Mikroskop	Zeiss
Biofuge pico (mit Heraeus Sepatech-Rotor #3324)	Heraeus
Biofuge Primo R	Heraeus
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschränke	Binder/Heraeus
CHEF III Pulsfeldgelelektrophoresegerät	Bio-Rad
Colony Counter 50971	Bioblock Scientific
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
MSM 300 Mikromanipulator	Singer Instruments
Multifuge X3R	Thermo Scientific
Multitron Inkubationschüttler mit Befeuchtung	Infors HT
Nanodrop Spektralphotometer	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
PCR-Thermocycler	MJ Research
Precellys Homogenisator	PEQLAB
Schüttler Polymax 2040	Heidolph
Speed-Vac Vacuum-Concentrator	Savant
Stereomikroskop SMZ-2T	Nikon
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin

## 2.3 Antikörper

Primärantikörper	Ursprung	Verdünnung	Referenz
GFP	Kaninchen	1:200	Invitrogen (A11122)
TAT-1 (Tubulin)	Zellkulturüberstand (Maus)	1:5	K. Gull (Woods <i>et al.</i> 1989)

Sekundärantikörper	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Cy3-Anti Kaninchen	Schaf	1:500	Sigma (C2306)
FITC-Anti Maus	Kaninchen	3:500	Sigma (F9137)

## 2.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Pfx</i> DNA Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Roche
RNase A	Sigma-Aldrich
<i>Taq</i> DNA Polymerase	eigene Herstellung
Zymolyase	Seikagaku
$\beta$ -Glucuronidase	Sigma-Aldrich

## 2.5 Kits

Kit	Hersteller
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen
QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen

## 2.6 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
Anti-Biotin MicroBeads	Miltenyi Biotec
LS Depletion Columns	Miltenyi Biotec
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Halb-Mikro Küvetten (1,6 ml)	Sarstedt
Petrischale 150 mm Ø	Sarstedt
Rundfilter Cellulose 150 mm Ø	Schleicher & Schüll
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt

## 2.7 Stämme

### 2.7.1 *S. pombe* Stämme

#### 2.7.1.1 Ausgangsstämme

Nummer	Genotyp	Herkunft
UFY 40	<i>ade6-M210, leu1-32, h<sup>-</sup></i>	P. Nurse
UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [ade6-M216], h<sup>-</sup></i>	M. Yanagida
UFY 108	<i>ade6-M210, ura4-Dx, Ch16 [ade6-M216], h<sup>+</sup></i>	M. Yanagida
UFY 221	<i>leu1-32, ura4-Dx, lacI-GFP/his7<sup>+</sup>, lacO-repeat/lys1<sup>+</sup>, h<sup>+</sup></i>	M. Yanagida*
UFY 1490	<i>leu1-32, CH12LE [LEU2], h<sup>-</sup></i>	M. Yanagida
UFY 1553	<i>ade6-M210, his<sup>-</sup>, ChR33 [ade6-M216], h<sup>-</sup></i>	M. Yanagida

Ch16: 530 Kbp Minichromosom (Niwa *et al.* 1986)

CH12LE: 280 Kbp Minichromosom (Niwa *et al.* 1989)

ChR33: 390 Kbp Minichromosom (Niwa *et al.* 1989)

\*(Furuya *et al.* 1998; Nabeshima *et al.* 1998)

#### 2.7.1.2 Hergestellte Stämme

Nummer	Ausgangsstämme	Genotyp
UFY 1424	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 1483	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>

Nummer	Ausgangsstämme	Genotyp
UFY 1484	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 1508	UFY 1490	<i>leu1-32, h<sup>-</sup></i>
UFY 1516	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [ade6-M216::kan<sup>R</sup>], h<sup>-</sup></i>
UFY 1538	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>bub1 bis ade6-M216::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup></i>
UFY 1545	UFY 221 X UFY 1516	<i>leu1-32, ura4-Dx, lacI-GFP/his7<sup>+</sup>, lacO-repeat/lys1<sup>+</sup>, Ch16 [ade6-M216::kan<sup>R</sup>], h<sup>+</sup></i>
UFY 1556	UFY 1553	<i>ade6-M210, his<sup>-</sup>, h<sup>-</sup></i>
UFY 1612	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>bub1 bis pof3::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup> Klon 1</i>
UFY 1613	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>bub1 bis pof3::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup> Klon 2</i>
UFY 1626	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>mug150 bis ade6-M216::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup> Klon 1</i>
UFY 1627	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>mug150 bis ade6-M216::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup> Klon 2</i>
UFY 1633	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>arp6 bis ade6-M216::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup> Klon 1</i>
UFY 1635	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>arp6 bis ade6-M216::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup> Klon 3</i>
UFY 1692	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>rgf3 bis ade6-M216::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup> Klon 9</i>
UFY 1693	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>sti1 bis ade6-M216::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup> Klon 6</i>
UFY 1694	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>sti1 bis ade6-M216::kan<sup>R</sup></i>], h<sup>-</sup> Klon 13</i>
UFY 2028	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Δ<i>arp6 bis vgl1::kan<sup>R</sup></i>, Ch16 [ade6-M216], h<sup>-</sup> Klon 1</i>
UFY 2031	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Δ<i>gep4 bis nse3::kan<sup>R</sup></i>, Ch16 [ade6-M216], h<sup>-</sup> Klon 2</i>
UFY 2065	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Δ<i>SPCC550.15c bis cig1::kan<sup>R</sup></i>, Ch16 [ade6-M216], h<sup>-</sup> Klon 2</i>
UFY 2066	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Δ<i>SPCC550.15c bis cig1::kan<sup>R</sup></i>, Ch16 [ade6-M216], h<sup>-</sup> Klon 3</i>
UFY 2067	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Δ<i>SPCC550.15c bis cig1::kan<sup>R</sup></i>, Ch16 [ade6-M216], h<sup>-</sup> Klon 5</i>
UFY 2098	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Disr. <i>myo2::kan<sup>R</sup></i> ade6-M216], h<sup>-</sup> Klon 3</i>
UFY 2106	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [Δ<i>cig1::kan<sup>R</sup></i>, ade6-M216], h<sup>-</sup></i>
UFY 2111	UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Chr. III: Δ<i>rec11::kan<sup>R</sup></i>, Ch16 [ade6-M216], h<sup>-</sup></i>

*ade6-Mx*: *ade6-M210* bzw. *ade6-M216*

*ura4-Dx*: *ura4-D6* bzw. *ura4-D18*

## 2.7.2 *S. cerevisiae* Stämme

### 2.7.2.1 Ausgangsstämme

Nummer	Genotyp	Herkunft
*74	<u>ura3-52</u> <u>lys2-801 amber</u> <u>ade2-101 ochre</u> <u>trp1</u> <u>his3</u> <u>leu2</u> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <u>a/a</u>	P. Hieter
*75	<u>ura3-52</u> , <u>lys2-801<sup>amber</sup></u> , <u>ade2-101<sup>ochre</sup></u> , <u>trp1</u> , <u>his3</u> , <u>leu2</u> , ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <u>a</u>	P. Hieter
*81	<u>ura3-52</u> <u>lys2-801 amber</u> <u>ade2-101 ochre</u> <u>trp1</u> <u>his3</u> <u>leu2</u> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1] [YAC12-LH (CEN4) LYS2, acentric arm HIS3], <u>a/a</u>	P. Hieter
*475	<u>ura3-52</u> <u>trp1-289</u> <u>his3<math>\Delta</math>1</u> <u>leu2-3</u> <u>a/a</u> (Cen-PK)	
*1554	<u>ura3-52</u> , <u>lys2-801<sup>amber</sup></u> , <u>ade2-101<sup>ochre</sup></u> , <u>trp1</u> , <u>his3</u> , <u>leu2</u> , ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2), <u>a</u> (Stamm *75 ohne YAC)	V. Thiemann
*1615	<u>ura3-52</u> <u>lys2-801 amber</u> <u>ade2-101 ochre</u> <u>trp1</u> <u>his3</u> <u>leu2</u> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2), <u>a/a</u> (*74 ohne YAC)	V. Thiemann
*1625	<u>ura3-52</u> <u>lys2-801 amber</u> <u>ade2-101 ochre</u> <u>trp1</u> <u>his3</u> <u>leu2</u> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2), <u>a/a</u> (Stamm *81 ohne YAC)	S. Kobus
42	<u>ura3-52</u> <u>lys2-801 amber</u> <u>ade2-101 ochre</u> <u>trp1</u> <u>his3</u> <u>leu2</u> [YAC12-UT (CEN6) URA3, acentric arm: TRP1] [YAC12-LH (CEN4) LYS2, HIS3], <u>a/a</u>	P. Hieter

\*Stammsammlung J. H. Hegemann

*trp1* = *trp1- $\Delta$ 1*; *his3* = *his3- $\Delta$ 200*; *leu2* = *leu2- $\Delta$ 1*

### 2.7.2.2 Hergestellte Stämme

Nummer	Ausgangsstamm	Genotyp
34	*75	<u>ura3-52</u> , <u>lys2-801<sup>amber</sup></u> , <u>ade2-101<sup>ochre</sup></u> , <u>trp1</u> , <u>his3</u> , <u>leu2</u> , $\Delta$ <i>flo8::ble<sup>R</sup></i> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <u>a</u> Klon 1
35	*75	<u>ura3-52</u> , <u>lys2-801<sup>amber</sup></u> , <u>ade2-101<sup>ochre</sup></u> , <u>trp1</u> , <u>his3</u> , <u>leu2</u> , $\Delta$ <i>flo8::ble<sup>R</sup></i> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <u>a</u> Klon 2
38	34	<u>ura3-52</u> , <u>lys2-801<sup>amber</sup></u> , <u>ade2-101<sup>ochre</sup></u> , <u>trp1</u> , <u>his3</u> , <u>leu2</u> , $\Delta$ <i>flo8::ble<sup>R</sup></i> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2), <u>a</u>
39	35	<u>ura3-52</u> , <u>lys2-801<sup>amber</sup></u> , <u>ade2-101<sup>ochre</sup></u> , <u>trp1</u> , <u>his3</u> , <u>leu2</u> , $\Delta$ <i>flo8::ble<sup>R</sup></i> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2), <u>a</u>
49	*74	<u>ura3-52</u> <u>lys2-801 amber</u> <u>ade2-101 ochre</u> <u>trp1</u> <u>his3</u> <u>leu2</u> $\Delta$ <i>mad2::ble</i> <u>ura3-52'</u> <u>lys2-801 amber'</u> <u>ade2-101 ochre'</u> <u>trp1'</u> <u>his3'</u> <u>leu2'</u> <i>MAD2</i> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <u>a/a</u>
51	49	<u>ura3-52</u> <u>lys2-801 amber</u> <u>ade2-101 ochre</u> <u>trp1</u> <u>his3</u> <u>leu2</u> $\Delta$ <i>mad2::ble<sup>R</sup></i> <u>ura3-52'</u> <u>lys2-801 amber'</u> <u>ade2-101 ochre'</u> <u>trp1'</u> <u>his3'</u> <u>leu2'</u> <i>MAD2::kan<sup>R</sup></i> ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <u>a/a</u>
54	42	<u>ura3-52</u> , <u>lys2-801<sup>amber</sup></u> , <u>ade2-101<sup>ochre</sup></u> , <u>trp1</u> , <u>his3</u> , <u>leu2</u> , [YAC12-LH (CEN4) LYS2, HIS3], <u>a</u>
55	42	<u>ura3-52</u> , <u>lys2-801<sup>amber</sup></u> , <u>ade2-101<sup>ochre</sup></u> , <u>trp1</u> , <u>his3</u> , <u>leu2</u> , [YAC12-UT (CEN6) URA3, acentric arm: TRP1], <u>a</u>
56	54	<u>ura3-52</u> , <u>lys2-801<sup>amber</sup></u> , <u>ade2-101<sup>ochre</sup></u> , <u>trp1</u> , <u>his3</u> , <u>leu2</u> , <u>a</u>

Nummer	Ausgangsstamm	Genotyp
57	55	<i>ura3-52, lys2-801<sup>amber</sup>, ade2-101<sup>ochre</sup>, trp1, his3, leu2, α</i>
60	*74	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δbim1::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 BIM1</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
61	*74	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δmcm21::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 MCM21</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
62	*74	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δbub3::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 BUB3</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
63	60	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δbim1::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 Δbim1::kanR</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
64	61	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δmcm21::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 Δmcm21::kanR</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
66	62	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δbub3::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 Δbub3::kanR</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
68	*74	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δame1::ble</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2' AME1</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
82	*74	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δmcm7::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 MCM7</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
83	*74	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δspc97::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 SPC97</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
85	*74	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δsmc1::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 SMC1</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
89	*74	<i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2 Δmcm2::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2 MCM2</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>
94	*75	<i>ura3-52, lys2-801<sup>amber</sup>, ade2-101<sup>ochre</sup>, trp1, his3, leu2,</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, Δ <i>sup11::ble<sup>R</sup></i> , acentric arm: TRP1], <i>α</i>
95	94	<i>ura3-52, lys2-801<sup>amber</sup>, ade2-101<sup>ochre</sup>, trp1, his3, leu2,</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2), <i>α</i>
100	*475	<i>ura3-52 trp1-289 his3Δ1 leu2-3 ade2::bleR, a/α</i> <i>ura3-52' trp1-289' his3Δ1' leu2-3' ADE2</i>
101	38	<i>ura3-52, lys2-801<sup>amber</sup>, ADE2, trp1, his3, leu2, Δflo8::ble<sup>R</sup></i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2), <i>α</i>
108	100	<i>ura3-52 trp1-289 his3Δ1 leu2-3 ade2::bleR, a/α</i> <i>ura3-52' trp1-289' his3Δ1' leu2-3' ade2::kanR'</i>
110	101	<i>ura3-52 lys2-801 amber ADE2 trp1 his3 leu2 Δflo8::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ADE2' trp1' his3' leu2' Δflo8::bleR'</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2), <i>a/α</i> (erstellt mit HO-Plasmid #204)
112	110	<i>ura3-52, lys2-801<sup>amber</sup>, ADE2, trp1, his3, leu2, Δflo8::ble<sup>R</sup>,</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2), <i>a</i> (erstellt durch Sporulation)
114	112 X 34	<i>ura3-52 lys2-801 amber ADE2 trp1 his3 leu2 Δflo8::bleR</i> <i>ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2' Δflo8::bleR'</i> (ΔCEN6::CEN2 LEU2), [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], <i>a/α</i>

Nummer	Ausgangsstamm	Genotyp
116	114	<i>ura3-52, lys2-801<sup>amber</sup>, ADE2, trp1, his3, leu2, Δflo8::ble<sup>R</sup>, (ΔCEN6::CEN2 LEU2), [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, acentric arm: TRP1], α</i> (erstellt durch Sporulation)
117	116	<i>ura3-52, lys2-801<sup>amber</sup>, ADE2, trp1, his3, leu2, Δflo8::ble<sup>R</sup>, (ΔCEN6::CEN2 LEU2), α</i>

\*Stammsammlung J. H. Hegemann

*trp1* = *trp1-Δ1*; *his3* = *his3-Δ200*; *leu2* = *leu2-Δ1*

## 2.8 Plasmide

Nummer	Bezeichnung	Genetische Marker, Beschreibung
177 (S. p.)	KLK 1153	PCR Vorlageplasmid; GFP- <i>kan<sup>R</sup></i> Kasette; Herkunft: K. Gould
973 (S. c.)	pUG66	PCR Vorlageplasmid; Hefeselektion: Phleomycin ( <i>ble</i> ); E. coli Selektion: Ampicillin ( <i>Amp</i> )
38 (S. c.)	pRS316	<i>CEN</i> -Plasmid: Bluescript M13 <sup>+</sup> KS <i>URA3 CEN6 ARSH4</i> ; Herkunft: P. Hieter
40 (S. c.)	pRS314	<i>CEN</i> -Plasmid: Bluescript M13 <sup>+</sup> KS <i>TRP1 CEN6 ARSH4</i> ; Herkunft: P. Hieter
204 (S. c.)	YCp50-HO-12	Zum Paarungstypwechsel haploider Stämme, enthält Insert: 3.1kb HindIII/BamHI <i>HO</i> -Gen für die <i>HO</i> -Endonuklease; <i>CEN4 ARS1 URA3</i> ; Herkunft: C. Mohr/ J. Herskovitz

(S. p.): *S. pombe* Plasmidsammlung (AG Fleig)

(S. c.): *S. cerevisiae* Plasmidsammlung (J.H. Hegemann)

## 2.9 Synthetische Oligonukleotide

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendungszweck
290	Kan Start Verif.; SC #361	ATCCAACATGGATGCTG	Verifikation
303	Kan rev. Verif.; SC #362	ATTCATATCAGGATTATC	Verifikation
622	$\alpha$ spezifisch	GCACGGAATATGGGACTCCTTCG	Paarungstypbestimmung S. c.
623	$\underline{a}$ spezifisch	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG	Paarungstypbestimmung S. c.
624	<i>MAT</i> Gen $\underline{a}$ und $\alpha$	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	Paarungstypbestimmung S. c.
691	$\Delta ade6$ fwd	TTTGAAAAAAGATTCGTTTTTTCAACATTTACCATCTCATTAAGCTGAGCTGCCAAGGTATATACATATTCATCGAATagcaaaaattacggctcctc	Deletion
692	$\Delta ade6$ rev	TACAATCTAGAATTTCAAATAAAATATTATTTAAAACAAAAAGCAAGCAAAATCATTTAACAGTTATGTCATGGTTCGcattcacatacgattgacgca	Deletion
694	Verif. $\Delta ade6$ fwd	TGCATTTCAATGCTTGGAA	Verifikation
695	Verif. $\Delta ade6$ rev	ATACATTTTCAATCTAGAA	Verifikation
744	$\Delta bub1-ade6$ fwd	CAACTTCTTTTTAAATAAAATAAACACACAAAATTATCCAAACATTTAAAAAAGGATGGAAACTTCCCTCTAGGCAAAAAagcaaaaattacggctcctc	Deletion
747	Verif. $\Delta bub1-ade6$ fwd	GTTTAGCATGCATATTGCAG	Deletion

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'- 3')	Verwendungszweck
794	$\Delta$ <i>bub1-pof3</i> rev	TCATTGGAAGCTATATGGGAGGTTTATGTTTATGT ATAGAAAAATAAATCGTTGGGTATAGAAATTAAG ATTTGGATTcattcacatacgattgacgca	Deletion
796	Verif. $\Delta$ <i>bub1-pof3</i> rev	AAGCTTGCGACTACGAAAGC	Verifikation
861	$\Delta$ <i>mug150</i> - <i>ade6</i> fwd	GCCGTAACAACAGTACATTTAATCGCGGTTTTTG GGTGAAGTTAAGACCTAAGATATAGGAATACATTT TTATTAATAATagcaaaaattacggctcctc	Deletion
862	Verif. $\Delta$ <i>mug150-ade6</i> fwd	ATACATTTTACAATCTAGAA	Verifikation
875	$\Delta$ <i>arp6-ade6</i> fwd	GCCGTAACAACAGTACATTTAATCGCGGTTTTTG GGTGAAGTTAAGACCTAAGATATAGGAATACATTT TTATTAATAATagcaaaaattacggctcctc	Deletion
878	Verif. $\Delta$ <i>arp6-ade6</i> fwd	ATACTATTGCTTCAAAGTGT	Verifikation
888	B-M	GGATGTATGGGCTAAATG	Verifikation
889	C-M	CCTCGACATCATCTGCC	Verifikation
898	$\Delta$ <i>sti1-ade6</i> fwd	TTAACAAACAACATTCATAAACTAAGTAAACGTTA AAACCTTTCTTTTTTTTAAATCTCACTTCTCACAAA AGCGCAAATagcaaaaattacggctcctc	Deletion
899	$\Delta$ <i>rgf3-ade6</i> fwd	AAACGTTTCCGATATTTCAAAGTATGGATGAGTAA AAAAGACAATCATGGCAAGAAAACCTTGAATAAAT ATGATAATTAagcaaaaattacggctcctc	Deletion
900	Verif. $\Delta$ <i>sti1-ade6</i> fwd	CAGTTATCCAATTCATCCGG	Verifikation
901	Verif. $\Delta$ <i>rgf3-ade6</i> fwd	TCGAAAGATGCAGGATGTTC	Verifikation
1023	Verif $\Delta$ <i>flo8</i> fwd	TCAACCAGAAAAGTGCCTGT	Verifikation
1024	Verif $\Delta$ <i>flo8</i> rev	GGCTTCGGACTCTTTTACGA	Verifikation
1035	$\Delta$ <i>flo8</i> fwd	TAGCGAAATGTCAGATACGTAACCTCATTCTCCTA GCTTTcagctgaagcttcgtacgc	Deletion
1036	$\Delta$ <i>flo8</i> rev	AGACACGGTGAGTTGACGTTAGTAAGTCACTGAG GCTATAgcatagccactagtgatctg	Deletion
1164	$\Delta$ <i>mad2 ble</i> fwd	TCGCCCCGAAGAATGATTGATGTTAAATACTCGT ACAAGAcagctgaagcttcgtacgc	Deletion
1165	$\Delta$ <i>mad2 ble</i> rev	AAATCTATATTCTTTCTAAACATCGAAAACGAGAT TTTTTgcatagccactagtgatctg	Deletion
1166	$\Delta$ <i>mad2 kan</i> fwd	GTATTGAAAACCACTTCAAAGGGGCCCAATAGCA CATTTA agcaaaaattacggctcctc	Deletion
1167	$\Delta$ <i>mad2 kan</i> rev	TGGACTTCCGCTTTTTTTTTTTTTTTGACTTGAAT TCTAattcacatacgattgacgca	Deletion
1168	Verif. $\Delta$ <i>mad2</i> fwd	GAAGTGCACATACCATTGCT	Verifikation
1169	Verif. $\Delta$ <i>mad2</i> rev	TGGTTTACAGAGGAAGTACG	Verifikation
1229	$\Delta$ <i>bim1 ble</i> fwd	AAACACTTGAACAAGTCAAAAAAATTGAAGGC AGACTCagctgaagcttcgtacgc	Deletion
1230	$\Delta$ <i>bim1ble</i> rev	TATATATTGATAACGAGTAATAAAAAAATAAAAA AAAAATgcatagccactagtgatctg	Deletion
1231	$\Delta$ <i>bim1 kan</i> fwd	AAAAGCAAGGATAATATTCCACCAAATCAGGGAC GAAGCAagcaaaaattacggctcctc	Deletion
1232	$\Delta$ <i>bim1kan</i> rev	AATACATATTCGAAAACAATACTGCTTTTTAGTTC TCAACattcacatacgattgacgca	Deletion
1233	Verif. $\Delta$ <i>bim1</i> fwd	CCTGAATGAACTTGAAGACC	Verifikation
1234	Verif. $\Delta$ <i>bim1</i> rev	TTTACCTGATCCCCCTTCCA	Verifikation
1235	$\Delta$ <i>mcm21ble</i> fwd	AAAGCCATATGGATAATGAGGGGAAAATGTGATT TCTTTAcagctgaagcttcgtacgc	Deletion

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'- 3')	Verwendungszweck
1236	$\Delta mcm21 ble$ rev	AGAGAAAATTAGCTCTATCCTCTTTCTATAAAGTA TATTTgcatagggcactagtgatctg	Deletion
1237	$\Delta mcm21kan$ fwd	CTTGAGCAATTCTTTCAAACATCAGTAACGCTCC TGGCAagcaaaaattacggctcctc	Deletion
1238	$\Delta mcm21kan$ rev	TTGTTAACATTCACTTGAATATTGTCGCGAAAGAA TGGTTattcacatacgattgacgca	Deletion
1239	Verif. $\Delta mcm21$ fwd	GGATTCGATACCTGGGCCGT	Verifikation
1240	Verif. $\Delta mcm21$ rev	CTCTGGGTTACCGCTATTTA	Verifikation
1241	$\Delta bub3 ble$ fwd	AAATAGTGAACGAAAAAATATCACATCGCGAAA GAAAAGcagctgaagcttcgtacgc	Deletion
1242	$\Delta bub3 ble$ rev	GGAGAAGCGAAGAGAGAGCGATGAATCTGAATTT TTTTTCgcatagggcactagtgatctg	Deletion
1243	$\Delta bub3 kan$ fwd	CTATCTGATATCTGCAACACGAAAAACAACAGT CGCGGCagcaaaaattacggctcctc	Deletion
1244	$\Delta bub3 kan$ rev	TGGAATGTTCTATCATACTACACGAATCTTCACGA AGATAattcacatacgattgacgca	Deletion
1245	Verif. $\Delta bub3$ fwd	GACCAACTTTTCGGTGACAAC	Verifikation
1246	Verif. $\Delta bub3$ rev	GAGCAGACTTTTGGGCTTAA	Verifikation
1257	Verif. <i>MCM21</i> rev	GCTAAGAAGATAATCCACGA	Verifikation
1258	Verif. <i>BUB3</i> fwd	CAATAACGGATGTTTATATC	Verifikation
1259	Verif. <i>BUB3</i> rev	CCTATACACGGCTGGCTCTG	Verifikation
1260	Verif. <i>BIM1</i> fwd	TTTTTATCATTCAATTCATC	Verifikation
1261	Verif. <i>BIM1</i> rev	CCATCACCGGCCATGGTAAT	Verifikation
1262	Verif. <i>MCM21</i> fwd	TCGACTTTAATATCCTTCAC	Verifikation
1263	$\Delta arp6-vgl1$ fwd	GCCGTAACAACAGTACATTTAATCGCGGTTTTTG GGTGAAGTTAAGACCTAAGATATAGGAATACATTT TTATTAATAATagcaaaaattacggctcctc	Deletion
1264	$\Delta arp6-vgl1$ rev	TACACATAATTTTCAAATACACTCTCAAAAAATTT GAGAAATGAATGTAAGTACTAAATAAAGGCTCCA AAATTTTACCattcacatacgattgacgca	Deletion
1265	$\Delta SPCC550.15c-$ <i>cig1</i> fwd	TAAGGAGAAATATGAGACGAAAGAATGTGGAGTA TGAAGTATATAATGAAAGAAACAAAAGGCCTCGT ACAATAAATAGAgcaaaaattacggctcctc	Deletion
1266	$\Delta SPCC550.15c-$ <i>cig1</i> rev	ATCCGTAATAATAAATATCGTAGGCTTAATAATAG CAAATAACTCAGAATATCATTGTTAACAACCTTCT GAAAGCAAACattcacatacgattgacgca	Deletion
1267	$\Delta gep4-nse3$ fwd	CTAAGACGTGTTCTATCATCGTTTAAATCCACAACA AAACTAACACAATTGTTTTATTAATTATCATCATCT TTGTTTGGCagcaaaaattacggctcctc	Deletion
1268	$\Delta gep4-nse3$ rev	ACGAATTTTTTTGTAGTAGCGGAGTAAGTATACAA TAGCATTAAACATGAGACGAGCATAATGTAAAAAC CTAAGAGTCAattcacatacgattgacgca	Deletion
1271	Verif. $\Delta arp6-vgl1$ fwd	GAGCCAGCGTTATTATACTA	Verifikation
1272	Verif. $\Delta arp6-vgl1$ rev	GGAATCAATAAGGAAAATGC	Verifikation
1274	Verif. $\Delta SPCC550.15c-$ <i>cig1</i> rev	GATGGAAGAGGGAATTCGGA	Verifikation
1275	Verif. $\Delta gep4-nse3$ fwd	CTCATTGGACACCAACAAGT	Verifikation
1276	Verif. $\Delta gep4-nse3$ rev	CGAGATATTAGCACGCATAT	Verifikation

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'- 3')	Verwendungszweck
1307	Verif. $\Delta$ SPCC550.15c- cig1 fwd	GGAGACGGAAATTGCTTGAA	Verifikation
1319	$\Delta$ ame1 fwd	TCCTGTGTTGCTCTGTATTGTCTTGACTATTTGCG TGTTCAATTTAAAGAAAAACCTCAGTcagctgaagcttctg acgc	Deletion
1320	$\Delta$ ame1 rev	ACATATATACATACATATATATATATATATATATAT ATATACATCTTTTGAACCAATTCCgcataggccactagt gatctg	Deletion
1321	Verif. $\Delta$ ame1 fwd	ACTATCGCCCCCTTCACAGCC	Verifikation
1322	Verif. $\Delta$ ame1 rev	CTATGAAGTATGTCTACCAC	Verifikation
1349	1 SUP11 rev +3 oder 4	TGACTGAGTGTCTTTTGGCC	Verifikation Orientierung
1350	3 URA3 rev + 1 oder 2	CCTTTGTTACTTCTTCCGCC	Verifikation Orientierung
1351	4 URA3 fwd + 1 oder 2	GGCGGAAGAAGTAACAAAGG	Verifikation Orientierung
1354	2 SUP11 fwd +3 oder 4	GGCTCAAGCTGCTGGAGTTT	Verifikation Orientierung
1355	$\Delta$ smc1 fwd	AAAATCACTTAAAGCAAGCATCCAGAGGCTATTG ATAAAAAGCAGGCACAAGGAGACGCACagctgaagct tcgtacgc	Deletion
1356	$\Delta$ smc1 rev	TTGACCTATATAGATATTATTAGTTATTTGACGGG TTATAGCAGAGGTTGGTTTCATAGA gcataggccactagtggatctg	Deletion
1357	Verif. $\Delta$ smc1 fwd	TTCAACGTTCCAAGGCTTGG	Verifikation
1358	Verif. $\Delta$ smc1 rev	TTTCTAAGGGATACCTCGGC	Verifikation
1359	$\Delta$ mcm2 fwd	ATACTCCACACACCTCTTTGCCTCTTTTCTAAGAA GTATAACACAACACTACAATATAAGTGcagctgaagcttcg tacgc	Deletion
1360	$\Delta$ mcm2 rev	TGGATTGAGACAGAGAATTTTTATCTTCATATCC AGATATTCGTAGGAATAACAAAGTTgcataggccacta gtggatctg	Deletion
1361	Verif. $\Delta$ mcm2 fwd	ATGGCGGAATCGCGTGTAAT	Verifikation
1362	Verif. $\Delta$ mcm2 rev	GTTTCTTATCCCCTCCACTG	Verifikation
1363	$\Delta$ mcm7 fwd	AATCACTACCTAGATTAGCTTGAATCTTGCAGGAA GAACTCAATACAGATAGACCAGATTcagctgaagcttcg tacgc	Deletion
1364	$\Delta$ mcm7 rev	GAAAAAAGGGGGAAAAAGAATAAAGAATGAAGG CCCTGTTGCTTTTTTTTTTAGAACTTgcataggccacta gtggatctg	Deletion
1365	Verif. $\Delta$ mcm7 fwd	CACGAAAGTGAGATAACAAGC	Verifikation
1366	Verif. $\Delta$ mcm7 rev	CACGGACATGCGCAGTCATA	Verifikation
1367	$\Delta$ spc97 fwd	TCCATAATATTTATTATCAAACCTGATCTAAGATTG CTTTGTACACATCTTGCGTGAAAAAcagctgaagcttcg tacgc	Deletion
1368	$\Delta$ spc97 rev	TTGGAACGGGATTCCACTTCCGCAAGTTGGTGC ACGTCGTTAGTGACATAACGCCGCGTgcataggccac tagtggatctg	Deletion
1369	Verif. $\Delta$ spc97 fwd	AGCGTTGCTATTACCCTTCC	Verifikation
1370	Verif. $\Delta$ spc97 rev	CTACCCTAGTGAGGTGTATG	Verifikation
1380	$\Delta$ sup11 fwd	TTAACTGATGGTTTATTACTTATATTTAAATATTG AAAGCTGCAAGATTTAAAAAATAcagctgaagcttcgta cgc	Deletion

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendungszweck
1381	$\Delta sup11$ rev	AAAACGTATTATAAGTAAATGCATGTATACTAAA CTCACAAATTAGAGCTTCAATTTAgcataggccactagt ggatctg	Deletion
1382	Verif. $\Delta sup11$ fwd	AAACTCCAGCAGCTTGAGCC	Verifikation
1396	Disr. <i>myo2</i> fwd	ACTTGCAAATTTGCTTGTAGTAATTTGATGGCTTG TATGTCCTTCAATCGCTTTTGAAAAATTTTCTTTG AAGAAAGCCagcaaaaattacggctcctc	Disruption
1397	Disr. <i>myo2</i> rev	ACCTATGTGGAATCTCGACGTGCTTCTGTCATGA TTTTGGAGGAGTTGAAAATTGACGAAGCATCTTAT CGAATTGGTGTattcacatacgattgacgca	Disruption
1398	Verif. Disr. <i>myo2</i> fwd	AGTACTACTTAATAAGGGCC	Verifikation
1399	Verif. Disr. <i>myo2</i> rev	CACAAGGGCTGGTTTTCCTA	Verifikation
1424	$\Delta ade2$ <i>kan</i> fwd	CAATCAAGAAAAACAAGAAAATCGGACAAAACAA TCAAGTagcaaaaattacggctcctc	Deletion
1425	$\Delta ade2$ <i>kan</i> rev	ATAATTATTTGCTGTACAAGTATATCAATAAACTTA TATAattcacatacgattgacgca	Deletion
1428	<i>ADE2</i> fwd Ins	GGATTCTAGAACAGTTGGTATATTAGG	Insertion
1430	$\Delta ade2$ <i>ble</i> fwd	AAAATCGTTGGATCTCTCTTCTAAGTACATCCTAC TATAAcagctgaagcttcgtacgc	Deletion
1431	$\Delta ade2$ <i>ble</i> rev	TGTAATCATAACAAAGCCTAAAAAATAGGTATATC ATTTTgcataggccactagtggatctg	Deletion
1432	Verif. $\Delta ade2$ fwd	TCTTACGTCATGATTGATTA	Verifikation
1433	Verif. $\Delta ade2$ rev	CACCTGTAAGCGTTGATTTTC	Verifikation
1439	<i>ADE2</i> rev Ins	CTTGTTTTCTAGATAAGCTTCGTAACCGACAG	Insertion
1454	$\Delta rec11$ fwd	CCTTGCCTCAATAAGAAAGTTAGCACATGTGCTTT CTTATCTCTTTCCCTCGGGGTTAATTAGTGTTA AAATTTGTTTagcaaaaattacggctcctc	Deletion
1455	$\Delta rec11$ rev	CGTAAACAAACCCATCGTTTCTGTTAGATTAATCT TTGCCATAACCAACCACCATCGTACCAATTAATTG AGTGATTTCAattcacatacgattgacgca	Deletion
1456	Verif. $\Delta rec11$ fwd	GTAGTTTTAGCGAGCACACG	Verifikation
1457	Verif. $\Delta rec11$ rev	GGAAAAGCCCGAAATTCGGA	Verifikation
1458	$\Delta cig1$ fwd	TACCTGAGTAAAAGGCAGTTTGAAAACCGACTTT CATCGCATGTCCAAAACTTTCTAAACAAGTGTGT GCTGGTTTACTAagcaaaaattacggctcctc	Deletion
1459	Verif. $\Delta cig1$ fwd	CTTTCCTCGAATCCTTCGTT	Verifikation

Kleinbuchstaben: Homologiebereich zum Vorlageplasmid

## 2.10 Medien und Wachstumsbedingungen

### 2.10.1 *S. pombe*

*S. pombe* Stämme wurden in Vollmedium oder Minimalmedium (EMM/MM) kultiviert. Den Medien wurden Supplementlösungen bis zu einer Endkonzentration von 75 mg/l zugegeben (Moreno *et al.* 1991). Standard-Minimalmedium (MM) enthielt als Stickstoffquelle Glutaminsäure, während Edinburgh-Minimalmedium (EMM) Ammoniumchlorid zugefügt wurde. Fester Nährboden enthielt zudem 20 g Agar pro Liter. *S. pombe* Stämme wurden in der Regel bei 30 °C 16 Stunden über Nacht (ü/N) inkubiert. Abweichende Inkubationsdauer und Temperaturen ergaben sich aus den jeweiligen

Versuchsansätzen, wie beispielsweise das Testen bestimmter Stämme auf Temperatursensitivität. Flüssigkulturen wurden auf einem Schüttler inkubiert, um den Zellen aerobes Wachstum zu ermöglichen. Die Selektion auf - durch Plasmide oder Integrationskassetten gewonnene - Aminosäureprototrophie wurde auf MM-Mangelplatten durchgeführt, denen die entsprechende Aminosäure nicht zugesetzt wurde. Ein Stamm ohne den entsprechenden Marker kann die fehlende Aminosäure nicht selber synthetisieren und ist somit nicht in der Lage, auf den Platten zu wachsen.

Die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin-Disulfat (G418) wurde auf Vollmediumsplatten mit einer G418-Konzentration von 100mg/l überprüft.

Die Mikrotubuli-destabilisierende Chemikalie Thiabendazol (TBZ) wurde den Nährmedien in einer Konzentration von 5,5 bis 8,5 µg/ml zugegeben, wenn die Sensitivität von Mutanten auf TBZ untersucht werden sollte (Berry und Gould 1997). Die Inkubationstemperatur betrug bei TBZ-haltigem Medium immer 25 °C.

#### Vollmedium (YE5S):

10 g Hefeextrakt

150 ml Adeninstocklösung

75 ml Uracilstocklösung

20 ml je Histidin-, Lysin-, und Leucinstocklösung

40 g Agar (nur für festes Medium)

in 1645 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, in 5 x 360 ml portionieren und autoklavieren.

60 g Glucose in 200 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, separat autoklavieren und dem Medium anschließend zugeben.

YE5S + G418: 100 mg/l G418 dem abgekühlten Medium zugeben, Platten gießen und bei 4°C lagern

#### Minimalmedium (MM) bzw. Edinburgh-Minimalmedium (EMM):

5,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

6 g Kaliumhydrogenphthalat

2 g Glutaminsäure (für MM)

10 g Ammoniumchlorid (für EMM)

40 ml 50 x Salzstocklösung

2 ml 1000 x Vitaminstocklösung

0,2 ml 10000 x Mineralstocklösung

40 g Agar (für Platten)

in 1780 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, in 5 x 360 ml portionieren und autoklavieren.

40 g Glucose in 100 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, separat autoklavieren und dem Medium anschließend zugeben.

Nach dem Autoklavieren werden die benötigten autoklavierten Supplementlösungen zu einer Endkonzentration von 75 mg/l zugefügt. Für Medium mit limitiertem Adenin werden lediglich 5 mg/l Adenin zugesetzt.

Supplementstocklösungen :

2,7 g/l Adeninstocklösung

2 g/l Uracilstocklösung

7,5 g/l Histidinstocklösung

7,5 g/l Lysininstocklösung

7,5 g/l Leucinstocklösung

7,5 g/l Argininstocklösung

50 x Salzstocklösung:

21,4 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

0,29 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

20 g KCl

0,8 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

in 400 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, autoklavieren und bei 4°C lagern.

1000 x Vitaminstocklösung:

1 g Natriumpantothenensäure

10 g Nikotinsäure

10 g Inositol

10 mg Biotin

in 1 l ddH<sub>2</sub>O lösen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

10000 x Mineralstocklösung:

5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

4 g MnSO<sub>4</sub>

4 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

2 g FeCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

4 g MoO<sub>3</sub>

1 g KI

4 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O

10 g Zitronensäure

in 1 l ddH<sub>2</sub>O lösen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

TBZ-Stocklösung: 10 mg/ml in DMF, Lagerung bei -20°C

### 2.10.2 *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* Stämme wurden in Vollmedium oder Minimalmedium (SD) kultiviert. Fester Nährboden enthielt zudem 20 g Agar pro Liter. *S. cerevisiae* Stämme wurden in der Regel bei 30 °C über Nacht (ü/N) inkubiert. Flüssigkulturen wurden auf einem Schüttler inkubiert, um den Zellen aerobes Wachstum zu ermöglichen. Die Selektion auf Aminosäureprototrophie wurde auf SD-Mangelplatten durchgeführt, denen die entsprechende Aminosäure(n) nicht zugesetzt wurde(n). Ein Stamm ohne den entsprechenden Marker kann die fehlende Aminosäure nicht selber synthetisieren und ist somit nicht in der Lage, auf diesen Platten zu wachsen.

Die Resistenz gegenüber dem Antimykotikum Phleomycin wurde auf Vollmediumsplatten (YPD) mit 10 µg/ml Phleomycin getestet. Geneticin-Disulfat (G418) Resistenz wurde auf Vollmediumsplatten mit einer G418-Konzentration von 200 mg/l überprüft.

Die Mikrotubuli-destabilisierende Chemikalie Thiabendazol (TBZ) wurde den Nährmedien in einer Konzentration von 30 bis 80 µg/ml zugegeben, wenn die Sensitivität von Mutanten auf TBZ untersucht werden sollte. Die Inkubationstemperatur betrug bei TBZ-haltigem Medium 25 °C oder 30 °C.

#### YPD<sup>+</sup>-Medium:

- 10 g Hefeextrakt
- 20 g Casein Hydrolysat (Pepton)
- 20 g Agar (nur bei Platten)
- 2 ml Adeninstocklösung (2 mg/ml)
- 4 ml Tryptophanstocklösung (5 mg/ml)

In 900 ml deionisierten Wasser lösen und autoklavieren.

20 g Glucose werden getrennt in 100 ml ddH<sub>2</sub>O autoklaviert und im Anschluss dem Medium zugesetzt.

#### SD-Minimalmedium:

- 20 g Agar (nur für Platten)
- 1,7 g Hefe Nitrogen Base (YNB)
- 5 g Ammoniumsulfat
- 2 g Aminosäuremix

In 900 ml deionisiertem Wasser lösen und vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf pH 6 einstellen. Zur Selektion wird die entsprechende Nukleo-Base oder Aminosäure nicht mit in den Aminosäure-Mix gegeben.

20 g Glucose werden separat in 100 ml ddH<sub>2</sub>O autoklaviert und im Anschluss dem Medium zugefügt.

#### Aminosäuremix +24:

Der Aminosäure-Mix ist die Kombination aus den folgenden Aminosäuren, Nukleo-Basen und Chemikalien unter Wegnahme der entsprechenden Substanz für die Selektion. Der Mix wird mindestens 15 min mit sterilen Mahlkugeln gemischt.

Substanz	Menge	Substanz	Menge
Adenin	0,5 g	Leucin	10,0 g
Alanin	2,0 g	Lysin	2,0 g
Arginin	2,0 g	Methionin	2,0 g
Asparagin	2,0 g	Para-Aminobenzoessäure	2,0 g
Asparaginsäure	2,0 g	Phenylalanin	2,0 g
Cystein	2,0 g	Prolin	2,0 g
Glutamin	2,0 g	Serin	2,0 g
Glutaminsäure	2,0 g	Threonin	2,0 g
Glycin	2,0 g	Tryptophan	2,0 g
Histidin	2,0 g	Tyrosin	2,0 g
Inositol	2,0 g	Uracil	2,0 g
Isoleucin	2,0 g	Valin	2,0 g

### 2.10.3 Serielle Tropftestanalysen

Serielle Tropftests konnten dazu genutzt werden, das Wachstum von *S. pombe* oder *S. cerevisiae* Stämmen unter definierten Bedingungen analysieren zu können. Die Zellen der zu untersuchenden Stämme wurden bei der permissiven Temperatur ü/N als Schüttelkulturen inkubiert. Anschließend wurde von den logarithmisch wachsenden Kulturen die Zellzahl pro Milliliter mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Nun wurde eine Verdünnungsreihe jeder Kultur in ddH<sub>2</sub>O so angesetzt, dass 5 µl einer Verdünnung jeweils 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> und 10 Zellen enthielten. Von jeder Verdünnung wurden nun 5 µl auf entsprechende Platten getropft. Die Platten wurden für 4 bis 7 Tage unter der Anwendung verschiedener Parameter wie Temperaturgradienten (24 °C bis 37 °C) oder TBZ-Konzentration (4,5 bis 8,5 µg/ml) inkubiert. Anhand der aus den einzelnen Zellen

heranwachsenden Kolonien ließ sich nun das Wachstum der Stämme beurteilen und miteinander vergleichen.

## 2.11 DNA Grundtechniken

Die für Klonierungsversuche angewandten DNA-Techniken wie Restriktionsanalysen und Ligationen sowie Techniken für die DNA-Fällung, -Aufkonzentrierung und Gelelektrophorese wurden gemäß den Standardprotokollen von Maniatis durchgeführt (Maniatis *et al.* 1982; Maniatis *et al.* 1989).

Die Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA erfolgte photometrisch über die Absorption bei 260 nm mittels Nanodrop Spektralphotometer oder über den Vergleich der Bandenintensität mit einem DNA-Längenstandard nach gelelektrophoretischer Auftrennung.

Die für die Hydrolyse von DNA verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden ebenso wie die beiliegenden Puffer in Konzentrationen eingesetzt, die den Herstellerangaben entsprachen.

### 2.11.1 Präparation von Nukleinsäuren

Die Isolation von genomischer DNA aus *S. pombe* Zellen erfolgte gemäß dem Protokoll von Hoffmann und Winston (Hoffman und Winston 1987). Für die Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aus *E. coli* Zellen wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet (Ish Horowicz und Burke 1981). Wurden größere Mengen Plasmid-DNA benötigt, so wurde das Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

### 2.11.2 DNA Fällung

Zur Fällung von DNA wurden dieser 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 96 %iges Ethanol zugesetzt. Der Ansatz wurde für 45 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C gefällt. Im Anschluss wurde die DNA zusätzlich mit 600 µl ml 70 %igem Ethanol gewaschen und mittels Vakuumkonzentrator („Speed-Vac“) getrocknet. Die DNA wurde in 10 mM Tris-HCl Puffer gelöst.

## 2.11.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.11.3.1 *Taq*-DNA-Polymerase PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des Standardprotokolls für die *Taq*-DNA-Polymerase (Maniatis *et al.* 1989):

#### Reaktionsansatz:

Template	1 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l
10 x Puffer	5 $\mu$ l
Primer a (50 mM)	1 $\mu$ l
Primer b (50 mM)	1 $\mu$ l
10mM dNTP	1 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	37 $\mu$ l
Insgesamt	50 $\mu$ l

#### Programm für *Taq*-PCR:

1. 94°C	5 Min.	
2. 94°C	0,5 Min.	
3. 55°C	0,5 Min.	Schritt 2-4 34 x wiederholen
4. 72°C	X Min.	X = 1 Min. pro kb
5. 72°C	7 Min.	
6. 12°C	$\infty$	

### 2.11.3.2 „PCR auf Zellen“

Der Nachweis für über homologe Rekombination in das Genom von *S. pombe* Zellen integrierte DNA-Fragmente erfolgte mit der so genannten „PCR auf Zellen“. Bei dieser Methode wird dem PCR-Ansatz Zellmaterial zugefügt. Die Zellwände werden durch die hohe Temperatur im Denaturierungsschritt des PCR-Zyklus aufgebrochen. Die dadurch freigesetzte genomische DNA dient als Matrize für die DNA-Polymerase. War ein Nachweis mit dieser Methode nicht erfolgreich, so wurde stattdessen isolierte genomische DNA (Kap. 2.11.1) als Matrize für eine *Taq*-DNA-Polymerase PCR (Kap. 2.11.3.1) eingesetzt.

#### Reaktionsansatz:

25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,8 $\mu$ l
10 x Puffer	3 $\mu$ l
Primer a (50 mM)	0,3 $\mu$ l
Primer b (50 mM)	0,3 $\mu$ l
10 mM dNTP	0,6 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase	0,3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	13,7 $\mu$ l
Insgesamt	20 $\mu$ l

Die 20 µl wurden in ein PCR Reaktionsgefäß gegeben, in dem sich bereits 10µl Wasser mit resuspendierten Zellen des zu untersuchenden Stamms/Klons befanden.

Programm für "PCR auf Zellen":

1. 94°C	5 Min.	
2. 94°C	1 Min.	
3. 54°C	2,5 Min.	Schritt 2-4 34 x wiederholen
4. 72°C	X Min.	X = 1 Min. pro kb
5. 12°C	∞	

### 2.11.3.3 Pfx-DNA-Polymerase PCR

Für die Amplifikation von DNA Fragmenten, die länger als 3 Kbp waren und/oder für Klonierungen verwendet wurden, wurde teilweise die *Pfx*-DNA-Polymerase (Gibco, Schottland) eingesetzt. Dieses Enzym verfügt im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase über eine „proof reading“ Reparaturfunktion (3´-5´ Exonuklease), was dazu führt, dass in dem neu synthetisierten DNA-Strang 26 mal weniger Mutationen als bei Einsatz der *Taq*-DNA-Polymerase auftreten. Die Durchführung dieser PCR-Methode erfolgte in Übereinstimmung mit den Herstellerangaben. Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde das QiaQuick PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet.

## 2.12 Hefemethoden

### 2.12.1 Isolation genomischer *S. pombe* DNA für die Pulsfeldgelelektrophorese

- 100 ml YE5S mit dem frisch ausgestrichenen Stamm inokulieren, Inkubation ü/N bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> >5.
- Zentrifugation der Zellen bei 5.000 x g, 10 Minuten, 4°C. Überstand abnehmen.
- Resuspendieren der Zellen in 10 ml eiskaltem 50 mM EDTA, pH 8.0.
- Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmen.
- 5 x 10<sup>8</sup> Zellen pro Stamm werden für 3 Minuten in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert (bei größeren Volumina 10 Minuten 5.000 x g, 4°C). Überstand abnehmen.
- Resuspendieren der Zellen (blaue Spitze, steril abgeschnitten, vorsichtig) in 200 µl Suspensionspuffer (10 mM Tris, pH 7.2, 20 mM NaCl, 50 mM EDTA), der 1 mg/ml Zymolyase sowie 1 mg/ml Lytikase enthält (beides frisch zum Puffer geben). Suspension mit der abgeschnittenen blauen Spitze in ein 15 ml Falcon Tube

geben. Inkubation der Zellen für 2h bei 37°C im Wasserbad. Schritt 7 mit vorbereiten!

- Die Zellen werden in 200 µl 2% LMP Agarose (abgekühlt auf 50°C (Heizblock)) eingebettet (vorsichtig schwenken zum Mischen, Gel wird dadurch 1% Endkonzentration), die mit sterilem ddH<sub>2</sub>O Wasser angesetzt wird. Agaroseblöckchen aushärten lassen.
- Waschen der Agaroseblöckchen mit 5 ml Waschpuffer (20 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA).
- Die Agaroseblöckchen werden für 90 Minuten bei 55°C (Wasserbad) in 3 ml 1% SDS, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.25 mM EDTA inkubiert. Waschen der Agaroseblöckchen mit 5 ml Waschpuffer.
- Die Agaroseblöckchen werden mit 3 ml Proteinase K (1 mg/ml End) in 1% Lauroylsarcosin, 0.5 M EDTA pH 8.0 für 48 Stunden bei 55°C verdaut.
- 4 x Waschen der Agaroseblöckchen mit 10 ml Waschpuffer. 30 Minuten pro Waschschrift bei Raumtemperatur mit leichtem Schwenken waschen.
- Lagerung der Agaroseblöckchen über lange Zeit bei 4°C möglich in 1 x Waschpuffer.

Benötigte Lösungen (teilweise aus Stocklösungen angesetzt, siehe unten):

100 ml YE5S Vollmedium flüssig/Ansatz

100 ml 50 mM EDTA, pH 8.0, 4°C kalt

200 µl Suspensionspuffer (10 mM Tris, pH 7.2, 20 mM NaCl<sub>2</sub>, 50 mM EDTA) + Zymolyase (Endkonzentration 1 mg/ml) FRISCH zugeben

Stocklösungen/Chemikalien:

1 M Tris pH 7.2

1 M NaCl<sub>2</sub>

0,5 M EDTA pH 8

ddH<sub>2</sub>O

Zymolyase

1 l Waschpuffer (20 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA)

Stocklösungen:

1 M Tris pH 8.0

0.5 M EDTA pH 8

ddH<sub>2</sub>O

3 ml 1% SDS, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.25 mM EDTA

Stocklösungen:

10% SDS (Stock 100 ml: 10 g SDS + 80 ml ddH<sub>2</sub>O, lösen, auffüllen, nicht autoklavieren)

1 M Tris pH 7.5

0.5 M EDTA pH 8

ddH<sub>2</sub>O

3 ml 1% Lauroylsarcosin, 0.5 M EDTA pH 8.0 (+ Proteinase K 1 mg/ml frisch zugeben)

Stocklösungen/Chemikalien:

0.5 M EDTA pH 8

Lauroylsarcosin

Proteinase K

10 ml 1 x Tris EDTA

#### Benötigte Stocklösungen

100 ml 1 M Tris-HCl pH 7.2

100 ml 1 M Tris-HCl pH 7.5

1 L 1 M Tris-HCl pH 8.0

1 L 0,5 M EDTA pH 8.0 (lösen mit NaOH Plättchen)

2 x 1 L ddH<sub>2</sub>O

### **2.12.2 Isolation genomischer *S. cerevisiae* DNA für die Pulsfeldgelelektrophorese**

- Die zu präparierenden Hefestämme wachsen in 5 ml YPD-Medium bis zur stationären Phase (OD<sub>600</sub> 2-5).
- Jeweils 1,5 ml dieser Kulturen werden in frische Reaktionsgefäße überführt und 15 Sek. bei 13000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden 2 x mit je 1 ml 0,05 M EDTA gewaschen.
- Nach der zweiten Waschung werden die Zellen in 150 µl 0,05 M EDTA resuspendiert und in jeden Ansatz wird 1 µl Zymolyase (20 mg/ml) pipettiert.

- Jedem Ansatz werden 250  $\mu\text{l}$  geschmolzene (ca. 42 °C), 1%ige niedrig schmelzende (LMP)-Agarose zugesetzt. Direkt nach Zugabe der LMP-Agarose wird vorsichtig gemischt und der Ansatz sofort auf Eis gestellt.
- Die entstehenden Agarose-Blöckchen werden mit je 400  $\mu\text{l}$  LET-Puffer unterschichtet und für 6-8 Std. bei 37 °C inkubiert.
- Der LET-Puffer wird verworfen, die Agaroseblöckchen werden in 10 ml Reaktionsgefäße überführt und in je 400  $\mu\text{l}$  NDS-Puffer mit 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K (40 mg/ml) für 8-10 Std. (ü/N) bei 50 °C inkubiert.

Die Agarose-Blöckchen müssen 3 x 30 min mit 0,05 M EDTA gewaschen werden (Aufbewahrt werden die Agarose-Blöckchen in 0,5 M EDTA bei 4 °C, um die DNA vor Verdau zu schützen).

Puffer und Lösungen:

- 0,5 M EDTA
- 0,05 M EDTA
- 0,1 M Tris (pH 7.5)
- Zymolyase (20 mg/ml)
- 1%ige LMP-Agarose in 0,125 M EDTA (pH 7.5)
- LET-Puffer: 0,5 M EDTA; 0,1 M Tris (pH 7.5)
- NDS-Puffer: 0,5 M EDTA; 0,1 M Tris (pH 7.5);
- 1% N-Lauroylsarcosin pH 9.5; 2 mg Proteinase K

### 2.12.3 Auftrennung von Chromosomen mittels

#### Pulsfeldgelelektrophorese

Auf speziellen Chromosomengelen ist es möglich, neben den natürlichen Chromosomen der Hefen *S. pombe* bzw. *S. cerevisiae* auch kleine Chromosomen wie das Minichromosom Ch16 oder ein artifizielles Hefechromosom (YAC) zu visualisieren. Um die Chromosomen im Agarosegel auftrennen zu können, sollte die DNA möglichst schonend präpariert werden, da die Chromosomen sonst brechen könnten. Dazu wird die von P. Hieter veränderte Methode nach Schwartz und Cantor angewendet (Schwartz und Cantor 1984). Die Chromosomen werden dann in einem gepulsten elektrischen Feld durch CHEF-Agarose-Gelelektrophorese (CHEF = Clamped homogeneous Electrical Field) aufgetrennt.

*S. cerevisiae*:

Zur Auftrennung von *S. cerevisiae*-Chromosomen wird ein 1% (in 0,5 x TBE) Agaroseflachbettgel gegossen. In die Ladungstaschen dieses Gels werden ca. 100 µl von den 3 x mit 0,05 M EDTA gewaschenen Agarose-Blöckchen geladen. Dazu wird mit einem sterilen Skalpell ein Stück eines Agaroseblöckchens abgeschnitten und bei 65 °C in einem Reaktionsgefäß geschmolzen. Um Beschädigungen der großen DNA-Moleküle durch Scherung beim Pipettieren zu vermeiden, wird die geschmolzene Agarose mit einer 1000 µl Pipette in die Ladungstaschen pipettiert. Nach dem Erstarren der LMP-Agarose kann der Gellauf gestartet werden. Zur Auftrennung von *S. cerevisiae*-Chromosomen wird der Gellauf in 0,5 x TBE-Puffer, bei 300V, 60-100 mA und bei einer Puffertemperatur von ca. 4 °C durchgeführt.

Nach dem Gellauf wird das Gel für ca. 30 Min. in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 mg/ml) angefärbt. Im Anschluss daran wird das Gel in einem Wasserbad unter Schütteln wieder entfärbt. Auf einem Transilluminator können daraufhin die aufgetrennten und angefärbten Hefechromosomen und auch die YACs identifiziert werden.

- Einstellungen: (Gellauf über 2 Tage)

1. Switching time: 7/100

Laufzeit: 24 h

4,5 V/cm

2. Switching time: 80/400

Laufzeit: 23 h

4 V/cm

Puffer: 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45 mM Borat, 1 mM EDTA, pH 8.3)

*S. pombe*:

- Die Agaroseblöckchen werden vor der Elektrophorese in 1 x TE für mindestens 1 Stunde äquilibriert.
- Beladung des 1 % Agarosegels vorsichtig mit einem kleinen Stück der Agaroseblöckchen, (Spatel + Skalpell verwenden).
- Die beladenen Taschen werden mit 1 % flüssiger Agarose versiegelt.
- Gellauf in 0.5 x TBE Puffer mit dem CHEF III Gerät.
- Einstellungen:

6 V/cm

Switch time: 115 Sek.

Angle: 120°

Temperatur: 14 °C

Zeit: 24 h → Färbung: 30 Minuten in EtBr-Lösung

### 2.12.4 Southern Blot Analyse

Die Methode des Southern Blots dient der Identifikation spezifischer DNA Fragmente (i. d. R. von Genen) eines Organismus mit Hilfe einer gegen diese DNA gerichteten DNA-Sonde. Bei vorangegangener Pulsfeldgelelektrophorese (Kap. 2.12.3) kann das zu detektierende DNA Fragment genau dem Chromosom zugeordnet werden, auf dem es lokalisiert ist.

Für die Erstellung der Sonde und die Detektion spezifischer immobilisierter chromosomaler DNA wurde das „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ der Firma Roche verwendet.

#### Sondenherstellung:

- PCR mit Plasmid als Matrize (Oligonukleotide müssen nicht ganzes Gen beinhalten, es reicht eine spezifische Sequenz die später erkannt wird; PCR mit Taq-Polymerase)
- Gelelution (QiaQuick Gel Extraction Kit)
- um das PCR-Produkt in größerer Reinheit zu erhalten (Plasmidreste können zu unspezifischen Banden führen), kann die PCR nochmals (mit der eluierten DNA als Matrize) wiederholt werden
- Messung der DNA Konzentration mittels Spektralphotometer (Nanodrop)

#### Sondenreaktion:

- 1 µg für die Sondenreaktion einsetzen (Endvolumen von 15 µl, vgl. Tabelle Kit)
- DNA 10 min bei 100 °C kochen und direkt auf Eis abkühlen
- DNA + 2 µl „Hexanucleotid Mix 10 x“ (Vial5) + 2 µl „dNTP Labeling Mix“ (Vial 6) + 1 µl „Klenow enzyme labeling grade“ (Vial7), kurz zentrifugieren
- 20 h bei 37 °C inkubieren
- Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8.0) stoppen und/oder 10 min bei 65 °C erhitzen
- Zusätzlich kann eine Kontrolle parallel durchgeführt werden: 5 µl DNA2 (Vial2) + 10 µl H<sub>2</sub>O + Mix aus Vial 5,6,7 s. o. → siehe S. 9 (Kit)

#### Sonden testen:

- Verdünnungsreihe von eigenen Sonden und der Kontrolle erstellen
- die Verdünnung wird von der Menge und den Konzentrationen angepasst

Tab. 2-1 Verdünnungsreihe für einen Sondentest.

Gefäß	aus Gefäß #	DNA	Puffer Vial3	Verdünnung	Endkonzentration
1					0,5 ng/μl
2	1	1 μl	49 μl	1:50	10 pg/μl
3	2	3 μl	7 μl	1:3,3	3 pg/μl
4	2	1 μl	9 μl	1:10	1 pg/μl
5	3	1 μl	9 μl	1:10	0,3 pg/μl
6	4	1 μl	9 μl	1:10	0,1 pg/μl
7	5	1 μl	9 μl	1:10	0,03 pg/μl
8	6	1 μl	9 μl	1:10	0,01 pg/μl
9	-	0 μl	10 μl	-	0

Gefäß 1 = 0,5 ng/μl (nicht wie im Kit angegeben 1 ng/μl)

- je 1 μl der Verdünnung auf die Membran tropfen (nebeneinander 9 Tropfen derselben Probe)
- „Crosslinking“ durch Backen (30min im Sterilisator bei 120 °C)
- in 20 ml Maleinsäurewaschpuffer für 2 min in einem Plastikbehältnis waschen
- 30 min in 10 ml Blockierungslsg. schütteln
- 30 min in 10 ml Antikörperlsg. schütteln
- 2 x 15 min in 10 ml Maleinsäurewaschlsg. waschen
- 2-5 min in Detektionspuffer äquilibrieren
- 2 ml frische „Colorsubstrate solution“ auf die Membran geben, nicht schütteln und dunkel halten
- mit H<sub>2</sub>O die Reaktion stoppen
- Vergleich der Intensität der Punkte von Kontrolle und eigenen Sonden → abschätzen

#### Gel waschen:

- Gel für 10 min in Depurinierungslsg. schütteln (nicht zu lange, je nach Größe der DNA, darf nicht zu stark angegriffen werden), anschließend kurz für 2 min mit H<sub>2</sub>O waschen
- 2 x 15 min in Denaturierungslsg. schütteln und kurz für 2 min mit H<sub>2</sub>O waschen
- 2 x 15 min. in Neutralisierungslsg. schütteln und kurz für 2 min mit H<sub>2</sub>O waschen
- währenddessen Membran (zuschneiden in exakter Größe des Gels) kurz mit H<sub>2</sub>O nass machen und für 15 min in 10 x SSC äquilibrieren

#### DNA-Übertragung auf Membran mittels Kapillartransfer (Abb. 2-1):

- große Glasschale, dort hinein eine kleinere Glasschale mit dem Boden nach oben, auf diese die Saugbrücke (langes Stück Whatmanpapier) legen, die mit einer Seite in eine andere Aluschale mit 10 x SSC Puffer führt (mit Deckel)

- auf die Brücke auf der Glasschale 4 feuchte Whatmanpapiere legen, das Gel mit den Taschen nach unten genau positionieren, die Membran luftblasenfrei exakt auf das Gel legen und die Taschen auf der Membran markieren, darauf 2 feuchte und dann 2 trockene Whatmanpapiere legen (mit Parafilm unten abdichten, damit die Flüssigkeit nur nach oben und nicht zur Seite ausweichen kann)
- Papiertücher in der Größe des Gels darauf legen und abschließend ein Gewicht, das die Apparatur ausbalanciert
- 12-24 h DNA-Transfer (je nach Größe der DNA, ü/N)

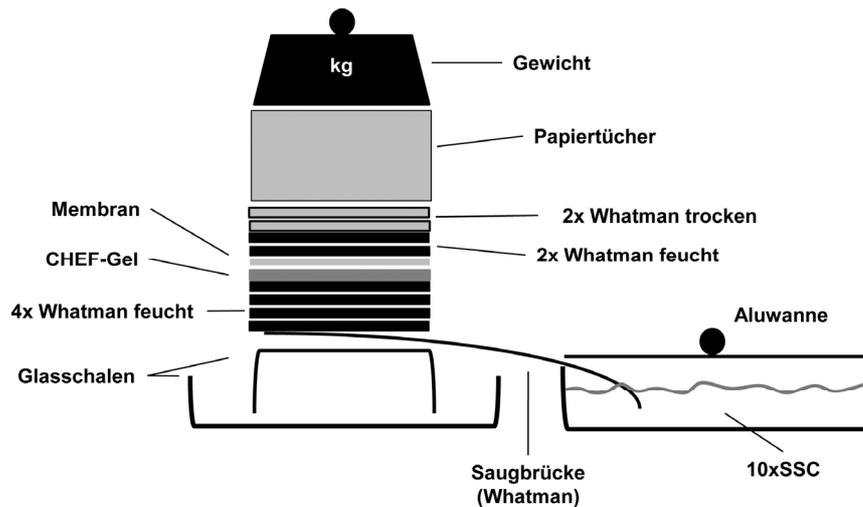


Abb. 2-1 Aufbau für den Kapillartransfer von DNA auf eine Membran (Southern Blot).

#### „Crosslinking“:

- Membran in 2 x SSC waschen
- Membran für 30 min bei 120 °C backen (Sterilisator)
- die Membran kann bei 4 °C gelagert werden oder direkt weiter behandelt werden

#### Membran mit Sonde hybridisieren:

- trockene oder nasse Membran in einen Plastikbehälter mit Deckel geben
- Prähybridisierungslsg. (vorwärmen) hinzugeben und 3 h bis ü/N bei 68 °C im Wasserbad schütteln
- Denaturierung der DIG gelabelten DNA Sonde (25ng/mL)\* für 5 min bei 100 °C → direkt im Eis abkühlen
- Prähybridisierungslsg. vorwärmen und mit Sonde mischen = Hybridisierungslsg. (3,5 ml/100 cm<sup>2</sup>)
- Membran zu ¾ einschweißen und Hybridisierungslsg. luftblasenfrei hinzugeben, komplett einschweißen
- 6 h bis ü/N bei 68 °C inkubieren
- die Hybridisierungslsg. kann nachher aufgefangen werden und bei -20 °C gelagert werden

- bei erneuter Nutzung nochmals 10 min bei 68 °C inkubieren

#### Membran Waschen:

- Membran aus der Folie schneiden und in einem Plastikbehälter mit Deckel geben
- 2 x 10 min bei RT in Waschlsg. 1 waschen (schütteln)
- 2 x 25 min bei 68 °C (im Wasserbad) in Waschlsg. 2 (Lösung bereits vorwärmen) waschen

#### Detektion:

- Membran 1-5 min. in Maleinsäurewaschpuffer waschen
- 30 min. in 100 ml Blockierungslsg. inkubieren (auf dem Schüttler)
- 30 min in 20 ml Antikörperlsg. inkubieren (auf dem Schüttler)
- 2 x 15 min. in 100 ml Maleinsäurewaschpuffer waschen
- Membran für 2-5 min in 20 ml Detektionspuffer äquilibrieren
- 10 ml „Colorsubstrate solution“ hinzugeben, verdunkeln und nicht mehr schütteln (es dauert einige Minuten bis Banden sichtbar sind; je nach Intensität kann die Detektion nach 1-3 h gestoppt werden, nach 16 h ist die Reaktion spätestens beendet)
- die Reaktion wird mit 50 ml sterilem H<sub>2</sub>O gestoppt
- Membran nass oder trocken fotografieren (Lineal dazulegen, um leichter die Banden zuordnen zu können)

#### Puffer und Lösungen:

Gemäß Protokoll „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ der Firma Roche.

## 2.12.5 Transformation

### 2.12.5.1 Transformation von *S. pombe*

Für die Transformation von DNA in *S. pombe* Zellen wurde die Lithium-Acetatmethode eingesetzt (Okazaki *et al.* 1990). Die DNA wurde durch einen 15-minütigen Hitzeschockschritt bei 43 °C von den kompetenten Zellen aufgenommen. Wenn für die spezifische Integration über homologe Rekombination in das Genom der Hefezelle lineare DNA-Fragmente transformiert werden sollten, so wurden dem Transformationsansatz 5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) zugegeben. Die Heringssperma-DNA muss in einem Denaturierungsschritt vor ihrem Einsatz 10 Minuten bei 100 °C gekocht werden. Sie verhindert den Abbau der zu integrierenden DNA-Fragmente durch die Exonukleasen der Hefezelle.

### 2.12.5.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Um Integrationskassetten in Hefe zu transformieren, wurde ein hocheffizientes Transformationsprotokoll verwendet, welches der Lithiumacetat-Methode basiert (Gietz *et al.* 1995).

- Eine 5 ml ü/N-Kultur des zu transformierenden Hefestammes wird in YPD<sup>+</sup>-Medium angesetzt.
- Die Zellzahl der ü/N-Kultur wird bestimmt und eine 50 ml YPD<sup>+</sup>-Kultur wird mit  $5 \times 10^6$  Zellen/ml angeimpft.
- Es erfolgt Wachstum bei 30 °C unter rotierendem Schütteln bis zu einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml. Falls die Zellmenge geringer ist, sollte beachtet werden, dass mindestens 2 Zellteilungen vor der Transformation durchlaufen werden müssen. Die Transformationseffizienz bleibt über 3 bis 4 Zellteilungen konstant.
- Die Kultur wird 5 min bei 3500 rpm sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in 25 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut 5 min 3500 rpm sedimentiert.
- Das erhaltene Zellsediment wird in 1 ml 100 mM LiAc pH 8.4 – 8.9 resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Die Zellen werden 5 Sek. bei 13000 rpm zentrifugiert und in 0,1 M LiAc pH 8.4 – 8.9 resuspendiert, nachdem der Überstand mit einer Pipette abgezogen wurde. Die Zellmenge sollte bei  $2 \times 10^9$  Zellen/ml liegen.
- Für die Transformationen werden 50 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.
- Die Zellen werden erneut 5 Sek. bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen.
- Die Carrier-DNA (2 mg/ml) wird zum Denaturieren für 10 min auf 100 °C erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt.
- Zu den kompetenten Hefezellen wird der folgende „Transformationsmix“ in der vorgegebenen Reihenfolge zugegeben:
  - 240 µl PEG (50 % w/v)
  - 36 µl 1 M LiAc pH 8.4 – 8.9
  - 50 µl Carrier DNA
  - x µl zu transformierende DNA (0,1 – 1 µg)
  - 34-x µl ddH<sub>2</sub>O
- Die Ansätze werden gut gemischt und 30 min bei 30 °C inkubiert.
- Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 30 min bei 42 °C im Thermoblock.

- Die Transformationsansätze werden bei 13000 rpm für 5 Sek. sedimentiert und in 200 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.
- Die Transformationsansätze werden zu je 90 % und 10 % auf zwei selektive Platten ausgestrichen und bei 30 °C für 2 Tage inkubiert.

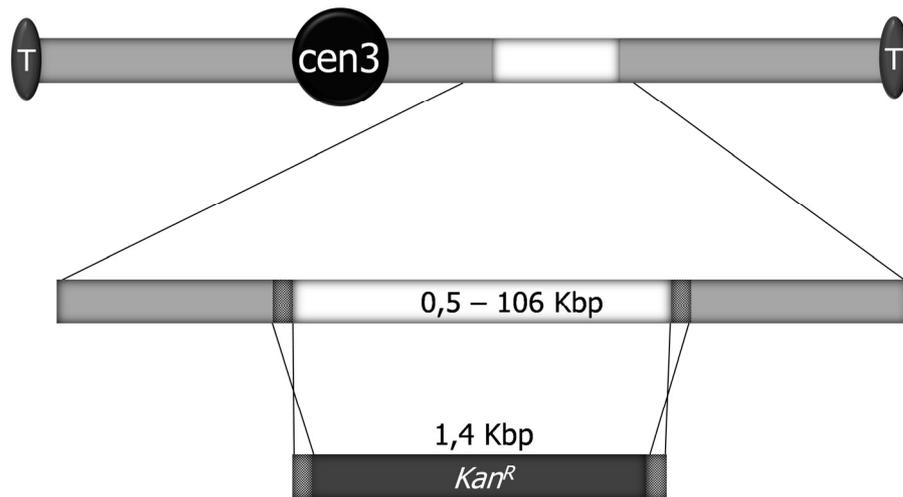
## 2.12.6 Homologe Rekombination

Die Methode der homologen Rekombination dient der Integration von linearen DNA-Fragmenten in das Genom eines Organismus. Um ein mittels PCR generiertes DNA-Fragment in das Genom der Hefen *S. pombe* oder *S. cerevisiae* zu integrieren, muss dieses am 5´ und 3´ Ende Sequenzen mit einer Länge von mindestens 80 Bp Homologie (*S. pombe*) oder 40 Bp (*S. cerevisiae*) zum Integrationsort aufweisen (Bahler *et al.* 1998). Mit dieser Methode können Fusionsproteine hergestellt werden, indem die lineare DNA-Kassette endogen an einen offenen Leserahmen fusioniert wird. Zudem ist es möglich, Kassetten mit Markergenen in das Genom einzubringen und gegen ganze Gene oder noch größere Bereiche eines Chromosoms auszutauschen. Dabei ist jedoch unbedingt darauf zu achten, diese Kassette in einem Bereich zu integrieren, in dem nicht die Promotor- oder Terminatorregion eines benachbarten Gens lokalisiert ist, die durch die Integration unterbrochen werden könnte.

### 2.12.6.1 Deletion großer chromosomaler Bereiche in *S. pombe*

Für die Deletion von offenen Leserastern (ORFs) oder größeren chromosomalen Bereichen wurde eine G418-Resistenz (*kan<sup>R</sup>*) – Kassette verwendet.

Abb. 2-2 zeigt schematisch die Integration der Kassette über homologe Rekombination. Für die Generierung der Kassette wurden Oligonukleotide verwendet, die 18-22 bp Homologie zum Matrizenplasmid sowie 80 bp Homologie zum Integrationsort aufwiesen. Als Matrize für das PCR-Fragment diente das Plasmid 177, welches das *kan<sup>R</sup>* (*kanMx6:GFP*) Epitop enthält. Das DNA-Fragment wurde in den aneuploiden *S. pombe* Stamm UFY 103 transformiert. Der Integrationsort befand sich auf Chromosom III und/oder auf dem Minichromosom Ch16. Für eine erfolgreiche Integration werden große Mengen des PCR-Fragments benötigt, i. d. R. wurden für einen Transformationsansatz fünf bis zehn vereinigte (aufkonzentriert durch Fällung) *Taq* PCR-Ansätze eingesetzt.



**Abb. 2-2 Schematische Darstellung der Deletion chromosomaler Bereiche von Chr. III bzw. Ch16 mittels Austausch durch eine G418-Resistenzkassette (*Kan<sup>R</sup>*).**

Der auszutauschende chromosomale Bereich (je nach Ansatz 0,5 bis 106 Kbp groß) ist weiß dargestellt, die Homologiebereiche zwischen Deletionskassette (unten) und Integrationsort (oben) kariert. T = Telomer; *cen3* = Zentromer.

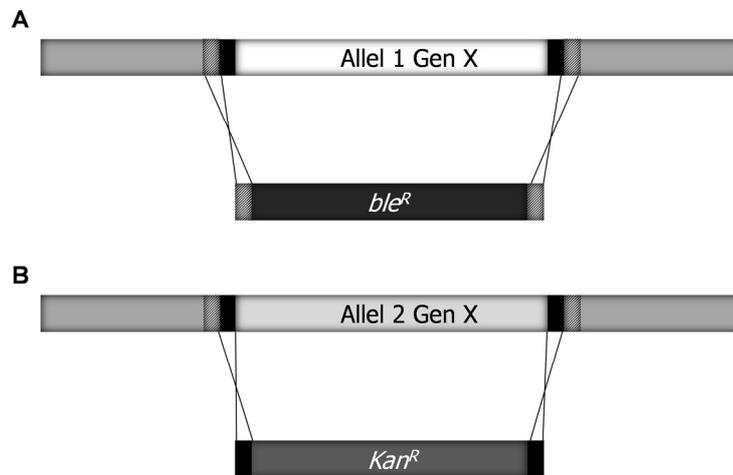
Positive Transformanten konnten dadurch identifiziert werden, dass sie durch das integrierte *kanMx*-Gen in der Lage waren, auf Platten mit dem Antibiotikum Geneticin-Disulfat (G418) zu wachsen. Zur Verifikation der korrekten Integration des Markergens in das Genom wurde eine PCR auf Zellen (Übergang der 5' Region und der 3' Region zur Kassette) (Kap. 2.11.3.2) mit spezifischen Oligonukleotiden für die Kassette und den umliegenden genomischen Bereich durchgeführt.

### 2.12.6.2 Hetero- und homozygote Deletion von ORFs in *S. cerevisiae*

Analog zur Deletion in *S. pombe* (Kap. 2.12.6.1) wurden für die gezielte Deletion von ORFs in der Hefe *S. cerevisiae* mittels PCR generierte Deletionskassetten eingesetzt. Die Homologie der Oligonukleotide zum Integrationsort betrug 40 bp. Die Deletion eines Gens in haploiden *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte mit einer Phleomycin (*ble*)-Resistenzkassette. Als Matrize für das PCR-Fragment diente das Plasmid pUG66.

Die heterozygote Deletion eines Allels in diploiden *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte ebenfalls mit einer Phleomycin-Resistenzkassette (Abb. 2-3A). Sollte für eine homozygote Deletion im Anschluss das zweite Allel ausgeschaltet werden, so geschah dies über eine G418-Resistenzkassette (Matrize: Plasmid 177). Um eine versehentliche Integration am Ort des bereits vorhandenen Phleomycin-Markergens zu verhindern, wurden die Homologiebereiche der Oligonukleotide für die G418-Kassette 40 bp hinter (5') bzw. vor (3') denen der Phleomycinkassette gewählt (Abb. 2-3B), so dass eine Integration der G418-Kassette ausschließlich gegen einen Austausch des zweiten Allels stattfinden konnte. Die korrekte Integration der Markergene in das Genom wurde mittels PCR auf

Zellen mit spezifischen Oligonukleotiden für die Kasette und den umliegenden genomischen Bereich überprüft.



**Abb. 2-3 Schematische Darstellung der Deletion eines ORFs in einem diploiden *S. cerevisiae* Stamm.**

**A** Austausch eines Allels (weiß) gegen eine Phleomycin-Resistenzkasette (*ble<sup>R</sup>*). Die Homologiebereiche sind schraffiert dargestellt. **B** Austausch des zweiten Allels (hellgrau) gegen eine Kanamycin-Resistenzkasette (*Kan<sup>R</sup>*). Die Homologiebereiche sind schwarz dargestellt.

### 2.12.7 Paarung von *S. pombe* Stämmen

*S. pombe* ist ein bevorzugt haploider Organismus, weshalb es nach der Paarung zweier haploider Stämme und anschließender Karyogamie in der Regel unmittelbar zur Ausbildung von Tetraden kommt. Zellen von zwei haploiden Stämme unterschiedlichen Paarungstyps ( $h^+$  und  $h^-$ ) wurden in einem Volumen von 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermengt. Das Gemisch wurde anschließend entweder auf Minimalmediumplatten ohne Supplementzugaben oder auf Malzextraktplatten pipettiert. Gepaarte Zellen verschmelzen zu einer diploiden Zelle, die sich unter Nährstoffmangel während der Meiose zu einem Ascus mit vier haploiden Sporen (Tetrade) entwickelt. Nach einer Inkubationsdauer von zwei bis drei Tagen bei 25 °C wurden die Platten mikroskopisch auf die Anwesenheit von Tetraden untersucht. Der Genotyp der einzelnen Sporen konnte dann mittels Tetraden- oder „Random spore“-Analyse bestimmt werden.

#### Malzextraktmedium:

12 g Malzextrakt

56,25 ml Adeninstocklösung

56,25 ml Uracilstocklösung

3 ml Histidinstocklösung

3 ml Leucinstocklösung

8 g Agar

in 281,5 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, den pH-Wert auf 5,5 einstellen und autoklavieren.

### 2.12.7.1 „Random spore“ Analyse

Diese Methode diente der Analyse von Sporen im größeren Maßstab. Allerdings konnten im Gegensatz zu der Tetradenanalyse die Sporen nicht mehr einer einzelnen Tetrade zugeordnet werden. Die Tetraden der Kreuzung wurden hierbei nicht direkt auf eine Vollmediumsplatte aufgebracht, sondern zunächst in einem Gemisch bestehend aus 980 µl ddH<sub>2</sub>O und 20 µl einer 1:10 verdünnten β-Glucuronidase-Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß resuspendiert. Durch die β-Glucuronidase Behandlung der Tetraden bei Raumtemperatur ü/N wurden die vegetativen Zellen und die Wände der Asci verdaut, die Sporenwände blieben jedoch intakt. Das Gemisch wurde zentrifugiert und die Sporen anschließend zweimal mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Sporenzahl pro Milliliter wurde dann mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Nun wurden jeweils 200 Sporen auf einer Vollmediumsplatte ausplattiert. Von den bei 25 °C heranwachsenden Kolonien konnten anschließend der Genotyp und dadurch die Anzahl rekombinanter Kolonien bestimmt werden.

### 2.12.7.2 Tetradenanalyse

Die Tetradenanalyse diente der Isolation der vier Sporen aus einer einzelnen Tetrade, um deren Genotyp und dadurch auch die Segregation bestimmter genetischer Marker während der Meiose überprüfen zu können. Dazu wurde Zellmaterial von der Kreuzung auf der Malzextraktplatte abgenommen und in 200 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Anschließend wurden von dieser Suspension 2-3 Tropfen auf eine schräg gehaltene Vollmediumsplatte getropft, so dass die Tropfen in einer Linie die Platte hinunterflossen. Sobald die Suspension auf der Platte angetrocknet war, wurden einzelne Asci unter dem Tetradenmikroskop mit Hilfe einer Glasfasernadel, die an einem Mikromanipulator befestigt ist, in einer Linie im Abstand von jeweils 5 mm auf der Platte abgelegt. Die Platte wurde nun mehrere Stunden bei 25 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen platzten die Asciwände auf und die vier Sporen wurden freigesetzt. Nun wurden die Sporen einer Tetrade mittels Mikromanipulator auf der Platte vereinzelt und untereinander abgelegt. Die Platte wurde bei 25 °C für mehrere Tage inkubiert, bis aus den Sporen Kolonien herangewachsen waren. Mittels Selektivausstrich einer einzelnen Kolonie ließ sich nun der Genotyp einer Spore bestimmen.

### 2.12.7.3 Genotypbestimmung

Durch die Überprüfung der Phänotypen generierter *S. pombe* Stämme konnte auf deren Genotyp geschlossen werden (Tab. 2-2). Das Wachstum der Zellen auf selektiven Minimalmediumplatten, denen entsprechende Aminosäuren oder Basen nicht zugesetzt wurden, diente der Bestimmung der Prototrophie-Marker. Die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin-Disulfat (G418) wurde auf G418-haltigen Vollmediumplatten getestet. Temperatursensitivität konnte durch die Inkubation der Zellen auf Vollmediumplatten bei Temperaturen von 30 °C bis zu 36 °C verifiziert werden.

**Tab. 2-2 Genotypbestimmung durch Analyse des Phänotyps.**

Genetischer Marker	Phänotyp
<i>ade6-M210</i>	kein Wachstum auf MM ohne Adenin/dunkelrosa auf MM lim. Adenin
<i>ade6-M216</i>	kein Wachstum auf MM ohne Adenin/hellrosa auf MM lim. Adenin
<i>leu1-32</i>	kein Wachstum auf MM ohne Leucin
<i>ura4-D6</i>	kein Wachstum auf MM ohne Uracil
<i>ura4-D18</i>	kein Wachstum auf MM ohne Uracil
<i>his3-D1</i>	kein Wachstum auf MM ohne Leucin
<i>kan<sup>R</sup></i>	Wachstum auf G418-haltigen Platten

## 2.12.8 Paarung von *S. cerevisiae* Stämmen

### 2.12.8.1 Paarungstypwechsel

Zum Wechsel des Paarungstyps wurde ein *HO*-Plasmid (#204) verwendet, welches die *HO*-Endonuklease kodiert. Das *HO* Gen ist in den meisten verwendeten Laborstämmen nicht mehr vorhanden, um einen Paarungstypwechsel innerhalb einer haploiden Population und damit die Ausbildung diploider Zellen zu verhindern.

Das Plasmid wurde in den entsprechenden haploiden Stamm transformiert (Kap. 2.12.5.2), die Selektion positiver Transformanden erfolgte auf SD-Mangelmedium ohne Uracil. Zellen, die das Plasmid enthielten, bildeten durch die *HO*-vermittelte Genkonversion am *MAT* Locus Populationen mit gemischtem Paarungstyp und konnten so mit sich selbst paaren. Das Plasmid musste anschließend wieder verloren werden, damit der später gewünschte haploide Stamm seinen Paarungstyp nicht mehr ändern konnte. Auf folgende Weise wurden diploide Zellen isoliert, die das Plasmid wieder verloren hatten:

- Transformanten wurden in 5 ml YPD inkubiert und je 250 Zellen auf YPD Platten plattiert
- nach 24 h Inkubation erfolgte eine Replikatlattierung auf SD-Platten ohne Uracil

- Transformanten, die auf SD ohne Uracil nicht mehr wachsen können (Verlust des Plasmids) wurden nochmals zur Kontrolle von der Ausgangs-YPD-Platte auf SD ohne Uracil ausgestrichen
- zusätzlich wurde durch Paarungstyp-PCR (siehe Kap. 2.12.8.2) auf Zellen überprüft, welche Kolonien diploid sind
- isolierte diploide Stämme wurden zur Sporulation (siehe Kap. 2.12.8.2) angeregt werden, so dass ein haploider Stamm des dem ursprünglichen Stamm entgegengesetzten Paarungstyps isoliert werden konnte

### 2.12.8.2 Kreuzung, Sporulation und Tetradenanalyse

Die Kreuzung haploider Hefestämme wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Zellen der beiden Stämme wurden auf getrennten YPD Platten frisch ausgestrichen und ü/N inkubiert
- mit gelber Spitze wurden von den Ausstrichen Zellen aufgenommen und in 20 µl H<sub>2</sub>O gemischt
- auf eine YPD Platte wurden 10 µl der Suspension getropft
- die Inkubation erfolgte für ca. 4-8 h bei 30 °C
- entstandene Zygoten wurden mit dem Mikromanipulator vereinzelt und wuchsen zu Kolonien heran

Die entstandenen diploiden Zellen konnten im Anschluss durch das Ausstreichen auf Mangelmedium zur Sporulation angeregt werden. Dazu wurde Kaliumacetat (KAc)-Medium verwendet. Um die Effizienz der Sporulation zu erhöhen, wurden die Zellen vor dem Ausstreichen auf KAc-Platten für 48 h auf sog. Präsporulationsmedium ausgestrichen. Dieses enthält eine im Vergleich zu Standardnährmedium erhöhte Glukosekonzentration. Die Inkubation auf KAc-Platten erfolgte für 4 Tage bei 30 °C.

Für eine anschließende Tetradenanalyse wurden etwa 50000 Zellen von den Sporulationsplatten entnommen und in 50 µl 1 M Sorbit resuspendiert. Es wurden 2 µl 20 mg/ml Zymolyase (20T) zugegeben, die Mischung wurde für 10-15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 450 µl 1 M Sorbit gestoppt, dann wurden die Zellen auf Eis gestellt. 10 µl der Zellsuspension wurden in einem Strich auf einer YPD-Platte aufgetragen. Tetraden und die darin enthaltenden Sporen konnten mit Hilfe eines Mikromanipulators vereinzelt und weiter analysiert werden. Die Inkubation der Platten erfolgte für 2-3 Tage bei 30 °C. Durch Selektivausstrich und Paarungstyp-PCR konnten die gewünschten haploiden Zellen isoliert werden.

Paarungstyp-PCR:

94°C	5min	
94°C	1min	} 30 Zyklen
58°C	2min	
72°C	2min	
72°C	8min	

verwendete Oligonukleotide: 622 ( $\alpha$ ), 623 ( $\underline{a}$ ), 624 (für  $\underline{a}$  und  $\alpha$ )

erwartete Produkte bei entsprechendem Paarungstyp:  $\underline{a}$  – 544 bp  
 $\alpha$  – 404 bp  
 $\underline{a}/\alpha$  – 404 & 544 bp

## 2.13 Alterungsexperimente

### 2.13.1 Bestimmung der chronologischen Lebensspanne von *S. pombe*

Die Bestimmung der chronologischen Lebensspanne (CLS) von *S. pombe* (Abb. 2-4) erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Roux (Roux *et al.* 2006).

- Stamm frisch auftauen auf YE5S, Inkubation bei 30 °C.
- Nach 1-2 Tagen auf Einzelkolonien ausstreichen auf - wenn nötig selektiver - EMM-Platte (Selektion auf Minichromosom).
- 4-5 Tage Inkubation bei 30 °C
- Inokulieren der 1. Vorkultur von Einzelkolonie: 20 ml 4 x EMM-Medium in 50 ml Kolben, wobei die Supplemente Adenin, Uracil, Lysin, Leucin und Histidin in 4-fachem Überschuss zugegeben werden → 30 °C 220 rpm auf Infors Multitron Schüttler mit 75 % Luftfeuchtigkeit. Alle Kolben in Alterungsexperimenten müssen mit Silikonschwammstopfen verschlossen werden, um einen Gasaustausch zu ermöglichen und gleichzeitig die Verdunstung des Mediums zu verhindern.
- Inokulieren der 2. Vorkultur (20 ml 4 x EMM in 50 ml Kolben) mit Start OD 0,2, wenn die erste Vorkultur eine OD<sub>600</sub> von 2-4 erreicht hat (ca. 15 Stunden) → Inkubation für 24 h bei 30 °C, 75 % Luftfeuchtigkeit und 220 rpm.
- Inokulieren der Hauptkultur mit einer OD von 0,1-0,4 (je nach Wachstum des Stamms, die Stämme sollten in etwa zur gleichen Zeit stationär werden) in einem 1 Liter Kolben mit 200 ml 4 x EMM-Medium. → Inkubation bei 30 °C, 75 % Luftfeuchtigkeit und 220 rpm.

- Wenn die Hauptkultur stationär ist (i. d. R. nach etwa 48 Stunden, Überprüfung durch Mikroskopie der Zellmorphologie und Bestimmung der optischen Dichte), wird diese in 3 x 250 ml Kolben mit je 50 ml Kultur aufgeteilt.
- Eine erste Probe wird sofort entnommen, von der eine 1:5000 (bei EMM mit reduzierter Glucose) oder 1:10000 Verdünnung (bei EMM mit 2 % Glucose) (Volumen 100 µl) auf Vollmediumsplatten (3 Platten je Kolben) ausplattiert wird. Es sollten etwa 300-500 Kolonien auf jeder Platte wachsen.
- Die Platten werden für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert und alle gebildeten Kolonien mittels Colony Counter gezählt. Der Mittelwert der Kolonienzahl (Mittelwert aus den Platten der 3 Kolben je Stamm) dieser ersten Platten wird als 100 % festgesetzt. Die prozentuale Standardabweichung vom Mittelwert wird im Graphen zusätzlich dargestellt.
- Es werden alle 2-3 Tage so lange weiter Aliquots der Hauptkulturen ausplattiert (Verdünnungen werden so angepasst, dass 300-500 Kolonien/Platte wachsen), bis 99,9 % der ausplattierten Zellen keine Kolonien mehr bilden können und die Kultur somit als tot definiert wird (Abb. 2-4B).

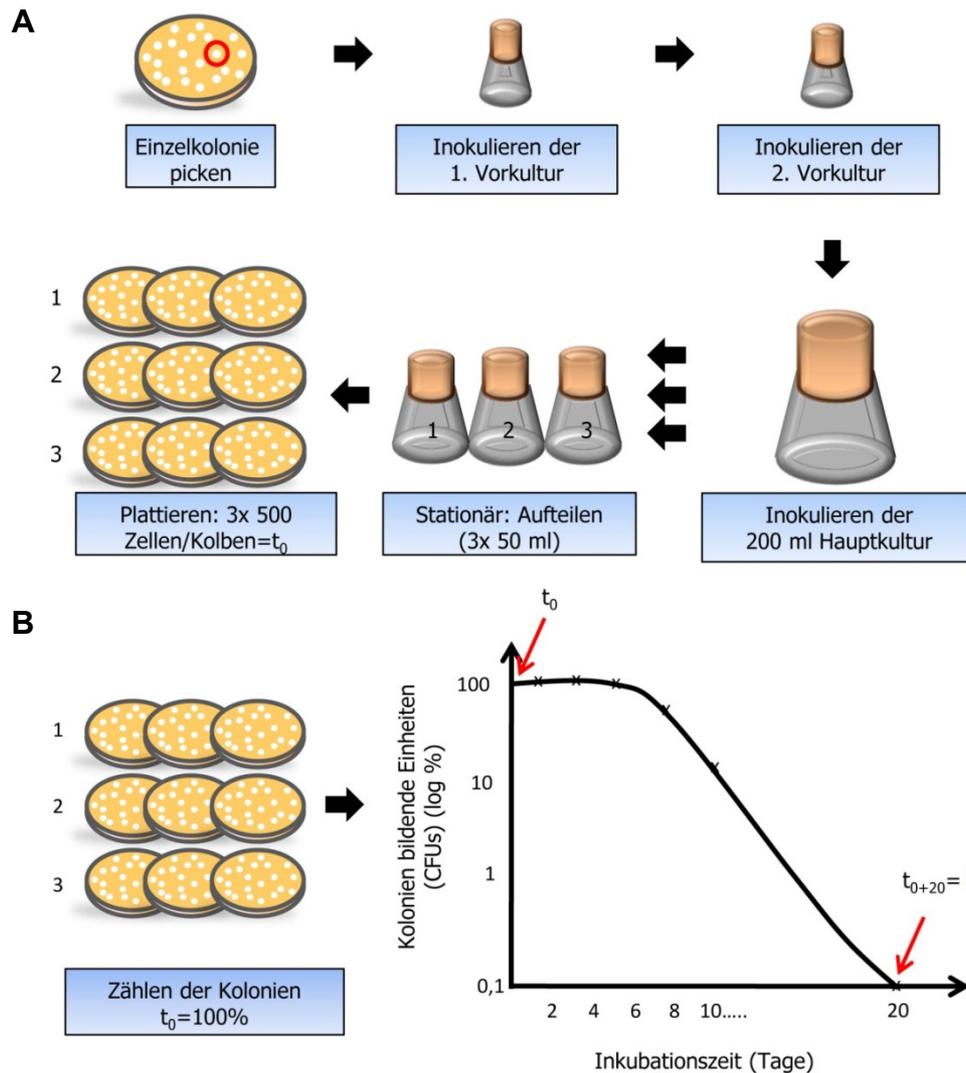
#### 4 x EMM Medium:

Rezept siehe EMM Medium (Kap. 2.10.1), jedoch werden die Supplemente Adenin, Uracil, Lysin, Leucin und Histidin in 4-fachem Überschuss (300 mg/l) aus den Stocklösungen zugesetzt.

Wichtig: Ammoniumchlorid von Sigma muss die Reinheit „cell culture tested“ aufweisen. Volumina und Mengenangaben sind beim Ansetzen dieses Mediums genauestens zu beachten.

Für Experimente mit limitierter Glucose (Kalorienrestriktion) wurden dem Medium 0,5 % Glucose (10 g/l; getrennt autoklavieren) zugefügt.

Bei jedem Experiment wurden die zu Beginn des Versuchs heranwachsenden Kolonien des aneuploiden Stamms auf Anwesenheit des Minichromosoms überprüft, indem entweder mindestens 300 Kolonien von den Vollmediumsplatten auf Selektivmedium (je nach Selektionsmarker des vorliegenden Minichromosoms: MM ohne Adenin oder Leucin oder YE5S Platten mit G418) ausgestrichen oder die Vollmediumsplatten replikaplattiert wurden. Konnten die Zellen einer Kolonie auf dem Selektivmedium nicht mehr wachsen, so bedeutete dies einen Verlust des Minichromosoms in der Flüssigkultur. Lag der Anteil von Kolonien ohne Minichromosom über 3 %, so konnte dies zu einer Verfälschung der Alterungskurven führen, so dass die Versuche abgebrochen wurden.



**Abb. 2-4 Bestimmung der chronologischen Lebensspanne (CLS).**

**A** Schematische Darstellung der Durchführung eines CLS Experiments. **B** Schema der Auswertung und graphischen Darstellung eines CLS Experiments.  $t$  = Tag; Erläuterung siehe Protokoll.

## 2.13.2 Bestimmung der replikativen Lebensspanne von *S. cerevisiae*

Die Bestimmung der replikativen Lebensspanne (RLS) von *S. cerevisiae* erfolgte im Wesentlichen nach einem Standardprotokoll von Steffen (Steffen *et al.* 2009).

- Stamm auf YPD als Einzelkolonieausstrich auftauen, 2-3 d 30°C  
→ bei einem Mutantenstamm wird der Wildtypstamm mitgetestet
- Auf plan gegossener YPD Platte (25 ml Medium) Einzelkolonie am linken Rand dünn ausstreichen (Wildtyp oben, zweiter Stamm unten) und ü/N bei RT inkubieren (insgesamt ca. 3-5 Platten).

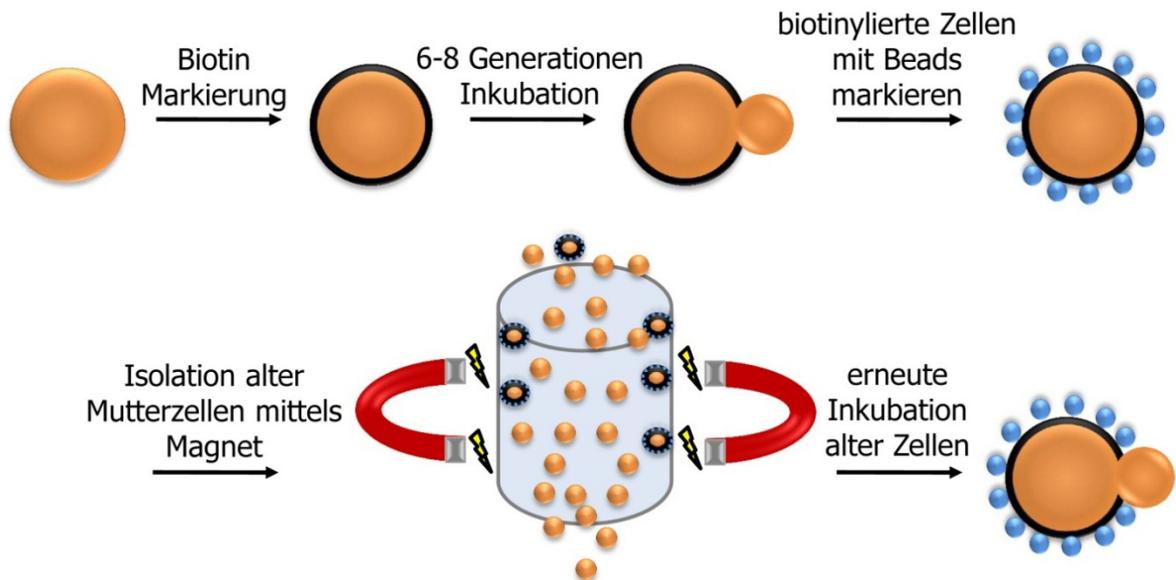
- 60-80 Zellen pro Stamm mit dem Mikromanipulator auf folgende Weise ablegen (bei Mutanten, die hohe Mortalität oder starke genomische Instabilität zeigen 120-180 Zellen ablegen, um mindestens 40-60 Zellen in der Auswertung zu haben):
  - 10 Zellen in eine Reihe, zwei Reihen frei lassen (diese dienen als „Friedhöfe“ für die von der zu analysierenden Zelle abgetrennten Tochterzellen) und wieder 10 nebeneinander ablegen, so dass 40 Zellen pro Platte abgelegt werden
- Die Platten werden bei 30 °C inkubiert, bis sich Knospen bilden (anfangs etwa alle 1-2 Stunden, später etwa alle 2-4 Stunden).
- Bei erster Knospung: Mutter auf „Friedhof“ legen (d.h. Mutter mit der Nadel von der Tochter vorsichtig trennen), Tochter liegen lassen.
- Sobald die Tochter eine Knospe bildet, die Tochter weglegen und die Enkelin der ursprünglichen Mutterzelle liegen lassen. Mit der Enkelin wird das eigentliche Experiment gestartet, da bei ihr die biologische Uhr auf „Null“ gestellt ist.
- Die Enkelzelle gilt nun als Mutterzelle, deren replikative Kapazität (maximale Anzahl der Teilungen) bestimmt wird. Die einzelnen Töchter werden von der Mutterzelle abgetrennt und auf dem „Friedhof“ abgelegt.
  - bei Stämmen mit YAC die Friedhofskolonien später auf Selektivplatten ausstreichen, um zu überprüfen, ob das YAC verloren wurde. Ist dies der Fall, werden die Mutterzellen nicht in die Auswertung aufgenommen.
- Generell werden nur Zellen mit ausgewertet, die mindestens eine Teilung vollzogen haben.

### 2.13.3 Isolation replikativ gealterter Hefezellen mittels

#### Biotinylierung und paramagnetischer Sortierung

Das Prinzip der paramagnetischen Sortierung biotinylierter Zellen wurde von der Firma Miltenyi Biotec entwickelt. Die Methodik zur Isolation alter Hefezellen (Abb. 2-5) wurde in abgewandelter Form von Smeal *et al.* und Chen *et al.* übernommen (Smeal *et al.* 1996; Chen *et al.* 2003). Zunächst werden primäre Amine von Zelloberflächenproteinen (besonders in der Seitenkette von Lysin) mit membranimpermeablem Sulfo-NHS-LC-Biotin (die Sulfonatgruppe dient der Wasserlöslichkeit) über eine stabile Amidbrücke gekoppelt. Kultiviert man biotinylierte Bäckerhefezellen, so sind deren Töchter (Knospen) nicht biotinyliert, da ihre Zelloberfläche ausschließlich neu synthetisierte Oberflächenproteine enthält. Die biotinylierten Mutterzellen in der Zellsuspension werden nun mit paramagnetischen anti-Biotin Microbeads markiert. Die Zellsuspension wird auf eine Säule gegeben, an die ein starkes magnetisches Feld angelegt ist. Die

paramagnetisch markierten alten Zellen werden an der Säule zurückgehalten, während jüngere Zellen hindurchfließen. Die biotinylierten Zellen können im Anschluss von der Säule eluiert, analysiert und erneut inkubiert werden.



**Abb. 2-5 Schematische Darstellung der Isolation alter Mutterzellen durch paramagnetische Sortierung.**

Junge Hefezellen (braun) werden biotinyliert (schwarze Umrandung) und für einige Generationen in einer Flüssigkultur inkubiert. Die entstandene Kultur mit biotinylierten und unbiotinylierten Zellen wird mit anti-Biotin Microbeads (blaue Kugeln) versetzt, die an der biotinylierten Oberfläche von Zellen anhaften. Die Suspension wird auf eine Säule gegeben, an die ein starkes magnetisches Feld angelegt wird. Nicht biotinylierte Zellen fließen durch die Säule, die markierten, biotinylierten alten Zellen werden durch das Magnetfeld in der Säule zurückgehalten und können anschließend eluiert werden. Die so isolierten Zellen können analysiert und ausplattiert oder für weitere Generationen inkubiert werden, um sie nach einem weiteren Anstieg des replikativen Alters erneut zu isolieren.

#### Kultivierung:

- ü/N 5 ml YPD dünn (Einzelkolonie) inokulieren mit frisch ausgestrichenem Stamm, 30 °C
- OD<sub>600</sub> messen (Eppendorf), im Idealfall ist Kultur nicht stationär (OD unter 6)
- 20 ml YPD mit ü/N Kultur inokulieren, Start OD 0,2
- nach 2-3 (5-6 h 30 °C, OD 1-1,5) Teilungen mit Biotinylierung beginnen

#### Biotinylierung:

- Zentrifugationsschritte 5-10 Minuten bei 300 x g und 4 °C
- Zellen zählen mit Neubauer Zählkammer
- $1,5 \times 10^8$  Zellen zentrifugieren und 3x mit 5 ml kaltem 1 x PBS (pH 8) waschen, in 5 ml kaltem PBS pH 8 resuspendieren
- ca. 0,3 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (1,5 mg benötigt für 5 ml PBS Endvolumen) frisch hinzugeben
- bei Raumtemperatur 45 min auf dem Rad (langsam) inkubieren

- zentrifugieren und 2 x mit 10 ml kaltem 1 x PBS + 100 mM Glycin (Quenching: Abstoppen der Biotinylierungsreaktion) waschen
- $2-3 \times 10^7$  biotinylierte Zellen gesamt inokulieren in 100 ml YPD für eine OD von 1 nach 6 Teilungen ( $2 \times 10^9$  Zellen gesamt in Kultur)
- Inkubation ü/N bei 25 °C (die Zellen werden sonst zu dicht)
- (Mikroskopische Analyse biotinylierter Zellen möglich, siehe Kap. 2.15.1 und 2.15.2)
- Im Anschluss erfolgt die Markierung und Sortierung mittels paramagnetischer Microbeads (Miltenyi), anschließend können die replikativ gealterten biotinylierten Zellen ausplattiert und/oder in frischem YPD Medium weiter inkubiert werden (immer maximal 7 Generationen, damit die Kultur logarithmisch bleibt).

#### Paramagnetische Markierung und Sortierung:

- Zentrifugationsschritte: 5-10 Minuten bei 300 x g und 4 °C
- bei OD 1 (ca.  $2-4 \times 10^9$  Zellen gesamt, 6-8 Teilungen, Zellen mehrfach zählen!) wird die Kultur zentrifugiert ( $1 \times 10^9$  Zellen, davon sind  $2-3 \times 10^7$  Zellen biotinyliert)
- 2 x waschen mit 50 ml kaltem 1 x PBS-EDTA-BSA pH 7.2
- resuspendieren in 1 ml PBS-EDTA-BSA, 50 µl anti-Biotin Microbeads je  $2 \times 10^9$  Zellen (gesamte Suspension) zugeben, gut mischen, 1h bei 4°C inkubieren
- 3 x waschen mit 1 ml kaltem 1 x PBS-EDTA-BSA (Entfernen ungebundener Beads) (2000 rpm 5 Minuten, Tischzentrifuge), Zellen zählen
- in 500 µl Puffer pro  $10^8$  Zellen resuspendieren (5 ml bei  $10^9$  Zellen)
- Sortierung erfolgt nach Protokoll (Miltenyi Biotec): Säule äquilibrieren mit 3 ml Puffer, Zellsuspension auf Säule geben, 3 x waschen der Säule mit 3 ml Puffer, Eluieren der biotinylierten Zellen mit 5 ml Puffer
- erneute Sortierung der biotinylierten Zellen über zweite Säule wie oben, so wird eine reinere biotinylierte Zellpopulation isoliert, eluierte Zellen mehrfach zählen!
- Tochterzellen (Durchfluss) können verworfen, biotinylierte Mutterzellen (maximal  $2-3 \times 10^7$  Zellen isoliert) weiter inkubiert (in 50 ml YPD, ü/N 25 °C) bzw. ausplattiert (YPD) werden (Lagerung der sortierten Zellen für mehrere Stunden bei 4 °C möglich)
- erneute Isolierung der biotinylierten Zellen mittels Sortierung nach weiteren 6 Generationen
- vor der dritten Sortierung sollten die Zellen erneut mit 50 µl anti-Biotin Microbeads markiert werden (1 h 4 °C, 3 x waschen, s. o.), da die Effizienz der Sortierung sonst nachlässt (nach etwa 2 Tagen beginnen sich die Beads zu lösen, Aussage Miltenyi Biotec)

Medien und Puffer:

YPD flüssig

PBS Puffer: 1 x PBS pH 8; 4 °C; autoklaviert

PBS-Glycin Puffer: 1 x PBS pH 8; 100 mM Glycin; 4 °C; autoklaviert

PBS-BSA Puffer: 1 x PBS pH 7.2; 2 mM EDTA; 0,5 % w/v BSA; 4 °C; sterilfiltriert mit Vakuumpumpe

## 2.14 Bestimmung chromosomaler Stabilität

### 2.14.1 Bestimmung der chromosomalen Stabilität mit Hilfe des YAC (*ade2-101/SUP11*)-Systems

Das Rot/Weiß-System zur Bestimmung chromosomaler Stabilität beruht ursprünglich auf *SUP11*-tragenden Chromosomenfragmenten (CF), die aus dem Vektor YRP14 entwickelt wurden (St John *et al.* 1981). Sie beinhalten eine CEN/ARS Sequenz zur stabilen mitotischen und meiotischen Segregation (Hieter *et al.* 1985). Diese CFs werden in Hefestämmen eingesetzt, welche das *ade2-101<sup>ochre</sup>*-Allel tragen. Durch eine Punktmutation wird hier fälschlicherweise ein Stopp-Kodon (*ochre*: UAA; im Gegensatz zu *amber*- (UAG) oder *opal*-Mutation (UGA)) an der Aminosäure-Position 64 kodiert, das zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führt (Brenner *et al.* 1965; Brenner *et al.* 1967; Stahl 1995). Dadurch wird ein Vorläuferprodukt der Purinbiosynthese gebildet, das sich als rotes Pigment in der Vakuole ansammelt. Aus diesen Zellen werden rote Kolonien gebildet. Ein *ochre*-Suppressor bewirkt, dass während der Translation das vorzeitige Stopp-Kodon überlesen und das Vollängenprotein gebildet werden kann (Goodman *et al.* 1977; Theis und Newlon 1992). Liegt der *ochre*-Suppressor *SUP11* in einer Kopie vor, kommt es durch dessen Expression zum Überlesen des Stopp-Kodons bei der Translation und dadurch zur Bildung weißer Kolonien in haploiden *ade2-101<sup>ochre</sup>* Stämmen, während in diploiden Stämmen zwei zusätzliche Kopien für die Formierung weißer Kolonien benötigt werden. Liegt in diploiden Stämmen lediglich eine Kopie vor, so entstehen aus den Zellen rosa Kolonien. Bei Fehlen des *ochre*-Suppressors *SUP11* bilden sowohl haploide als auch diploide *ade2-101<sup>ochre</sup>* Zellen rote Kolonien.

Für den Nachweis chromosomaler Instabilität wurde in dieser Arbeit das YAC System verwendet, da dieses etwa 360 Kbp große, nicht-essentielle exogene Chromosom mit einer Verlustrate von ca.  $1 \times 10^{-3}$  stabil vererbt wird und vom Aufbau den endogenen Chromosomen am ehesten entspricht (Telomere, CEN/ARS Sequenz, Größe) (Sikorski und Hieter 1989; Pavan *et al.* 1990; Kouprina *et al.* 1994). Zudem enthält das verwendete YAC12-UT ((Y (U/T/S)) genannt) bis auf die Selektionsmarker keine kodierende

*S. cerevisiae* DNA, welche einen Einfluss auf die Zellen ausüben könnte (Burke *et al.* 1987; Sears *et al.* 1995).

Der Nachweis des Verlustes erfolgt über die Färbung der Kolonien (vgl. Abb. 3-1A). Verliert eine Hefezelle während der ersten Teilung auf Platte das YAC, entsteht durch die folgenden Zellteilungen ein roter Sektor in einer rosa (diploide Zellen) (1:0-Segregation = Chromosomenverlust) Kolonie. Ebenso führt die Fehlverteilung von zwei YACs in einer diploiden Hefezelle zu weißen und roten Sektoren (2:0-Segregation = Chromosomenfehlverteilung („Non-Disjunction“)) in einer rosa Kolonie. Je früher das Verlustereignis stattfindet, desto größer sind die zu beobachtenden Sektoren. Über die Anzahl halbsektorieller Kolonien erfolgt die Berechnung der Verlustfrequenz, da nur dort das Verlustereignis bei der ersten Mitose auf der Platte stattfand. Auch Kolonien, die mehr als zur Hälfte rot sind (z. B.  $\frac{3}{4}$  rot) werden berücksichtigt, da dort nach dem ersten Verlustereignis ein weiterer Verlust während der zweiten Teilung folgte.

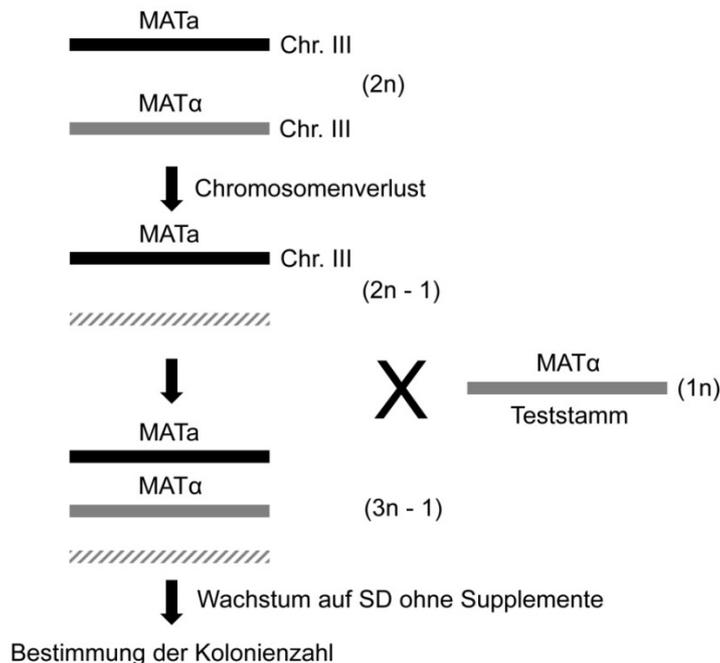
Für die Analyse der chromosomalen Stabilität mit zunehmendem replikativen Alter wurden biotinylierte Mutterzellen sortiert (Kap. 2.13.3) und auf großen YPD Platten (150 mm Ø) ausplattiert. Je Generation wurden 40 Platten eingesetzt, wobei im Schnitt 400 Kolonien pro Platte wachsen sollten (16.000 Kolonien/Generation), um signifikante Unterschiede in der Häufigkeit von Halbsektorierung bestimmen zu können. Die Platten wurden für 10-15 Tage bei 30 °C inkubiert, um eine ausreichende Koloniegröße und -Färbung zu erhalten. Die Bestimmung der Kolonienzahl erfolgte mit einem Colony Counter.

Komplett rote ( $2n - 1$  YAC) und weiße ( $2n + 2$  YACs) Kolonien wurden für die Berechnung des YAC Verlustes nicht berücksichtigt, da der Genotyp der Ausgangszellen dieser Kolonien nicht dem des Wildtyp ( $2n + 1$  YAC) entsprach (Hieter *et al.* 1985).

## 2.14.2 Bestimmung der Verlustrate des endogenen Chr. III (Quantitativer Paarungsversuch)

Die Verlustrate von Chromosom III der Hefe *S. cerevisiae* kann exemplarisch für die Stabilität endogener Chromosomen bestimmt werden. Hierzu wurde ein von Dr. Gabriele Köhler (Köhler 2005) abgewandeltes Protokoll nach (Spencer *et al.* 1990) verwendet. Auf Chromosom III der Hefe befindet sich der *MAT*-Lokus, die kodierende Sequenz für den Paarungstyp. Während haploide Hefen den Paarungstyp *MATa* oder *MAT $\alpha$*  aufweisen, werden bei diploiden Hefen beide Loci aktiviert, wodurch bei ihnen der Paarungstyp *MATa/ $\alpha$*  vorliegt. Diploide Stämme können im Gegensatz zu haploiden Hefen, die mit dem jeweils entgegengesetzten Paarungstyp paaren können, nicht mehr paaren. Der Verlust einer der beiden Chromosom III Kopien in einer diploiden Hefe führt zur Aneuploidie ( $2n - 1$ ) und damit zum Verlust eines der beiden *MAT*-Allele. Das führt zur

Paarungsfähigkeit der aneuploiden Hefe, sie ist durch die Expression haploidspezifischer Gene nun in der Lage, sich mit einer haploiden Hefe des entgegengesetzten Paarungstyps zu paaren. Aus einer solchen Paarung entstehen Hefezellen mit dem Genotyp  $3n - 1$  (Abb. 2-6). Zusätzlich kann auch ein mitotisches Rekombinationsereignis am *MAT*-Lokus auf beiden Chromosomen denselben *MAT*-Lokus hervorrufen, wodurch nach Paarung mit einer haploiden Hefe Zellen mit triploidem Chromosomensatz ( $3n$ ) entstehen. Das mögliche Auftreten von Rekombinationsereignissen wurde in diesem Versuch nicht berücksichtigt.



**Abb. 2-6 Verlustanalyse von Chromosom III.**

Ein diploider Hefestamm wird mit einem haploiden Testerstamm gekreuzt. Kommt es zu einem Verlust von dem Chromosom III (schraffiert), das für denselben Paarungstyp kodiert wie der Testerstamm, kann der diploide Ausgangsstamm mit dem Testerstamm paaren. Die erfolgreiche Paarung kann durch Koloniebildung auf SD Platten ohne Supplemente beobachtet werden. Verändert nach (Gerring *et al.* 1990).

Zur Bestimmung der Verlustrate von Chromosom III wurden diploide Wildtyp- oder Deletionsmutantenstämme und ein haploider Teststamm über Nacht in  $YPD^+$ -Medium bei  $30\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden  $2 \times 10^6$  Zellen des haploiden Hefestammes und  $5 \times 10^5$  Zellen der diploiden Stämme miteinander vermischt, zentrifugiert und in  $10\ \mu\text{l}$  75 % YPD resuspendiert. Die Zellen wurden für 6 Stunden bei  $25\text{ }^\circ\text{C}$  ohne Schütteln inkubiert und anschließend auf SD-Platten ohne Supplemente getropft. Auf diesen Platten können nur die Zellen zu Kolonien heranwachsen, die zuvor gepaart haben, da der haploide Teststamm lediglich eine Mutation im *HIS1* Gen aufweist (*his1*), während die diploiden Stämme andere Selektionsmarker beinhalten. Somit kommt es zu einer Komplementation der Selektionsmarker.

Zur Bestimmung der Verlustrate wurden die angewachsenen Kolonien ins Verhältnis zu den für die Paarung eingesetzten Zellen gesetzt ( $5 \times 10^5$ ). Es wurde also eine theoretisch maximale Paarungsfähigkeit angenommen. Dabei ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass lediglich 50 % der eingesetzten Zellen ( $2,5 \times 10^5$ ) paaren können, da nur jede 2. Zelle mit einem Chromosom III Verlust den zum Testerstamm passenden Paarungstyp aufweist.

## 2.15 Mikroskopie

Zur einfachen Analyse der Morphologie bestimmter Hefestämme und für Auszählungen von Flüssigkulturen mit einer Neubauer-Zählkammer wurde ein ICS Standard Lichtmikroskop der Firma Zeiss verwendet.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und DIC Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenz-Mikroskop mit einer Kamera der Firma Hamamatsu durchgeführt. Für Aufnahmen wurde die Software Open-Lab (Improvision) eingesetzt. Die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit der Software Powerpoint 2010 (Microsoft) bzw. Photoshop CS5 (Adobe).

### 2.15.1 Untersuchung der Sortierungseffizienz von biotinylierten Zellen

Für die mikroskopische Analyse des Biotinylierungsgrads von Zellen wurden einige Zellen in 38  $\mu\text{l}$  1 x PBS pH 8 resuspendiert. Anschließend wurden 2  $\mu\text{l}$  APC-konjugiertes Streptavidin (bindet an Biotin) zugegeben. Die Zellen wurden für mindestens 2-3 Stunden bei 4 °C inkubiert, 1 x gewaschen mit 1 x PBS pH 8 und am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 2.15.2 Calcofluor Weiß Färbung von Knospungsnarben

Die Methode basiert auf einer Methode von Pringle *et al.* (Pringle *et al.* 1989).

#### Herstellung einer Calcofluor Weiß-Stocklösung (5 mg/ml):

- 50 mg Calcofluor Weiß in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen und auf 7 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen
- Calcofluor Weiß mit einigen Tropfen 10 M NaOH in Lösung bringen
- Mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 ml Endvolumen auffüllen, aliquotieren und dunkel lagern bei -20 °C

#### Färbung:

- Etwa 10<sup>7</sup> biotinylierte Zellen (Kap. 2.13.3) werden mit Calcofluor Weiß versetzt (Endkonzentration 100  $\mu\text{g/ml}$ ).
- Die Zellen werden für 5 Min. dunkel bei Raumtemperatur inkubiert
- Die Zellen werden 2 x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen
- Die gefärbten Zellen können am Fluoreszenzmikroskop mit einem DAPI kompatiblen Filter fotografiert werden.

- Knospungsnarben werden gezählt, indem man durch die Zellen hindurch fokussiert, um Narben auf beiden Seiten erkennen zu können.

### 2.15.3 Immunfluoreszenz

*S. pombe* Zellen für Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden nach dem Protokoll von Hagan und Hyams präpariert (Hagan und Hyams 1988). Für die Detektion von GFP-Signalen wurde eine Paraformaldehydfixierung durchgeführt. Durch diese Fixierung bleibt das mitotische Mikrotubulizytoskelett erhalten. Die gewünschten Strukturen, in diesem Fall das Zentromer von Chromosom I und die mitotischen Mikrotubuli, wurden mit einem Primärantikörper und daraufhin mit einem Fluoreszenzfarbstoff-tragenden Sekundärantikörper behandelt. Die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 2.3 aufgelistet.

### 2.16 Signifikanztests

Statistische Berechnungen wurden mit der Tabellenkalkulationssoftware Excel (Microsoft) und dem Statistikprogramm SPSS 17 durchgeführt. Die Unabhängigkeit der Häufigkeiten von Merkmalen wurde mittels  $\chi^2$ -Test analysiert. Zum Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben mit Varianzhomogenität wurde der Zweistichproben-t-Test eingesetzt. Die Überprüfung der Übereinstimmung zweier unabhängiger Verteilungen wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test (U-Test) durchgeführt. Als Signifikanzniveau  $\alpha$  wurden 5 % festgesetzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Der Zusammenhang zwischen replikativer Alterung und Chromosomeninstabilität in *S. cerevisiae*

Es war bisher nicht bekannt, durch welche Prozesse eine in vielen Organismen beobachtete Zunahme von Aneuploidie mit dem Alter entsteht. Mit einer neu etablierten Methode wurde daher untersucht, in welchem Maße und auf welche Weise sich mit zunehmendem Alter die Genauigkeit der Chromosomenweitergabe verändert.

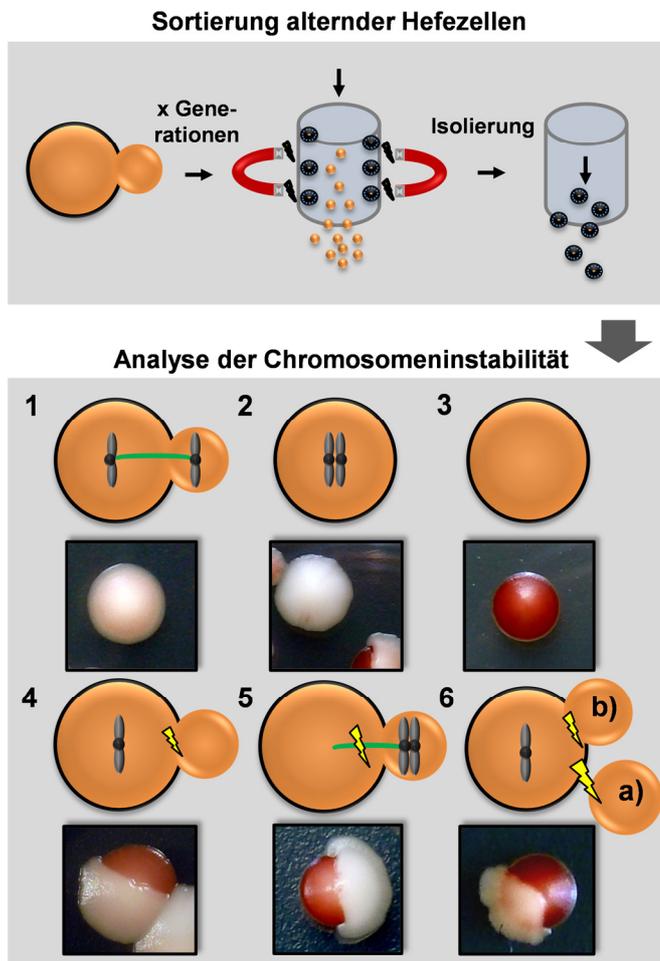
Dazu wurden replikativ alternde *S. cerevisiae* Zellen untersucht (Kap. 2.13.3). Zusammengefasst wurden junge, diploide YAC tragende Hefezellen biotinyliert und durchliefen mehrere Teilungen in einer Flüssigkultur (Abb. 3-1 oben). Anti-Biotin Microbeads wurden zur Markierung der biotinylierten Zellen verwendet, die so mittels paramagnetischer Sortierung aus der Kultur isoliert und erneut inkubiert werden konnten. Mit Hilfe des YAC Systems (Kap. 2.14.1) wurden die isolierten Zellen analysiert. Diese waren homozygot für die *ade2-101<sup>ochre</sup>* Mutation (in Zukunft *ade2-101* genannt), die Adeninauxotrophie verursacht. Das defekte *ADE2*-Gen weist ein sog. *ochre*-Stoppkodon auf. Diese Mutation führt dazu, dass sich in den Vakuolen der Hefezellen ein Vorläuferprodukt der Purinbiosynthese ansammelt, welches durch die Oxidation mit dem Luftsauerstoff rot wird. Auf dem YAC befindet sich das *SUP11* Gen, das für eine Suppressor-tRNA<sub>TYR</sub> kodiert, die während der Translation zur Überschreibung des Stoppkodons führt und damit eine Anhäufung des roten Pigments verhindert.

Enthalten diploide Zellen mit diesem genetischen Hintergrund ein YAC, so entstehen aus ihnen auf YPD-Platten rosafarbene Kolonien (Abb. 3-1 (1)). Befinden sich in den Zellen zwei YAC-Kopien, so führt dies durch die zusätzliche *SUP11* Kopie zu vollständiger Adeninprototrophie und sie bilden weiße Kolonien (Abb. 3-1 (2)). Verlieren die Zellen das YAC, wachsen aus ihnen rote Kolonien heran (Abb. 3-1 (3)). Die von der YAC-Kopienzahl abhängige Koloniefärbung kann dazu genutzt werden, den Verlust und auch den Zugewinn eines YACs während einer mitotischen Zellteilung direkt nachzuweisen (Hieter *et al.* 1985).

Zellen unterschiedlichen replikativen Alters wurden isoliert und auf YPD Platten ausplattiert. Anschließend wurde das Auftreten halbsektorieller Kolonien quantifiziert.

Tritt bei einer Zelle beim ersten Zellzyklus auf der Platte ein das YAC betreffender Chromosomenverlust („Chromosome Loss“ (CL)) auf, so entsteht eine halbsektorierte Kolonie, die zu je einer Hälfte rot und rosa ist (Abb. 3-1(4)). Wird das YAC während der Mitose fehlverteilt (Chromosomenfehlverteilung oder „Non-Disjunction“ (ND)), so dass eine Zelle zwei und die andere keine YAC Kopie erhält, dann ist die heranwachsende

Kolonie zu je einer Hälfte rot und weiß (Abb. 3-1(5)). Hinzugezählt wurden auch Kolonien, die zu mehr als 50 %, jedoch nicht vollständig rot waren, da in diesen ebenfalls bei der ersten Teilung ein YAC-Verlustereignis stattgefunden hat, gefolgt von einem zweiten (Abb. 3-1(6)).



**Abb. 3-1 Untersuchung von Chromosomeninstabilität mit dem YAC-System in alternden diploiden Zellen.**

Schema der Isolation replikativ alternder, diploider Zellen sowie der Analyse chromosomaler Instabilität. Oben: Biotinylierte Mutterzellen (braune, schwarz umrandete Kugel) wurden mit anti-Biotin Microbeads (blauschwarze Umrandung) markiert und mit Hilfe eines Magneten (rot) nach 6-9 Generationen aus einer Kultur isoliert und auf YPD Platten ausgestrichen (Kap. 2.13.3). Die isolierten Zellen wurden für weitere Generationen inkubiert und erneut sortiert. Unten: Analyse der gewachsenen Kolonien zur Bestimmung der YAC-Verteilung. Die angegebenen Verteilungen des YACs auf Mutter- und Tochterzelle sind jeweils auch umgekehrt vorstellbar. Unter den Schemazeichnungen sind typische Bilder der aus den Zellen hervorgehenden Kolonien dargestellt. 1 Die korrekte Verteilung der YACs (grau) auf Mutter- (schwarz umrandete braune Kugel) und Tochterzelle (kleine braune Kugel) führt zu Bildung einer rosa Kolonie auf der Platte. 2 Verbleiben bei einer Zellteilung in der Kultur zwei YACs in der Mutterzelle, so bildet diese Zelle eine weiße Kolonie auf der Platte. 3 Der Verlust des YACs in der Mutterzelle vor Plattierung verursacht Adeninauxotrophie, die Kolonie wird rot.

4 Chromosomenverlust führt zu Halbsektorientierung. Während des ersten Zellzyklus auf der Platte erhält lediglich die Mutterzelle ein YAC und bildet den Ausgangspunkt für die rosa Hälfte einer Kolonie, die Tochterzelle ohne YAC lässt die rote Hälfte entstehen. 5 Chromosomenfehlverteilung führt ebenfalls zu Halbsektorientierung. Ein Fehler während der Chromosomensegregation (gelber Blitz) führt zur Adeninauxotrophie der Mutterzelle, die die Ausgangszelle für die rote Hälfte einer Kolonie bildet. Die adeninprototrophe Tochterzelle mit zwei YACs ist die Ursprungszelle der weißen Hälfte der Kolonie. 6 a) Die Mutterzelle gibt ein YAC bei der ersten Teilung auf der Platte nicht an die Tochterzelle weiter (Chromosomenverlust), die die rote Hälfte einer Kolonie bildet. b) Auch bei der zweiten Teilung tritt ein Chromosomenverlust auf, die Tochter lässt einen 1/4 roten Sektor entstehen. Verlaufen die weiteren Teilungen der Mutterzelle ohne Chromosomenverlust, so wird von ihr ein 1/4 rosa Sektor ausgebildet.

Die Koloniefärbungen in 4, 5 und 6 wurden als halbsektorientiert gewertet. Nicht dargestellt: 1/4 weiß/3/4 rote Kolonie (wie 6, jedoch Chromosomenfehlverteilung) und von Halb- und Dreiviertelsektorientierung abweichende Sektorientierungstypen. Grün: mitotische Spindel.

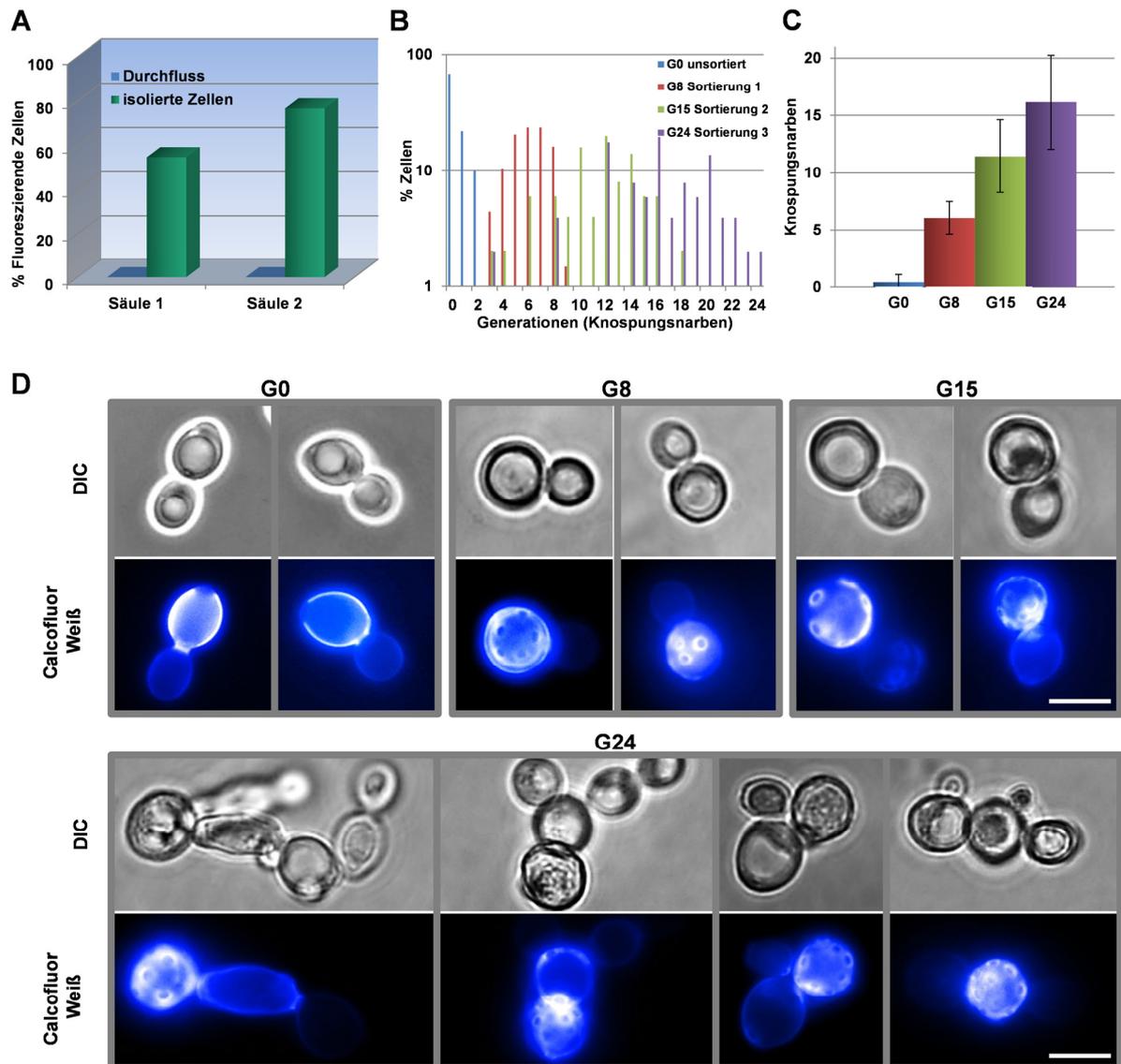
### 3.1.1 Nachweis der Isolation alter Mutterzellen mittels Biotinylierungs- und Knospungsnarben-Analyse

Die Effizienz der Isolationsmethode wurde durch mikroskopische Auswertung der Oberflächenbiotinylierung und der Anzahl der Knospungsnarben in einem diploiden Wildtypstamm verifiziert.

Die Oberfläche paramagnetisch sortierter, biotinylierter Zellen wurde mittels APC-konjugiertem Streptavidin sichtbar gemacht und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Kap. 2.15.1). Von über 1000 Zellen des Durchflusses, also Zellen, die nicht in der Säule zurückgehalten wurden, wies keine Oberflächenfluoreszenz auf (Abb. 3-2A). Bei den isolierten Zellen zeigten 55 % ( $n = 647$ ) eine leuchtende Umrandung. Die isolierten Zellen wurden anschließend über eine zweite Säule sortiert, um den Anteil biotinylierter Zellen zu erhöhen. Auch hier ließ keine Zelle des Durchflusses ( $n > 1000$ ) ein Signal erkennen, die Prozentzahl fluoreszierender Zellen unter den isolierten Zellen stieg auf 77 % an ( $n = 606$ ). Aufgrund dieser Erhöhung der Sortierungseffizienz wurden biotinylierte Mutterzellen in allen Experimenten über zwei aufeinanderfolgende Säulen isoliert.

Um zu beweisen, dass isolierte Zellen zunehmender Generationenzahl tatsächlich ein ansteigendes replikatives Alter aufweisen, wurden sortierte Zellen mit Calcofluor Weiß angefärbt, welches das Chitin der Knospungsnarben sichtbar macht (Kap. 2.15.2). Zunächst wurde die Generationenzahl ( $G$ ) durch Auszählung der Zellverdopplungen in der Kultur vor der Sortierung bestimmt. Dann wurde die Anzahl der Knospungsnarben von mindestens 50 Zellen der Generationen 0, 8, 15 und 24 ermittelt, wobei die Geburtsnarbe nicht mitgezählt wurde. In der Altersverteilung wurde ein Anstieg der Knospungsnarben mit zunehmender Generationenzahl sichtbar (Abb. 3-1B). Die durchschnittliche Anzahl der Knospungsnarben pro Zelle betrug  $0,4 (\pm 0,7)$  für unsortierte Zellen ( $G_0$ ). Nach einer Sortierung ( $G_8$ ) wurden  $6,1 (\pm 1,4)$  Narben für  $G_8$ -Zellen und  $11,5 (\pm 3,2)$  für Zellen der Generation 15 gezählt. Im Schnitt waren auf den Zellen nach drei Sortierungen ( $G_{24}$ )  $16,2 (\pm 4,1)$  Knospungsnarben sichtbar (Abb. 3-2C). Demnach ist diese Methode zur Isolation replikativ alternder, biotinylierter Mutterzellen geeignet.

Neben einem Anstieg der Knospungsnarben wurden auch morphologische Veränderungen bei zunehmender Generationenzahl erkennbar. Während junge Zellen ( $G_0$ ) noch eine ovale Form aufwiesen und im Vergleich zur Mutterzelle kleine Knospen ausbildeten, wurden ältere Zellen zunehmend runder ( $G_8$  und  $G_{15}$ ) und die Knospen erreichten nahezu die Größe der Mutterzelle ( $G_{15}$  und  $G_{24}$ ) (Abb. 3-2D; oben). Die Oberfläche der ältesten Zellen ( $G_{24}$ ) erschien zerfurcht und einzelne Knospen wurden bei 71 % der Zellen nicht von der Mutter abgetrennt (Quantifizierung nicht gezeigt) (Abb. 3-2D; unten).



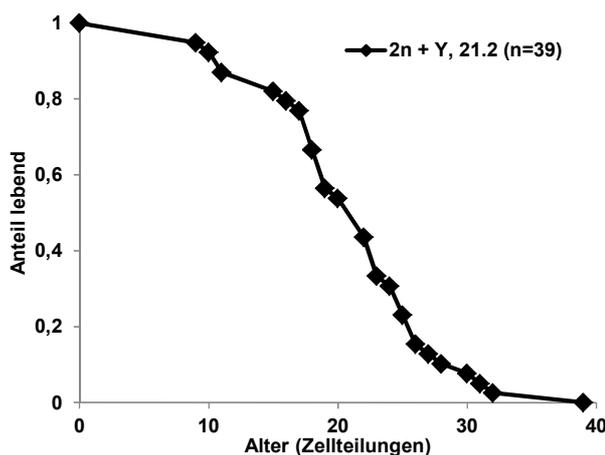
**Abb. 3-2 Biotinylierungs- und Knospungsarbenanalyse isolierter Mutterzellen.**

**A** Logarithmisch wachsende Zellen eines wildtypischen Hefestamms mit YAC wurden biotinyliert, für 8 Generationen inkubiert und aus der Kultur mittels paramagnetischer Sortierung über eine Säule von den jüngeren Zellen separiert. Der Anteil biotinylierter Zellen im Durchfluss, also bei Zellen, die von dem Magneten nicht an der Säule zurückgehalten wurden, und bei isolierten Zellen nach paramagnetischer Sortierung über eine bzw. zwei aufeinanderfolgende Säulen wurde mittels Streptavidin-APC-Färbung fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Durchfluss: ( $n > 1000$ ); isolierte Zellen: ( $n = 647$  für Säule 1; ( $n = 606$  für Säule 2). **B** Das replikative Alter isolierter biotinylierter Zellen wurde nach 0, 8, 15 und 24 Generationen (G) durch Zählen der mit Calcofluor Weiß gefärbten Knospungsarben fluoreszenzmikroskopisch bestimmt ( $n \geq 50$  je Generation). **C** Durchschnittliche Anzahl der Knospungsarben verschiedener Generationen der in (B) ausgezählten Zellen. Fehlerbalken: Standardabweichung. **D** Mikroskopische Aufnahmen einzelner biotinylierter und Calcofluor-Weiß angefärbter Zellen verschiedener Generationen. DIC: Phasenkontrast, darunter: gleiche Zelle mit Knospungsarben in blau. Balken, 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2 Replikatives Altern führt zu einer linearen Abnahme in der Genauigkeit der Chromosomenweitergabe

Zur Überprüfung der Genauigkeit der Chromosomenweitergabe mit zunehmendem Alter wurden diploide, YAC tragende Wildtypzellen unterschiedlichen replikativen Alters nach der in Kap. 2.13.3 beschriebenen Methode isoliert und ausplattiert. Es war notwendig, zuerst die durchschnittliche replikative Lebensspanne (RLS) des zu analysierenden Stamms zu kennen, damit festgelegt werden konnte, bis zu welcher Generation alte Mutterzellen maximal isoliert werden konnten. Die RLS wurde in einem separaten Experiment bestimmt. Dabei wurde der Anteil teilungsfähiger Zellen (1 entspricht 100 %) bei steigender Generationenzahl ermittelt (Kap. 2.13.2). Die RLS betrug für den hier untersuchten diploiden Stamm durchschnittlich 21,2 Zellteilungen (Abb. 3-3).

Eine Isolation und die anschließende Analyse alternder Mutterzellen waren maximal bis Generation 24 möglich, da sich bei einer erneuten Inkubation in Flüssigmedium der Großteil der bei Generation 24 isolierten Zellen nicht mehr teilen konnte.



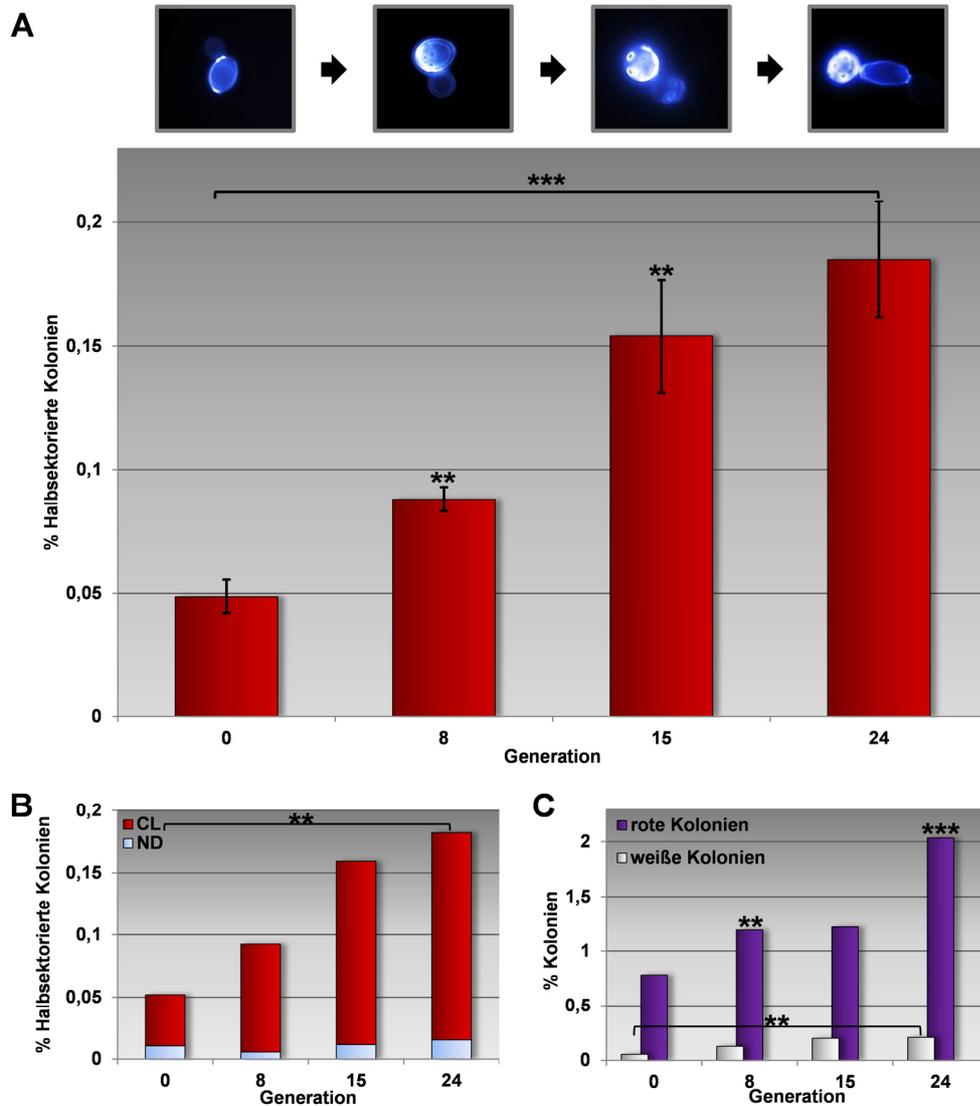
**Abb. 3-3 Die replikative Lebensspanne (RLS) eines diploiden Wildtypstamms.**

Der Anteil teilungsfähiger Mutterzellen (1 entspricht 100 %) eines diploiden, YAC-tragenden Wildtypstamms wurde gegen die erreichten Zellteilungen aufgetragen. Die durchschnittliche RLS der Zellen ( $n = 39$ ) betrug 21,2 Zellteilungen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C.

In drei unabhängigen Experimenten wurde ein linearer Anstieg halbsektorierte Kolonien mit zunehmendem replikativem Alter festgestellt (Abb. 3-4A). Aus 0,05 % der plattierten jungen Zellen (G0) entstanden durch einen Fehler in der Chromosomenweitergabe halbsektorierte Kolonien. Dieser Wert stieg mit dem replikativen Alter stetig (0,09 % bei G8; 0,15 % bei G15) bis auf 0,19 % bei Generation 24 an. Das entspricht ca. 5 bzw. 19 Fehlern bei  $10^4$  Zellteilungen. Der Anstieg um den Faktor 4 von Generation 0 auf 24 war höchst signifikant ( $p < 0,001$ ; Zweistichproben t-Test). Eine ähnliche lineare Zunahme wurde auch für haploide Hefezellen ermittelt (Anhang Abb. 6-1).

Der Großteil der beobachteten Halbsektorierungen beruhte auf Chromosomenverlustereignissen (YAC Segregation: 1:0). Ein Beispielerperiment verdeutlicht, dass Chromosomenfehlverteilungen (YAC Segregation: 2:0) selten auftraten (Abb. 3-4B). Zudem erhöhte sich von Generation 0 (0,01 %) bis 24 (0,015 %) der Anteil rot/weißer Kolonien unter allen Kolonien nicht signifikant. Betrachtet man ausschließlich

alle halbsektorierten Kolonien, so sank der Anteil rot/weißer Kolonien unter ihnen von 20 % bei Generation 0 auf 8 % bei Generation 24 ab. Der lineare Anstieg chromosomaler Instabilität mit zunehmendem replikativen Alter ist also in erster Linie auf einen Verlust des YACs während des ersten Zellzyklus einer Mutterzelle auf der Platte zurückzuführen.



**Abb. 3-4 Mit zunehmendem replikativen Alter steigt die Chromosomenverlustrate linear an.**

A Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Auftretens halbsektoriierter Kolonien verschiedener Generationen aus drei unabhängigen Experimenten für einen wildtypischen, diploiden Stamm mit YAC. Oben: Mikroskopiebilder Calcofluor Weiß gefärbter Zellen der Generationen 0, 8, 15 und 24 (von links). \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  im Vergleich zur vorherigen oder angegebenen (Schweifklammer) Generation (Zweistichproben-t-Test). Fehlerbalken: Standardabweichung. B Darstellung des prozentualen Anteils halbsektoriierter Kolonien aus einem Beispielexperiment des Stamms aus (A). Es wurde unterschieden zwischen rosa/rot sektorierten Kolonien mit Chromosomenverlustereignis (CL) bzw. weiß/rot sektorierten Kolonien, bei denen eine Chromosomenfehlsegregation (ND) stattgefunden hat. Für die Berechnung der Signifikanz wurden CL und ND Ereignisse addiert. \*\*,  $p < 0,01$  im Vergleich zur angegebenen (Schweifklammer) Generation ( $\chi^2$ -Test). C Experiment aus (B), jedoch wurden die komplett roten und weißen Kolonien der verschiedenen Generationen gezählt und prozentual dargestellt. \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  im Vergleich zur vorherigen oder angegebenen (Schweifklammer) Generation ( $\chi^2$ -Test).

Komplett rote und weiße Kolonien entstehen ebenfalls durch Fehler bei der Chromosomenweitergabe (Abb. 3-1A). Der Anteil roter Kolonien stieg mit steigendem replikativen Alter signifikant und linear an (Abb. 3-4C). Rote Kolonien entstehen aus Mutterzellen, die während der Inkubation in der Flüssigkultur das YAC verloren haben. Die Zahl dieser Zellen erhöhte sich von 0,8 % bei Generation 0 auf 2 % bei Generation 24. Auch die anderen in Kap. 3.1.3 beschriebenen *S. cerevisiae* Stämme wiesen einen linearen Anstieg roter Kolonien auf (Daten nicht gezeigt). Weiße Kolonien, deren Zellen 2 YACs enthalten, traten im Vergleich zu roten Kolonien nur selten auf (0,05 % bis 0,21 %), es fand ein signifikanter Anstieg von Generation 0 auf 24 statt. Rote und weiße Kolonien dienten jedoch nur als Hinweis auf Chromosomenverlust- oder Gewinnereignisse, die innerhalb eines längeren Zeitraums, in diesem Fall über 7-9 Generationen, aufgetreten sind. Fehler in der Chromosomenweitergabe, die während eines definierten Zellzyklus stattfanden, konnten nur durch Analyse der Halbsektierung bewiesen werden. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Kapiteln ausschließlich Halbsektierungsereignisse zur Ermittlung der Chromosomenstabilität berücksichtigt.

### **3.1.3 Der Einfluss einzelner Prozesse des Chromosomenzyklus auf den Anstieg der Chromosomeninstabilität mit dem replikativen Alter**

Es war denkbar, dass für den linearen Anstieg der Fehlerhäufigkeit in der Chromosomenweitergabe ein mit zunehmendem Alter auftretender Funktionsverlust eines oder mehrerer Prozesse des Chromosomenzyklus (Kap. 1.4.1) verantwortlich ist. Diese Prozesse umfassen unter anderem die Replikation, die Kohäsion, die eine vorzeitige Trennung von Schwesterchromatiden verhindert, sowie den Aufbau der mitotischen Spindel ausgehend vom Spindelpolkörper. Die Kinetochore der Schwesterchromatiden müssen bipolar über Mikrotubulus-assoziierte Proteine der mitotischen Spindel verknüpft werden, damit eine gleichmäßige Segregation der Chromosomen zu den Spindelpolen gewährleistet ist. Diese Verknüpfung wird durch den Spindelkontrollpunkt überprüft, der bei nicht bipolarer Ausrichtung einen Metaphase-Arrest auslöst.

Gene, deren kodierte Produkte in diesen Prozessen eine wichtige Funktion ausüben, wurden im YAC tragenden diploiden Stamm deletiert (Kap. 2.12.6.2). Durch den Verlust einer oder beider Genkopien sollte eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Genexpression erreicht werden. Die Gene *MAD2* und *BUB3* (Spindelkontrollpunkt), *MCM21* (Kinetochor) und *BIM1* (Mikrotubulus-Kinetochor Verknüpfung) wurden sowohl hetero- als auch homozygot deletiert. Die Gene *AME1* (Kinetochor), *SMC1* (Kohäsinkomplex), *SPC97* (Spindelpolkörper) sowie *MCM2* und *MCM7* (Prä-

Replikationskomplex) sind essentiell und konnten daher nur heterozygot deletiert werden. Die Verifikation der Deletionen erfolgte durch PCR auf Zellen, bei der die Übergänge der Deletionskassetten zum umliegenden chromosomalen Bereich überprüft wurden (Kap. 2.11.3.2; Anhang Tab. 6-1).

Zeigten Mutanten in einer seriellen Tropftestanalyse erhöhte Temperatursensitivität, so wurde zusätzlich ihre RLS ermittelt, da eine erhöhte Stresssensitivität mit einer verkürzten RLS einhergehen könnte. Unterschied sich die RLS eines homozygoten Deletionsstamms so drastisch vom Wildtyp, dass eine Isolation von zum Wildtyp vergleichbar alten Zellen nicht möglich war, so wurde die Genauigkeit der Chromosomenweitergabe sowohl im hetero- als auch im homozygot deletierten Stamm analysiert. Die Genauigkeit der Chromosomenweitergabe wurde in den erstellten Stämmen durch das Auftreten halbsektorieller Kolonien ermittelt.

### 3.1.3.1 Der Spindelkontrollpunkt

Dem mitotischen Spindelkontrollpunkt (SKP) kommt eine entscheidende Bedeutung bei der korrekten Weitergabe von Chromosomen während der Mitose zu. Bei Fehlern in der Verknüpfung der mitotischen Spindel mit den Kinetochoren der Schwesterchromatiden wird der SPK aktiviert und verhindert den vorzeitigen Eintritt in die Anaphase, bis die Fehler korrigiert wurden. Für spezielle Proteine des SKPs wurde ein Bezug zur Alterung hergestellt (Baker *et al.* 2004). Zwei wichtige Komponenten des SKP sind die evolutionär konservierten Proteine Mad2 und Bub3, die mit weiteren SPK Proteinen einen Komplex bilden, der die vorzeitige Chromosomentrennung verhindert (Hoyt *et al.* 1991; Li und Murray 1991).

In einer seriellen Tropftestanalyse wurde das Wachstumsverhalten der für *MAD2* und *BUB3* deletierten Mutanten im Vergleich zum isogenen Wildtyp bei verschiedenen Temperaturen und unter Stress mit der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz TBZ analysiert (Abb. 3-5A). Unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 30 °C wuchsen die Stämme ähnlich. Lediglich im homozygot deletierten *BUB3* Stamm war eine leichte Einbuße der Lebensfähigkeit sichtbar. Dies galt auch für die getestete Temperatur von 36 °C und für das Wachstum auf der TBZ-haltigen Platte. Die Abwesenheit des Gens *MAD2* verursachte keine Temperatur-, jedoch eine leichte TBZ-Sensitivität.

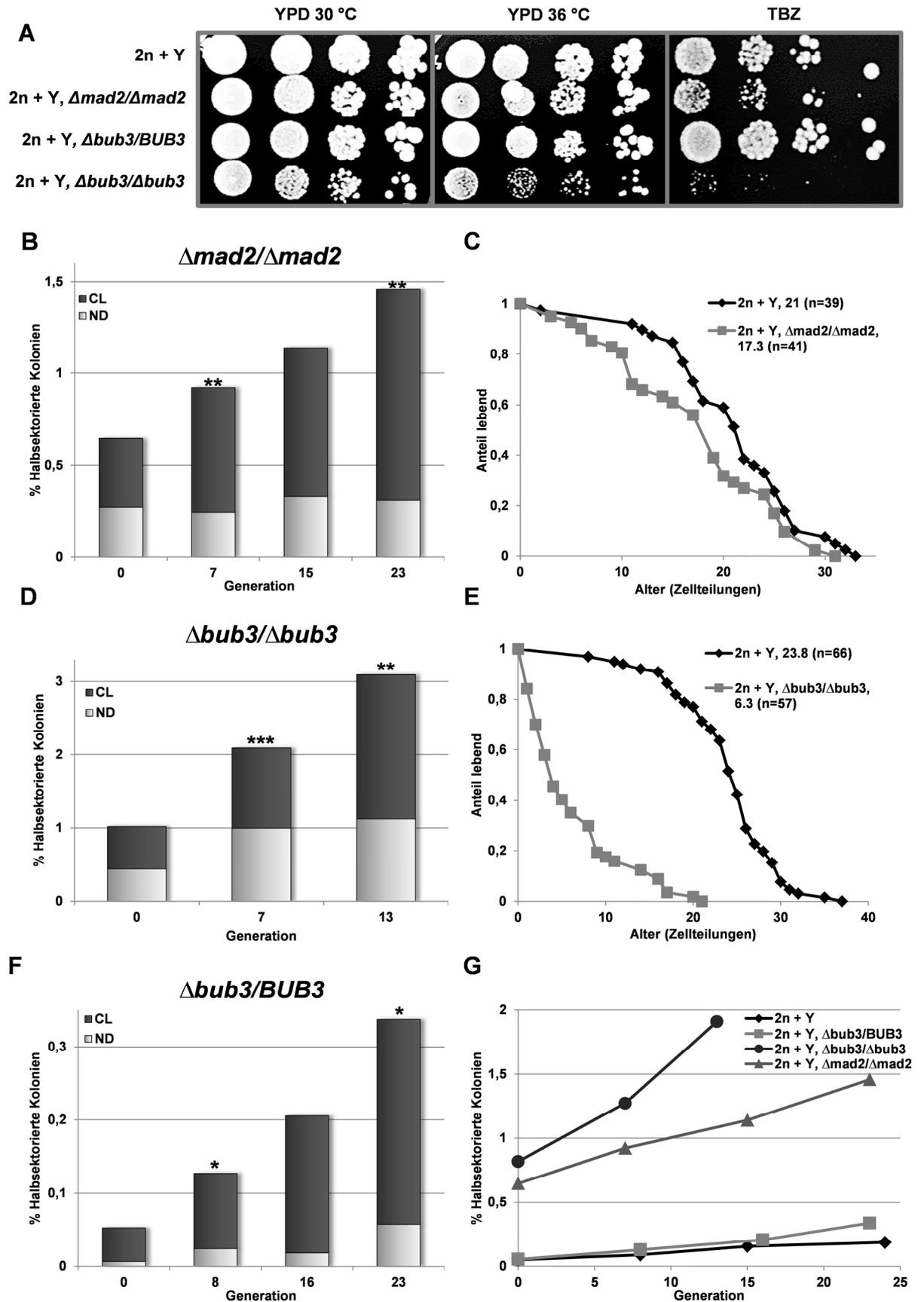
Ich untersuchte das Auftreten von Halbsektorierung in den Deletionsstämmen. Der homozygote *MAD2* Deletionsstamm zeigte bereits in der Ausgangskultur einen um den Faktor 13 erhöhten Chromosomenverlust ( $G_0 = 0.65\%$ ) gegenüber dem Wildtyp mit durchschnittlich 0,048 % (Abb. 3-5B, G). Mit steigendem replikativen Alter stieg der Verlust auf 1,5 % ( $G_{23}$ ) an, was etwa um den Faktor 8 höher ist als im isogenen Kontrollstamm. Der absolute Anteil halbsektorieller Kolonien ist also deutlich höher als im

Vergleichsstamm. Die Rate, mit der die Halbsektorierung im Alter zunimmt, ist jedoch nicht erhöht. Sie beträgt bei der Mutante 2,3 (G0 auf G23) und beim Wildtyp 4,1 (G0 auf G24). Im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem 20 % der halbsektorierten Kolonien bei G0 durch Chromosomenfehlverteilungen entstanden waren (Abb. 3-4 B), war dieser Anteil im *MAD2* Deletionsstamm mit 42 % doppelt so hoch, stieg jedoch mit zunehmender Generationszahl nicht signifikant an (Abb. 3-5 B). Der Deletionsstamm wies eine um 18 % signifikant verringerte RLS auf (Abb. 3-5C).

Die Abwesenheit des Gens *BUB3* rief eine noch stärkere Erhöhung der Chromosomeninstabilität hervor, bei G0 lag der Wert mit 1 % um den Faktor 21 über dem Wildtyp und stieg signifikant auf 3,1 % bei G13 an (Abb. 3-5D und G). Das von G0 an sehr hohe Auftreten von Chromosomenfehlverteilungen (0,44 % aller Kolonien) stieg mit zunehmendem replikativen Alter um den Faktor 2,5 bei G13 höchst signifikant an (Abb. 3-5D; Signifikanz nicht dargestellt;  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ -Test). Auch bei dieser Deletionsmutante war jedoch die Rate, mit der die Halbsektorierung bis G13 anstieg (Faktor 3), dem Wildtyp sehr ähnlich (Faktor 3,2 bei G15). Über G13 hinaus ließen sich keine Zellen isolieren, da diese Mutante mit durchschnittlich 6,3 Teilungen eine um 74 % geringere RLS als der wildtypische Stamm erreichte (Abb. 3-5E).

Durch das Fehlen von lediglich einer *BUB3* Kopie wurde bis G16 keine signifikante Erhöhung von Halbsektorierungsereignissen im Vergleich zum Kontrollstamm ausgelöst (Abb. 3-5F und G). Die Prozentzahl stieg von 0,05 % bei G0 auf 0,3 % bei den ältesten Zellen an. Interessanterweise ergab sich beim Vergleich des G23 Werts des Deletionsstamms mit dem G24 Wert des Wildtyps eine hoch signifikante Erhöhung (Daten nicht gezeigt;  $p < 0,01$ ;  $\chi^2$ -Test). Zusätzlich wurde eine signifikante Erhöhung der Chromosomenfehlverteilungen von 0,007 % bei jungen Zellen auf 0,06 % (G23) festgestellt (Signifikanz nicht dargestellt;  $p < 0,05$ ;  $\chi^2$ -Test (Abb. 3-5F)), die beim Wildtyp nicht erkennbar war.

Die Abwesenheit einer oder beider *BUB3* Kopien ist demnach ein Auslöser für einen Anstieg von Chromosomenfehlverteilungen mit zunehmendem Alter. Das Fehlen einer *BUB3* Kopie verursacht bei sehr alten Zellen zudem einen beim Wildtyp nicht beobachteten sprunghaften Anstieg der generellen Chromosomeninstabilität.



**Abb. 3-5 Defekte im Spindelkontrollpunkt verursachen eine Erhöhung der Anzahl, nicht aber der Rate halbsektorierte Kolonien.**

(Die Legende befindet sich auf der folgenden Seite.)

**Abb. 3-5 Defekte im Spindelkontrollpunkt verursachen eine Erhöhung der Anzahl, nicht aber der Rate halbsektoriierter Kolonien.**

**A** Serielle Tropftestanalyse. Die Zellen des diploiden Kontrollstamms ( $2n + Y$ ) und der angegebenen homo- ( $\Delta/\Delta$ ) bzw. heterozygoten ( $\Delta$ ) Deletionsmutanten wurden auf YPD und YPD mit 30  $\mu\text{g/ml}$  Thiabendazol (TBZ) (30 °C) getropft und für 4-5 Tage inkubiert. **B** Darstellung des prozentualen Anteils halbsektoriierter Kolonien des *MAD2* deletierten Stamms aus (A). Für die Berechnung der Signifikanz wurden CL und ND Ereignisse addiert. \*\*,  $p < 0,01$  im Vergleich zur vorherigen Generation ( $\chi^2$ -Test). **C** Die RLSs des Kontrollstamms ( $n = 39$ ) und des *MAD2* deletierten Stamms ( $n = 41$ ) aus (A) wurden untersucht. Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Zahl der Zellteilungen aufgetragen. Der Deletionsstamm zeigt mit durchschnittlich 17,3 Zellteilungen eine verringerte RLS ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test) gegenüber dem Kontrollstamm (21 Teilungen). Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. **D** Wie (B), jedoch wurde der Stamm mit homozygot deletiertem *BUB3* untersucht. \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  im Vergleich zur vorherigen Generation ( $\chi^2$ -Test). **E** Wie (C), jedoch der *BUB3* deletierte Stamm ( $n = 57$ ) mit höchst signifikant reduzierter RLS (6,3 Teilungen) gegenüber dem Wildtyp (23,8 Teilungen, ( $n = 66$ )).  $p < 0,001$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. **F** Wie (B), aber es wurde der Stamm mit heterozygot deletiertem *BUB3* untersucht. \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur vorherigen Generation ( $\chi^2$ -Test). **G** Darstellung der Daten aus (B), (D) und (F) im direkten Vergleich zu denen des Wildtyps aus (Abb. 3-4A). CL: Chromosomenverlust, ND: Chromosomenfehlverteilung, Y: YAC. Die Versuche aus (C) und (E) wurden von Stefanie Kobus<sup>1</sup> nach meinen Vorgaben durchgeführt.

### 3.1.3.2 Das Kinetochor

Ein funktioneller Kinetochorkomplex ist essentiell für die präzise Verteilung von Chromosomen während der Mitose, und die Funktion des Kinetochors ist eng verknüpft mit dem SKP (Skibbens und Hieter 1998; Cheeseman *et al.* 2002). Die Abwesenheit des nicht essentiellen Kinetochorproteins Mcm21 verursacht beispielsweise Chromosomeninstabilität (Poddar *et al.* 1999). Das Kinetochorprotein Ame1 hingegen ist essentiell und wird für die Aufrechterhaltung des SKPs benötigt (Pot *et al.* 2005). Beide Proteine sind Bestandteil des COMA Komplexes, der die Zentromer-DNA mit den äußeren Proteinen des Kinetochors verbindet (De Wulf *et al.* 2003).

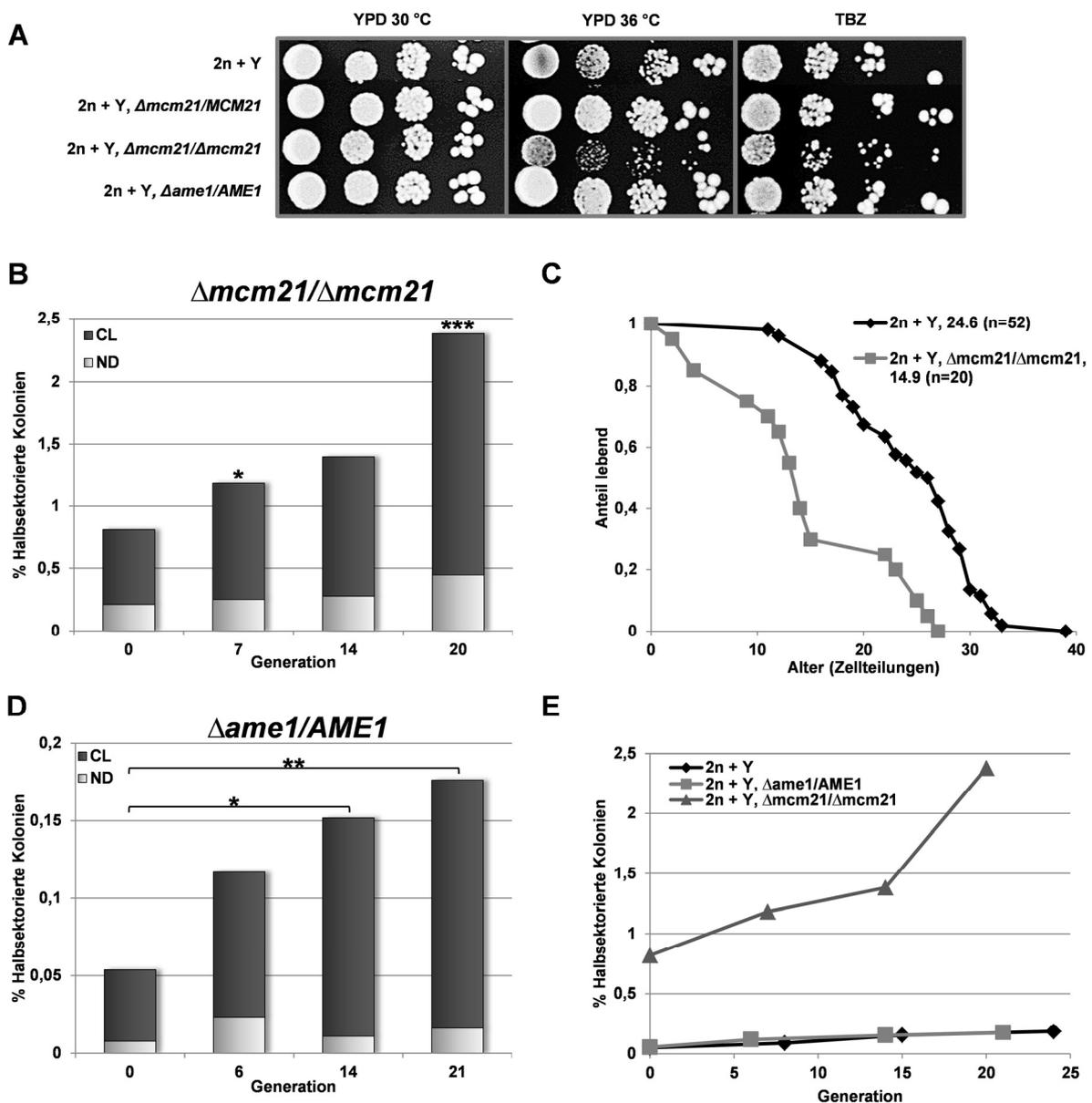
Ein heterozygoter *AME1* Deletionsstamm sowie hetero- und homozygote *MCM21* Deletionsmutanten wiesen unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 30 °C ein zum Wildtyp sehr ähnliches Wachstum auf (Abb. 3-6A). Das galt für die heterozygoten Stämme auch bei einer erhöhten Temperatur von 36 °C und in Anwesenheit von TBZ. Die Deletion beider *MCM21* Gene im diploiden Stamm führte jedoch zu Temperatur- und TBZ-Sensitivität.

Die Abwesenheit des Kinetochorproteins Mcm21 verursachte eine stark erhöhte Chromosomeninstabilität: von 0,8 % (17-fach über dem Wildtyp) bei G0 stieg der Verlust nach 20 Zellteilungen für die alten Mutterzellen (G20) auf 2,4 % (ca. 13-fach über dem Wildtyp) an (Abb. 3-6B und E). Auch bei dieser Mutante war also absolut betrachtet die Anzahl, nicht aber die relative Steigerung halbsektoriierter Kolonien im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die RLS dieses Stammes lag mit durchschnittlich 14,9 Zellteilungen

<sup>1</sup> Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland

deutlich (39 %) unter der des Wildtyps mit 24,6 Teilungen, daher konnten nur Zellen bis Generation 20 isoliert werden (Abb. 3-6C). Chromosomenfehlverteilungen stiegen mit dem replikativen Alter signifikant von 0,2 % (G0) auf 0,4 % (G20) an (Signifikanz nicht dargestellt;  $p < 0,01$ ;  $\chi^2$ -Test (Abb. 3-6B)). Demnach löst, wie schon für *BUB3* beschrieben, auch das Fehlen des Mcm21 Proteins eine Zunahme von Chromosomenfehlverteilungen mit dem Alter aus.

Die Deletion eines *AME1* Allels bewirkte keine Erhöhung von Chromosomenverlusten oder Chromosomenfehlverteilungen (Abb. 3-6D und E). Eine Genkopie reichte im diploiden Stamm demnach aus, um die Chromosomenstabilität auf wildtypischem Niveau zu halten, die Anzahl halbsektorieller Kolonien stieg von 0,05 % (G0) um den Faktor 3,6 auf 0,18 % (G21) an.



**Abb. 3-6** Ohne *MCM21* treten vermehrt Chromosomenverluste und Chromosomenfehlverteilungen auf, der Anstieg mit dem Alter bleibt jedoch wildtypisch. (Die Legende befindet sich auf der folgenden Seite.)

**Abb. 3-6 Ohne *MCM21* treten vermehrt Chromosomenverluste und Chromosomenfehlverteilungen auf, der Anstieg mit dem Alter bleibt jedoch wildtypisch.**

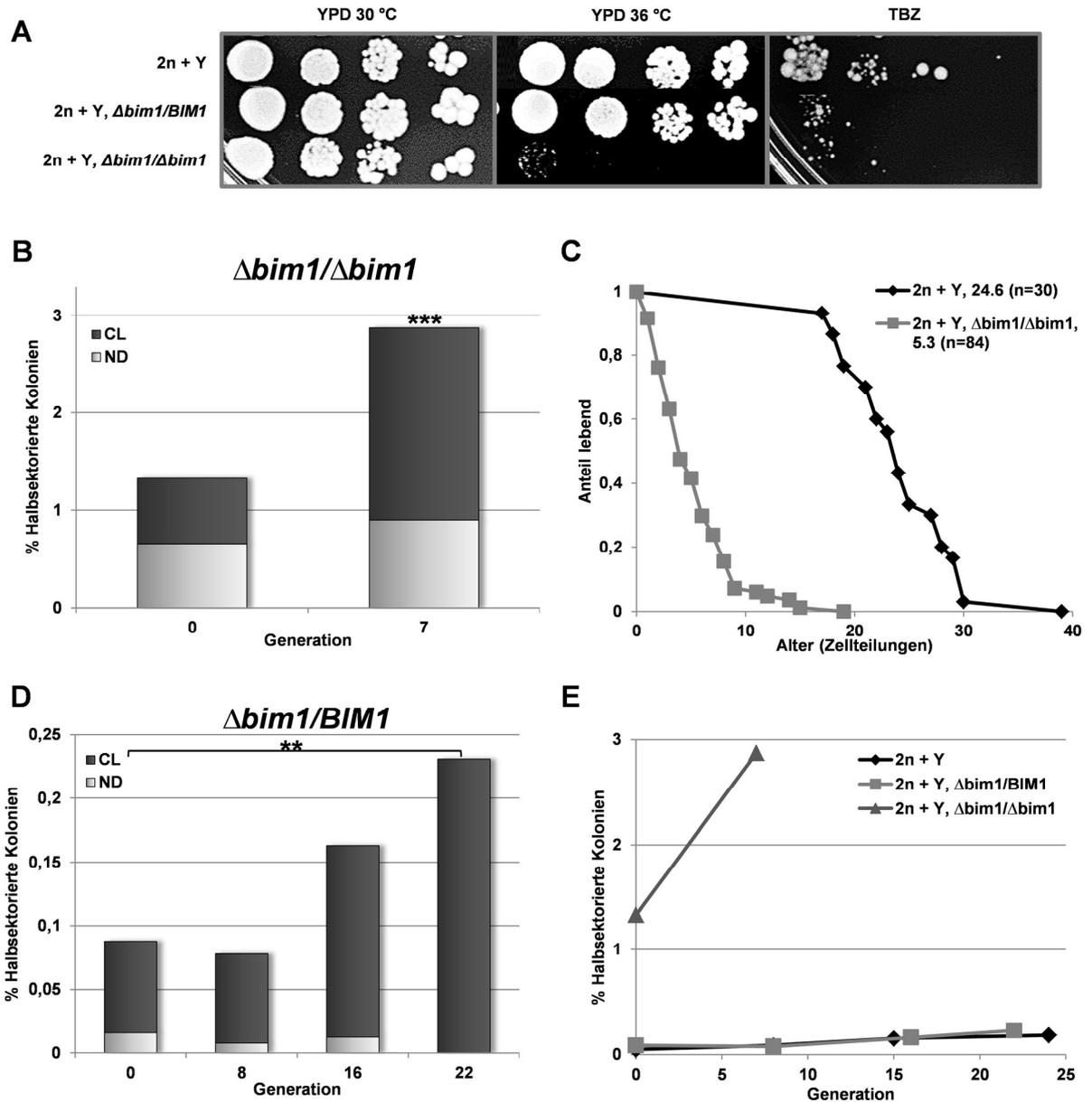
**A** Serielle Tropftestanalyse der Zellen des diploiden Kontrollstamms ( $2n + Y$ ) und der angegebenen homo- ( $\Delta/\Delta$ ) bzw. heterozygoten ( $\Delta$ ) Deletionsmutanten. Zellen von  $\bar{u}/N$  Kulturen wurden auf YPD- und YPD-Platten mit 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Thiabendazol (TBZ) (30 °C) getropft, die Inkubation erfolgte über 4 Tage. **B** Dargestellt ist der prozentuale Anteil halbsektorierter Kolonien des homozygot *MCM21* deletierten Stamms aus (A). Für die Berechnung der Signifikanz wurden CL und ND Ereignisse addiert. \*,  $p < 0,05$ , \*\*\*,  $p < 0,001$  im Vergleich zur vorherigen Generation ( $\chi^2$ -Test). **C** Die RLS des Wildtyps ( $n = 52$ ) wurde mit der des *MCM21* deletierten Stamms ( $n = 20$ ) aus (A) verglichen. Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Zahl der Zellteilungen aufgetragen. Der Stamm ohne *MCM21* Gen zeigt mit durchschnittlich 14,9 Zellteilungen eine geringere RLS ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test) als der Kontrollstamm (24,6 Teilungen). Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. **D** Wie (B), jedoch wurde der Stamm mit heterozygot deletiertem *AME1* untersucht. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  im Vergleich zur angegebenen (Schweifklammer) Generation ( $\chi^2$ -Test). **E** Die Daten aus (B) und (D) sind im direkten Vergleich zu denen des Kontrollstamms aus (Abb. 3-4A) dargestellt. CL: Chromosomenverlust, ND: Chromosomenfehlverteilung, Y: YAC. Die Bestimmung der RLS (C) wurde von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben durchgeführt.

### 3.1.3.3 Die Verknüpfung der mitotischen Spindel mit dem Kinetochor

Das Kinetochor dient als Verknüpfungspunkt der Chromosomen mit der mitotischen Spindel (Tanaka 2010). Diese Verknüpfung wird unter anderem über Mikrotubuli (MT)-assoziierte Proteine der EB1 Familie vermittelt, die auch mit dem Spindelkontrollpunkt interagieren (Tirnauer *et al.* 2002; Morrison 2009). Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das nicht essentielle, hoch konservierte Bim1 Protein, dessen Verlust mit erhöhter Chromosomenfehlsegregation einhergeht (Su *et al.* 1995; Schwartz *et al.* 1997; Yuen *et al.* 2007).

Die Deletion eines oder beider *BIM1* Gene verursachte keine Wachstumsdefekte in einer seriellen Tropftestanalyse unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 30 °C (Abb. 3-7A). Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 36 °C war eine Genkopie ausreichend, um wildtypisches Wachstum zu ermöglichen, während eine homozygote Deletion starke Temperatursensitivität hervorrief. Unter TBZ Einwirkung führte bereits der Verlust eines *BIM1* Gens zu schwerwiegenden Einbußen der Lebensfähigkeit. Auffällig war die starke Sektorierung sämtlicher Kolonien des homozygoten Deletionsstamms bereits bei optimalen Wachstumsbedingungen (30 °C; Daten nicht gezeigt). Die Ermittlung der chromosomalen Stabilität mit steigendem replikativen Alter konnte für Zellen ohne *BIM1* Gen nur bis G7 erfolgen, da die RLS dieses Stammes im Durchschnitt lediglich 5,3 Zellteilungen betrug (Abb. 3-7C). Die Verkürzung gegenüber dem Kontrollstamm mit 24,6 Teilungen belief sich auf höchst signifikante 78 %. Unter den G0 Kolonien wurde eine gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 28 gesteigerte Chromosomeninstabilität beobachtet (Abb. 3-7B und E). Mit 1,3 % war dies der höchste ermittelte Halbsektierungswert von G0 Kolonien in allen durchgeführten Experimenten. Dieser Wert nahm weiter zu und erreichte bei G7 Zellen 2,9 %. Doch auch diese hohen Werte

bedeuteten, betrachtet man den reinen Anstieg um den Faktor 2,2, keine deutliche Steigerung gegenüber dem Wildtyp (Faktor 1,8 von G0 auf G8).



**Abb. 3-7 Die homozygote Deletion von *BIM1* verursacht eine stark beeinträchtigte Lebensfähigkeit und erhöhte Chromosomeninstabilität.**

**A** Serielle Tropftestanalyse. Die Zellen des diploiden Kontrollstamms (2n + Y) und der dargestellten homo- ( $\Delta/\Delta$ ) bzw. heterozygoten ( $\Delta$ ) *BIM1*-Deletionsmutanten wurden auf YPD und YPD mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Thiabendazol (TBZ) (30 °C) getropft und für 4-5 Tage inkubiert. **B** Der prozentuale Anteil halbsektoriierter Kolonien des homozygoten *BIM1* Deletionsstamms aus (A) wurde gegen die Generationszahl aufgetragen. Zur Signifikanzberechnung wurden CL und ND Ereignisse addiert. \*\*\*,  $p < 0,001$  im Vergleich zu G0 ( $\chi^2$ -Test). **C** Die Lebensspannen des Wildtyps (n = 30) und des homozygot *BIM1* deletierten Stamms (n = 84) aus (A) wurden bestimmt. Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Zahl der Zellteilungen aufgetragen. Der Deletionsstamm zeigt mit durchschnittlich 5,3 Zellteilungen eine stark verringerte RLS gegenüber dem Kontrollstamm mit 24,6 Teilungen ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. **D** Wie (B), jedoch wurde der Stamm mit heterozygot deletiertem *BIM1* untersucht. \*\*,  $p < 0,01$  im Vergleich zu G0 ( $\chi^2$ -Test). **E** Die Daten aus (B) und (D) wurden neben denen des Wildtyps aus (Abb. 3-4A) graphisch dargestellt. CL: Chromosomenverlust, ND: Chromosomenfehlverteilung, Y: YAC. Die RLS Bestimmung (C) des *BIM1* Deletionsstamms wurde von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben durchgeführt.

Chromosomenfehlverteilungen wurden mit 49 % aller halbsektorierten Kolonien bei G0 häufig beobachtet, stiegen aber im Gegensatz Chromosomenverlusten bis G7 nicht signifikant an.

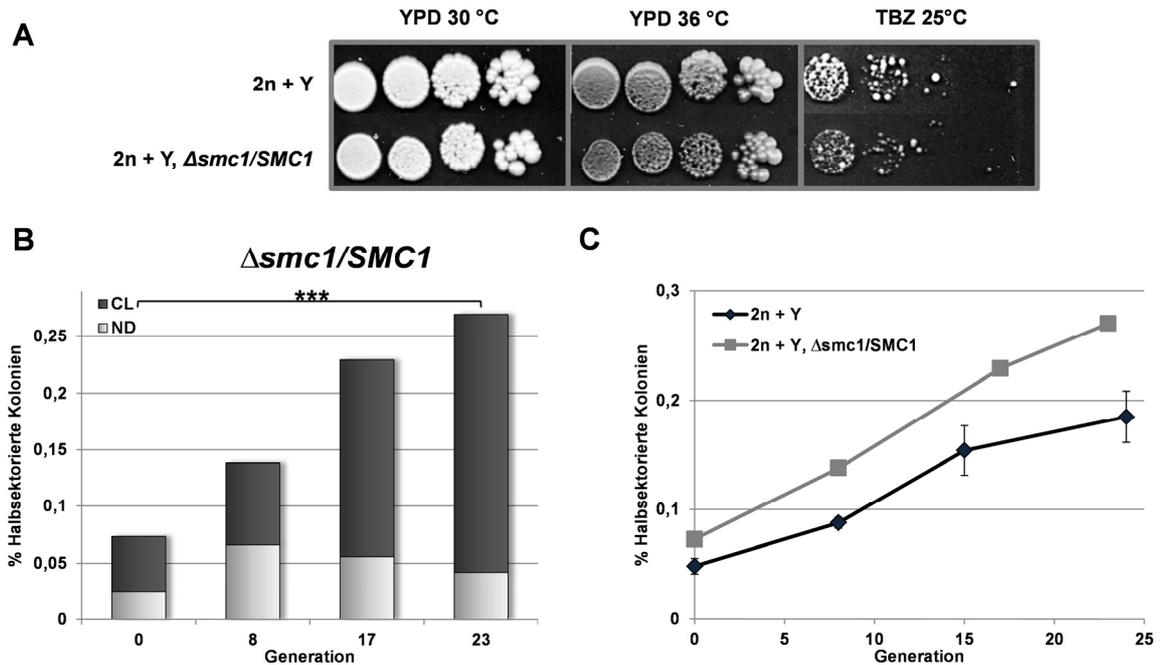
Der Anteil halbsektorierte Kolonien des heterozygot deletierten *BIM1* Stamms war mit 0,09 % bei G0 etwa doppelt so hoch wie beim Wildtyp (0,048 %; Abb. 3-4A) und stieg auf ein wildtypisches Niveau von 0,23 % bei G22 an (Abb. 3-7D und E). Eine statistische Überprüfung ergab jedoch, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den G0 Werten der beiden Stämme bestand ( $p > 0,05$ ;  $\chi^2$ -Test). Auch das Auftreten von Chromosomenfehlverteilungen bei G0 glich mit 0,015 % dem Wildtyp (Abb. 3-4B) und nahm mit zunehmendem Alter nicht signifikant zu oder ab ( $p > 0,05$  %,  $\chi^2$ -Test). Die Deletion eines *BIM1* Allels hat demnach keinen Einfluss auf die Chromosomenstabilität.

#### 3.1.3.4 Die Kohäsion

Durch die Kohäsion der Schwesterchromatiden wird im Zellzyklus eine vorzeitige Separation der Chromosomen und dadurch eine mögliche Fehlseggregation verhindert (Larionov *et al.* 1985; Michaelis *et al.* 1997). Die Proteine des mitotischen Kohäsinkomplexes sind essentiell und konnten daher nicht homozygot deletiert werden. Das Fehlen einer Kopie des Kohäsingens *SMC1* verursacht jedoch Haploinsuffizienz in einem diploiden Hefestamm (Deutschbauer *et al.* 2005). Ich untersuchte daher, ob die Deletion eines *SMC1* Allels ausreichen würde, um eine Erhöhung der Chromosomeninstabilität auszulösen.

In einer vorangehenden seriellen Tropftestanalyse konnte keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 30 °C und erhöhter Temperatur beobachtet werden, lediglich eine leichte TBZ-Sensitivität war zu erkennen (Abb. 3-8A). Das Auftreten halbsektorierte Kolonien unterschied sich bei jeder Generation nicht signifikant vom Wildtyp ( $p > 0,05$  %,  $\chi^2$ -Test), es wurde ein Anstieg von 0,07 % (G0) auf 0,27 % (G23) festgestellt (Abb. 3-8B und C).

Der Anteil rot/weißer Kolonien (Chromosomenfehlverteilungen) war mit 0,02 % bei G0 nicht signifikant höher als beim Wildtyp, die Zunahme auf 0,04 % bei G23 war ebenfalls nicht signifikant. Nach Verlust einer *SMC1* Kopie entsprechen somit die beobachtete Häufigkeit und der Anstieg von Chromosomeninstabilität der des Wildtyps.



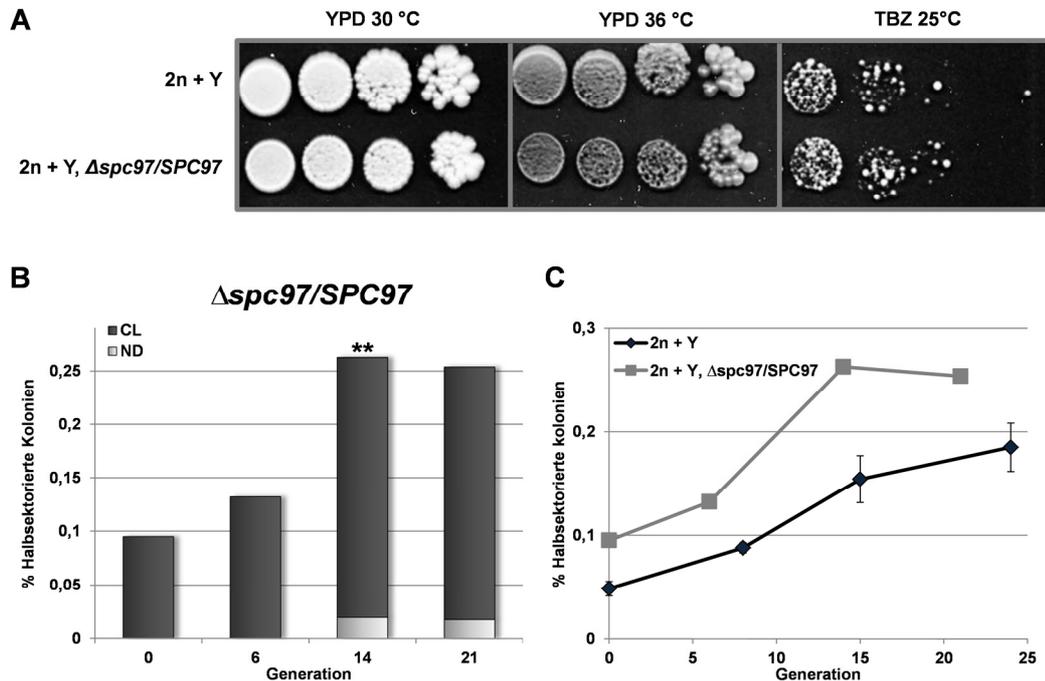
**Abb. 3-8 Bei Verlust einer Kopie des Kohäsingens *SMC1* verändert sich die Chromosomenstabilität im Vergleich zum Wildtyp nicht.**

**A** Serielle Tropftestanalyse. Die Zellen des diploiden Kontrollstamms ( $2n + Y$ ) und der dargestellten heterozygoten ( $\Delta$ ) *SMC1*-Deletionsmutante wurden auf YPD und YPD mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Thiabendazol (TBZ) getropft und für 5 Tage inkubiert. **B** Der Anteil halbsektorierte Kolonien des Stamms mit heterozygot deletiertem *SMC1* Gen unterschiedlich alter Zellen (Generation) wurde ermittelt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Addition der CL und ND Werte. \*\*\*,  $p < 0,001$  im Vergleich zu  $G_0$  ( $\chi^2$ -Test). **C** Die Werte aus (B) wurden zu Vergleichszwecken mit denen des Wildtyps (Abb. 3-4A) in einem Diagramm dargestellt. Fehlerbalken: Standardabweichung. CL: Chromosomenverlust, ND: Chromosomenfehlverteilung, Y: YAC.

### 3.1.3.5 Der Spindelpolkkörper

Nahezu alle Bestandteile des Spindelpolkkörpers von *S. cerevisiae* sind essentiell, oder ihr Fehlen verursacht eine stark reduzierte Lebensfähigkeit (Jaspersen und Winey 2004). Für die Komponenten Spc97 und Spc98 wurde gezeigt, dass die Deletion eines Allels Haploinsuffizienz in Bezug auf Wachstum auslöst (Deutschbauer *et al.* 2005). Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen *SPC97* Überexpression und erhöhter Chromosomenfehlsegregation festgestellt (Niu *et al.* 2008). Daher wurde die chromosomale Stabilität eines diploiden Stamms überprüft, in dem eine *SPC97* Kopie ausgeschaltet worden war. Wachstumsunterschiede zum Wildtypstamm unter erhöhter Temperatur und unter TBZ-Einfluss traten nicht auf (Abb. 3-9A). Die Häufigkeit von Fehlern bei der YAC Weitergabe nahm mit dem replikativen Alter zu, unterschied sich jedoch nicht signifikant vom Wildtyp (Abb. 3-9B und C). Sie erhöhte sich um den Faktor 2,6 von 0,095 % bei  $G_0$  auf 0,25 % bei  $G_{21}$ . Fehlverteilungen des YACs traten erst ab  $G_{14}$  auf und erhöhten sich nicht weiter. Der Anstieg von 0 % ( $G_0$ ) auf 0,02 % ( $G_{14}$ ) war nicht signifikant ( $p > 0,05$  %,  $\chi^2$ -Test). In Bezug auf Wachstum und Chromosomenstabilität

konnte zusammenfassend eine Haploinsuffizienz für *SPC97* im verwendeten Stammhintergrund nicht bestätigt werden.



**Abb. 3-9 Die Deletion einer Kopie des Spindelpolkörpergens *SPC97* löst keine erhöhte Fehlerrate bei der Chromosomenweitergabe aus.**

**A** Serielle Tropftestanalyse. Die Zellen des diploiden Kontrollstamms (2n + Y) und des dargestellten heterozygoten ( $\Delta$ ) *SPC97*-Deletionsstamms wurden auf YPD und YPD mit 50  $\mu$ g/ml Thiabendazol (TBZ) getropft und für 5 Tage inkubiert. **B** Die Anzahl halbsektorieller Kolonien verschiedener Generationen eines für *SPC97* heterozygoten Mutantenstamms wurde ermittelt und graphisch dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach Addition der beobachteten CL und ND Ereignisse. \*\*,  $p < 0,01$  im Vergleich zu G6 ( $\chi^2$ -Test). **B** Dargestellt sind die in (B) ermittelten Prozentwerte halbsektorieller Kolonien des Deletionsstamms im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-4A). Fehlerbalken: Standardabweichung. CL: Chromosomenverlust, ND: Chromosomenfehlverteilung, Y: YAC.

### 3.1.3.6 Die Chromosomenreplikation

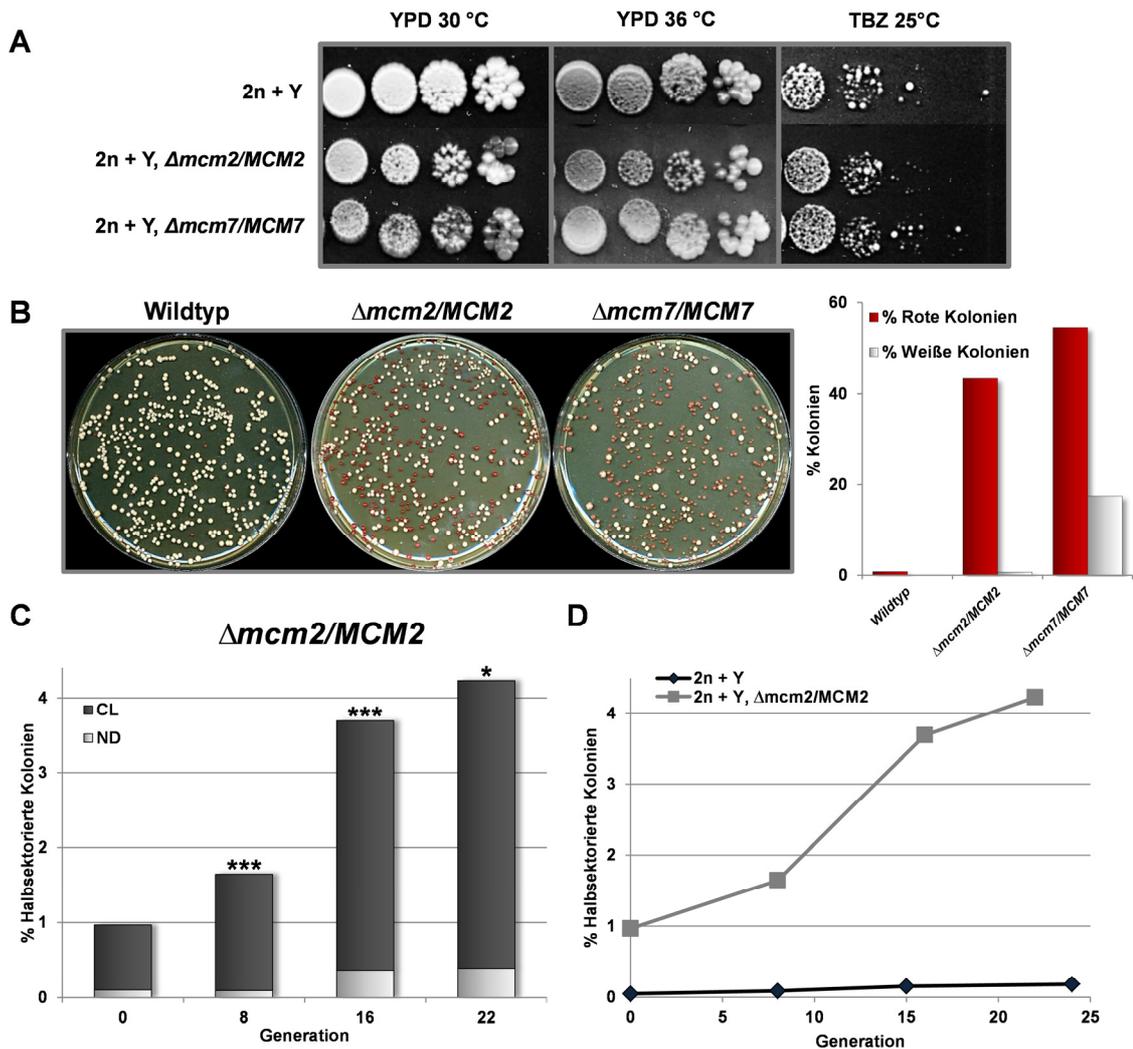
Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass in erster Linie die Chromosomenverluste und nicht Chromosomenfehlverteilungen mit dem Alter zunahen (Kap. 3.1.2-3.1.3.5). Es war somit denkbar, dass ein Fehler in der Chromosomenweitergabe bereits vor der Mitose stattfindet, etwa in der Synthese (S)-Phase des Zellzyklus, bei der das genetische Material einer Zelle repliziert wird. So kann beispielsweise ein nicht funktioneller S-Phase Kontrollpunkt, der normalerweise bei fehlerhafter Replikation aktiviert würde, den Verlust von Chromosomen bewirken (Klein 2001). Auch Mutationen der essentiellen Gene *MCM2* bis *MCM7* des prä-replikativen Komplexes verursachen erhöhte Verlustraten eines zirkulären Minichromosoms (Maine *et al.* 1984). Für die Gene *MCM2* und *MCM7* wurde beschrieben, dass das Vorliegen von nur einer Genkopie in einem diploiden Stamm Haploinsuffizienz hervorruft (Deutschbauer *et al.* 2005). Diese beiden Gene wurden daher heterozygot deletiert.

Wachstumsunterschiede zum Wildtyp wurden bei den Mutanten in einer seriellen Tropftestanalyse unter erhöhter Temperatur (36 °C) und bei Stressinduktion durch TBZ nicht sichtbar (Abb. 3-10A). Auffällig war jedoch der hohe Anteil roter Kolonien, die aus Zellen, die kein YAC enthielten, entstanden waren (Abb. 3-10B). Dieser betrug 43 % bei der *MCM2*- und 55 % bei der *MCM7* Mutante, während beim wildtypischen Stamm nur 0,8 % der Kolonien, die aus jungen Zellen gebildet wurden, rot waren. Auf der anderen Seite kamen weiße Kolonien, die aus Zellen mit zwei YACs hervorgingen, beim *MCM2* heterozygot deletierten Stamm mit 0,7 % 14-mal häufiger vor als beim Wildtyp. Bei der *MCM7* Mutante war dieser Wert mit 18 % sogar um den Faktor 360 erhöht. Die heterozygote Deletion dieser Gene verursacht also starke Haploinsuffizienz in Bezug auf die korrekte Vererbung des YACs, wobei auch hier Chromosomenverluste häufiger auftreten als der Zugewinn eines YACs (Chromosomenfehlverteilung).

Dies wurde durch die Analyse halbsektierter Kolonien verschiedener Generationen des *MCM2* Deletionsstamms bestätigt. Bei G0 betrug ihr Anteil 0,97 % und war somit gegenüber dem Wildtyp 20-fach erhöht (Abb. 3-10C und D). Mit zunehmendem Alter erreichten sie einen Anstieg um den Faktor 4,4 auf 4,2 % (G22). Trotz der hohen YAC-Instabilität war die replikative Lebensspanne der Zellen nicht stark beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Chromosomenfehlverteilungen traten bei jungen Zellen (G0 und G8) zu 0,1 % auf und stiegen bis G16 höchst signifikant auf 0,4 % an (Signifikanz nicht dargestellt;  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ -Test) (Abb. 3-10C). Ein weiterer Anstieg von G16 auf G22 (0,4 %) wurde nicht festgestellt. Die Deletion eines *MCM2* Gens ist also ausreichend, um die Häufigkeit von YAC Zugewinnen (Chromosomenfehlverteilungen) oder Verlusten (Chromosomenverluste oder Chromosomenfehlverteilungen) gegenüber dem Wildtyp zu erhöhen. Für den heterozygoten *MCM7* Deletionsstamm wurde die Chromosomenstabilität nicht bestimmt, da der Anteil von Zellen, die ein YAC trugen, bei G0 lediglich 28 % betrug. Somit konnten nicht genügend Kolonien in der Auswertung berücksichtigt werden.

**Abb. 3-10 Die heterozygote Deletion von Komponenten des prä-replikativen Komplexes bewirkt einen Anstieg der chromosomalen Instabilität.**

**A** Serielle Tropftestanalyse. Die Zellen des diploiden Kontrollstamms ( $2n + Y$ ) und der dargestellten heterozygoten ( $\Delta$ ) *MCM2* und *MCM7*-Deletionsstämme wurden auf YPD und YPD mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Thiabendazol (TBZ) getropft und für 5 Tage inkubiert. **B** Links: exemplarische Fotos von Platten, auf denen G0 Zellen der genannten Stämme ausgestrichen wurden. Die Inkubation erfolgte für 6 Tage bei 30 °C. Rechts: Graphische Darstellung des Anteils roter und weißer Kolonien, die insgesamt gezählt wurden (Wildtyp: ( $n = 9719$ ),  $\Delta mcm2/MCM2$ : ( $n = 21194$ ),  $\Delta mcm7/MCM7$ : ( $n = 17716$ )). **C** Dargestellt ist der prozentuale Anteil halbsektierter Kolonien des heterozygoten *MCM2* Deletionsstamms. Für die Berechnung der Signifikanz wurden CL und ND Ereignisse addiert. \*,  $p < 0,05$ , \*\*\*,  $p < 0,001$  im Vergleich zur vorherigen Generation ( $\chi^2$ -Test). **D** Die Daten aus (C) wurden im Vergleich zu denen des Kontrollstamms aus (Abb. 3-4A) dargestellt. CL: Chromosomenverlust, ND: Chromosomenfehlverteilung, Y: YAC.



**Abb. 3-10** Die heterozygote Deletion von Komponenten des prä-replikativen Komplexes bewirkt einen Anstieg der chromosomalen Instabilität. (Die Legende befindet sich auf der vorherigen Seite.)

### 3.1.4 Verlust des endogenen Chromosoms III bei Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Das YAC System stellt eine etablierte Methode zur Bestimmung von Chromosomeninstabilität dar (Hieter *et al.* 1985; Kouprina *et al.* 1988; Kouprina *et al.* 1993; Hegemann *et al.* 1999). Dennoch sollte überprüft werden, ob die in dieser Arbeit bei vielen Mutanten beobachtete Erhöhung halbsektorieller Kolonien gegenüber dem Wildtyp ein YAC-spezifisches Phänomen darstellte oder auch für endogene Chromosomen nachweisbar war. Daher wurde für die Mutanten mit signifikant höheren Fehlerraten ein quantitativer Paarungsversuch durchgeführt, bei dem anhand der Paarungseffizienz der zu untersuchenden Stämme der Verlust des endogenen Chromosoms (Chr. III) ermittelt werden konnte (Details siehe Kap. 2.14.2).

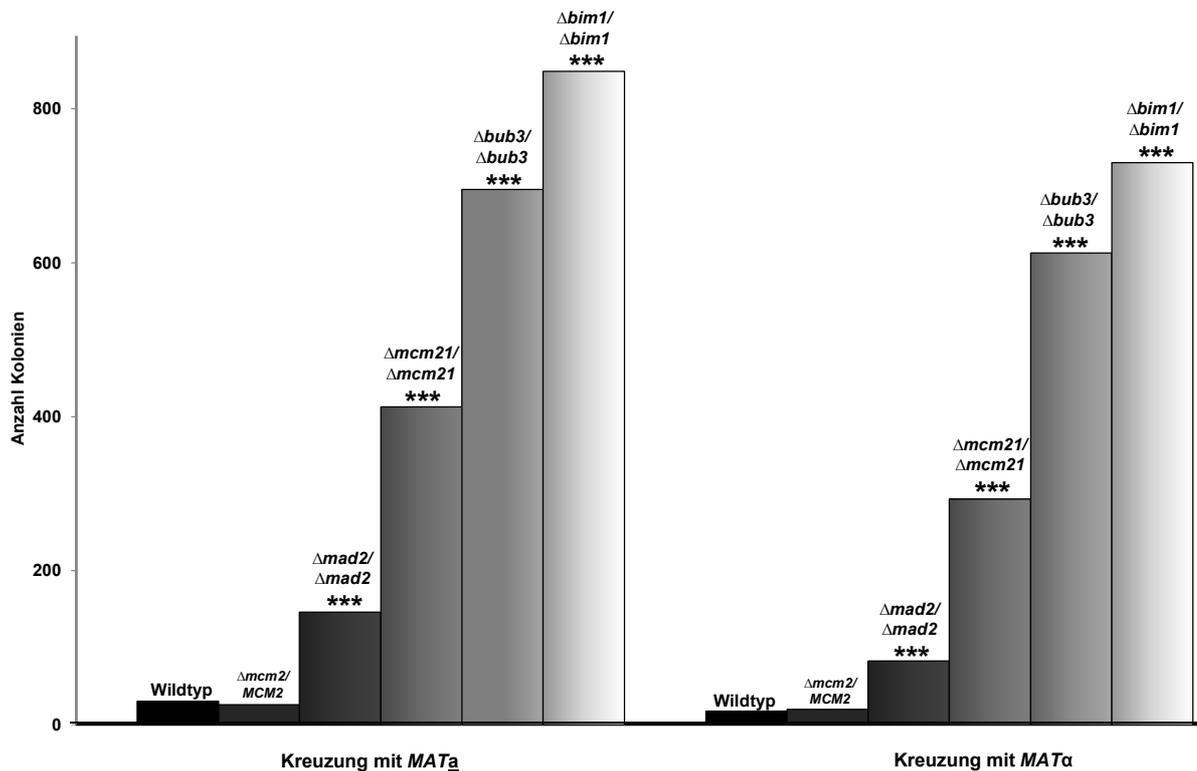
Überraschenderweise war die Verlustrate von Chr. III bei der heterozygoten *MCM2* Replikationsmutante gegenüber dem Wildtyp nicht signifikant erhöht, für den Wildtyp wurden als Median 30 (Paarung mit *MAT<sub>a</sub>*) bzw. 16 (Paarung mit *MAT<sub>α</sub>*) Kolonien gezählt, bei der *MCM2* Mutante wuchsen 20 bzw. 19 Kolonien (Abb. 3-11). Die errechneten Paarungsraten lagen entsprechend mit dem Faktor 0,9 sowie 1,1 (*Δmcm2/MCM2*) nur knapp unter oder über der des Wildtyps (Tab. 3-1), der das Chr. III mit einer Rate von etwa  $7-12 \times 10^{-5}$  verlor. Die Daten verdeutlichen, dass die starke Erhöhung chromosomaler Instabilität in der Replikationsmutante YAC-spezifisch ist und nicht auf die Genauigkeit der Weitergabe endogener Chromosomen übertragen werden kann. Aus diesem Grunde wurden die mit diesem Stamm erzielten Ergebnisse in den folgenden Auswertungen nicht berücksichtigt.

**Tab. 3-1 Rate paarungsfähiger Zellen ausgewählter Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp.**

Genotypen	Beobachtete Paarungsrate		Rate X <i>MAT<sub>a</sub></i> über WT (+/+)	Rate X <i>MAT<sub>α</sub></i> über WT (+/+)
	X <i>MAT<sub>a</sub></i> (* 10 <sup>-5</sup> )	X <i>MAT<sub>α</sub></i> (* 10 <sup>-5</sup> )		
Wildtyp +/+	12,2 ± 4,0	7,1 ± 3,9	1	1
<i>Δmcm2/MCM2</i>	10,4 ± 6,8	8,0 ± 2,2	0,9	1,1
<i>Δmad2/Δmad2</i>	58,5 ± 27,2	33,2 ± 18,1	4,8	4,7
<i>Δmcm21/Δmcm21</i>	165,2 ± 34,8	117,3 ± 68,1	13,5	16,5
<i>Δbub3/Δbub3</i>	278,1 ± 166,0	245,2 ± 136,5	22,8	34,5
<i>Δbim1/Δbim1</i>	339,6 ± 127,4	292,1 ± 63,6	27,8	41,1

Dargestellt ist die Rate, mit der paarungskompetente diploide Zellen des entsprechenden Genotyps entstanden sind. Diese Zellen wurden nach Kreuzung mit haploiden *MAT<sub>a</sub>* or *MAT<sub>α</sub>* Teststämmen prototroph triploid (3n - 1). Die entstandenen Zygoten konnten auf entsprechenden Indikatorplatten Kolonien bilden. Zur Berechnung der Rate wurde eine Paarungseffizienz von 50 % angenommen (Methode nach (Spencer *et al.* 1990)). WT: Wildtyp; ± Standardabweichung

Die übrigen untersuchten Mutantenstämme ließen eine höchst signifikante Erhöhung des Chr. III Verlusts erkennen, der um den Faktor 4,7 (*Δmad2/Δmad2*) bis 41,5 (*Δbim1/Δbim1*) über dem des Wildtyps lag. Die Paarungsraten für den jeweiligen Deletionsstamm waren dabei für die Kreuzungen gegen die beiden unterschiedlichen Teststämmen vergleichbar. Die Reihenfolge der Erhöhung des Chromosomenverlusts gegenüber dem Wildtyp entsprach genau der, die auch für das Auftreten von Halbsektierung in den Stämmen ermittelt wurde. Dort zeigte der *MAD2* deletierte Stamm ebenfalls die geringste und der Stamm ohne *BIM1* die höchste Chromosomeninstabilität. In der Mitte lagen die Werte der Stämme ohne die Gene *MCM21* bzw. *BUB3*.



**Abb. 3-11 Mit Ausnahme der Replikationsmutante ist der Verlust von Chromosom III in allen Deletionsstämmen erhöht.**

Zellen einer  $\bar{u}/N$  Kultur des diploiden Wildtyps und der angegebenen Deletionsmutanten wurden mit haploiden Zellen eines  $MAT\alpha$  und eines  $MAT\alpha$ -Stamms gekreuzt und auf SD-Platten ohne Aminosäuren ausgestrichen. Nur gepaarte Zellen konnten dort zu Kolonien heranwachsen, die anschließend gezählt wurden. Aus 8 unabhängigen Experimenten wurde der Median ermittelt und graphisch dargestellt. \*\*\*,  $p < 0,001$  im Vergleich zum Wildtyp (Zweistichproben-t-Test).

### 3.1.5 Es besteht eine Korrelation zwischen replikativer Lebensspanne und dem Auftreten von Chromosomeninstabilität

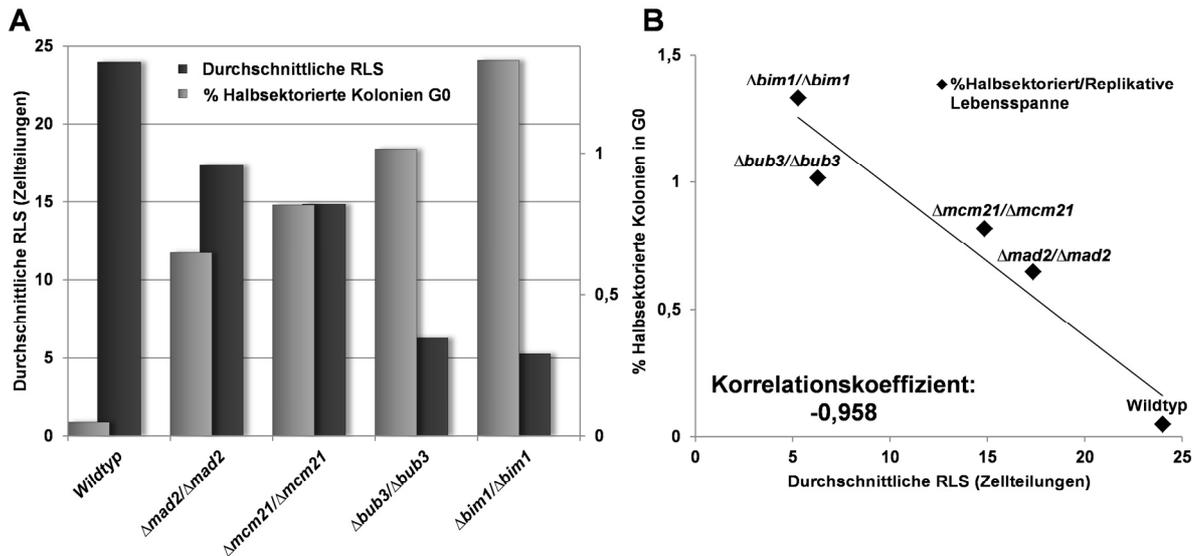
Die ermittelte RLS der stark sektorierenden Deletionsstämme ließ einen weiteren interessanten Zusammenhang erkennen.

Je kürzer die durchschnittlich ermittelte Lebensspanne der Stämme war, desto höher fiel der Anteil halbsektorierte Kolonien und damit die Chromosomeninstabilität bei G0 aus (Abb. 3-12A). So erreichte der Wildtyp mit der geringsten Halbsektorierung von 0,05 % die längste RLS von 24 Teilungen (vgl. auch Abb. 3-5E), während eine homozygote *BIM1* Deletion, durch die die RLS auf 5 Teilungen reduziert wurde, mit 1,33 % die größte Chromosomeninstabilität verursachte (vgl. auch Abb. 3-7B und C).

Setzte man RLS und Halbsektorierung für einen Stamm ins Verhältnis und betrachtete anschließend alle Stämme, so wurde ein klarer negativer Zusammenhang deutlich (Abb. 3-12B). Die ermittelten Datenpunkte lagen nah an der linearen Regressionslinie. Die statistische Auswertung erfolgte durch Ermittlung des Korrelationseffizienten. Je näher

dieser Wert an  $\pm 1$  liegt, desto stärker ist die Korrelation zwischen den Datenpunkten. Ein Wert unter 0 zeigt dabei einen negativen, ein Wert über 0 einen positiven Zusammenhang an. Je näher der Korrelationskoeffizient bei 0 liegt, desto geringer ist der Zusammenhang zwischen den Datenreihen. Ob dabei die eine Größe ursächlich ist für die Erhöhung oder Verringerung der zweiten Variable oder aber eine dritte, unbekannte Variable den Zusammenhang herstellt, kann nicht gesagt werden.

Mit  $-0,958$  lag der Korrelationskoeffizient sehr nah an  $-1$ , es besteht also eine starke negative Korrelation.



**Abb. 3-12 Die RLS steht in negativer Korrelation zur beobachteten Chromosomeninstabilität in G0.**

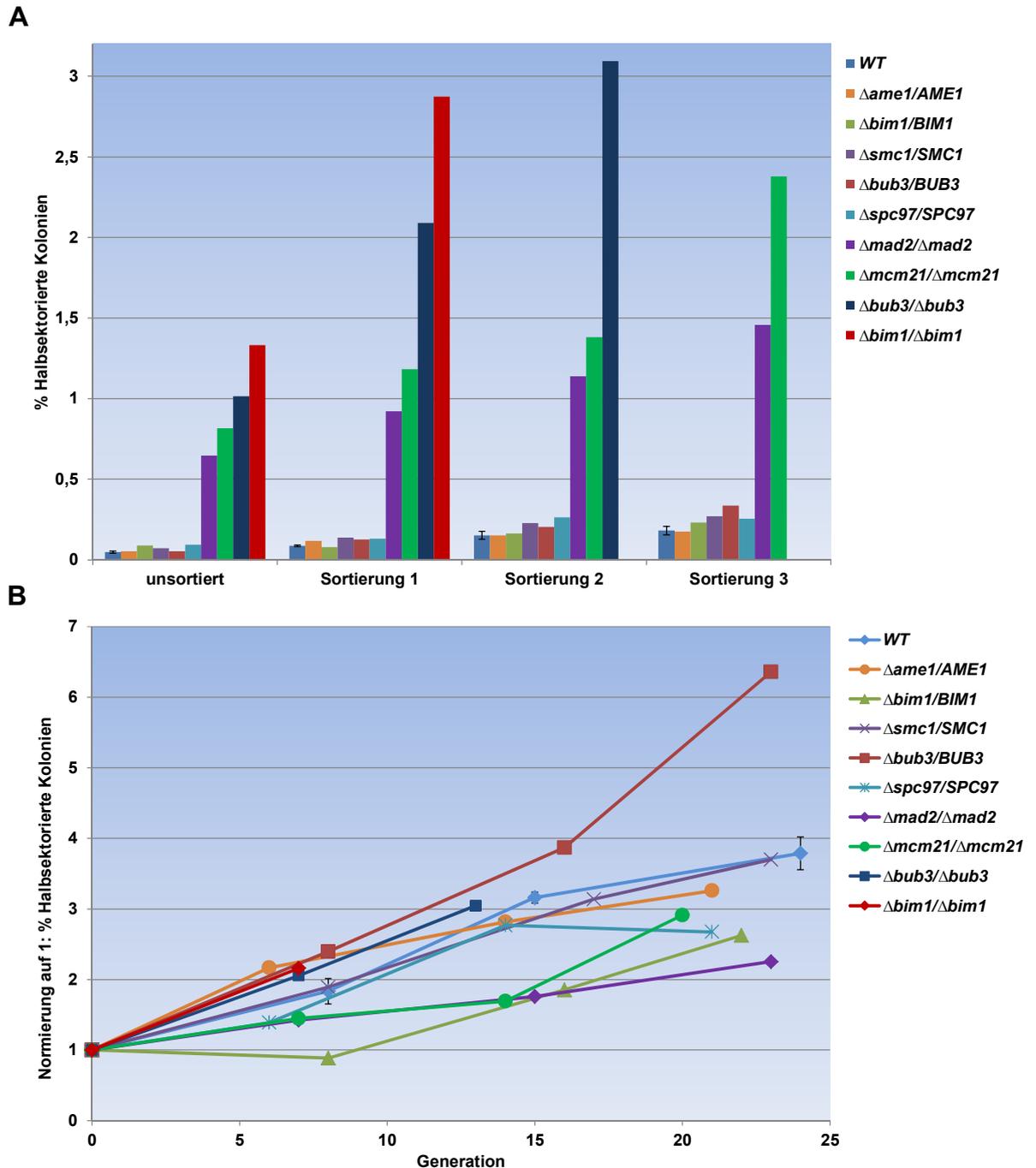
**A** Die ermittelte durchschnittliche replikative Lebensspanne (RLS) wurde neben dem beobachteten Anteil halbsektoriierter Kolonien bei Generation 0 (G0) für die angegebenen Stämme aufgetragen. **B** Die Werte aus (A) wurden gegeneinander aufgetragen. Die Daten für den jeweils angegebenen Stamm sind als Raute dargestellt. Eine lineare Regression wurde durchgeführt, um die ermittelte negative Korrelation (Korrelationskoeffizient:  $-0,958$ ) der Datenpunkte zu verdeutlichen.

### 3.1.6 Die Fehlfunktion einzelner Komponenten des Chromosomenzyklus erklärt nicht vollständig die Ursache der unpräzisen Chromosomenweitergabe mit dem Alter

Betrachtet man die erhaltenen Daten im Zusammenhang, so wird deutlich, dass sich die heterozygoten Deletionsstämme im absoluten Anteil halbsektorieller Kolonien, welche aus Zellen der verschiedenen Sortierungen gebildet wurden, nicht oder nur geringfügig vom Wildtyp unterscheiden, während eine homozygote Deletion der ausgewählten Gene diese Prozentzahl drastisch steigen ließ (Abb. 3-13A).

Dabei zeigten alle untersuchten Mutanten den auch beim Wildtyp beobachteten linearen Anstieg des YAC-Verlustes, lediglich die heterozygote *BUB3* Mutante unterschied sich hier leicht. Um den linearen Anstieg der verschiedenen Stämme besser vergleichbar zu machen, wurde eine Normierung der Halbsektierungswerte durchgeführt, so dass bei G0 der Y-Wert aller Stämme gleich 1 war (Abb. 3-13B). Hier wurde der ähnliche Anstieg aller Stämme sichtbar. Innerhalb der ersten 6-16 Generationen fand bei den Stämmen eine Verdopplung oder Verdreifachung des Anteils halbsektorieller Kolonien statt, teilweise stieg der Wert auf 3 bis 4 bei der letzten isolierten Generation an. Ein stärkerer Anstieg wurde lediglich beim heterozygot deletierten *BUB3* Stamm erkennbar, dessen Werte bei den älteren Zellen deutlich über denen der übrigen Stämme lagen. Bei G16 lag der Anteil halbsektorieller Kolonien mit dem Faktor 4, bei G23 sogar mit dem Faktor 6,4 über dem G0 Wert.

Es lässt sich insgesamt festhalten, dass nach Deletion bestimmter Gene des Chromosomenzyklus zwar die Anzahl halbsektorieller Kolonien gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht wurde, der Anstieg der Chromosomeninstabilität mit zunehmendem Alter war jedoch bei allen erstellten Stämmen linear und unterschied sich nicht wesentlich vom Wildtyp.



**Abb. 3-13 Die Erhöhung der Chromosomeninstabilität mit steigendem replikativen Alter ist beim Wildtyp und bei Chromosomenzyklusmutanten meist linear.**

**A** Dargestellt ist der Anteil halbsektoriierter Kolonien der angegebenen Stämme, der nach Plattierung unsortierter und sortierter biotinylierter Zellen steigenden replikativen Alters ermittelt wurde. Durch die kurze RLS der homozygot deletierten *BIM1* und *BUB3* Stämme konnten von diesen nur Zellen bei Sortierung 1 bzw. 2 isoliert und plattiert werden (vgl. Kap. 3.1.3.1 und 3.1.3.3). **B** Dargestellt ist die beobachtete Chromosomeninstabilität (% Halbsektorierte Kolonien) der angegebenen Stämme, die gegen die entsprechenden Generationen aufgetragen wurde. Die Prozentwerte halbsektoriierter Kolonien wurden dabei für jeden Stamm auf den Y-Wert 1 bei G<sub>0</sub> normiert. Fehlerbalken beim Wildtyp: Standardabweichung, WT: Wildtyp.

## 3.2 Die Auswirkungen exogener Chromosomen auf die replikative Alterung von *S. cerevisiae*

Um den Zusammenhang zwischen Alterung und Aneuploidie in der Hefe aufzuklären, wurde untersucht, ob (a) ein Anstieg von Aneuploidie mit zunehmendem Alter stattfindet (Kap.3.1), und (b), ob die Anwesenheit zusätzlicher Chromosomen *per se* den Alterungsprozess beeinflussen kann. Es ist publiziert, dass aneuploide *S. cerevisiae* Zellen, die disomisch für ein oder mehrere endogene Chromosomen sind, in der Regel eine verkürzte chronologische Lebensspanne aufweisen (Torres *et al.* 2007). Begründet wird dieser Effekt mit einer veränderten Proteinzusammensetzung.

Uns interessierte, ob in *S. cerevisiae* auch exogene Chromosomen die Alterung beeinflussen können. Dazu wurde die Auswirkung von YACs auf die RLS analysiert. Sie bestehen außer *S. cerevisiae* Markergenen und der für Segregation und Stabilität benötigten Zentromer-DNA, einem Replikationsursprung und Telomersequenzen zu 97 % aus humaner DNA (Kap. 1.6.1) (Sears *et al.* 1995). Es wurde überprüft, ob ein einzelnes YAC, welches eine Erhöhung der Chromosomenlast um 6 % (16 + 1 Chromosomen) verursacht, einen Effekt auf die RLS von haploiden *S. cerevisiae* Zellen ausüben kann. Dieses YAC wird in den folgenden Kapiteln als (Y (U/T/S)) bezeichnet, da es die *S. cerevisiae* Gene URA3, TRP1 und SUP11 enthält.

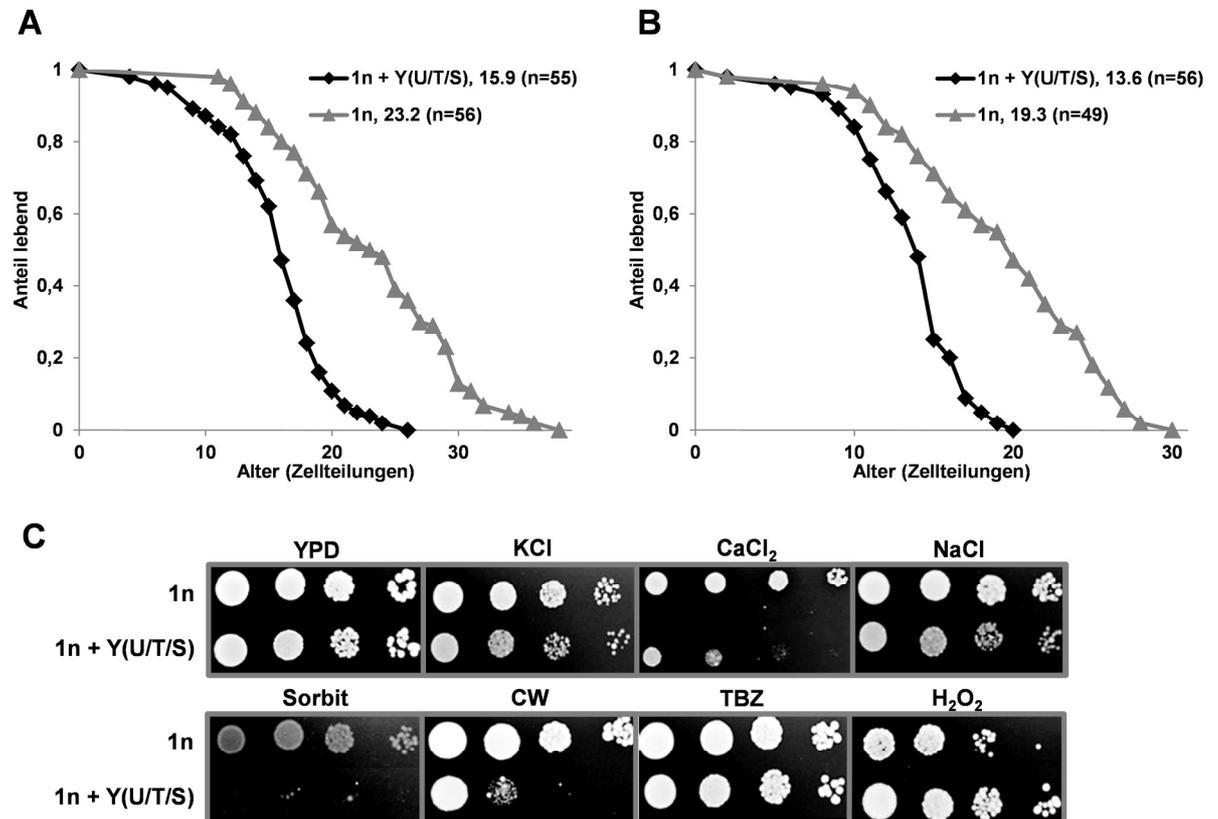
### 3.2.1 Die Anwesenheit eines bestimmten YACs verkürzt die RLS haploider *S. cerevisiae* Zellen um 30 % und verringert die Stressresistenz

Die Bestimmung der RLS erfolgte nach der in Kap. 2.13.2 beschriebenen Methode. Die RLS eines haploiden, YAC-tragenden Stammes wurde bestimmt. Durch Verlust des YACs wurde ein isogener, haploider Kontrollstamm hergestellt.

Es stellte sich heraus, dass die Anwesenheit eines YACs in einem haploiden Hefestamm ( $1n + Y(U/T/S)$ ) eine höchst signifikante ( $p < 0,001$ , Wilcoxon-Mann-Whitney Test) Verkürzung der RLS gegenüber dem Kontrollstamm ( $1n$ ) von durchschnittlich 23,2 auf 15,9 Zellteilungen verursacht (Abb. 3-14A). Die RLS wird somit um 30 % reduziert. Dieses Ergebnis ist reproduzierbar, ein zweites Beispiel ist in Abb. 3-14B dargestellt. Auch hier reduzierte sich die RLS um ein Drittel von 19,3 auf 13,6 Zellteilungen.

Es war denkbar, dass ein YAC, dessen Anwesenheit die RLS negativ beeinflusst, einen generellen Stressfaktor für die Zelle darstellt. Daher wurde mittels serieller Tropftestanalysen der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf den YAC-tragenden Stamm getestet (Abb. 3-14C). Unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 30 ° C ließ

sich ein leicht reduziertes Wachstums im Vergleich zum euploiden (1n) Stamm erkennen. Interessanterweise wies der kurzlebige YAC-tragende Stamm erhöhte Sensitivität gegenüber dem Großteil der getesteten exogenen Noxen wie KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, Sorbit und Calcofluor auf, nicht jedoch gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz TBZ oder oxidativem Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Abb. 3-14 Die Anwesenheit eines YACs verkürzt die RLS und erhöht die Stresssensitivität.**

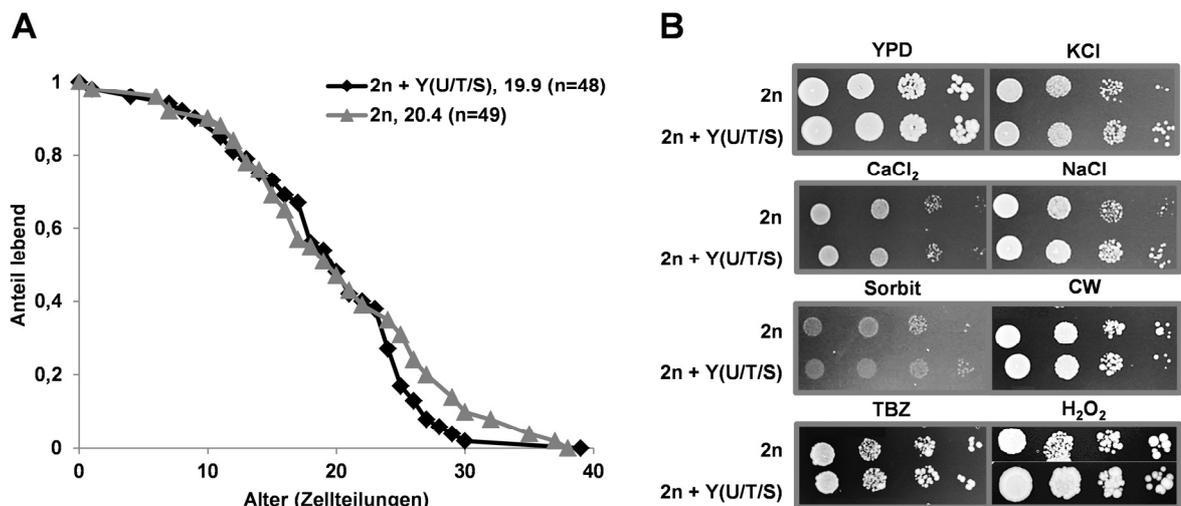
**A** Die RLS eines haploiden Hefestamms mit ((1n + Y(U/T/S); (n = 55)) bzw. ohne YAC ((1n); (n = 56)) wurde untersucht. Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Generationenzahl aufgetragen. Der YAC-tragende Stamm zeigt mit durchschnittlich 15,9 Zellteilungen eine verringerte RLS ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test) gegenüber dem Kontrollstamm (23,2 Teilungen). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 30 °C. **B** Wiederholung des Versuchs aus (A), die durchschnittlichen Lebensspannen (13,6 (n = 56 Zellen) bzw. 19,3 (n = 49 Zellen) Zellteilungen) unterscheiden sich höchst signifikant ( $p < 0,001$ , Wilcoxon-Mann-Whitney Test). **C**  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen wurden auf YPD und YPD mit den Zusätzen 1,25 M KCl, 0,4 M CaCl<sub>2</sub>, 0,75 M NaCl, 2 M Sorbit, 5 µg/ml Calcofluor (CW), 80 µg/ml Thiabendazol (TBZ) und 3,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> getropft und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Tropftestanalyse wurde von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben durchgeführt. Y (U/T/S): YAC mit den Genen *URA3/TRP1* und *SUP11*.

### 3.2.2 Die Anwesenheit eines YACs verkürzt nicht die RLS eines diploiden Hefestamms

Es stellte sich nun die Frage, ob die Anwesenheit eines YACs ebenfalls einen RLS verkürzenden Einfluss auf einen diploiden Hefestamm ausüben kann. Die RLS eines YAC tragenden diploiden Stamms wurde mit der eines isogenen diploiden Kontrollstamms, der über YAC Verlust generiert wurde, verglichen.

Die Lebensspannen der Stämme unterschieden sich mit durchschnittlich 19,9 (mit YAC) bzw. 20,4 (ohne YAC) Teilungen kaum voneinander (Abb. 3-15A). Auffällig ist eine Trennung der Alterungskurven bei etwa 30 % der lebenden Zellen. Dadurch weisen die Zellen des Kontrollstamms gegenüber dem YAC tragenden Stamm eine geringfügig - jedoch nicht signifikant - erhöhte durchschnittliche RLS auf.

Auch exogener Stress führte bei Anwesenheit des zusätzlichen Chromosoms nicht zu einem Wachstumsnachteil. In einer seriellen Tropftestanalyse zeigten alle getesteten Substanzen, die beim haploiden Stamm mit YAC die Lebensfähigkeit beeinträchtigt hatten, keinen Effekt (Abb. 3-15B).



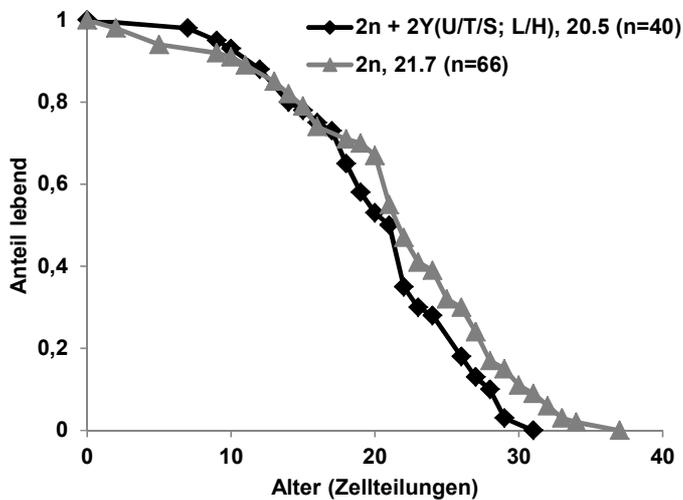
**Abb. 3-15 Die Anwesenheit eines YACs hat keinen Einfluss auf RLS und Stresssensitivität eines diploiden Stamms.**

**A** Darstellung der RLS eines diploiden Stamms mit YAC (2n + Y(U/T/S)) im Vergleich zum isogenen Kontrollstamm ohne YAC (2n). Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Generationenzahl aufgetragen. Der YAC-tragende Stamm zeigt mit durchschnittlich 19,9 Zellteilungen ( $n = 48$ ) keine zur Kontrolle (20,4 Teilungen; ( $n = 49$ )) signifikant unterschiedliche Lebensspanne ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Die Zellen wurden bei 30 °C inkubiert. Y (U/T/S): YAC mit den Genen *URA3/TRP1* und *SUP11*. **B** Serielle Tropftestanalyse. Die Zellen wurden auf YPD und YPD mit den Zusätzen 1,25 M KCl, 0,5 M  $\text{CaCl}_2$ , 0,75 M NaCl, 2 M Sorbit, 4  $\mu\text{g/ml}$  Calcofluor (CW), 50  $\mu\text{g/ml}$  Thiabendazol (TBZ) und 3,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  getropft und für 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Tropftestanalyse wurde von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben durchgeführt.

### 3.2.3 Die Anwesenheit von zwei YACs hat keinen Einfluss auf die RLS diploider *S. cerevisiae* Zellen

Die chromosomale Last in einem haploiden Stamm wurde durch ein YAC um 6 % erhöht. In einem diploiden Stamm mit 32 Chromosomen müssten zwei YACs vorliegen, um diesen Wert erreichen. Es war also denkbar, dass die chromosomale Last von lediglich einem YAC in einem diploiden Stamm nicht ausreicht, um einen Effekt auf die RLS auszuüben. Daher wurde die RLS eines diploiden Stamms bestimmt, der zwei unterschiedliche YACs trägt. Zum einen war dies das zuvor verwendete YAC (Y (U/T/S)),

zum anderen ein ebenfalls 340 Kbp großes YAC mit den *S. cerevisiae* Genen *LYS2* und *HIS3*, die Prototrophie für Lysin und Histidin vermitteln (Y (L/H)); (Sears *et al.* 1995)). Der Kontrollstamm ohne YACs wurde über sequentiellen Verlust der YACs gewonnen.



**Abb. 3-16 Zwei YACs beeinflussen nicht die RLS eines diploiden Hefestamms.**

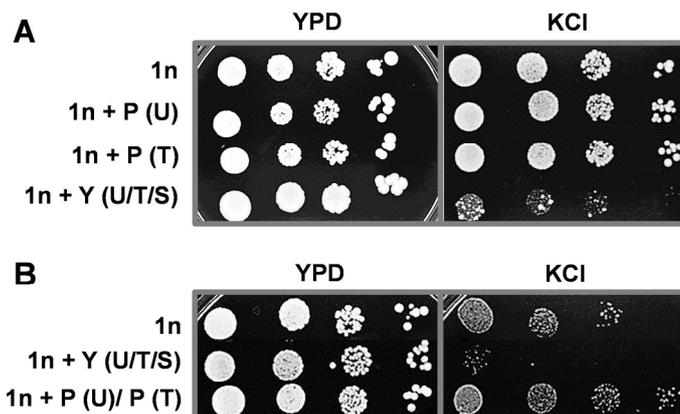
Dargestellt ist die RLS eines diploiden Stamms mit 2 YACs ( $2n + 2Y(U/T/S; L/H)$ ) im Vergleich zum isogenen Kontrollstamm ohne YACs ( $2n$ ). Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Generationenzahl aufgetragen. Die durchschnittlichen Lebensspannen (20,5 ( $n = 40$ ) gegenüber 21,7 ( $n = 66$ )) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Die Zellen wurden bei 30 °C inkubiert.  $2Y(U/T/S; L/H)$ : 1 YAC mit den Genen *URA3/TRP1/SUP11* und 1 YAC mit den Genen *LYS2/HIS3*.

Die Analyse der RLS dieses Stammes ergab wie beim diploiden Stamm mit einem YAC keinen Unterschied zum diploiden Kontrollstamm ohne YAC. Die leichte Erhöhung der durchschnittlichen Lebensspanne beim Kontrollstamm mit 21,7 durchschnittlich erreichten Teilungen gegenüber dem aneuploiden Stamm mit 20,5 Teilungen ist nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test) (Abb. 3-16). Ebenso ließ eine von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben durchgeführte serielle Tropftestanalyse, bei der die gleichen stressinduzierenden Substanzen wie bei der Analyse in Abb. 3-15B verwendet wurden, keine Wachstumsunterschiede zwischen den Stämmen mit und ohne YACs erkennen (Daten nicht gezeigt).

Somit hat im Gegensatz zum haploiden Stamm in einem diploiden Stamm die Erhöhung der Chromosomenlast um 3 % und 6 % keinen sichtbaren Einfluss auf Lebensspanne und Stresssensitivität gegenüber exogenen Noxen. Da die Erhöhung der Chromosomenzahl um 6 % in *S. cerevisiae* also nicht zwangsläufig eine Verkürzung der RLS nach sich zieht, war es denkbar, dass die Expression eines auf dem YAC (Y(U/T/S)) liegenden Hefegens die beobachteten Phänotypen in haploiden, nicht jedoch in diploiden Hefezellen verursacht.

### 3.2.4 Die Expression des YAC-Markergens *SUP11* verringert die Stressresistenz und RLS

Es wurde untersucht, ob die Expression der auf dem YAC (Y(U/T/S)) vorliegenden *S. cerevisiae* Gene die beobachteten Phänotypen (kurze RLS und Stresssensitivität) in haploiden Hefezellen auslösen. Um den Einfluss der YAC-Marker *URA3* und *TRP1* zu analysieren, wurden *CEN*-Plasmide (Herkunft: (Sikorski und Hieter 1989)) mit diesen Genen in den haploiden Stamm ohne YAC transformiert. Diese stabil vererbten Plasmide, die neben einer Zentromer Sequenz einen Replikationsursprung enthalten, liegen nur mit 1-2 Kopien pro Zelle vor und sind daher in Bezug auf die Kopienzahl der Markergene mit einem YAC vergleichbar (Clarke und Carbon 1980). Zur Untersuchung der Auswirkung auf das Wachstum wurde eine Tropftestanalyse der Transformanden auf Platten mit KCl durchgeführt, welches beim YAC-tragenden haploiden Stamm eine deutliche Reduktion der Lebensfähigkeit verursacht hatte (Abb. 3-14C).



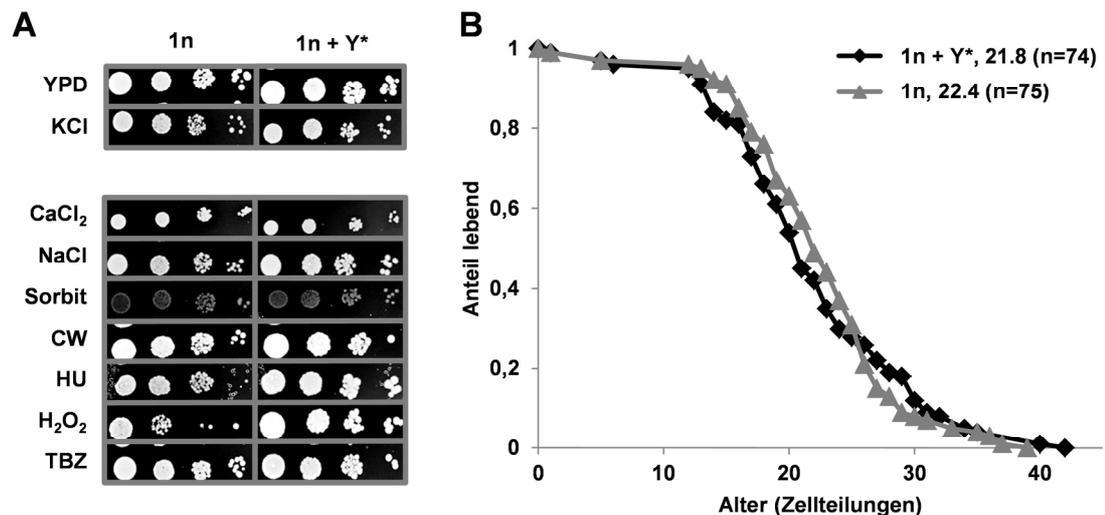
**Abb. 3-17 Uracil- und Tryptophanprototrophie verursachen keine KCl-Sensitivität.**

**A** Serielle Tropftestanalyse. Die haploiden Zellen (1n) und die Transformanden mit *CEN*-Plasmid (1n + P) bzw. Zellen mit YAC (1n + Y (U/T/S)) wurden auf YPD und YPD mit 1,4 M KCl getropft und für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. **B** Wie (A), jedoch Inkubation für 3 Tage bei 30 °C. Der Stamm (1n + P (U)/P (T)) trägt zwei unterschiedliche *CEN*-Plasmide. Die Tropftestanalysen

wurden von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben durchgeführt. Y (U/T/S): YAC mit *URA3*, *TRP1* und *SUP11* Gen; P (U)/P (T): *CEN*-Plasmid mit *URA3* (U) oder *TRP1* (T) Gen.

Die Tropftestanalyse wurde auf YPD anstelle von Selektivplatten durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit zu den vorherigen Tropftestanalysen zu ermöglichen. Der Plasmidverlust bei den Transformanden auf Vollmediumsplatten wurde getestet und betrug 8 % (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich, dass durch ein *CEN*-Plasmid vermittelte Uracil- oder Tryptophanprototrophie keinerlei Auswirkung auf das Wachstum unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 30 °C und auf KCl-haltigen Platten hatte (Abb. 3-17A). Anschließend wurde untersucht, ob die Markergene in Kombination erhöhte Stresssensitivität verursachen können. Dazu wurden die unterschiedlichen *CEN*-Plasmide (mit *URA3* bzw. *TRP1* Gen) gleichzeitig in den haploiden Hefestamm ohne YAC transformiert. Auch die Expression beider Hefegene verursachte keine Verringerung in der Lebensfähigkeit im Vergleich zur auxotrophen Kontrolle (Abb. 3-17B).

Als nächstes wurde geprüft, ob die Abwesenheit des *ochre*-Suppressorgens *SUP11*, welches das dritte Hefegen im YAC (Y (U/T/S)) darstellt, die Kurzlebigkeit aufhebt. Dazu wurde zunächst ein Stamm verwendet, der ein vom bisher verwendeten YAC (Y (U/T/S)) abweichendes YAC (Y\* genannt) mit den Genen *URA3* und *TRP1*, jedoch ohne das *SUP11* Gen und mit einem unterschiedlichem Zentromer enthält (Sears *et al.* 1995). Der YAC (Y\*) tragende Stamm wies ein zum Kontrollstamm identisches Wachstum auf YPD und KCl haltigen Platten auf (Abb. 3-20A). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Expression des YAC-kodierten *SUP11* Gens für die verschlechterte Lebensfähigkeit unter Stresseinfluss (Abb. 3-14C) verantwortlich sein könnte. Der Befund wurde mit einer ausgeweiteten Tropftestanalyse, bei der dem Medium weitere exogene Noxen zugefügt wurden, untermauert. Alle eingesetzten Substanzen riefen keinen vom Kontrollstamm abweichenden Stressphänotyp hervor (Abb. 3-20A). Es wurde überprüft, ob sich die RLS des YAC (Y\*) tragenden Stamms ohne eine Kopie des *ochre*-Suppressors *SUP11* vom Kontrollstamm unterscheidet. Auch hier zeigte sich keine signifikante Abweichung in den Lebensspannen ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test), der YAC tragende Stamm (1n + Y\*) erreichte mit durchschnittlich 21,8 Zellteilungen ein ähnliches replikatives Alter wie der haploide Stamm (RLS: 22,4 Teilungen) (Abb. 3-20B).

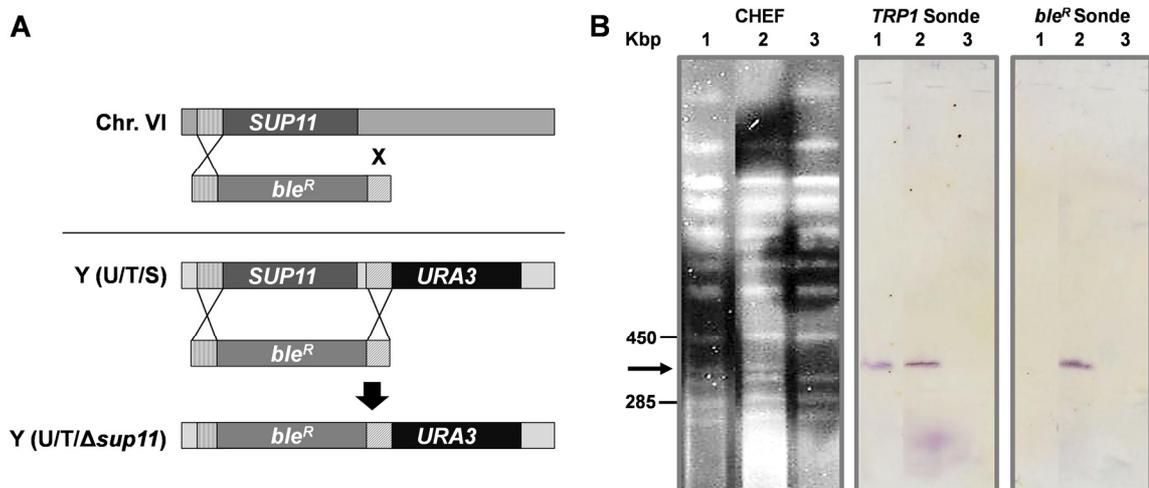


**Abb. 3-18** Durch die Anwesenheit eines YACs ohne *SUP11* werden das Wachstum unter Stress und die RLS nicht beeinträchtigt.

**A**  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen der Stämme ohne (1n) und mit YAC (1n + Y\*) wurden auf YPD und YPD mit den Zusätzen 1 M KCl, 0,4 M CaCl<sub>2</sub>, 0,75 M NaCl, 2 M Sorbit, 5 µg/ml Calcofluor (CW), 50 mM Hydroxyharnstoff (HU), 3,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 80 µg/ml Thiabendazol (TBZ) getropft und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. **B** Die RLS der haploiden Hefestämme aus (A) wurde untersucht. Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Generationenzahl aufgetragen. Die Lebensspannen unterscheiden sich mit durchschnittlich 21,8 (1n + Y\*) bzw. 22,4 (1n) Zellteilungen nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 30 °C. Y\*: YAC mit den Genen *URA3* und *TRP1*. Die serielle Tropftestanalyse wurde von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben durchgeführt.

Um sicherzustellen, dass dieser Phänotyp nicht spezifisch für diese genetisch vom YAC (Y (U/T/S)) abweichende Chromosomenvariante war, wurde das *ochre*-Suppressorgen

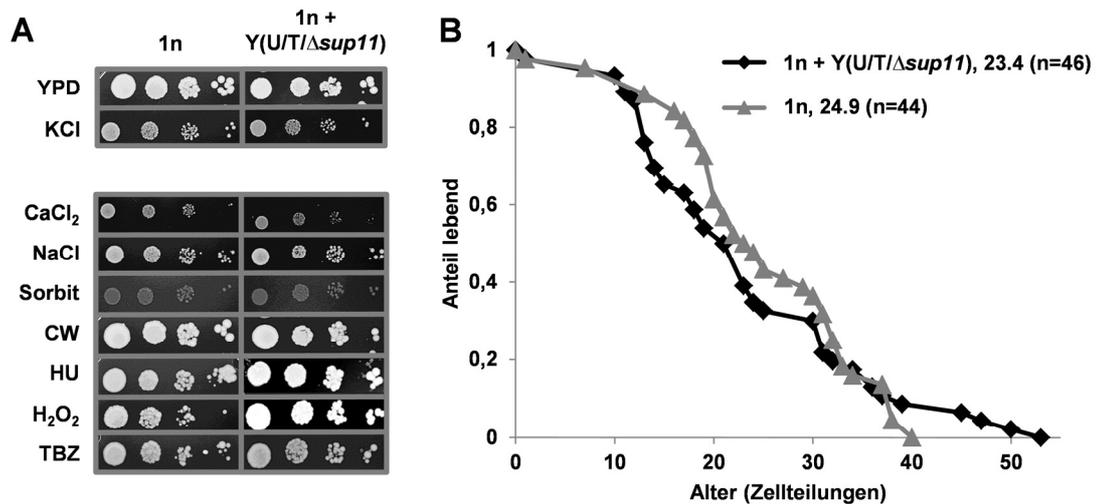
*SUP11* Gen auf dem lebensverkürzenden YAC (Y (U/T/S)) deletiert. Dies musste durch homologe Rekombination (Kap. 2.12.6.2) zielgerichtet auf dem YAC geschehen, da sich eine wildtypische Kopie dieses Gens auf Chromosom VI befindet. Möglich war die gerichtete Ausschaltung durch die von Chr. VI abweichende Sequenz des an *SUP11* angrenzenden Bereichs auf dem YAC (Abb. 3-19A). Die korrekte Deletion des *SUP11* Gens durch Austausch gegen eine Phleomycin-Resistenzkassette wurde mittels Verifikations-PCR (Kap. 2.11.3.2) und Southern-Blot Analyse überprüft (Kap. 2.12.4; Abb. 3-19B). Dazu wurde chromosomale DNA der Stämme mit dem YAC mit *SUP11* (Y (U/T/S)) bzw. deletiertem *SUP11* ((Y (U/T/ $\Delta$ sup11)) und ohne YAC mittels Pulsfeldgelelektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Für die Southern-Blot Analyse wurde eine *TRP1*-Sonde zur Lokalisierung des YACs auf dem Agarosegel eingesetzt. Da das *TRP1* Gen auf Chr. IV in dem YAC (Y (U/T/S)) tragenden Stamm deletiert ist, konnte die *TRP1* Sonde lediglich an der *TRP1* Sequenz des YACs hybridisieren. Für Stämme mit YAC (Mitte; Spur 1 und 2) wurde wie erwartet eine Bande auf einer Höhe von etwa 360 Kbp sichtbar, die beim Stamm ohne YAC (Spur 3) fehlte. Eine gegen Phleomycin gerichtete Sonde ließ nur beim Stamm, bei dem *SUP11* auf dem YAC deletiert wurde, eine Bande auf der Höhe des YACs erkennen (rechts; Spur 2).



**Abb. 3-19 Schematische Darstellung der YAC-spezifischen Deletion des Gens *SUP11* und Nachweis der Deletion mittels Southern Blot.**

**A** Oben dargestellt ist ein Ausschnitt von Chr. VI, welches das wildtypische *SUP11* Gen enthält. Die Deletionskassette mit dem Phleomycin-Resistenzgen (*ble<sup>R</sup>*) weist Homologie (längst gestreift) zum Bereich vor *SUP11*, nicht jedoch hinter dem *SUP11* Gen auf. Daher kann die Kassette nicht über homologe Rekombination in das Chromosom integriert werden. Unten: Die Deletionskassette weist Homologie zum Bereich vor dem ochre-Suppressorgen *SUP11* (längst gestreift) und vor dem *URA3* Gen (schraffiert) auf dem ausschnittsweise dargestellten YAC (Y (U/T/S)) auf, sie kann daher in das YAC integrieren. Es entsteht ein Stamm mit einem YAC, auf dem *SUP11* deletiert ist (Y (U/T/ $\Delta$ sup11)). **B** Darstellung eines 1 %-iges CHEF-Agarosegels (links) und von Southern-Blot Analysen dieses Gels mit DNA-Sonden gegen *TRP1* (*TRP1* Sonde; Mitte) bzw. das Phleomycinresistenzgen (*ble<sup>R</sup>* Sonde; rechts). Folgende chromosomale DNA wurde aufgetrennt: Spur 1: (1n + Y(U/T/S)); Spur 2: (1n + Y(U/T/ $\Delta$ sup11)); Spur 3: (1n). Der Pfeil gibt die erwartete Größe des YACs (360 Kbp) an. Die Southern-Blot Analyse wurde von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben durchgeführt. Y (U/T/S): YAC mit *URA3*, *TRP1* und *SUP11* Gen. Y (U/T/ $\Delta$ sup11): YAC mit *URA3*, *TRP1* und deletiertem *SUP11* Gen.

Mit dem so modifizierten YAC (Y (U/T/ $\Delta$ sup11)) ließ eine serielle Tropftestanalyse in der Lebensfähigkeit keinen Unterschied zum Kontrollstamm erkennen (Abb. 3-20A). Zudem wich die RLS des aneuploiden Stamms mit 23,4 Zellteilungen nicht signifikant von der Lebensspanne der Kontrolle (RLS: 24,9 Teilungen) ab (Abb. 3-20B). Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht die Anwesenheit des YACs an sich sondern die Expression des *ochre*-Suppressorgens *SUP11* auf dem YAC (Y (U/T/S)) verantwortlich ist für eine erhöhte Stresssensitivität und eine verkürzte RLS in dem YAC tragenden haploiden Hefestamm.



**Abb. 3-20 Die Anwesenheit eines YACs mit deletiertem *SUP11* Gen beeinträchtigt nicht das Wachstum unter Stress und die RLS.**

**A** Serielle Tropftestanalyse.  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen der Stämme ohne (1n) und mit YAC (1n + Y(U/T/ $\Delta$ sup11)) wurden auf YPD und YPD mit den Zusätzen 1 M KCl, 0,4 M CaCl<sub>2</sub>, 0,75 M NaCl, 2 M Sorbit, 5  $\mu$ g/ml Calcofluor (CW), 50 mM Hydroxyharnstoff (HU), 3,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 80  $\mu$ g/ml Thiabendazol (TBZ) getropft und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. **B** Die RLS der haploiden Hefestämme aus (A) wurde untersucht. Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Generationenzahl aufgetragen. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 30 °C. Die Lebensspannen unterschieden sich mit durchschnittlich 23,4 (1n + Y(U/T/ $\Delta$ sup11)) bzw. 24,9 (1n) Zellteilungen nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Y (U/T/ $\Delta$ sup11): YAC mit *URA3*, *TRP1* und deletiertem *SUP11* Gen. Die hier gezeigten Versuche wurden von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben durchgeführt.

### 3.2.6 Die Expression des *ochre*-Suppressorgens *SUP11* verringert Stressresistenz und RLS unabhängig von Adeninprototrophie

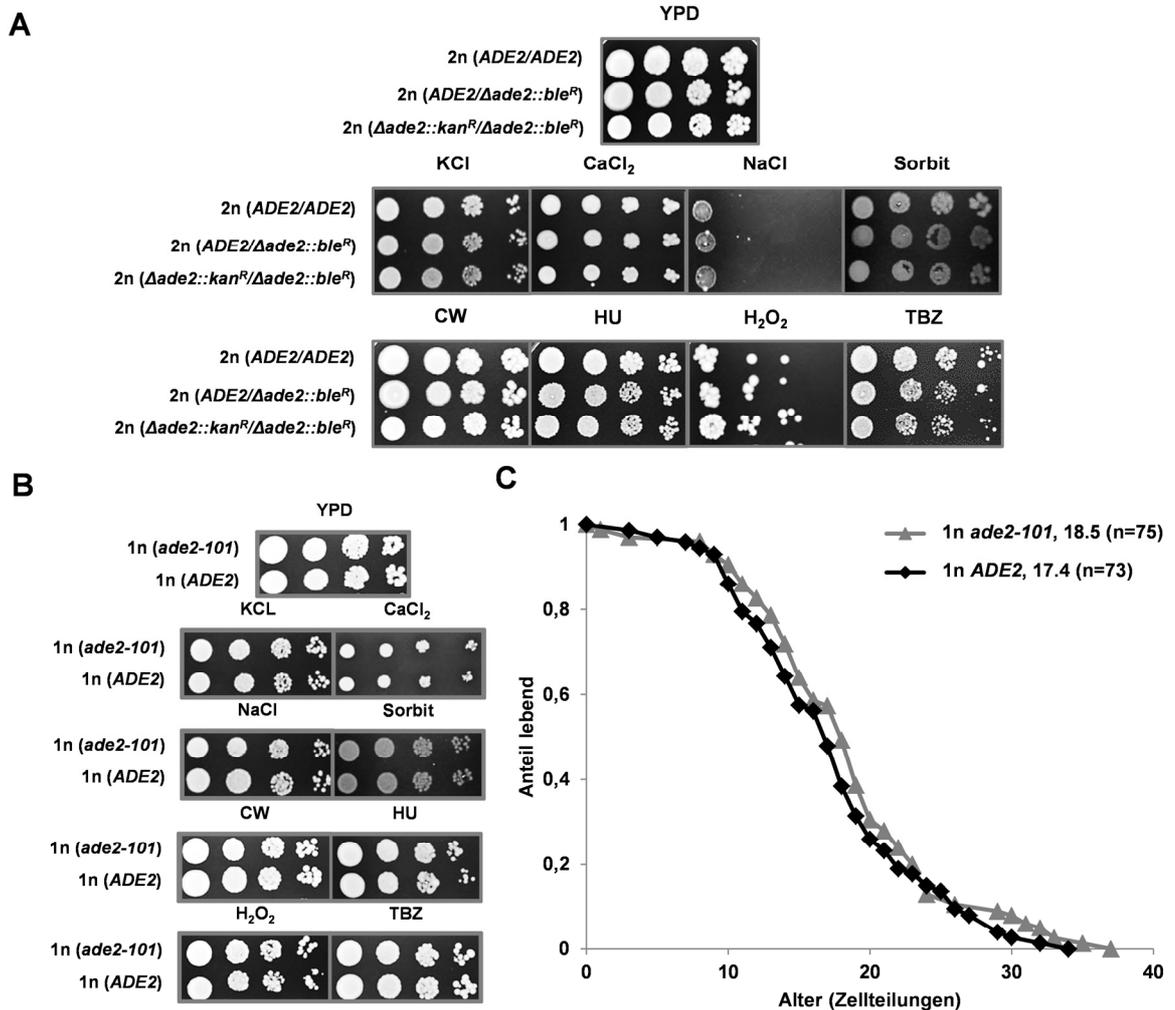
Die Expression des *SUP11* Gens auf dem YAC (Y (U/T/S)) verursacht Stresssensitivität und eine Verkürzung der RLS in haploiden Hefezellen (Kap. 0). Die von *SUP11* kodierte tRNA<sub>TYR</sub> ist ein sog. *ochre*-Suppressor und vermittelt Adeninprototrophie in einem Stamm mit der *ade2-101<sup>ochre</sup>* Mutation (Kap. 2.14.1). Daher wurde überprüft, ob Adeninprototrophie unabhängig von *SUP11* zu einer Verkürzung der RLS in Hefezellen führen kann.

Der Effekt der Adeninprototrophie auf das Wachstum wurde zunächst für einen diploiden Hefestamm ermittelt. Die in den untersuchten diploiden Stämmen durch das YAC vorliegende *SUP11* Kopie kann dort im Gegensatz zum haploiden Stamm die Adeninauxotrophie nur teilweise supprimieren (Kap. 2.14.1) (Hieter *et al.* 1985). Es schien daher vorstellbar, dass erst durch vollständige Adeninprototrophie auch in einem diploiden Stamm – unabhängig vom YAC - ein Effekt auf Stressresistenz und RLS auftreten könnte. In einem adeninprototrophen diploiden Stamm wurden ein bzw. beide wildtypischen *ADE2* Allele sequentiell deletiert (Kap. 2.12.6.2). So konnte der unterschiedliche Einfluss der *ADE2* Gendosis in einem homozygot wildtypischem, einem heterozygot deletierten und in einem homozygot deletierten *ADE2* Hefestamm getestet werden. In einer seriellen Tropftestanalyse wurde deutlich, dass Adeninprototrophie in diploiden Zellen keine erhöhte Stresssensitivität hervorruft. Die Stämme zeigten unter allen getesteten Bedingungen eine vergleichbare Lebensfähigkeit (Abb. 3-21A).

Um den Einfluss von Adeninprototrophie in haploiden Hefen zu überprüfen, wurde das wildtypische *ADE2* Gen in einem haploiden, adeninauxotrophen Stamm ohne YAC (Kontrollstamm (1n) aus Kap. 3.2.1) gegen den *ade2-101* Locus ausgetauscht. Die Insertion des über PCR aus einem adeninprototrophen Stamm gewonnenen offenen Leserahmens (ORF) des *ADE2* Gens erfolgte wie in Kap. 2.12.6.2 beschrieben über homologe Rekombination. Nach der Transformation der *ADE2*-Kassette erfolgte eine Selektion auf adeninprototrophe Zellen.

Der Vergleich zwischen haploidem Stamm mit und ohne *ADE2* Gen ließ keinerlei Wachstumsabweichung unter Stressbedingungen erkennen (Abb. 3-21B). Auch die RLS unterschied sich mit durchschnittlich 18,5 Teilungen im adeninauxotrophen Stamm nicht signifikant vom adeninprototrophen Stamm mit 17,4 Zellteilungen (Abb. 3-21C) ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test).

Die Expression des auf dem YAC (Y (U/T/S)) vorliegenden *ochre*-Suppressorgens *SUP11* verursacht also unabhängig von der vermittelten Adeninprototrophie eine Verkürzung der RLS und erhöhte Stresssensitivität in haploiden Hefezellen.



**Abb. 3-21 Adeninprototrophie hat keinen Einfluss auf Stresssensitivität haploider und diploider sowie auf die RLS haploider Hefezellen.**

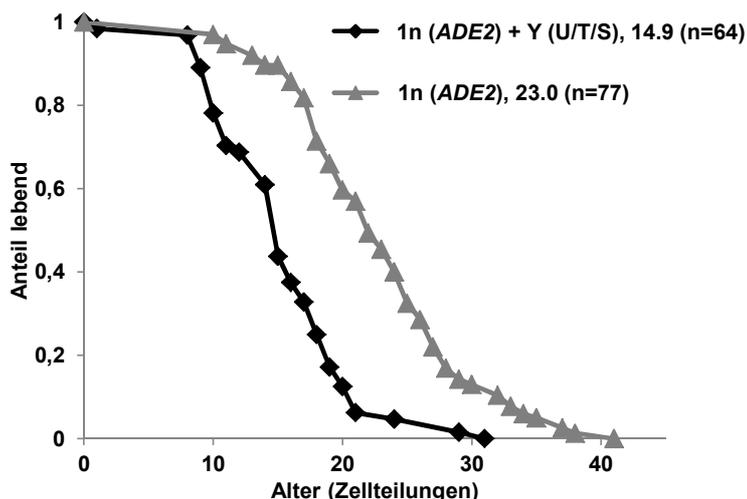
**A** Tropftestanalyse diploider Zellen (2n) mit zwei (*ADE2/ADE2*), einer (*ADE2/ade2-101::ble<sup>R</sup>*) und keiner (*ade2-101::ble<sup>R</sup>/ade2-101::kan<sup>R</sup>*) wildtypischen *ADE2* Genkopie. Die Zellen wurden auf YPD und YPD mit den Zusätzen 1 M KCl, 0,4 M CaCl<sub>2</sub>, 0,75 M NaCl, 2 M Sorbit, 5 µg/ml Calcofluor (CW), 50 mM Hydroxyharnstoff (HU), 3,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 100 µg/ml Thiabendazol (TBZ) getropft und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. **B** Wie (A), jedoch haploide Stämme ohne (1n (*ade2-101*)) bzw. mit wildtypischem *ADE2* Gen (1n (*ADE2*)). **C** Die RLS der haploiden Hefestämme aus (B) wurde untersucht. Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Generationenzahl aufgetragen. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 30 °C. Zwischen den Stämmen ist mit durchschnittlich 18,5 (1n *ade2-101*) bzw. 17,4 (1n *ADE2*) Zellteilungen kein signifikanter Unterschied sichtbar ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Die beschriebenen Stämme wurden von mir generiert und von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben analysiert.

### 3.2.7 Der Einfluss der Expression von *SUP11* auf die RLS haploider Zellen mit wildtypischem *ADE2* Gen

Eine Gendosiserhöhung des *ochre*-Suppressorgens *SUP11* Gens kann meiotische Chromosomenfehlverteilung auslösen und eine starke Überexpression des Gens ist letal (Hieter *et al.* 1985; Louis und Haber 1989; Kitada *et al.* 1996).

Es wurde untersucht, ob die Expression einer zusätzlichen Kopie dieses Gens auf dem YAC in einem wildtypischen *ADE2* Stammhintergrund eine stärkere Wirkung auf die RLS ausübt als bei einem Stamm mit der *ade2-101* Mutation. In einem Stamm mit wildtypischem *ADE2* Gen wird *SUP11* bei der Translation nicht zum Überlesen des vorzeitigen Stoppkodons benötigt und könnte sich somit nachteilig auf die Translation anderer mRNAs auswirken.

Die Generierung des haploiden, YAC tragenden *ADE2* Stamms (1n (*ADE2*) + Y (U/T/S)) erfolgte wie in Kap. 2.12.8 beschrieben über Paarungstypwechsel und anschließende Kreuzung. Die RLS des generierten YAC-tragenden Stammes war mit 14,9 Zellteilungen gegenüber dem Kontrollstamm (1n (*ADE2*)) mit 23 Zellteilungen höchst signifikant um 35 % verkürzt ( $p < 0,001$ , Wilcoxon-Mann-Whitney Test; Abb. 3-22). Dieses Ergebnis bestätigt die vorherigen Resultate, da die Expression von *SUP11* hier unabhängig von vorhandener Adeninprototrophie die RLS verringert. Die Anwesenheit des wildtypischen *ADE2* Gens verstärkt die von *SUP11* vermittelte Kurzlebigkeit nur geringfügig im Vergleich zu einem Stamm mit der *ade2-101* Mutation, bei dem die RLS durch *SUP11* Expression um 30 % verkürzt wurde (Kap. 3.2.1).



**Abb. 3-22 YAC-kodierte *SUP11* tRNA<sub>TYR</sub> verkürzt die RLS in einem haploiden Stamm mit wildtypischem *ADE2* Gen um 35 %.**

Dargestellt ist die RLS eines haploiden Stamms mit YAC (1n (*ADE2*) + Y(U/T/S)) im Vergleich zum isogenen Kontrollstamm ohne YAC (1n (*ADE2*)). Der Anteil lebender Mutterzellen (1 entspricht 100 %) wurde gegen die ermittelte Generationenzahl aufgetragen. Die durchschnittlichen Lebensspannen von 14,9 (n = 64) gegenüber 23 (n = 77) Zellteilungen unterscheiden sich

höchst signifikant ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Die Zellen wurden bei 30 °C inkubiert. Y(U/T/S): YAC mit den Genen *URA3/TRP1/SUP11*. Die RLS wurde von Stefanie Kobus nach meinen Vorgaben bestimmt.

Es lässt sich festhalten, dass die Erhöhung der chromosomalen Last durch die getesteten YACs um 3 bzw. 6 % die RLS von haploiden und diploiden Hefezellen nicht ursächlich

---

verkürzt. Erst die Anwesenheit eines bestimmten *S. cerevisiae* Gens auf dem YAC, in diesem Fall des *ochre*-Suppressorgens *SUP11*, führte zu einer Verringerung der RLS in einem haploiden, nicht jedoch in einem diploiden Hefestamm.

### 3.3 Der Einfluss eines endogenen Minichromosoms auf die Alterung von *S. pombe*

In den vorangegangenen Kapiteln wurde dargestellt, welchen Einfluss zusätzliche exogene Chromosomen (YACs) auf die replikative Alterung in *S. cerevisiae* ausüben. Dabei stellte sich heraus, dass die Erhöhung der chromosomalen Last keinen Effekt auf die Alterung hatte, jedoch die Expression des auf dem YAC vorliegenden *ochre*-Suppressorgens *SUP11* die RLS eines haploiden Hefestamms verkürzte.

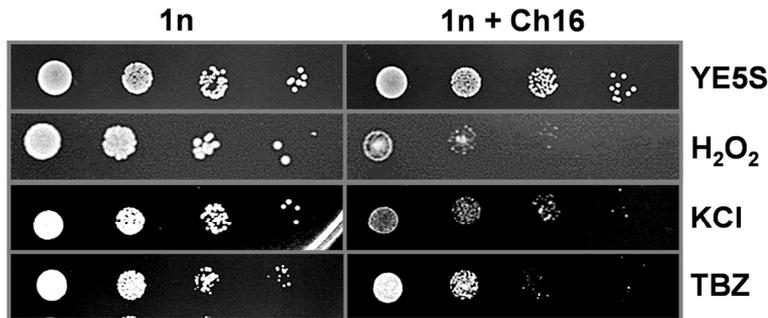
Uns interessierte die Frage, ob durch zusätzliche endogene Chromosomen verursachte Aneuploidie bei *S. pombe* die Alterung beeinflusst. Die Auswirkungen zusätzlicher Chromosomen auf die Spalthefe *S. pombe* sind schwer zu analysieren, da hier Disomien nicht stabil vererbt werden (Niwa und Yanagida 1985). Es existiert jedoch ein mitotisch stabiles, 530 Kbp große Minichromosom (Ch16), das durch  $\gamma$ -Bestrahlung eines instabilen, für Chromosom III (Chr.) disomischen *S. pombe* Stamms erstellt wurde (Kap. 1.6.2). Auch eine Disomie dieser verkürzten Chromosom III Version ist mitotisch nicht stabil (Niwa *et al.* 1986). Daher konnte in dieser Arbeit lediglich die Auswirkung eines zusätzlichen endogenen Chromosoms auf die chronologische Alterung der Spalthefe untersucht werden.

#### 3.3.1 Das endogene Minichromosom Ch16 verursacht erhöhte Stresssensitivität

Um zu untersuchen, ob eine Erhöhung der chromosomalen Last bei *S. pombe* zu erhöhter Stresssensitivität führt, wurde das Wachstum des durch Ch16 aneuploiden Stamms im Vergleich zum euploiden Wildtypstamm unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Eine Vergleichbarkeit ist nur bei - mit Ausnahme des Minichromosoms - Isogenität der beiden Stämme gegeben.

Zur Generierung des Kontrollstamms wurden Zellen des aneuploiden Stamms auf Platten mit limitiertem Adenin aufgebracht. Das auf dem Minichromosom vorliegende *ade6-216* Allel führt zusammen mit dem *ade6-210* Allel auf Chr. III durch intragene Komplementation zu Adeninprototrophie. Verliert die Zelle eines dieser Allele, wird sie adeninauxotroph und bildet ein rotes Farbpigment, das als Zwischenprodukt der Purinbiosynthese entsteht und zur Bildung einer roten Kolonie auf Platten mit limitiertem Adenin führt. So kann der Verlust des Minichromosoms anhand der Koloniefärbung erkannt und der euploide Vergleichsstamm durch Isolierung einer roten Kolonie von einer solchen Platte gewonnen werden (Kap. 2.12.7.3).

Ein serieller Tropftest zeigte ähnliches Wachstum der beiden Stämme unter optimalen Wachstumsbedingungen (YE5S) bei 30 °C, während unter allen getesteten Stressbedingungen wie oxidativem Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Salzstress (KCl) und der Mikrotubulidestabilisierenden Substanz TBZ Wachstumsdefekte beim aneuploiden Stamm hervorgerufen wurden (Abb. 3-23).



**Abb. 3-23 Die Anwesenheit des Minichromosoms Ch16 verursacht erhöhte Stresssensitivität.**

Serieller Tropftest eines haploiden *S. pombe* Stamms (1n) im Vergleich zum isogenen aneuploiden Stamm (1n + Ch16). Inkubation: 3-4 Tage bei 30 °C (TBZ 25 °C). YE5S: Vollmedium; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1 mM; KCl: 1 M; TBZ: 9 µg/ml.

### 3.3.2 Die Anwesenheit von Ch16 beeinflusst nicht die Genauigkeit der Chromosom I Segregation

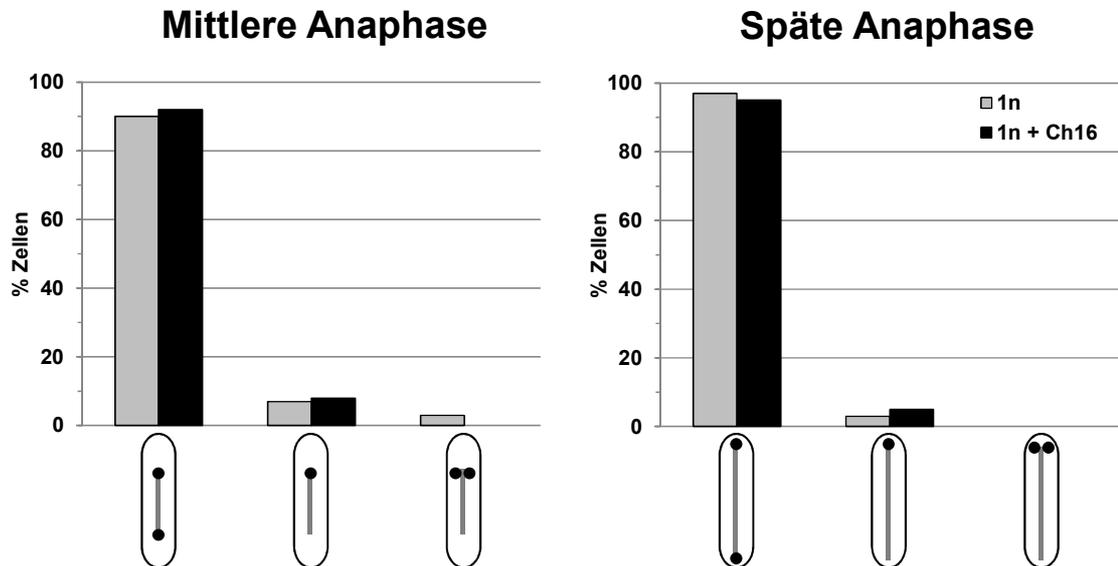
Um die Auswirkungen der Erhöhung der chromosomalen Last um 25 % durch das vierte Chromosom auf den mitotischen Apparat zu analysieren, wurde die Segregation von Chr. I während der Mitose in aneuploiden und euploiden Zellen untersucht.

Durch Kreuzung (UFY 221 x UFY 1516; Kap. 2.12.7) wurde dazu ein Stamm generiert, bei dem eine 30 Kbp vom Zentromer I entfernte Region (*lys1*<sup>+</sup> Locus) mit LacO-Wiederholungen versehen ist, an die ein LacI-GFP-Fusionsprotein binden kann (Nabeshima *et al.* 1998). In fixierten Zellen konnten somit die Lokalisation der Zentromernahen Region von Chr. I und die mitotische Spindel fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden.

Die Chr. I Segregation wurde in der mittleren (mitotische Spindel > 4 µm) und späten (mitotische Spindel > 7 µm) Anaphasezellen quantifiziert. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen dem euploiden Kontrollstamm (1n) und dem aneuploiden Stamm (1n + Ch16) sichtbar (Abb. 3-24). Jeweils über 90 % der Zellen zeigten die erwartete 1:1 Segregation der Cen1-GFP Signale zu den entgegengesetzten Polen der Zelle. Lediglich 7 (1n) bzw. 8 % (1n + Ch16) der Zellen ließen in der mittleren Anaphase nur ein Signal an einem Spindelende erkennen. In der späten Anaphase trat dieser Phänotyp mit 3 bzw. 5 % noch seltener auf. Eine eindeutige Fehlseggregation (zwei Cen1-GFP Signale an einem Ende der Spindel) wurde nur in einer Zelle des Kontrollstamms in der mittleren Anaphase beobachtet. Die Färbung der Gesamt-DNA mit DAPI ließ keine Auffälligkeiten erkennen. Die einzige Ausnahme bildete eine Zelle des aneuploiden Stamms in der

späten Anaphase, bei der nicht bis zu den Enden transportiertes Chromatin entlang der elongierten mitotischen Spindel sichtbar war (Daten nicht gezeigt).

Die Anwesenheit des Minichromosoms Ch16 ruft somit keine erhöhte Fehlseggregation von Chr. I hervor.



**Abb. 3-24 Die Anwesenheit des Minichromosoms verursacht keine Chr. I Fehlseggregation.** Graphische Auswertung der Chr. I-Segregation mittlerer ( $n = 100$ ; Spindel  $> 4\mu\text{m}$ ) und später ( $n = 100$ ; Spindel  $> 7\mu\text{m}$ ) Anaphasen euploider ( $1n$ ) und aneuploider ( $1n + \text{Ch16}$ ) mitotischer Zellen. Die Inkubation erfolgte  $\ddot{u}/N$  bei  $32\text{ }^\circ\text{C}$ . Die PFA-fixierten Zellen wurden mit anti-GFP und anti-Tubulin Antikörpern sowie DAPI behandelt. Schwarzer Kreis: Zentromer I (cen1-GFP); graue Linie: mitotische Spindel (Tubulin).

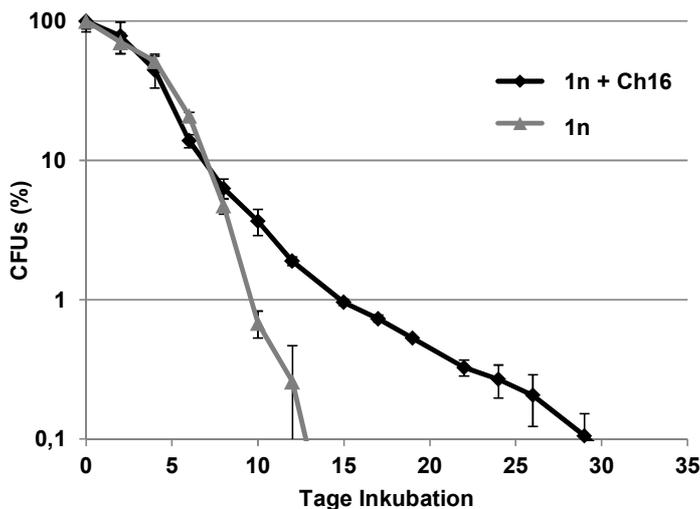
### 3.3.3 Die Präsenz des Minichromosoms Ch16 verlängert die chronologische Lebensspanne

Die Anwesenheit eines zusätzlichen endogenen Chromosoms führt zu zahlreichen Veränderungen im Zellmetabolismus und –Proteinhaushalt (Torres *et al.* 2007). Auch die Präsenz des Ch16 Minichromosoms beeinflusst massiv die Genexpression der Spalthefe durch Veränderung der Gendosis und Heterochromatinverteilung (Chikashige *et al.* 2007). Daher wurde die Auswirkung der Aneuploidie auf die CLS im Vergleich zum euploiden Wildtyp untersucht.

Der experimentelle Ablauf nach (Roux *et al.* 2006) wird ausführlich in Kap. 2.13.1 beschrieben. Zusammengefasst wurden der durch Ch16 aneuploide Hefestamm ( $1n + \text{Ch16}$ ) und der dazu isogene haploide Kontrollstamm ( $1n$  (Stamm 1)) bis zur stationären Phase inkubiert. Anschließend wurde alle 2-3 Tage ein Aliquot der Kulturen auf Vollmediumsplatten ausplattiert. Bei den heranwachsenden Kolonien wurde die Anwesenheit des Minichromosoms durch Selektivausstrich überprüft. Die heranwachsenden Kolonien wurden gezählt, die Kolonienzahl der ersten Plattierung

entsprach dabei 100 %. Fiel die Zahl der Kolonien unter den Schwellenwert von 0,1 %, galt die Kultur als tot.

Überraschenderweise wies der aneuploide Stamm eine um etwa 2,3 mal (30 Tage) längere maximale chronologische Lebensspanne als der Kontrollstamm (13 Tage) auf (Abb. 3-25). Auch mit einem zweiten Kontrollstamm (1n) war dieses Ergebnis reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Auffällig war hierbei, dass lediglich bei einer Subpopulation von etwa 8 % der Zellen nach 8-10 Tagen diese erhöhte CLS erkennbar war.

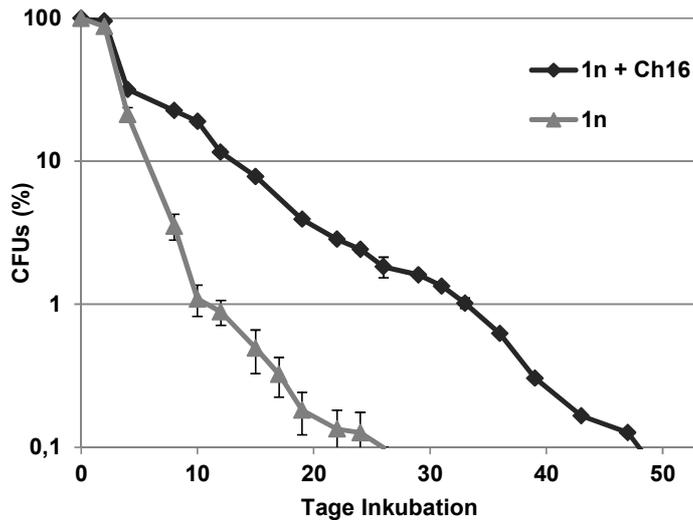


**Abb. 3-25 Das zusätzliche Chromosom Ch16 verlängert die chronologische Lebensspanne.**

Darstellung der chronologischen Lebensspanne (CLS) des aneuploiden Stamms (1n + Ch16) im Vergleich zum haploiden Wildtyp (1n). Fehlerbalken: Standardabweichung. CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

Bei einem Großteil der bislang untersuchten Modellsysteme bis hin zu Säugetieren führt eine Verringerung der Nahrungszufuhr zu einer verlängerten Lebensspanne (Weindruch und Walford 1988; Sohal und Weindruch 1996; Roth *et al.* 1999; Lin *et al.* 2002; Smith *et al.* 2007). Bei *S. cerevisiae* und *S. pombe* wird diese sogenannte Kalorienrestriktion (CR) über eine Reduktion der Glucose im Medium von 2 % auf 0,5 % erreicht (Lin *et al.* 2000; Roux *et al.* 2009).

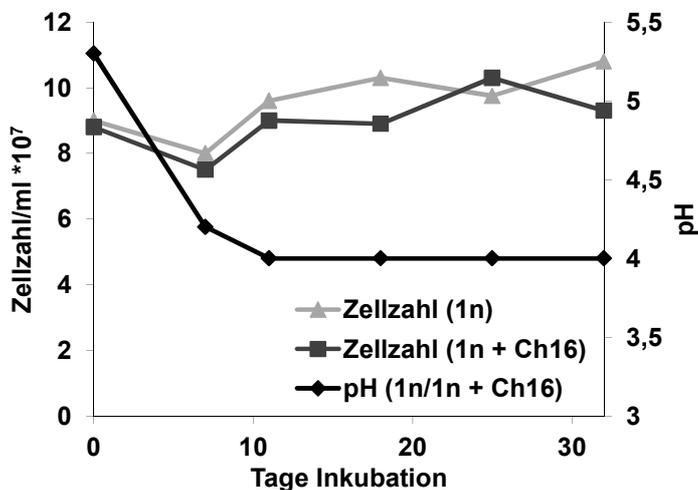
Es wurde überprüft, ob die CLS des aneuploiden Stamms sich durch CR verlängern lässt. Bei einer Reduktion der Glucosemenge im Medium auf 0,5 % erhöhte sich die maximale CLS des Kontrollstamms um den Faktor 2,2 auf etwa 26 Tage und im aneuploiden Stamm um den Faktor 1,5 auf 48 Tage (Abb. 3-26). Das Verhältnis der maximal erreichten Lebensspannen zwischen den beiden Stämmen (Faktor: 1,8) wurde nicht weiter verstärkt, sondern leicht abgeschwächt. Auffällig ist die frühere Auftrennung der beiden Kurven unter CR nach bereits 2 Tagen. Etwa 96 % der Population des aneuploiden Stamms erreichen ein höheres chronologisches Alter als der Kontrollstamm, unter normalen Glucosebedingungen ist dies nur bei 8 % der Zellen der Fall (Abb. 3-25).



**Abb. 3-26 Kalorienrestriktion verstärkt die durch Ch16 verbesserte Lebensfähigkeit.**

Darstellung der CLS des aneuploiden Stamms (1n + Ch16) im Vergleich zum haploiden Wildtyp (1n) unter Glucose limitierten (0,5 %) Bedingungen. Fehlerbalken: Standardabweichung. CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

Aus chronologischen Alterungsstudien mit *S. cerevisiae* ist bekannt, dass es in stationären Kulturen - abhängig vom jeweils verwendeten Medium - zu einem Absinken des pH Werts durch die Sekretion von Essigsäure ins Medium kommt, was zum Tod der Zellen führt (Burtner *et al.* 2009). Entsprechend führen Mutationen, die den Abbau oder eine geringere Akkumulation von Essigsäure bewirken, zu Langlebigkeit (Matecic *et al.* 2010). Aus diesem Grunde wurden unter normalen Glucosebedingungen die pH Werte in Kulturen des langlebigen aneuploiden Stamms mit denen des Kontrollstamms verglichen. Zusätzlich wurde im Verlauf des CFU Experiments die Zellzahl in den Kulturen bestimmt, um Zelllysen erkennen zu können. Dabei wurden die Werte des Kontrollstamms auch über den Tod der Kultur (12 Tage) hinaus weiter ermittelt. Der pH Wert des Mediums sank wie erwartet in den sauren Bereich, von 5,3 an Tag 0 auf 4,0 an Tag 11. Interessanterweise war diese Entwicklung jedoch bei beiden getesteten Stämmen identisch (Abb. 3-27). Die Zellzahl der Stämme sank im Verlauf des Experiments nicht wie zunächst erwartet ab, sondern verblieb konstant bei etwa  $9 \times 10^7$  Zellen/ml (Abb. 3-27). Eine langsamere Zelllysis oder eine geringere Säuresekretion können demnach nicht der Grund für die durch Ch16 vermittelte Langlebigkeit sein.



**Abb. 3-27 pH Wert und Zellzahl chronologisch alternder Kulturen.**

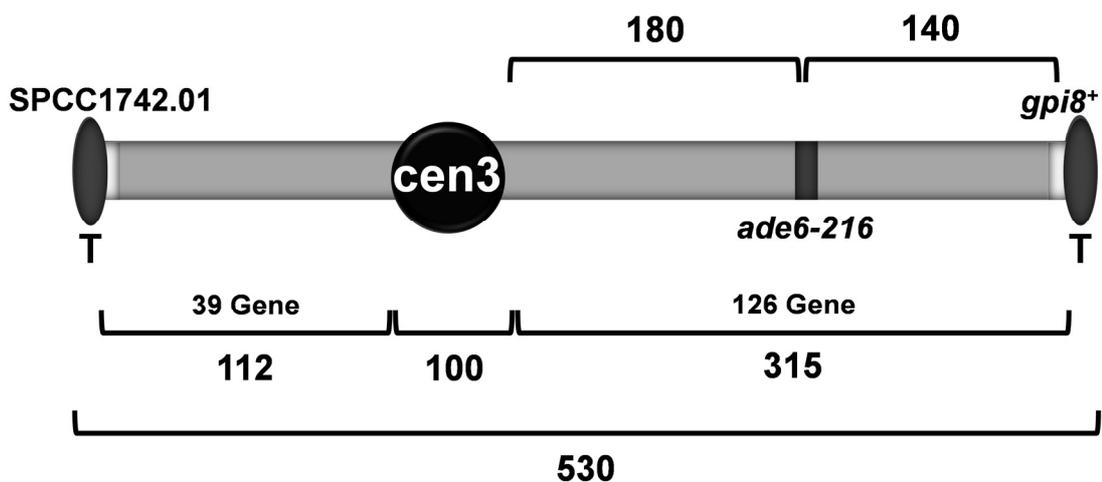
Die Zellzahlen (primäre Y-Achse) und der pH Wert (sekundäre Y-Achse) der Kulturen des haploiden (1n) und aneuploiden (1n + Ch16) Stamms wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Alterungs-experiments bestimmt.

### 3.3.4 Ein spezifischer Bereich von Ch16 vermittelt die Lebensverlängerung

Zum Verständnis der im Folgenden beschriebenen Versuche wird an dieser Stelle die Struktur des lebensverlängernden Minichromosoms dargestellt:

Das Ch16 Minichromosom enthält bei einer Länge von etwa 530 Kbp 163 vollständige und 2 verkürzte Gene an den Chromosomenenden (Chikashige *et al.* 2007) (Abb. 3-28). Äußerst links lokalisiert ist ein Teil des bislang nicht charakterisierten Gens SPCC1742.01, das äußerst rechts lokalisierte Gen, *gpi8*<sup>+</sup>, kodiert für eine GPI-Anker Transamidase. Der rechts vom Zentromer liegende Arm des Minichromosoms umfasst etwa 315 Kbp, auf denen mehr als dreiviertel (126) der Gene von Ch16 lokalisiert sind. Auf den etwa 112 Kbp des links vom Zentromer liegenden Arms befinden sich 39 Gene. Das Zentromer weist eine Länge von etwa 100 Kbp auf. Der *ade6-216* Selektionsmarker ist ungefähr mittig auf dem rechten Arm lokalisiert, 180 Kbp vom Zentromer und 140 Kbp vom Telomer entfernt.

#### Ch16:



**Abb. 3-28 Schematische Darstellung des Minichromosoms Ch16.**

Dargestellt ist das Ch16 Minichromosom mit seinem Zentromer (*cen3*), den Telomeren (T), dem Selektionsmarker *ade6-216* sowie den verkürzten Genen SPCC1742.01 am linken und *gpi8*<sup>+</sup> am rechten Ende des Chromosoms. Die Schweifklammern dienen der Illustration der ungefähren Länge der Abschnitte. Größenangaben in Kilobasenpaaren.

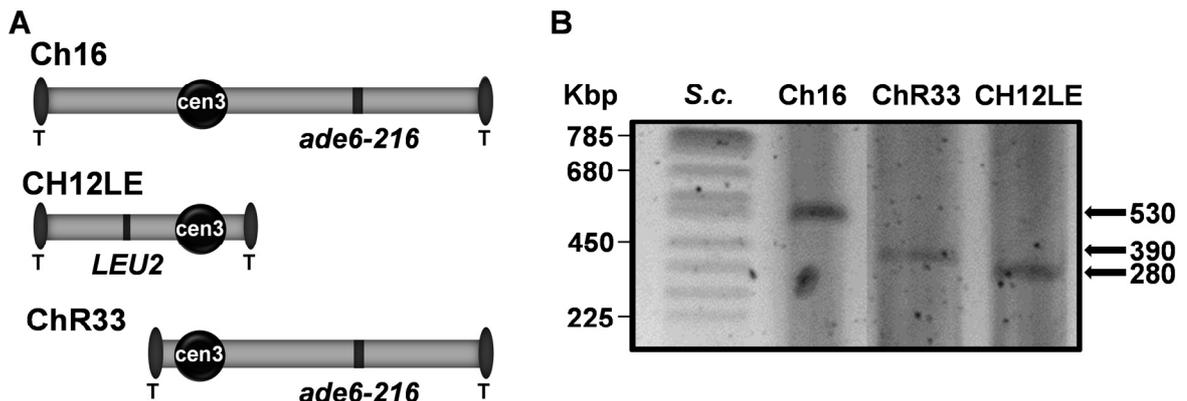
Es waren zwei Szenarien vorstellbar, die zu einer durch Aneuploidie vermittelten Lebensverlängerung führen könnten:

1. Die Anwesenheit eines zusätzlichen Chromosoms *per se* bewirkt generelle Veränderungen im Zellhaushalt, die in einer stationären Kultur lebensverlängernde Auswirkungen haben.
2. Die Anwesenheit einer spezifischen Region/von Gen(en) auf Ch16 bewirkt einen Überlebensvorteil in der stationären Phase.

Sollte das erste Szenario zutreffen, müssten auch andere Minichromosomen eine CLS Verlängerung bewirken. Beim zweiten Szenario könnten verkürzte Ch16 Varianten genutzt werden, um durch Eingrenzung den Bereich zu lokalisieren, der lebensverlängernd wirkt. Um beide Möglichkeiten zu überprüfen, wurde auf bereits publizierte Minichromosomvarianten von Ch16 zurückgegriffen.

### 3.3.4.1 Verkürzte Minichromosomvarianten verursachen erhöhte Stresssensitivität

Neben dem Minichromosom Ch16 wurden durch  $\gamma$ -Bestrahlung des Ch16 tragenden Stamms weitere, mitotisch weniger stabile Chromosomenvarianten generiert (Niwa *et al.* 1989). Zwei dieser kürzeren Varianten decken jeweils den linken bzw. rechten Arm des Ch16 Chromosoms ab (Abb. 3-29A). Die Präsenz und Größe der Minichromosomen in den Stämmen wurden mittels Pulsfeldgelelektrophorese in einem CHEF Agarosegel (Kap. 2.12.3) überprüft. Es waren Banden in der erwarteten Höhe (Ch16: 530 Kbp; ChR33: 390 Kbp; CH12LE: 280 Kbp) sichtbar (Abb. 3-29B).

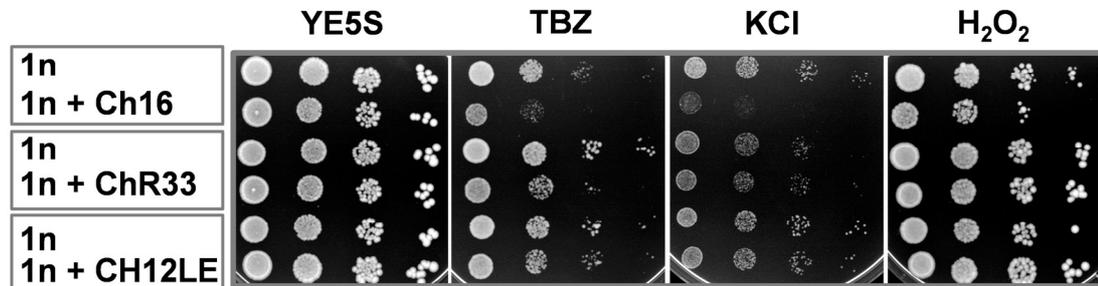


**Abb. 3-29 Das Minichromosom Ch16 und die verkürzten Varianten CH12LE und ChR33.**

**A** Schematische Darstellung des Minichromosoms Ch16 (oben) und der Varianten CH12LE (Mitte) und ChR33 (unten), die den linken bzw. rechten Arm von Ch16 abdecken. T: Telomer; *cen3*: Zentromer III; *ade6-216/LEU2*: Selektionsmarker für (durch intragene Komplementation mit *ade6-210* vermittelte) Adeninprototrophie bzw. Leucinprototrophie. **B** Ausschnitt eines 1 %igen CHEF-Gels, in dem die aus den Minichromosom tragenden Stämmen isolierten Chromosomen gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden. Der Ausschnitt zeigt die Banden in den für die Minichromosomen (Ch16, ChR33 und CH12LE) erwarteten Höhen. Größenangaben in Kilobasenpaaren (Kbp). Größenstandard: *S. cerevisiae* Chromosomen (*S.c.*).

Da die aneuploiden Stämme durch die erhaltene  $\gamma$ -Bestrahlung wahrscheinlich einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund aufwiesen, mussten vor der Bestimmung der CLS isogene euploide Kontrollstämme generiert werden. Dies geschah beim ChR33 tragenden Stamm wie beim Ch16 Stamm durch Isolation einer adeninauxotrophen roten Kolonie (vgl. Kap. 3.3.1). Beim CH12LE tragenden Stamm war dies durch den abweichenden Selektionsmarker (*LEU2*) jedoch nicht möglich. Zellen dieses Stamms wurden auf Vollmedium ausplattiert und die heranwachsenden Kolonien nach 2 Tagen

(30 °C) auf MM-Platten ohne Leucin replikaplatziert. Durch Vergleich der Platten wurde festgestellt, ob eine Zelle das Minichromosom verloren hatte und dadurch auf MM ohne Leucin keine Kolonie bilden konnte. Die entsprechende Kolonie wurde von der Vollmediumsplatte isoliert. Somit wurde ein euploider Kontrollstamm generiert.



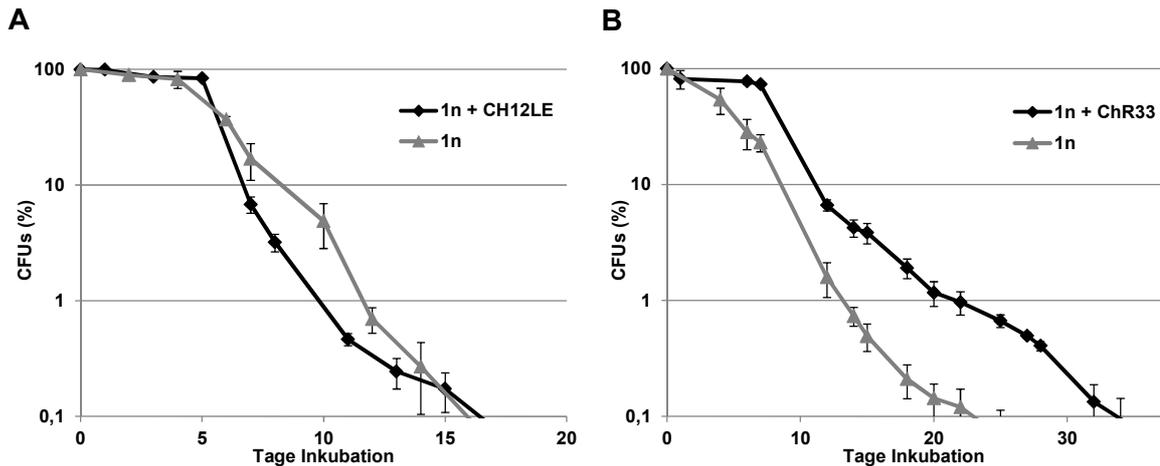
**Abb. 3-30 Die Anwesenheit der Minichromosomvarianten ChR33 und CH12LE verursacht erhöhte Stresssensitivität.**

Serieller Tropftest haploider *S. pombe* Kontrollstämmen (1n) im Vergleich zu isogenen aneuploiden Stämmen (1n + Ch16/1n + ChR33/1n + CH12LE). Inkubation: 3-4 Tage bei 30 °C (TBZ 25 °C). Kontrolle: YE5S; TBZ: 9 µg/ml; KCl: 1 M; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1 mM.

Das Wachstum der aneuploiden Stämme im Vergleich zu den isogenen Kontrollstämmen unter der Einwirkung exogener Stressoren wurde mittels serieller Tropftestanalysen untersucht. Auf den Kontrollplatten (YE5S) wuchsen die Stämme vergleichbar. Sowohl der CH12LE- als auch der ChR33 tragende Stamm wiesen wie der aneuploide Ch16 Stamm eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz TBZ sowie durch KCl vermitteltem Salzstress auf (Abb. 3-30). Oxidativer Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) beeinträchtigte die Lebensfähigkeit der aneuploiden Stämme mit den verkürzten Minichromosomvarianten nicht. Alle Minichromosomvarianten reduzieren also die Wachstumsfähigkeit unter bestimmter Stresseinwirkung, wobei das größte Minichromosom (Ch16) den stärksten und die kürzeste Variante (CH12LE) den schwächsten Phänotyp verursacht.

### 3.3.4.2 Der chromosomale Bereich für ein längeres Leben ist auf dem rechten Arm des Minichromosoms Ch16 lokalisiert

Die Bestimmung der CLS des CH12LE Stammes ergab, dass diese sich nicht von der des isogenen Kontrollstammes unterschied (Abb. 3-31A). Beide Stämme erreichten eine CLS von etwa 16 Tagen. Somit war die Möglichkeit widerlegt, dass die pure Anwesenheit eines zusätzlichen Chromosoms für die Verlängerung der CLS ausreicht (Kap. 3.3.4). Auffällig am Kurvenverlauf war, dass der aneuploide Stamm zwar die gleiche maximale CLS wie der Kontrollstamm erreichte, in einem Alter von ca. 6-13 Tagen jedoch einen stärkeren Abfall in der Lebensfähigkeit verzeichnete. In diesem Fall wirkte sich das Minichromosom nachteilig auf das Überleben eines großen Teils der Population in der stationären Kultur aus.



**Abb. 3-31 Die Anwesenheit von Chr33 verlängert die CLS, die Präsenz von CH12LE hingegen nicht.**

Darstellung der CLS der aneuploiden Stämme mit dem Minichromosom CH12LE (**A**; 1n + CH12LE) bzw. Chr33 (**B**; 1n + Chr33) im Vergleich zum jeweils isogenen Wildtyp (1n). Fehlerbalken: Standardabweichung. CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

Im Gegensatz dazu vermittelte die Minichromosomvariante Chr33 einen deutlichen Überlebensvorteil (Abb. 3-31B). Der aneuploide Stamm wies mit 33 Tagen eine um den Faktor 1,5 erhöhte CLS im Vergleich zum Kontrollstamm (CLS: 22 Tage) auf. Das bedeutete, dass der lebensverlängernde chromosomale Bereich auf dem rechten Arm des Minichromosoms Ch16 lokalisiert sein musste, da die Variante des linken Arms keinen Überlebensvorteil vermitteln konnte (Abb. 3-31A). Im Folgenden wurde versucht, den in Frage kommenden Bereich weiter einzugrenzen.

### 3.3.4.3 Eingrenzung des lebensverlängernden Bereichs mit Hilfe neuer Minichromosomvarianten

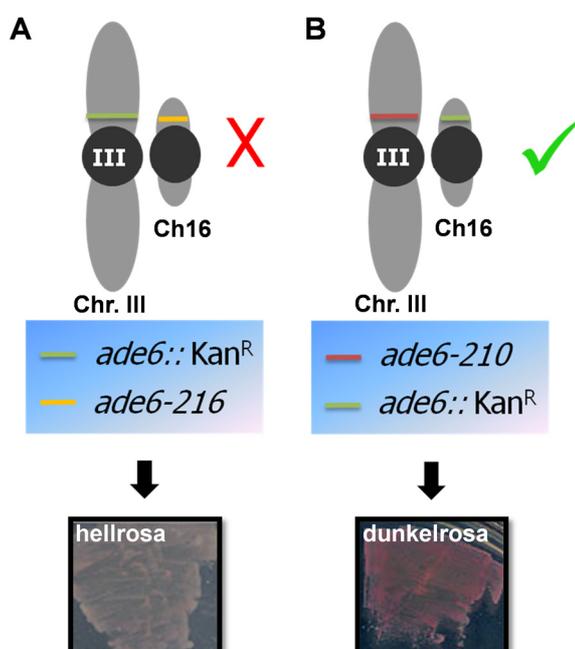
Die lebensverlängernde Wirkung bei Anwesenheit von Ch16 wird durch den rechten Arm des Minichromosoms hervorgerufen. Dort sind 126 Gene lokalisiert (vgl. Abb. 3-28). Dazu zählt z. B. das *ade6-216* Allel, welches zusammen mit *ade6-210* Adeninprototrophie vermittelt. Viele weitere dort kodierte Proteine könnten einen Überlebensvorteil für alternde Zellen einer stationären Kultur bieten, beispielsweise Chaperone (Vtc4p, Sti1p) durch eine veränderte Stressantwort, Histone (Hta1p, Htb1p) und Chromatinmodulierer (Arp6p, Hst2p) durch Änderungen der Genexpression, an der Kohäsion beteiligte Proteine (Rad21p, Nse3p, Rec11p) oder Zellzyklusproteine (Cig1p, Bub1p) beim Wiedereintritt in den Zellzyklus nach Plattierung der Zellen.

Angesichts dieser großen Bandbreite potentieller Langlebigkeitsgene wurden systematisch einzelne Deletionen auf dem rechten Arm des Minichromosoms durchgeführt, mit dem Ziel, den gesuchten Bereich einzugrenzen. Das Vorgehen der Deletion mittels homologer Rekombination wird in Kapitel 2.12.6.1 erläutert.

Das Ch16 Minichromosom ist identisch zu einem 530 Kbp Abschnitt auf Chr. III. Aufgrund der gleichen DNA-Sequenz bestand bei allen in dieser Arbeit in *S. pombe* durchgeführten Deletionen mittels homologer Rekombination die Möglichkeit, dass der Austausch des chromosomalen Bereichs gegen die *Kan<sup>R</sup>*-Deletionskassette entweder auf Chr. III oder auf dem Minichromosom stattfindet. Auch eine gleichzeitige Deletion auf beiden Chromosomen war denkbar, sofern der auszutauschende Bereich keine essentiellen Gene enthielt. Erwünscht war lediglich die Deletion auf dem Minichromosom. Zur Unterscheidung konnte die unterschiedliche Rosafärbung abhängig vom in den Transformanden vorliegenden *ade6-x* Allel ausgenutzt werden. Zellen, in denen nur das *ade6-210* Allel vorliegt (Deletion des *ade6-216* Markers auf dem Minichromosom), bilden auf Medium mit limitiertem Adenin dunkelrosa Kolonien, während Zellen, die nur das *ade6-216* Allel enthalten (Deletion des *ade6-210* Markers auf Chr. III), eine hellrosa Koloniefärbung erkennen lassen (Abb. 3-32).

Daher wurde bei den nachfolgend beschriebenen Deletionen, soweit dies möglich war, immer der zu untersuchende Chromosomenbereich bis einschließlich des *ade6-216* Allels gegen die PCR-Kassette ausgetauscht.

Die genauen Koordinaten der deletierten Abschnitte (Tab. 6-2) sowie die Dokumentation der Verifikations-PCRs zur Überprüfung der korrekten Integration der Deletionskassette sind im Anhang (Kap. 6.1) aufgeführt.



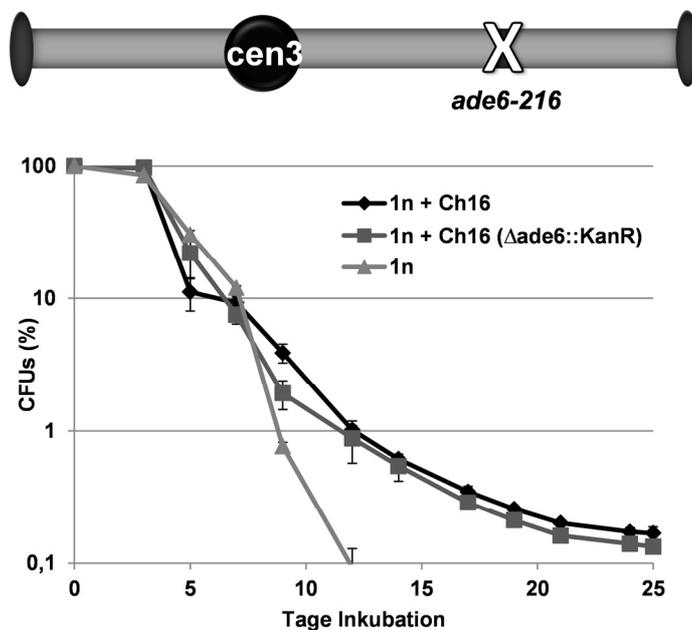
**Abb. 3-32 Unterschiedliche Rosatöne dienen zur Unterscheidung einer Deletion auf Chr. III bzw. Ch16.**

**A** Der unerwünschte Austausch des *ade6-210* Allels gegen die *Kan<sup>R</sup>*-Kassette (grün) auf Chr. III verursacht eine hellrosa Färbung des Zellausstrichs (unten) auf MM mit limitiertem Adenin durch den noch vorhandenen *ade6-216* Marker (gelb) auf dem Minichromosom Ch16. **B** Der Austausch des *ade6-216* Allels gegen die *Kan<sup>R</sup>*-Kassette (grün) auf Ch16 bewirkt eine dunkelrosa Färbung des Zellausstrichs (unten) auf MM mit limitiertem Adenin durch den *ade6-210* Marker (rot) auf Chr. III. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 3-5 Tage bei 30 °C.

### 3.3.4.3.1 Adeninauxotrophie hat keinen Einfluss auf die CLS

Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass die durch den Minichromosom-Selektionsmarker *ade6-216* vermittelte Adeninprototrophie vorteilhaft für das Überleben der Zelle ist.

Die Analyse der CLS des Stamms mit dem modifiziertem Ch16 Minichromosom, bei dem das *ade6-216* Allel gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde ((1n + Ch16 ( $\Delta ade6::kan^R$ )); Anhang Abb. 6-2A), ergab keinen Unterschied zum aneuploiden Ausgangsstamm ((1n + Ch16); Abb. 3-33). Beide Stämme wiesen eine im Vergleich zum euploiden Kontrollstamm ((1n); CLS: 12 Tage) erhöhte CLS auf. Adeninprototrophie ist demnach nicht für die lebensverlängernde Wirkung verantwortlich.



**Abb. 3-33 Adeninauxotrophie verringert die durch Ch16 vermittelte längere CLS nicht.**

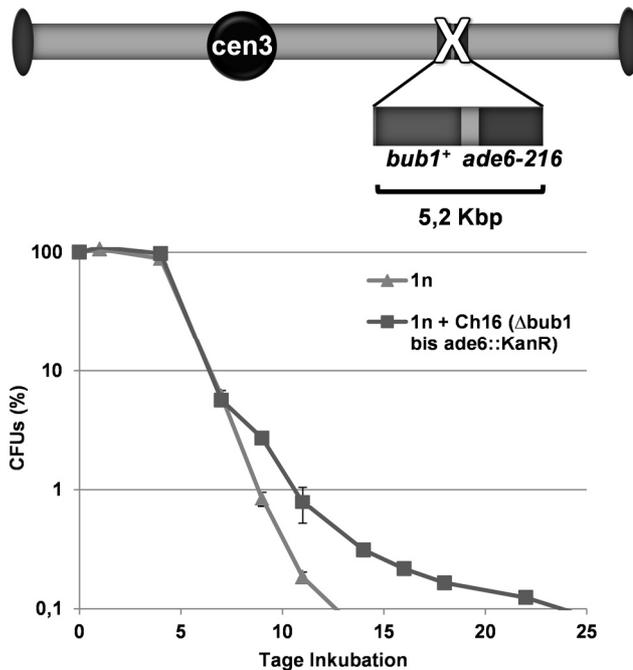
Oben: Schema des Ch16 Minichromosoms mit deletiertem (X) *ade6-216* Allel. Unten: Darstellung der CLS des aneuploiden Stamms mit deletiertem *ade6-216* Allel (1n + Ch16 ( $\Delta ade6::kan^R$ )) und mit dem ursprünglichen Ch16 Chromosom (1n + Ch16) im Vergleich zum haploiden Kontrollstamm (1n). Fehlerbalken: Standardabweichung. *cen3*: Zentromer; CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

### 3.3.4.3.2 Die Expression der zweiten Kopie des Spindelkontrollpunktgens *bub1<sup>+</sup>* verlängert nicht die CLS

Für bestimmte Spindelkontrollpunktproteine konnte ein eindeutiger Zusammenhang zur Alterung hergestellt werden (Kap.1.3). So zeigen beispielsweise Mäuse mit hypomorphem *Bub1b<sup>H/H</sup>* Allel erhöhte Raten von Aneuploidie und altern vorzeitig (Baker *et al.* 2004).

Auf dem rechten Arm des Minichromosoms Ch16 befindet sich angrenzend an das *ade6-216* Allel das zu *Bub1b* homologe Gen *bub1<sup>+</sup>*. Die Deletion von *bub1<sup>+</sup>* bis einschließlich *ade6-216* (5,2 Kbp) auf dem Minichromosom sollte klären, ob die zweite Genkopie und damit einhergehend eine potentiell höhere Bub1p Proteinmenge ursächlich waren für die erhöhte CLS des aneuploiden Stamms (Anhang Abb. 6-2B). Die Analyse der CLS des aneuploiden Stamms mit der Deletionsvariante des Ch16 Chromosoms ließ

jedoch keinen signifikanten Unterschied zur zuvor gezeigten Langlebigkeit des Ch16 Stamms erkennen (Abb. 3-34). So erreichten die aneuploiden Zellen eine maximale CLS von etwa 24 Tagen, während der Kontrollstamm bereits nach 13 Tagen den Schwellenwert von 0,1 % unterschritt. Demnach verursacht die Expression der 2. Kopie des *bub1*<sup>+</sup> Gens nicht die verlängerte Lebensspanne.



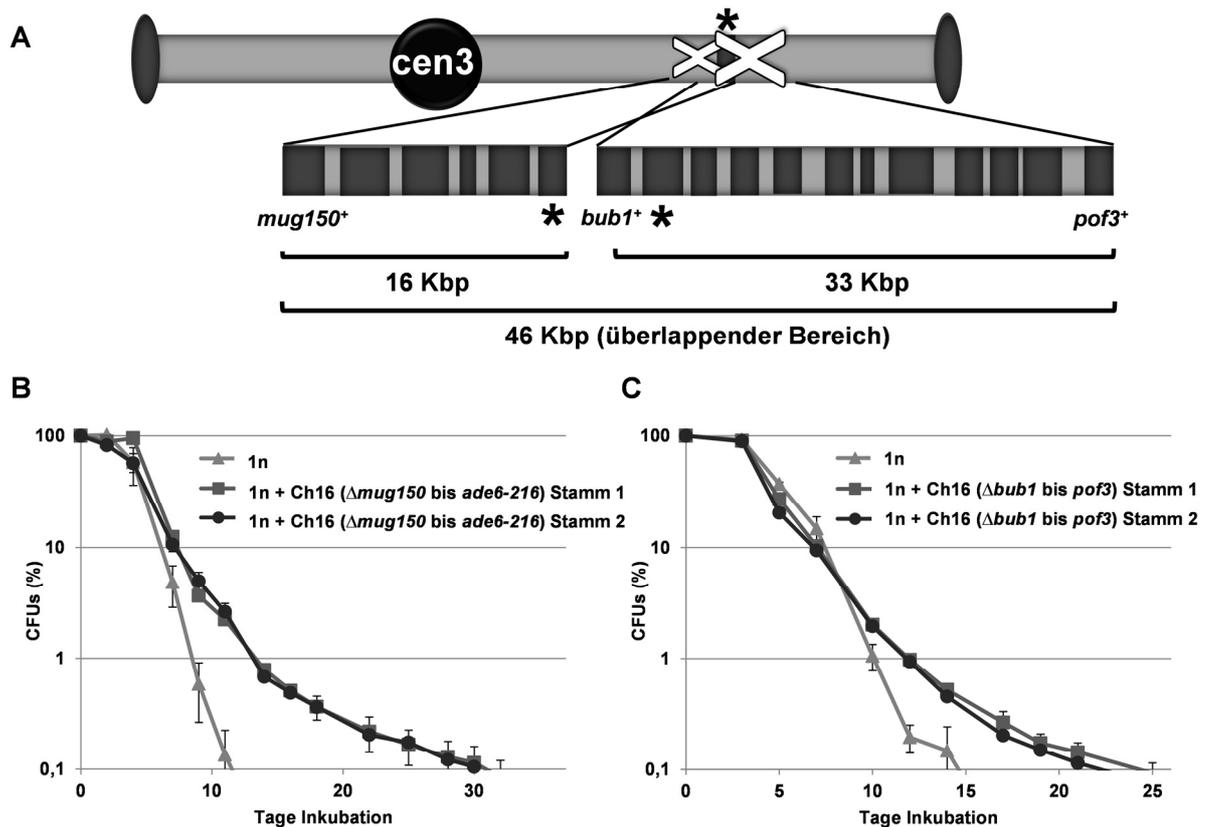
**Abb. 3-34 Die Abwesenheit eines Ch16 kodierten *bub1*<sup>+</sup> ORFs vermindert nicht die durch Ch16 vermittelte längere CLS.** Oben: Schema des Ch16 Minichromosoms mit deletierten (X) 5,2 Kbp (Vergrößerung) vom *bub1*<sup>+</sup> ORF bis einschließlich *ade6-216*. Dunkelgrau: ORF. Hellgrau in Vergrößerung: nicht kodierender Bereich. Unten: Darstellung der CLS des aneuploiden Stamms mit einer 5,2 Kbp Deletion auf Ch16 (1n + Ch16 (Δ*bub1* bis *ade6::kan<sup>R</sup>*)) im Vergleich zum haploiden Kontrollstamm (1n). Fehlerbalken: Standardabweichung. *cen3*: Zentromer; CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

### 3.3.4.3 Verkürzungen des Minichromosoms um 16 und 33 Kbp beeinflussen nicht die CLS

Im weiteren Verlauf wurden größere chromosomale Abschnitte in einem Schritt deletiert, um somit den in Frage kommenden Bereich Stück für Stück eingrenzen zu können.

Ausgehend vom *ade6-216* Allel wurden 16 Kbp in Richtung des Zentromers und vom *bub1*<sup>+</sup> Gen 33 Kbp in Richtung des Telomers deletiert (Abb. 3-35A; Anhang Abb. 6-2C und D). Zur Bestimmung der CLS wurden von den beiden Deletionsvarianten jeweils zwei Stämme eingesetzt. Dies diente der Bestätigung der Reproduzierbarkeit.

Die Deletion von 16 Kbp des Minichromosoms, die sechs Gene einschließt, verursachte keine Verkürzung der CLS. Beide getesteten Deletionsstämme wiesen eine maximale Lebensspanne von 30 Tagen auf, während diese beim Kontrollstamm bereits nach 11 Tagen erreicht war (Abb. 3-35B). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Deletion der 12 Gene von *bub1*<sup>+</sup> bis einschließlich *pof3*<sup>+</sup>. Auch hier erreichten beide Deletionsstämme eine nahezu identische CLS von etwa 24 Tagen, eine Verkürzung auf das Niveau der CLS des Kontrollstamms (15 Tage) blieb aus (Abb. 3-35C). Demnach wirkt der 46 Kbp umfassende, an das *ade6-216* Allel angrenzende chromosomale Bereich nicht lebensverlängernd.



**Abb. 3-35** Der lebensverlängernde Bereich auf Ch16 befindet sich nicht im 46 Kbp Bereich von *mug150<sup>+</sup>* bis *pof3<sup>+</sup>*.

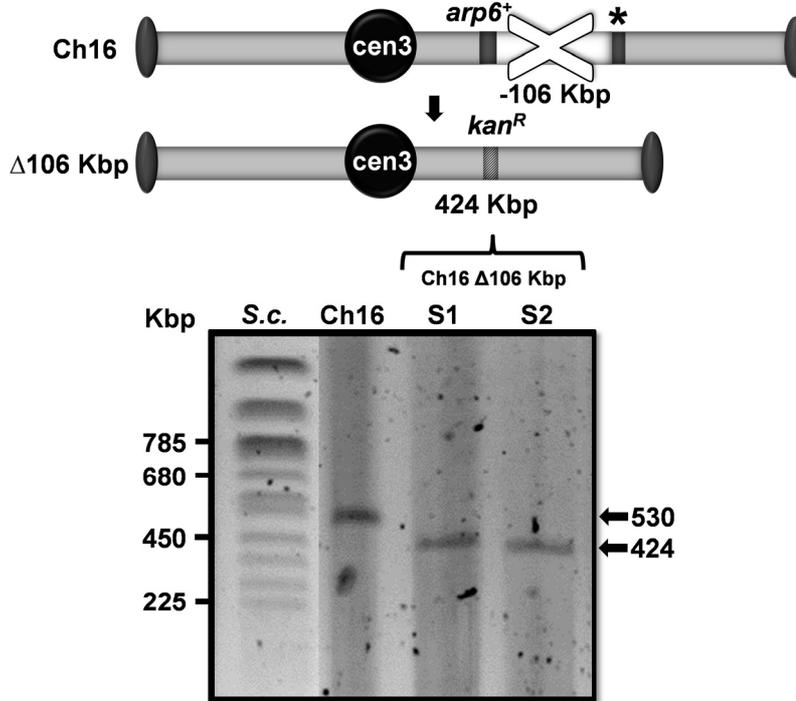
**A** Schema des Ch16 Minichromosoms mit deletierten 16 Kbp (kleines X; Vergrößerung links) vom *mug150<sup>+</sup>* ORF bis einschließlich *ade6-216* (\*Stern) und mit deletierten 33 Kbp (großes X; Vergrößerung rechts) vom *bub1<sup>+</sup>* ORF bis einschließlich *pof3<sup>+</sup>*. Dunkelgrau: ORF. Hellgrau in Vergrößerung: nicht kodierender Bereich. *cen3*: Zentromer. **B** Darstellung der CLS von zwei Stämmen mit einer 16 Kbp Deletion auf Ch16 (1n + Ch16 ( $\Delta mug150$  bis *ade6-216*) Stamm 1 und des Kontrollstamms (1n). **C** Darstellung der CLS der aneuploiden Stämme mit einer 33 Kbp Deletion auf Ch16 (1n + Ch16 ( $\Delta bub1$  bis *pof3*) Stamm 1/2) im Vergleich zum haploiden Kontrollstamm (1n). Fehlerbalken: Standardabweichung. CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

#### 3.3.4.3.4 Der Bereich, dessen Anwesenheit die CLS verlängert, befindet sich in einem Chromosomenabschnitt von 106 Kbp

Im nächsten Schritt sollte eine Großdeletion von 106 Kbp auf dem Minichromosom, auf denen sich 37 Gene von *arp6<sup>+</sup>* bis einschließlich *ade6-216* befinden, den für die Lebensverlängerung in Frage kommenden Bereich weiter eingrenzen. Es war nicht klar, ob ein solch großer chromosomaler Bereich in einem Schritt durch eine etwa 1,4 Kbp große PCR-Kassette über homologe Rekombination ausgetauscht werden kann, da ein solches Vorhaben für die Spalthefe bislang nicht beschrieben wurde.

Die Verifikation des erfolgreichen Einbaus des Kanamycin-Selektionsmarkers wurde wie bei allen Deletionen zunächst mittels PCR auf Zellen durchgeführt (Kap. 2.11.3.2), bei der die Übergänge vom chromosomalen Bereich zur integrierten DNA überprüft wurden (Anhang Abb. 6-2E). Als zusätzliche Kontrolle wurde die chromosomale DNA von zwei generierten Deletionsstämmen isoliert, um die Verkürzung des Minichromosoms von 530

auf 424 Kbp mittels Chromosomengel (Kap. 2.12.3) nachzuweisen. Bei beiden Deletionsstämmen (Spur 3 und 4) war eine Bande in dem erwarteten Bereich unterhalb der Ch16 Bande (Spur 2) sichtbar (Abb. 3-36).



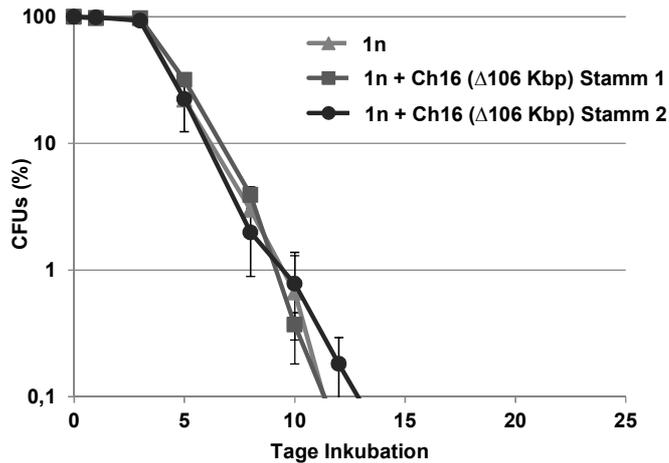
**Abb. 3-36 Deletion von 106 Kbp des Minichromosoms und Nachweis mittels CHEF-Gel.**

Oben dargestellt ist schematisch das Minichromosom Ch16 mit dem zu deletierenden Bereich (X; weiß) von 106 Kbp, von *arp6<sup>+</sup>* bis einschließlich zum *ade6-216* Markergen (\*Stern), und darunter das Ergebnis der erfolgreichen Deletion durch homologe Rekombination, ein 424 Kbp großes Minichromosom mit dem Kanamycin-Resistenzgen (*kan<sup>R</sup>*; schraffiert). *cen3*: Zentromer III. Dunkelgrau: ORF. Unten zeigt ein Ausschnitt eines 1 %igen CHEF-Gels, in dem die

isolierten Chromosomen der Minichromosom tragenden Stämme gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, Banden in den für die Minichromosomen (Ch16, Ch16  $\Delta$ 106 Kbp Stamm 1/2)) erwarteten Höhen (Pfeil). S1 bzw. 2: Stamm 1 bzw. 2. Größenangaben in Kilobasenpaaren (Kbp). Größenstandard: Chromosomen von *S. cerevisiae* (S.c.).

Es erfolgte die Bestimmung der CLS der beiden aneuploiden Deletionsstämmen, als Kontrolle diente der euploide Kontrollstamm. Die Verkürzung des Ch16 Minichromosoms um 106 Kbp bewirkte eine Reduktion der CLS auf das Niveau des Kontrollstamms (CLS: 12 Tage), die Deletionsstämmen erreichten eine maximale Lebensspanne von 12 (Stamm 1) bzw. 13 Tagen (Stamm 2) (Abb. 3-37).

Somit wurde der lebensverlängernde Bereich auf dem rechten Arm von Ch16 identifiziert. Im Anschluss wurden kleinere Deletionen innerhalb des 106 Kbp Abschnitts durchgeführt, um den Bereich, der Langlebigkeit vermittelt, weiter einzugrenzen.



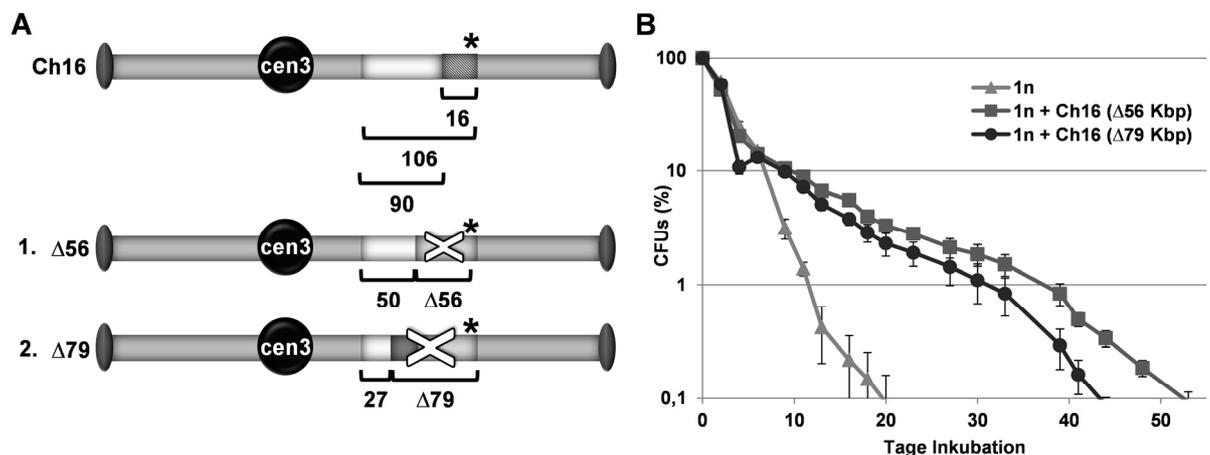
**Abb. 3-37** Bei Abwesenheit eines Bereichs von 106 Kbp auf dem Minichromosom verkürzt sich die CLS auf das Niveau des Kontrollstamms.

Darstellung der CLS von zwei Stämmen (1n + Ch16 ( $\Delta$ 106 Kbp) Stamm 1/2), die ein um 106 Kbp verkürztes CH16 Chromosom enthalten und dem haploiden Kontrollstamm (1n). Fehlerbalken: Standardabweichung. CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

### 3.3.4.3.5 Eingrenzung des lebensverlängernden Bereichs auf 27 Kbp

Die bisherigen Daten zeigten, dass der CLS verlängernde Bereich 90 Kbp umfasst, da die Deletion von 16 Kbp keine Verkürzung der CLS bewirkte und eine lebensverkürzende 106 Kbp Deletion diese 16 Kbp einschließt (Abb. 3-38A oben).

Es wurden weitere Deletionen von 56 bzw. 79 Kbp Länge innerhalb des 106 Kbp Abschnitts durchgeführt, die 19 (*sti1*<sup>+</sup> bis einschließlich *ade6-216*) bzw. 27 (*rgf3*<sup>+</sup> bis einschließlich *ade6-216*) Gene beinhalteten (Abb. 3-38A unten; Anhang Abb. 6-2F und G).



**Abb. 3-38** Reduktion des Bereichs für eine Lebensverlängerung auf 27 Kbp.

**A** Schema der Deletionen zur weiteren Eingrenzung des lebensverlängernden Bereichs. Oben dargestellt ist das Minichromosom Ch16 mit Selektionsmarker *ade6-216* (\*Stern), den Deletionen von 16 Kbp (schraffiert, lebensverlängernd) und 106 Kbp (lebensverkürzend) und dem identifizierten 90 Kbp großen lebensverlängernden Bereich (weiß). Unten: Deletionen (X) von 56 Kbp (1.) sowie 79 Kbp (2.) reduzieren den 90 Kbp Abschnitt auf 50 bzw. 27 Kbp. Größenangaben in Kilobasenpaaren. *cen3*: Zentromer. **B** CLS-Kurve der Stämme mit den verkürzten Ch16 Varianten (1n + Ch16 ( $\Delta$ 56 Kbp/ $\Delta$ 79 Kbp)) aus (A) im Vergleich zum Kontrollstamm (1n) unter Glucose limitierten (0,5 %) Bedingungen. Fehlerbalken: Standardabweichung. CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

Die Analyse der CLS erfolgte unter Glucose limitierten Bedingungen, da es das Ziel war, eine frühere Auftrennung der Überlebenskurven zu erreichen, um kleinere Unterschiede in

der Lebensfähigkeit der getesteten Stämme besser erkennen zu können. Die beiden Minichromosomvarianten riefen eine im Vergleich zum Kontrollstamm (CLS: 20 Tage) um den Faktor 2,6 (Ch16  $\Delta$ 56 Kbp) bzw. 2,2 (Ch16  $\Delta$ 79 Kbp) verlängerte CLS hervor (Abb. 3-38B). Die Kurvenverläufe glichen dabei mit einer maximalen Lebensspanne von 44 (1n + Ch16 ( $\Delta$ 79 Kbp)) bzw. 52 (1n + Ch16 ( $\Delta$ 56 Kbp)) Tagen der mit Ch16 erstellten Kurve unter Kalorienrestriktion (Abb. 3-26). Demnach musste sich der lebensverlängernde Bereich in einem 27 Kbp langen DNA Abschnitt nahe dem Zentromer des Minichromosoms befinden.

### 3.3.4.3.6 Ein Bereich mit drei Genen hat einen Effekt auf die Verlängerung der CLS

Der 27 Kbp umfassende lebensverlängernde Abschnitt wurde in vier DNA Segmente unterteilt, die jeweils aus dem Minichromosom entfernt werden sollten (Abb. 3-39A; Anhang Abb. 6-3A-C).

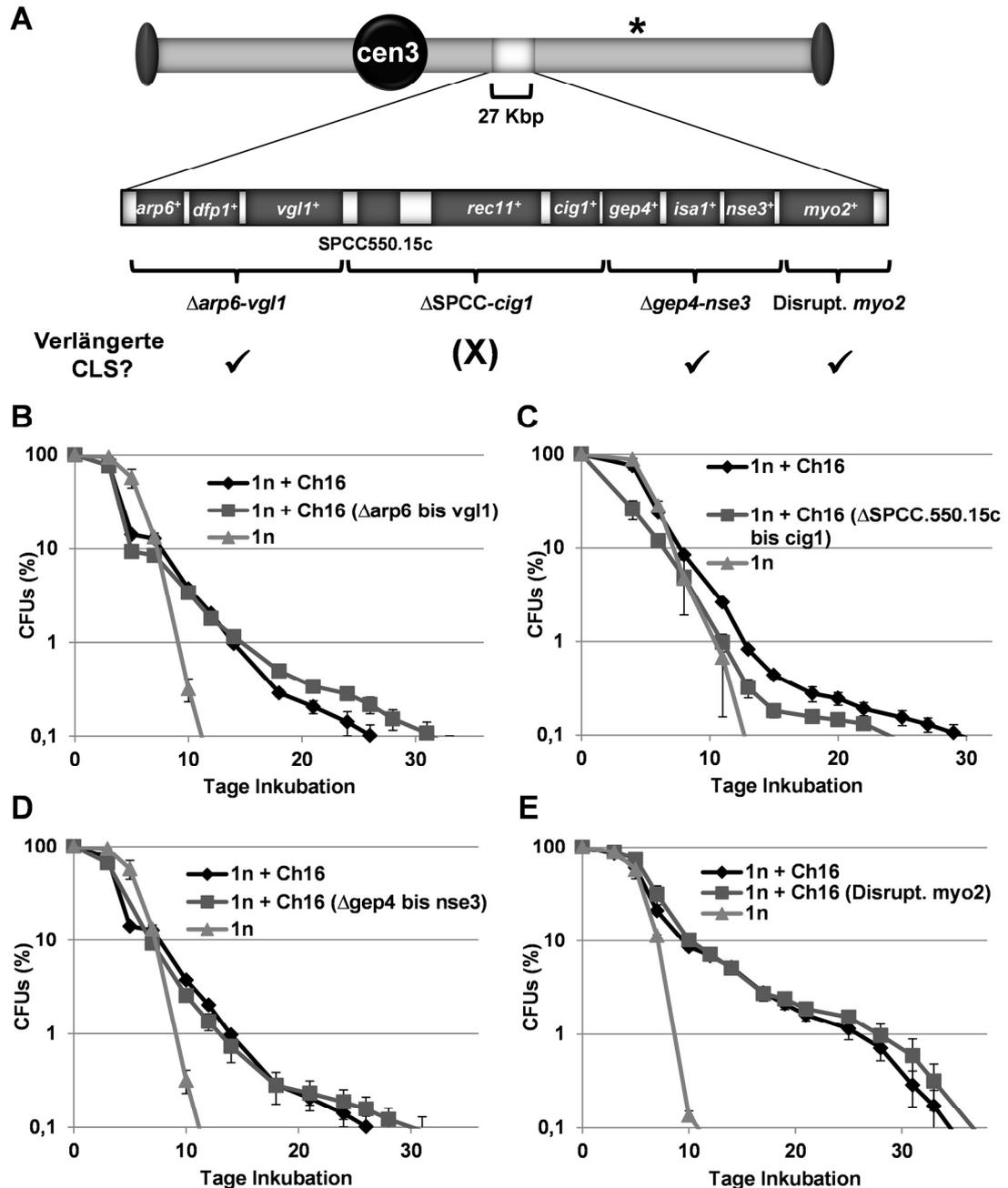
Das erste DNA Segment umfasste die ORFs der Gene *arp6*<sup>+</sup>, *dfp1*<sup>+</sup> und *vgl1*<sup>+</sup>. Die Abwesenheit dieses Bereichs bewirkte keine Veränderung der CLS, der Stamm (1n + Ch16 ( $\Delta$ *arp6* bis *vgl1*)) erreichte eine zur aneuploiden Kontrolle ((1n + Ch16); CLS: 27 Tage) vergleichbare maximale Lebensspanne von 31 Tagen, der haploide Kontrollstamm (1n) erreichte diese bereits nach 11 Tagen (Abb. 3-39B).

Das dritte DNA Segment mit den ORFs der Gene *gep4*<sup>+</sup>, *isa1*<sup>+</sup> und *nse3*<sup>+</sup> beeinflusst die CLS nicht. Nach Entfernung dieses Abschnitts erreichten die Kulturen (1n + Ch16 ( $\Delta$ *gep4* bis *nse3*)) eine dem Ch16 Stamm (1n + Ch16; CLS 27 Tage) ähnliche CLS von 30 Tagen, der haploide Stamm verstarb bereits nach 11 Tagen (Abb. 3-39D).

Der vierte Abschnitt, der hauptsächlich aus dem ORF des Gens *myo2*<sup>+</sup> besteht, konnte nicht erfolgreich deletiert werden. Daher wurde das Gen *myo2*<sup>+</sup> durch die *kan*<sup>R</sup>-Kassette disruptiert (Anhang Abb. 6-3D). Auch nach Veränderung dieses chromosomalen Bereichs wurde bei einer ermittelten CLS von 37 (1n + Ch16 (Disrupt. *myo2*)) Tagen kein Unterschied gegenüber der aneuploiden Kontrolle (1n + Ch16; CLS: 35 Tage) sichtbar, der euploide Stamm (1n) erzielte in diesem Experiment eine maximale Lebensspanne von 11 Tagen (Abb. 3-39E).

Das Fehlen des 7 Kbp großen zweiten Bereichs mit den ORFs der Gene SPCC550.15c, *rec11*<sup>+</sup> und *cig1*<sup>+</sup> verursachte eine Verkürzung der CLS von 30 (1n + Ch16) auf 24 Tage (1n + Ch16 ( $\Delta$ SPCC550.15c bis *cig1*)) gegenüber dem Ch16 Kontrollstamm (Abb. 3-39C). Der Kurvenverlauf verdeutlicht, dass nicht nur die maximale Lebensspanne reduziert wurde, sondern ein stärkerer Abfall der Lebensfähigkeit in der stationären Phase bereits ab Tag 4 (26 % CFUs gegenüber 75 % CFUs beim Ch16 Kontrollstamm) auftrat. Dieses Ergebnis war auch mit einem zweiten Stamm dieses Genotyps reproduzierbar (Daten

nicht gezeigt). Das bedeutet, dass die Anwesenheit dieses chromosomalen Bereichs lebensverlängernd wirkt.



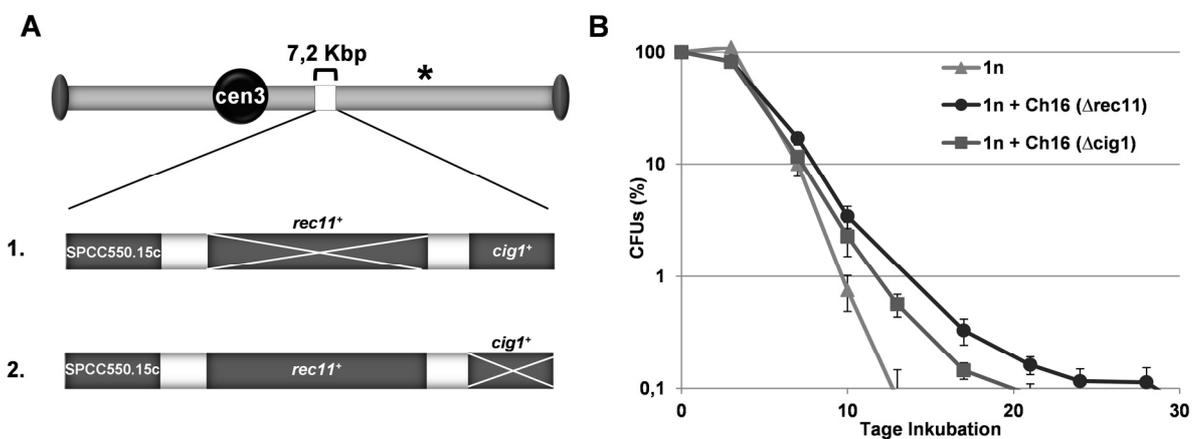
**Abb. 3-39 Ein DNA-Abschnitt mit drei Genen hat einen Effekt auf die Langlebigkeit.**

**A** Dargestellt ist das Minichromosom Ch16 mit dem *ade6-216* Marker (\*Stern) und dem 27 Kbp DNA-Abschnitt (weiß), der die Lebensverlängerung bewirkt. In Vergrößerung sind die 10 darin enthaltenen ORFs und die dazwischen liegenden, nicht kodierenden Bereiche (weiß) abgebildet, darunter die vier durchgeführten Deletionen bzw. die Disruption von *myo2*<sup>+</sup> (Schweifklammern). Haken unter den Schweifklammern: verlängerte CLS; (X): im Vergleich zum CH16 tragenden Stamm verkürzte CLS. *cen3*: Zentromer. **B** Darstellung der CLS des aneuploiden Stamms, bei dem der Abschnitt mit den ORFs von *arp6*<sup>+</sup>, *dfp1*<sup>+</sup> und *vgl1*<sup>+</sup> deletiert wurde (1n + Ch16 (Δ*arp6* bis *vgl1*)), im Vergleich zum aneuploiden und euploiden Kontrollstamm ((1n + Ch16) bzw. (1n)). **C** wie (B), beim aneuploiden Stamm wurde ein Segment mit den ORFs von SPCC550.15c, *rec11*<sup>+</sup> und *cig1*<sup>+</sup> (1n + Ch16 (ΔSPCC550.15c bis *cig1*)) ausgeschaltet. **D** Identisches Experiment wie (B), aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde der Stamm mit dem dritten entfernten Abschnitt (1n + Ch16 (Δ*gep4* bis *nse3*)) separat dargestellt. **E** Wie (B), beim aneuploiden Stamm (1n + Ch16 (Disrupt. *myo2*)) wurde der ORF von *myo2*<sup>+</sup> disruptiert. Fehlerbalken: Standardabweichung. CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

### 3.3.4.3.7 Der *cig1*<sup>+</sup> ORF vermittelt Langlebigkeit

In einem letzten Schritt sollte eine Analyse des Abschnitts mit den ORFs von SPCC550.15c, *rec11*<sup>+</sup> und *cig1*<sup>+</sup> Klarheit darüber verschaffen, ob die teilweise Erhöhung der CLS durch einen einzelnen ORF hervorgerufen wurde. Dazu wurden jeweils einzeln die vollständigen ORFs der Gene *cig1*<sup>+</sup> und *rec11*<sup>+</sup> ohne umgebende Bereiche deletiert (Abb. 3-40A, Anhang Abb. 6-3E und F).

Das Fehlen eines *rec11*<sup>+</sup> ORFs führte zu keiner Reduktion der Ch16 vermittelten Langlebigkeit (Abb. 3-40B). Der Stamm erreichte mit 28 Tagen eine ähnliche CLS wie der Ch16 tragende Stamm (1n + Ch16) in den vorangegangenen Experimenten (Abb. 3-39B-E), während der Kontrollstamm bereits nach 12 Tagen verstarb.



**Abb. 3-40 Die Abwesenheit des *cig1*<sup>+</sup> ORFs reduziert die Ch16 vermittelte Langlebigkeit.**

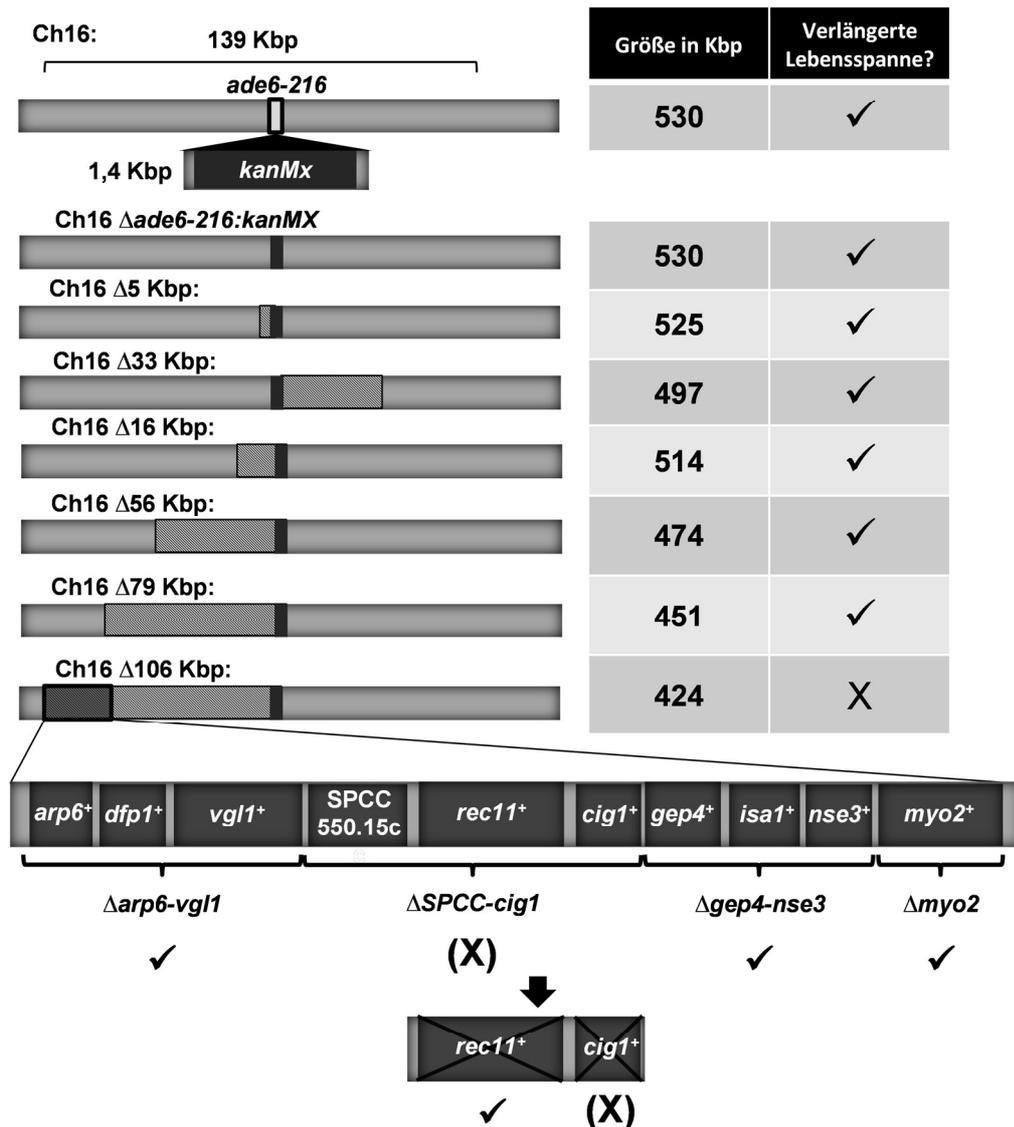
**A** Schema der Deletion einzelner ORFs zur Bestimmung des lebensverlängernden Bereichs. Oben dargestellt ist das Minichromosom Ch16 mit dem Selektionsmarker *ade6-216* (\*Stern) und dem identifizierten 7,2 Kbp großen lebensverlängernden Bereich (weiß). Unten: Maßstabsgetreue Vergrößerung des 7,2 Kbp Bereichs mit Deletion (X) des *rec11*<sup>+</sup> (1.) bzw. *cig1*<sup>+</sup> (2.) ORFs und den dazwischen liegenden, nicht kodierenden Bereichen (weiß). Die ORFs wurden gegen die 1,4 Kbp große *kanMx* Kasette (nicht dargestellt) ausgetauscht. *cen3*: Zentromer. **B** CLS-Kurve der Stämme mit den Ch16 Deletionsvarianten aus (A) im Vergleich zum Kontrollstamm (1n). Fehlerbalken: Standardabweichung. CFUs: Kolonien bildende Einheiten.

Die Abwesenheit des *cig1*<sup>+</sup> ORFs bewirkte eine deutliche Reduktion der CLS auf 20 Tage, die Kurve verläuft zwischen Kontroll- und *rec11*<sup>+</sup> deletiertem Stamm. Der Kurvenverlauf entspricht im Wesentlichen dem in Abb. 3-39B dargestellten Verlauf nach Deletion des Abschnitts mit den Genen SPCC550.15c bis *cig1*<sup>+</sup>. Demnach wird der chromosomale Bereich des *cig1*<sup>+</sup> ORFs für die vollständige Ch16 vermittelte Lebensverlängerung benötigt.

Die wichtigsten Erkenntnisse der durchgeführten CLS-Analysen sind schematisch in Abb. 3-41 zusammengefasst. Abschließend lässt sich festhalten, dass ein chromosomaler Bereich von 106 Kbp auf dem rechten Arm des Minichromosoms Ch16 identifiziert wurde, der überraschenderweise dazu führt, dass endogene Aneuploidie eine lebensverlängernde Wirkung in *S. pombe* verursachen kann. Durch arbeitsintensive Eingrenzung gelang es, unter den 37 ORFs dieses Bereichs den ORF *cig1*<sup>+</sup> zu

identifizieren, nach dessen Deletion die Ch16 vermittelte Langlebigkeit deutlich reduziert wurde. Das evolutionär konservierte Gen *cig1*<sup>+</sup> kodiert für ein B-Typ-Zyclin, das für die effiziente Regulation des G1/S sowie des G2/M Übergangs im Zellzyklus benötigt wird und mit der Zyclin-abhängigen Kinase Cdc2p während der Mitose aktiv ist (Bueno *et al.* 1991; Basi und Draetta 1995). Eine Funktion von *cig1*<sup>+</sup> im Alterungsprozess ist bislang nicht beschrieben.

Dies ist der erste uns bekannte Nachweis dafür, dass eine Aneuploidie für ein endogenes Chromosom lebensverlängernd wirken kann.



**Abb. 3-41 Übersicht der erstellten Minichromosomvarianten und ihre Auswirkung auf die CLS.**

Linke Seite: Illustration des bearbeiteten 189 Kbp Bereichs auf dem Minichromosom Ch16. Die Deletionen erfolgten durch Austausch des *ade6-216* Allels (hellgrau) und dessen angrenzende Bereiche (schraffiert) gegen die 1,4 Kbp große Kanamycin-Resistenzkassette (*kanMX*; dunkelgrau). Die Größe der daraus resultierenden Chromosomvarianten und deren Auswirkung auf die Langlebigkeit sind in der Tabelle rechts aufgeführt. Darunter: Deletionen ohne Austausch gegen das *ade6-216* Allel im lebensverlängernden 27 Kbp DNA Abschnitt und ihr Effekt auf die Langlebigkeit. Unten (Pfeil): Einzeldeletionen der ORFs von *rec11*<sup>+</sup> bzw. *cig1*<sup>+</sup>. Haken: langlebig; X: kurzlebig; (X): Teilweise Reduktion der Ch16 vermittelten Langlebigkeit. Zwischen den ORFs dargestellte hellgraue Bereiche enthalten keine kodierende DNA.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze verfolgt, um den Zusammenhang zwischen Aneuploidie und Alterung näher aufzuklären. Zum einen konnte mit einem neuen Testsystem, bei dem alternde Zellen isoliert und auf ihre Chromosomeninstabilität hin visuell analysiert wurden, erstmals die grundsätzliche Frage bearbeitet werden, in welchem Maße und auf welche Weise Aneuploidie mit steigendem Alter zunimmt. Zum anderen wurde mit Hilfe zusätzlicher exogener Chromosomen (YACs, *S. cerevisiae*) bzw. eines endogenen Minichromosoms (Ch16, *S. pombe*) der Einfluss von Aneuploidie auf den replikativen und chronologischen Alterungsprozess bestimmt.

### 4.1 Der Anstieg von Aneuploidie mit zunehmendem Alter in *S. cerevisiae*

#### 4.1.1 Ein Testsystem zur Überprüfung der Aneuploidie in alternden Zellen

Die Genauigkeit der Weitergabe eines YACs mit zunehmendem replikativen Alter von *S. cerevisiae* Zellen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe meines neuen Testsystems untersucht, welches zwei etablierte Methoden verbindet:

1. Die Isolierung von Zellen unterschiedlichen Alters.
2. Die visuelle Analyse von Chromosomenverlusten und -fehlverteilungen.

Die erste Methode zur Gewinnung und Analyse von biotinylierten Zellen unterschiedlichen replikativen Alters im großen Maßstab wurde bereits in einigen Studien erfolgreich angewendet: Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass replikativ alte Zellen ihre Paarungsfähigkeit verlieren (Smeal *et al.* 1996) und eine Erhöhung von Chromosomenfehlverteilungen in der Meiose, ähnlich den menschlichen Keimzellen, mit steigendem replikativen Alter in *S. cerevisiae* stattfindet (Boselli *et al.* 2009). Die Sortierung ist dabei noch effizienter, als es aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Analyse in dieser Arbeit den Anschein hat: drei Viertel der isolierten Zellen wiesen nach Streptavidin-APC-Färbung eine biotinylierte Oberfläche auf, doch in einer deutlich sensitiveren FACS (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung) Analyse zeigten über 94 % der sortierten Zellen ein Fluoreszenzsignal (Sven-Boris Heick<sup>2</sup>, persönliche Mitteilung).

---

<sup>2</sup> Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland

Die Sortierungsmethode wurde in dieser Arbeit mit der zweiten Methode, dem YAC-System, kombiniert, um die Chromosomenstabilität in alternden Zellen bestimmen zu können: Sortierte, YAC-tragende Mutterzellen eines spezifischen Alters wurden auf Platten ausgebracht, auf denen sie Kolonien bildeten. Chromosomenverluste oder Fehlverteilungen während des ersten Zellzyklus auf der Platte konnten anhand der Entstehung gefärbter Sektoren in der Kolonie direkt nachgewiesen werden (Hieter *et al.* 1985). Die Verlustrate des YACs lag bei jungen wildtypischen Zellen bei  $5 \times 10^{-4}$  und ist damit etwa um den Faktor 25-50 höher als bei endogenen Hefechromosomen (Hartwell *et al.* 1982; Hartwell und Smith 1985). Das YAC-System ist somit sehr sensibel für die Erkennung von Chromosomeninstabilität, es offenbart eine ansonsten möglicherweise schwer erkennbare Zunahme der Fehler in der Genauigkeit der Chromosomenweitergabe mit zunehmendem Alter. Die zweite Methode wurde bisher in zahlreichen Studien zur Bestimmung von Chromosomeninstabilität, in dieser Arbeit jedoch erstmals zur Aufklärung eines Alterungsprozesses eingesetzt (Yuen *et al.* 2007; Stirling *et al.* 2011). Die Möglichkeit, im Gegensatz zur herkömmlichen Analyse von Mutterzellen mittels Mikromanipulator eine sehr große Anzahl von Zellen eines spezifischen replikativen Alters isolieren und dabei gleichzeitig auf einfache Weise die Genauigkeit der Chromosomenweitergabe in einem beliebigen Stammhintergrund überprüfen zu können, qualifiziert dieses neu etablierte System zur Aufklärung der Prozesse, die zu genomischer Instabilität im Alter führen.

#### **4.1.2 Die Chromosomeninstabilität nimmt mit dem replikativen Alter der Hefezelle linear zu**

Es konnte erstmals *in vivo* in wildtypischen Zellen der Prozess verfolgt werden, mit dem es zu einer Zunahme von Aneuploidie im steigenden Alter kommt. Dabei stellte sich heraus, dass die Aneuploidie in einem wildtypischen diploiden Stamm reproduzierbar mit steigendem Alter in linearem Maß zunimmt, in den ältesten Zellen traten Chromosomeninstabilitäten dabei 4 mal häufiger auf als in sehr jungen Zellen. Ein linearer Anstieg war auch für einen wildtypischen haploiden Stamm sichtbar, was auf ein von der Ploidie unabhängiges Alterungsphänomen schließen lässt.

Über die Zunahme von genomischer Instabilität in alternden, sich mitotisch teilenden Hefezellen war bislang wenig bekannt. Durch Stammbaumanalysen wurde eine Zunahme des Verlusts der Heterozygotie („Loss Of Heterozygosity“, LOH) in den Nachkommen beobachtet, die im hohen Alter von der Mutter generiert wurden (McMurray und Gottschling 2003; McMurray und Gottschling 2004). LOH beschreibt den Verlust eines von zwei unterschiedlichen Allelen eines homologen Chromosomenpaars, der durch

Rekombination, Chromosomenverlust, Mutation oder Konversion verursacht werden kann. LOH tritt fast ausschließlich in Tochterzellen auf, die nach der 25. Zellteilung der Mutter entstehen. Die Frequenz von LOH-Ereignissen bleibt danach konstant, und das Auftreten nach 25 Teilungen ist unabhängig von der maximalen RLS der Mutterzellen (McMurray und Gottschling 2004). Die beobachtete genomische Instabilität entsteht in den Tochterzellen durch mitotische, homologe Rekombinationsereignisse und nicht durch Chromosomenfehlverteilungen, führt also nicht zu Aneuploidie (McMurray und Gottschling 2003).

Dieser Alterungsphänotyp unterscheidet sich deutlich von dem von mir beschriebenen Anstieg der Chromosomeninstabilität mit dem Alter. Zum einen ist die Wahrscheinlichkeit, dass die beobachtete Halbsektierung in dieser Arbeit teilweise durch homologe Rekombinationsereignisse entstehen könnte, äußerst gering, da das YAC zu 97 % aus Human-DNA besteht, die keine größeren Homologiebereiche zu den endogenen Hefechromosomen aufweist (Burke *et al.* 1987; Sears *et al.* 1995). Zum anderen unterscheidet sich der vom jungen Alter an kontinuierliche, lineare Anstieg der Chromosomeninstabilität deutlich von den erst im hohen Alter auftretenden LOH-Ereignissen. Es bleibt die Frage, warum ein linearer Anstieg von Chromosomeninstabilität in den Arbeiten von McMurray und Gottschling nicht beobachtet wurde. Das liegt vermutlich darin begründet, dass im Vergleich zum YAC sehr viel stabilere endogene Chromosomen untersucht wurden und zudem durch die aufwendige Stammbaumanalyse nur eine geringe Anzahl von Zellen analysiert werden konnte. Darüber hinaus wurde mit einem deutlich langlebigeren Stamm gearbeitet, was die Vergleichbarkeit erschwert.

Der von mir beobachtete lineare Anstieg der Aneuploidie in *S. cerevisiae* bestätigt die wenigen Studien in höheren Eukaryoten, in denen ebenfalls ein linearer Anstieg von Aneuploidie mit zunehmendem Alter festgestellt wurde. Beispielsweise wurden Metaphasen weißer Milzblutzellen von wildtypischen Mäusen unterschiedlichen Alters analysiert, und es wurde eine lineare Zunahme von CIN mit dem Alter der Mäuse festgestellt (Lushnikova *et al.* 2011). Die Anzahl aneuploider Zellen stieg stetig auf ca. den doppelten Wert (20 %) im beobachteten Zeitraum von 2 bis 14 Monaten an. Ein linearer Anstieg der Aneuploidie im Alter wurde auch für den Menschen beschrieben, allerdings nicht in Bezug auf die Autosomen, für die widersprüchliche Daten existieren: In Lymphozyten, deren Metaphase karyogenetischer hinterotypisiert wurde, konnte kein Anstieg autosomaler Aneuploidien mit zunehmendem Alter beobachtet werden (Ford und Russell 1985; Nowinski *et al.* 1990). In Interphase-Hautfibroblastenzellen wiesen jedoch 6 von 15 getesteten Autosomen eine erhöhte Aneuploidie im Alter auf (Mukherjee und Thomas 1997). Auf 4 dieser 6 Chromosomen befinden sich Gene, die mit dem

Alterungsprozess assoziiert werden. Ob der Anstieg linear ist, kann nicht beurteilt werden, da die Zellen nur an zwei Zeitpunkten untersucht wurden.

In mehreren Studien wurde jedoch ein linearer Anstieg der Frequenz von Gonosomeninstabilität mit zunehmendem Alter nachgewiesen (Nowinski *et al.* 1990; Guttenbach *et al.* 1995). Das Einsetzen und die Stärke des Anstiegs werden höchstwahrscheinlich auch hormonell mitbestimmt. Die Frequenz einer X-Chromosom Hypoploidie bei Frauen liegt deutlich über der des Y-Chromosoms bei Männern. Bei Frauen wurde ein linearer Anstieg bis zum 50. Lebensjahr, bei der im Schnitt die Menopause einsetzt, beobachtet, danach jedoch nahmen Chromosomenverluste stärker zu (Horsman *et al.* 1987; Guttenbach *et al.* 1995). Bei Männern setzt der lineare Anstieg der Y-Hypoploidie erst nach der Pubertät ein und bleibt bis ins hohe Alter konstant, wo etwa 5-mal mehr Zellen Y-Hypoploidie aufweisen (Guttenbach *et al.* 1995). Es existieren allerdings auch Studien, in denen ein Anstieg von Y-Chromosom Instabilität mit dem Alter nicht beobachtet wurde (Jarvik *et al.* 1976; Nowinski *et al.* 1990; Percy *et al.* 1993). Die widersprüchlichen Ergebnisse werden auf große Unterschiede im experimentellen Ablauf sowie eine geringe Stichprobenzahl zurückgeführt (Guttenbach *et al.* 1995).

Als Folge von Chromosomenfehlverteilungen entstehen in menschlichen Zellen sog. Mikrozellkerne, die das fehlverteilte Chromosom oder Chromosomenstück enthalten (Surralles *et al.* 1996). Interessanterweise liegt die Frequenz dieser Mikrozellkerne, die jedes der 46 menschlichen Chromosomen enthalten können, bei sehr alten Menschen um den Faktor 3-4 über dem von Neugeborenen und Kindern, was sich mit den Werten des Anstiegs von Aneuploidie im Wildtyp in dieser Arbeit deckt (Fenech und Morley 1985; Guttenbach *et al.* 1994).

Es muss kritisch angemerkt werden, dass die genannten Studien die Zusammenhänge zwischen zunehmender Aneuploidie und Alter lediglich deskriptiv darstellen. Der Ploidiezustand der Zellen wurde untersucht und nicht der Prozess, der zu Aneuploidie führt. Zudem ermöglicht die in den Studien durchgeführte aufwendige mikroskopische Auswertung der Karyotypen im Gegensatz zu der in dieser Arbeit verwendeten Methode nur die Analyse einer begrenzten Anzahl von Zellen, was die widersprüchlichen Ergebnisse besonders in Bezug auf autosomale Instabilität erklärt.

### **4.1.3 Chromosomenverlust ist die Hauptursache für Aneuploidie und ihre Zunahme im Alter**

In dieser Arbeit wurde die Frequenz von Aneuploidieereignissen mit zunehmendem Alter bestimmt und dabei unterschieden, ob das Chromosom fehlverteilt oder verloren wurde. Dabei stellte sich heraus, dass in wildtypischen Zellen (und im Großteil der generierten

Deletionsmutanten) Chromosomenverlustereignisse (sichtbar durch eine 1:0 YAC-Segregation) 4- bis 9-mal häufiger auftraten als der Zugewinn und Verlust von Chromosomen durch eine Fehlsegregation (2:0 YAC-Segregation). Auch der Anstieg der Chromosomeninstabilität mit dem Alter wurde im Wesentlichen durch Chromosomenverluste hervorgerufen.

Diese Beobachtung ist nicht hefespezifisch. Beim Menschen wurden für alle 46 Chromosomen in Metaphasen von Lymphozyten Hypoploidien deutlich häufiger beobachtet als Hyperploidien (Nowinski *et al.* 1990). Auch im Gehirn gesunder Menschen wurden monosomische Zellen (Auto- und Gonosomen) 2 bis 3-mal häufiger festgestellt als trisomische Zellen (Iourov *et al.* 2009). Diese Ergebnisse stimmen mit zahlreichen Studien überein, in denen ein erhöhter Chromosomenverlust der Gonosomen, insbesondere des X-Chromosoms, in Lymphozyten und Hautfibroblasten mit zunehmendem Alter beschrieben wurde (Jacobs *et al.* 1963; Neurath *et al.* 1970; Fitzgerald und McEwan 1977; Horsman *et al.* 1987; Hando *et al.* 1994). Auch für bestimmte Autosomen wurde beim Menschen ein stärkerer Anstieg von Monosomien mit dem Alter festgestellt (Mukherjee und Thomas 1997). In einer neuen Studie wurden in Mäusen Chromosomengewinne insgesamt seltener festgestellt und nahmen im Gegensatz zu Verlusten ebenfalls nur geringfügig mit dem Alter zu (Lushnikova *et al.* 2011). Bislang wird vermutet, dass die Chromosomenverluste beim Menschen und bei der Maus aus Fehlern in der Replikation, der DNA-Reparatur oder apoptotischen Signalwegen resultieren (Feng *et al.* 2007; Gorbunova *et al.* 2007; Lushnikova *et al.* 2011). Meine im folgenden Kapitel diskutierten Daten zeigen jedoch, dass bei der Hefe ebenfalls Fehler in Prozessen der Mitose vorwiegend Chromosomenverluste verursachen.

Treten Chromosomenverluste häufiger auf, weil sie weniger schädlich für einen Organismus sind? Diese Aussage gilt vermutlich nicht grundsätzlich, denn es ist wahrscheinlich, dass ein Chromosomenverlust einen sich entwickelnden oder einzelligen Organismus vor größere Probleme stellt als ein Chromosomenzugewinn, während einzelne monosomische Zellen in ausdifferenzierten Geweben und im erwachsenen Organismus bestehen können. Das zeigt sich allein darin, dass Monosomien (bis auf die Monosomie X) tödlich für einen sich entwickelnden menschlichen Embryo sind. Beim Menschen korreliert die Verlustrate eines Autosoms negativ mit dessen Größe, was damit begründet wird, dass der Verlust einer größeren Anzahl von Genen für eine Zelle nur schwer zu kompensieren ist (Neurath *et al.* 1970; Nicholls *et al.* 1978; Wenger *et al.* 1984). Das YAC ist diesbezüglich ein Sonderfall, da die Hefezelle es verlieren kann, ohne dass eine Veränderung der Gendosis (mit Ausnahme der Selektionsmarker) auftritt. Ähnliches gilt für die hohe Verlustrate des X-Chromosoms mit dem Alter bei Frauen: eines

der beiden X-Chromosomen ist als Barr-Körperchen in jeder Zelle größtenteils inaktiv. Ein Fehlen der inaktiven Kopie ändert demnach die Gendosis nur geringfügig und wird daher toleriert (Wojda und Witt 2003).

Der quantitative Paarungsversuch zur Bestimmung der Verlustrate von Chromosom III in dieser Arbeit zeigt jedoch, dass bei Verlust eines endogenen Chromosoms *S. cerevisiae* Zellen durchaus überleben und sich teilen können. Es ist publiziert, dass dies ebenso für die übrigen 15 *S. cerevisiae* Chromosomen gilt (Reid *et al.* 2008). Allerdings gibt dieser Versuchsansatz im Gegensatz zum YAC-System keinen Aufschluss darüber, ob das Fehlen eines Chromosoms auf einem Chromosomenverlust (1:0) oder einer Fehlverteilung (2:0) beruht.

#### **4.1.4 Mehrere Prozesse im Zellzyklus sind für die Zunahme von Aneuploidie mit dem replikativen Alter verantwortlich**

Durch hetero- und homozygote Deletionen einzelner im Chromosomenzyklus involvierter Gene wurden diploide Stämme generiert, deren Chromosomeninstabilität mit zunehmendem Alter Aufschluss über den oder die Prozesse geben sollte, die im wildtypischen Stamm den linearen Anstieg von Chromosomenverlusten verursachen. Dies schloss Gene des Spindelkontrollpunkts (*MAD2*, *BUB3*), des Kinetochors (*AME1*, *MCM21*), der Kinetochor-Mikrotubulus Bindung (*BIM1*), des Kohäsinkomplexes (*SMC1*), des Spindelpolkkörpers (*SPC97*) und der Replikationsmaschinerie (*MCM2*, *MCM7*) ein. Somit wurden entscheidende Prozesse des Chromosomenzyklus berücksichtigt.

Es war unklar, in welchem Maße sich das Fehlen eines an dem Anstieg mit dem Alter beteiligten Gens auf die Chromosomenstabilität auswirkt. Es schienen mehrere Szenarien vorstellbar. Das System für eine exakte Chromosomenweitergabe, welches im Alter normalerweise langsam an Funktionalität verliert, könnte durch das Fehlen des Genprodukts zusammenbrechen. Das würde bereits in jungen Zellen zu verstärkter Aneuploidie führen, ein Anstieg mit dem Alter könnte ausbleiben oder geringer ausfallen. Als weitere Möglichkeit könnte das Genprodukt zwar in dem Alterungsprozess involviert, jedoch nicht alleine für den Anstieg verantwortlich sein. Es ist Teil eines redundanten Systems: erst das Fehlen weiterer Gen(e) dieses Systems verhindert eine genaue Chromosomenweitergabe. Dies nachzuweisen ist schwierig, da ein Unterschied zum Wildtyp nur gering ist oder erst nach der Deletion weiterer Gene sichtbar würde. Denkbar wäre auch, dass das Fehlen eines Genprodukts in jungen Zellen durch redundante Proteine/Prozesse ausgeglichen werden kann und daher die Chromosomenstabilität dem Wildtyp entspricht. Ein Funktionsverlust dieser ausgleichenden Prozesse in alten Zellen

könnte zu einer exponentiellen Zunahme der Chromosomenverluste im Gegensatz zum linearen Anstieg beim Wildtyp führen.

In allen Szenarien muss die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass sich unter Umständen nur eine homozygote Deletion des Gens in diploiden Zellen phänotypisch auswirkt, während eine heterozygote Deletion kompensiert wird oder nur leichte Defekte hervorruft.

#### 4.1.4.1 Die Auswirkungen heterozygoter Deletionen von Genen des Chromosomenzyklus

Auffällig war, dass das Fehlen einer Genkopie bei den von mir untersuchten Genen mit Ausnahme von sehr alten  $\Delta bub3/BUB3$  Zellen und den Replikationsmutanten keinen signifikanten Unterschied in der Chromosomeninstabilität und ihrem Anstieg mit dem Alter gegenüber dem Wildtyp verursachte. Der Verlust einer Kopie führt nicht zu Haploinsuffizienz, die verringerte Gendosis kann auch im hohen Alter sehr gut kompensiert werden. Das ist insofern bemerkenswert, als für die heterozygot deletierten Gene *SMC1* (Kohäsinkomplex) und *SPC97* (Spindelpolkkörper) Haploinsuffizienz in Bezug auf die Wachstumsfähigkeit beschrieben wurde (Deutschbauer *et al.* 2005). Auch ein solcher Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyp wurde nicht beobachtet, es zeigte sich nach heterozygoter Deletion von *SMC1* lediglich eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber TBZ. Erklärbar ist die fehlende Haploinsuffizienz durch die große genetische Divergenz zwischen *S. cerevisiae* Laborstämmen, was sich beispielsweise darin zeigt, dass sich typische wildtypische Stämme bereits in ihrer durchschnittlichen RLS um bis zu 33 % unterscheiden (Steffen *et al.* 2009). Anhand dieser Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass Fehlfunktionen der Kohäsion oder des Spindelpolkkörpers an der Zunahme der Aneuploidie im Alter beteiligt sind. Einen näheren Aufschluss über die Beteiligung dieser Prozesse könnten Mutanten mit reduzierter Proteinfunktion für diese oder andere an der Kohäsion/dem Spindelaufbau beteiligte Proteine liefern.

Die hohe YAC-Verlustrate bei der heterozygoten *MCM2* Replikationsmutante konnte im Gegensatz zu anderen Stämmen mit erhöhter YAC-Instabilität für das endogene Chr. III nicht bestätigt werden, da dieses stabil vererbt wurde. Die in diesem Stamm beobachtete Aneuploidie ist daher YAC-spezifisch. Das trifft wahrscheinlich auch auf eine weitere Beobachtung zu: Sowohl in der *MCM2* als auch in der *MCM7* Deletionsmutante wurde eine massive Erhöhung weißer und weiß sektorierter Kolonien mit 2 YAC-Kopien pro Zelle festgestellt, was bedeutet, dass das YAC dort redupliziert oder fehlsegregiert wurde. Weitergehende Analysen sind nötig, um die Beteiligung der Replikation an der Zunahme von Aneuploidie im Alter aufzuklären. Dabei sollten auch der ORC („Origin Recognition Complex“) als Teil des Prä-Replikationskomplexes und die DNA-Reparaturmaschinerie,

die eng mit der Replikation verknüpft ist und mit dem Alter in ihrer Funktionalität abnimmt, einbezogen werden. Sowohl dem ORC als auch zahlreichen Reparaturproteinen wird eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Chromosomenstabilität zugeschrieben (Wang *et al.* 2005; Bhaskara *et al.* 2007; Gorbunova *et al.* 2007; Ben-Aroya *et al.* 2010; Sheltzer *et al.* 2011).

Die starke Erhöhung der Chromosomeninstabilität in alten  $\Delta bub3/BUB3$  Zellen deckt sich mit einer Studie in Mäusen, in der gezeigt wurde, dass eine Reduktion der Mengen des homologen Spindelkontrollpunktproteins Bub3 und des ebenfalls im Kontrollpunkt involvierten Rae1 Proteins (homolog zu Gle2 in *S. cerevisiae*) mit erhöhter Aneuploidie und vorzeitiger Alterung einhergehen (Baker *et al.* 2006). Zudem wurde ein den  $\Delta bub3/BUB3$  Zellen vergleichbares Muster im Verlauf des Anstiegs von Aneuploidie mit zunehmendem Alter für transgene Mäuse gezeigt (Lushnikova *et al.* 2011): In jungen Mäusen war der Anteil aneuploider Zellen in der Mutante und im Wildtyp gleich. Bei den transgenen Mäusen, in denen Mdm2, ein an der DNA Reparatur beteiligter Verursacher von CIN, überexprimiert wurde, kam es jedoch mit steigendem Alter zu einer exponentiellen Zunahme aneuploider Zellen, während im Wildtyp der Anstieg linear verlief. Daher implizieren meine Daten, dass das *BUB3* Gen an der Zunahme der Aneuploidie im Alter in *S. cerevisiae* beteiligt ist.

#### 4.1.4.2 Die Auswirkungen homozygoter Deletionen von Genen des Chromosomenzyklus

Die vollständige Abwesenheit von bestimmten Genen (*MAD2*, *MCM21*, *BUB3*, *BIM1*) des Chromosomenzyklus durch homozygote Deletion verursachte in allen Fällen eine massive Erhöhung (Faktor 13 bis 28 bei G0) der YAC-Instabilität gegenüber dem Wildtyp schon in jungen Zellen. Die Analyse des Verlusts von Chr. III in diesen Stämmen bestätigte diesen Trend und machte deutlich, dass es sich nicht um eine YAC-spezifische Beobachtung handelt. Die Rangfolge in Bezug auf eine Erhöhung der Chr. III Instabilität in den Mutanten deckte sich exakt mit der für das YAC ermittelten Reihenfolge, was die Aussagekraft beider Befunde untermauert. Allerdings muss beachtet werden, dass bei der Bestimmung der Verlustrate von Chr. III mittels des quantitativen Paarungsversuchs eine wildtypische Paarungsfähigkeit der eingesetzten Zellen angenommen wurde, was aufgrund der verringerten Lebensfähigkeit dieser Mutanten nicht realistisch ist. Die Deletion eines direkt am Prozess der Paarung beteiligten Gens wie *BIM1* kann zudem die Verlustrate verändern, und auch Meiosedefekte, die bei homozygoter Deletion der Gene *MAD2*, *BUB3* oder *BIM1* beschrieben wurden und dazu führen könnten, dass eine Paarung mit den Testerstämmen trotz eines Chr. III Verlusts nicht erfolgt, flossen nicht in die Berechnungen ein (Enyenihi und Saunders 2003; Tsuchiya *et al.* 2011). Die Chr. III

Verlustrate muss daher als Ergänzung zu den aussagekräftigen YAC-Befunden angesehen werden.

Interessanterweise ging die erhöhte Chromosomeninstabilität der homozygoten Deletionsstämme nicht mit einer erhöhten Steigerung von Aneuploidieereignissen im Alter einher. Eine Normierung der Chromosomeninstabilität auf die Basis 1 machte deutlich, dass der lineare Anstieg in allen homozygoten Mutanten dem Wildtyp sehr ähnlich war. Geht man von der Annahme aus, dass eine direkte Beteiligung eines Gens an der Zunahme von Aneuploidie im Alter sich darin äußert, dass dessen Fehlen in einem eher exponentiellen als linearen Anstieg resultiert, so scheinen die deletierten Gene nicht oder nur in Kombination mit weiteren Genen diesen altersbedingten Anstieg auszulösen. Insbesondere bei den sehr kurzlebigen *BUB3* und *BIM1* Deletionsstämmen ist es allerdings möglich, dass ein später exponentieller Anstieg nicht sichtbar wird, da Zellen maximal bis Generation 13 ( $\Delta bub3/\Delta bub3$ ) bzw. 7 ( $\Delta bim1/\Delta bim1$ ) isoliert werden konnten. Die Häufigkeit von Chromosomeninstabilität korrelierte in den homozygoten Deletionsstämmen und im Wildtyp stark mit einer reduzierten RLS. Von einem Korrelationskoeffizienten lassen sich zwar keine Kausalitäten ableiten, doch aufgrund der in der Literatur beschriebenen nachteiligen Auswirkungen von Aneuploidie auf die Lebensspanne ist es wahrscheinlich, dass die massive Chromosomeninstabilität, die beispielsweise im *BIM1* Deletionsstamm beobachtet wurde, die RLS reduziert und einen nachteiligen Einfluss auf die Zellfitness nimmt. Beispielsweise reduzieren in diploiden *S. cerevisiae* Zellen nahezu alle Trisomien die CLS und verursachen weitere Chromosomenverluste, was eine zusätzlichen Verringerung der Fitness hervorruft (Torres *et al.* 2007; Sheltzer *et al.* 2011).

#### 4.1.4.3 Chromosomenfehlverteilungen in Deletionsmutanten

Chromosomenverluste und nicht Fehlverteilungen waren die Hauptursache für einen Anstieg von Aneuploidie mit dem Alter im Wildtyp (Kap. 4.1.3), jedoch wurde auch ein leichter Anstieg von Chromosomenfehlverteilungen mit zunehmendem Alter im Wildtyp festgestellt. Die heterozygoten Deletionsmutanten unterschieden sich im Auftreten von Chromosomenfehlverteilungen nicht signifikant vom Wildtyp mit Ausnahme des  $\Delta bub3/BUB3$  Stamms (und  $\Delta mcm2/MCM2$ , der aufgrund der YAC-Spezifität nicht weiter berücksichtigt wurde), bei dem Chromosomenfehlverteilungen mit zunehmendem Alter signifikant anstiegen.

Nach homozygoter Deletion von Genen des Chromosomenzyklus wurde jedoch in allen Fällen ein signifikant erhöhtes Auftreten von Fehlverteilungen beobachtet, und auch der Anteil rot/weißer (also aus einer 2:0 Fehlsegregation hervorgegangener Kolonien) unter allen halbsektorierten Kolonien war im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. Das ist nicht

verwunderlich, da den vier homozygot deletierten Genen (*MAD2*, *MCM21*, *BUB3*, *BIM1*) eine enorme Bedeutung für eine fehlerfreie Chromosomensegregation zugeschrieben wird (Daniel *et al.* 2006; Yuen *et al.* 2007; Tsuchiya *et al.* 2011). Interessant ist allerdings, dass im *MCM21* und *BUB3* deletierten Stamm Chromosomenfehlverteilungen im Gegensatz zum Wildtyp auch mit steigendem Alter signifikant zunahm. Daraus lässt sich schließen, dass die Integrität des Kinetochors (Mcm21) und des Spindelkontrollpunkts (Bub3) während des Alterungsprozesses für eine Aufrechterhaltung der Stabilität in der mitotischen Chromosomensegregation unerlässlich sind. Vermutlich ist auch die Kinetochor-Mikrotubulus-Verknüpfung entscheidend daran beteiligt, denn im homozygoten *BIM1* Deletionsstamm beruhte in jungen Zellen die Hälfte der Halbsektorientierungsereignisse auf Chromosomenfehlverteilungen. Zudem interagiert *BIM1* genetisch mit *MCM21* und *BUB3* (Tong *et al.* 2004; Collins *et al.* 2007). Ein möglicher Anstieg mit dem Alter konnte aufgrund der geringen RLS dieses Stammes nicht nachvollzogen werden.

Es handelt sich bei den untersuchten Prozessen des Chromosomenzyklus um redundante Systeme, was bedeutet, dass der teilweise Ausfall einer Komponente durch heterozygote Deletionen in den meisten Fällen phänotypisch nicht sichtbar wird. Eine Variation im experimentellen Ablauf würde es ermöglichen, auch die Funktion für die Chromosomenstabilität im Alter von essentiellen Genen wie *MCM2*, *MCM7*, *AME1*, *SMC1* oder *SPC97* und von Genen wie *BIM1*, die bei vollständigem Verlust einen zu starken Phänotyp zeigen, genauer zu bestimmen: Ein regulierbarer Promotor könnte diesen Genen vorgeschaltet werden, um während des replikativen Alterungsprozesses eine definiert reduzierte Transkription oder Überexpression dieser Gene ermöglichen. Dazu eignet sich beispielsweise das *tetO*-System, bei dem der *tetO* Promotor durch Zugabe von Doxzyklin reguliert werden kann (Belli *et al.* 1998; Yen *et al.* 2003).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Funktionsverlust mehrerer Prozesse des Chromosomenzyklus dazu führt, dass mit zunehmendem replikativen Alter ein linearer Anstieg von Chromosomeninstabilität, insbesondere von Chromosomenverlusten, ausgelöst wird. Die Rolle der Replikation und Kohäsion im altersabhängigen Anstieg von Aneuploidie ist unbekannt, Chromosomenverluste könnten zum Teil auf nicht oder fehlerhaft replizierte Chromosomen sowie unkorrekt oder nicht verbundene Schwesterchromatiden zurückzuführen sein. Das Mcm21 Kinetochorprotein (Kinetochor) wird wie das Spindelkontrollpunktprotein Bub3 zur Verhinderung von Fehlsegregationen mit zunehmendem Alter benötigt. Der starke Anstieg der Chromosomenverluste mit hohem Alter beim heterozygot deletierten *BUB3* Stamm zeigt, dass dieses Gen für die Verhinderung altersabhängiger Chromosomeninstabilität von enormer Bedeutung ist.

## 4.2 Der Einfluss exogener Chromosomen (YAC) auf die replikative Lebensspanne von *S. cerevisiae*

Die Frage, ob die reine Anwesenheit eines zusätzlichen Chromosoms die Lebensspanne beeinflussen kann, wurde mit Hilfe von YACs beantwortet, die zu 97 % aus Human-DNA bestehen (Sears *et al.* 1992; Sears *et al.* 1995). Während die reine Erhöhung der chromosomalen Last durch YACs die RLS nicht beeinträchtigte, übte einer der Selektionsmarker, das *ochre*-Suppressorgen *SUP11*, einen massiven Einfluss auf die Stresssensitivität und die RLS haploider Hefezellen aus. Somit verursachte ein Gendosisseffekt und nicht eine Erhöhung chromosomaler Last *per se* eine Verkürzung der RLS.

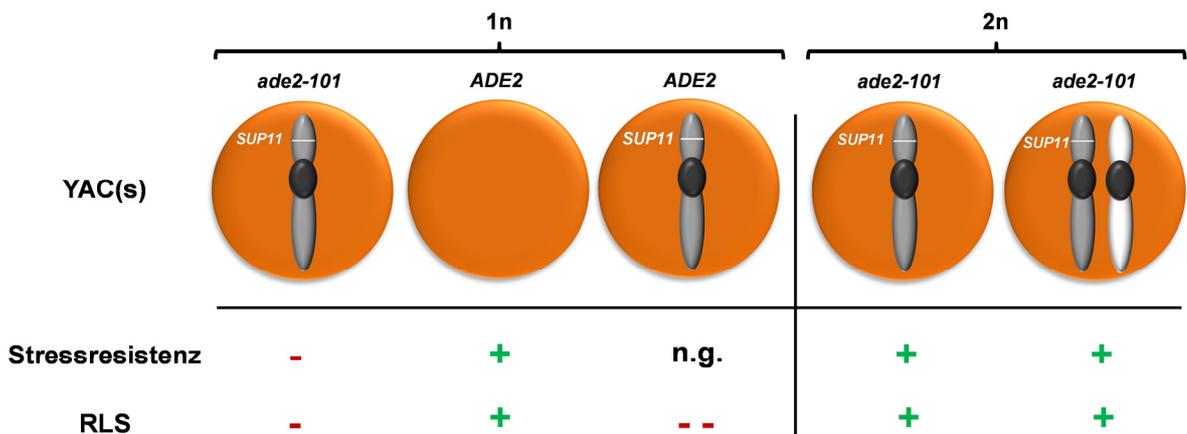
### 4.2.1 Die Expression von *SUP11* auf dem YAC verkürzt die RLS und erhöht die Stresssensitivität eines haploiden Hefestamms

Die Anwesenheit eines bestimmten YACs (Y (U/T/S)) reduzierte die RLS eines haploiden Stamms um 30 % und erhöhte die Stresssensitivität gegenüber bestimmten exogenen Stressoren (Abb. 4-1). Diese Phänotypen wurden nicht durch die reine Anwesenheit des YACs, sondern durch das auf dem YAC kodierte *ochre*-Suppressorgen *SUP11* verursacht.

Im verwendeten haploiden Stamm vermittelt das *ochre*-Suppressorgen *SUP11* Adeninprototrophie durch Suppression des *ade2-101<sup>ochre</sup>* Allels. Für haploide *S. cerevisiae* Zellen wurde kürzlich gezeigt, dass eine Deletion des *ADE2* Gens (oder bestimmter anderer Gene der *de novo* Purinbiosynthese) die CLS verlängert, bzw. Adeninprototrophie die CLS verkürzt (Matecic *et al.* 2010). Es war daher vorstellbar, dass auch die RLS durch die *SUP11* vermittelte Adeninprototrophie verkürzt werden könnte. Dieser Verdacht bestätigte sich jedoch nicht, da die RLS eines Stammes mit wildtypischem *ADE2* Gen, der kein YAC trug, im Vergleich zu einem ansonsten isogenen Stamm mit *ade2-101<sup>ochre</sup>* Allel nicht verkürzt wurde (Abb. 4-1). Demnach muss die Expression des *ochre*-Suppressorgens *SUP11* einen weiteren, schädlichen Einfluss auf den Zellmetabolismus haploider Zellen ausüben.

Es ist publiziert, dass das *ochre*-Suppressorgen *SUP11* in einer hohen Kopienzahl letal wirkt (Hieter *et al.* 1985). Zwei Kopien des *ochre*-Suppressors (zusätzlich zum wildtypischen *SUP11* Gen) reichen zudem aus, um Meiose I Fehlsegregationen in diploiden Hefezellen auszulösen und so die Lebensfähigkeit der Sporen zu reduzieren (Louis und Haber 1989). 4 von 5 der dort getesteten endogenen Chromosomen wurden

durch die Anwesenheit des *ochre*-Suppressorgens *SUP11* signifikant häufiger fehlverteilt. Dabei war es unerheblich, auf welchem Chromosom *SUP11* lokalisiert war. Die Genauigkeit der mitotischen Chromosomensegregation wurde durch *SUP11* jedoch nicht beeinträchtigt. Es wird vermutet, dass die toxische Wirkung von *SUP11* durch fehlerhafte Proteine verursacht wird, die durch die Überlesung des wildtypischen Stoppkodons bei der Translation entstehen (Hieter *et al.* 1985; Kitada *et al.* 1996). Im Falle der meiotischen Fehlsegregationen betrifft dies höchstwahrscheinlich Proteine, die in der Chromosomenpaarung, Rekombination oder Segregation involviert sind (Louis und Haber 1989).



**Abb. 4-1 Die Auswirkungen der Anwesenheit eines *SUP11* enthaltenden YACs und Adeninprototrophie auf Stressresistenz und RLS in haploiden und diploiden *S. cerevisiae* Zellen.**

Schematisch dargestellt sind haploide (1n) und diploide (2n) *S. cerevisiae* Zellen (braun), die ein, kein oder zwei YAC(s) (hellgrau, mit Zentromer, (dunkelgrau)) tragen sowie entweder das mutierte *ade2-101* Allel oder das wildtypische *ADE2* Gen enthalten. Die ermittelten Auswirkungen der Anwesenheit eines YACs mit dem *ochre*-Suppressorgen *SUP11* auf Stressresistenz und RLS sind darunter angegeben. Ein YAC mit *SUP11* verringert (-) in einem haploiden Hefestamm mit *ade2-101* Allel die Stressresistenz und RLS, während Adeninprototrophie alleine (*ADE2* ohne YAC) die wildtypische Stressresistenz und RLS haploider Zellen nicht beeinflusst (+). Trägt der haploide Stamm neben dem *SUP11* YAC das wildtypische *ADE2* Gen, wird die RLS stärker reduziert (- -). In diploiden Hefezellen mit *ade2-101* Allel haben weder ein *SUP11* enthaltendes YAC noch die Anwesenheit eines zweiten, unterschiedlichen YACs (weiß) einen Einfluss auf die Stressresistenz oder RLS. n.g.: nicht getestet.

Interessanterweise beeinflusst die Anwesenheit des *ochre*-Suppressorgens *SUP11* in haploiden Hefezellen nicht die CLS (Stefanie Kobus, persönliche Mitteilung<sup>3</sup>). Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass Zellen in der stationären Phase nur eine sehr geringe metabolische Aktivität aufweisen und daher dort weniger Translationsvorgänge stattfinden, die durch *SUP11* beeinträchtigt werden könnten, als in replikativ alternden Zellen.

Da sich die Expression von *SUP11* theoretisch auf die Translation sämtlicher mRNAs nachteilig auswirken kann, ist eine Eingrenzung der Ursache für die verkürzte RLS

<sup>3</sup> Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland

äußerst schwierig. In einem Stamm mit wildtypischem *ADE2* Gen wird die *ochre*-Suppressor-tRNA<sub>TYR</sub> bei der Translation nicht zum Überlesen des vorzeitigen Stoppkodons benötigt. Daher habe ich überprüft, ob dort durch die zusätzlich verfügbare *ochre*-Suppressor-tRNA<sub>TYR</sub> und einer damit einhergehenden fehlerhaften Translation anderer mRNAs die RLS weiter verkürzt wird. Tatsächlich verringerte sich die RLS im adeninprototrophen Stamm mit YAC (Y (U/T/S)) um weitere 5 % (auf 35 %) gegenüber dem Wildtyp (Abb. 4-1). Um hier die Signifikanz bestimmen zu können, müsste jedoch die RLS dieses adeninprototrophen Stamms direkt neben der des *ade2-101<sup>ochre</sup>* Stamms mit YAC (Y (U/T/S)) ermittelt und ausgewertet werden.

#### 4.2.2 Warum beeinflusst die Expression von *SUP11* die RLS und Stresssensitivität haploider, nicht jedoch diploider Zellen?

Die Anwesenheit des *SUP11* tragenden YACs (Y (U/T/S)) hatte keinen Einfluss auf die RLS oder Stresssensitivität eines diploiden Hefestamms, und auch die Anwesenheit eines zweiten YACs (Y (L/H)) änderte diesen Befund nicht (Abb. 4-1). Die Tatsache, dass haploide aber nicht diploide Hefezellen betroffen sind, lässt sich vermutlich durch die Gendosis von *SUP11* erklären. Es wurde gezeigt, dass Trisomien für diploide Hefezellen weniger schädliche Folgen haben als Disomien für haploide Zellen, die zu einer erhöhten Stresssensitivität oder vermehrten Chromosomenverlusten führen (Torres *et al.* 2007; McCulley und Petes 2010; Sheltzer *et al.* 2011). Begründet wird dies mit einer besseren Gendosiskompensation in diploiden Zellen. Zudem wurde nachgewiesen, dass eine Kopie des *ochre*-Suppressors *SUP11* in diploiden Zellen nur eine geringe Erhöhung von meiotischen Fehlsegregationen auslöst, während zwei Kopien die Entstehung disomischer Sporen signifikant begünstigen (Louis und Haber 1989).

Es ist daher denkbar, dass das Vorliegen eines *SUP11* Gens die beobachtete Verkürzung der RLS in einem haploiden Stammhintergrund auslöst, während dazu in diploiden Zellen zwei *SUP11* Kopien benötigt werden. Die Stärke der Transkription der meisten Gene und auch die Translation vieler kodierter Proteine steigt mit der Anzahl der vorhandenen Genkopien (Guo *et al.* 1996; Galitski *et al.* 1999; Chikashige *et al.* 2007; Torres *et al.* 2007). Entsprechend sind die nachteiligen Auswirkungen der Expression einer Kopie von *SUP11* auf die Translation wildtypischer Proteine in diploiden Zellen vermutlich weniger dramatisch, da dort weniger *ochre*-Suppressor-tRNA<sub>TYR</sub> Moleküle pro Translationsprozess zur Verfügung stehen. Eine Anpassung der *SUP11* Gendosis an die doppelte Chromosomenzahl diploider Zellen ließe sich durch die Transferierung eines zweiten *SUP11* tragenden YACs oder durch die Integration des *ochre*-Suppressors auf ein

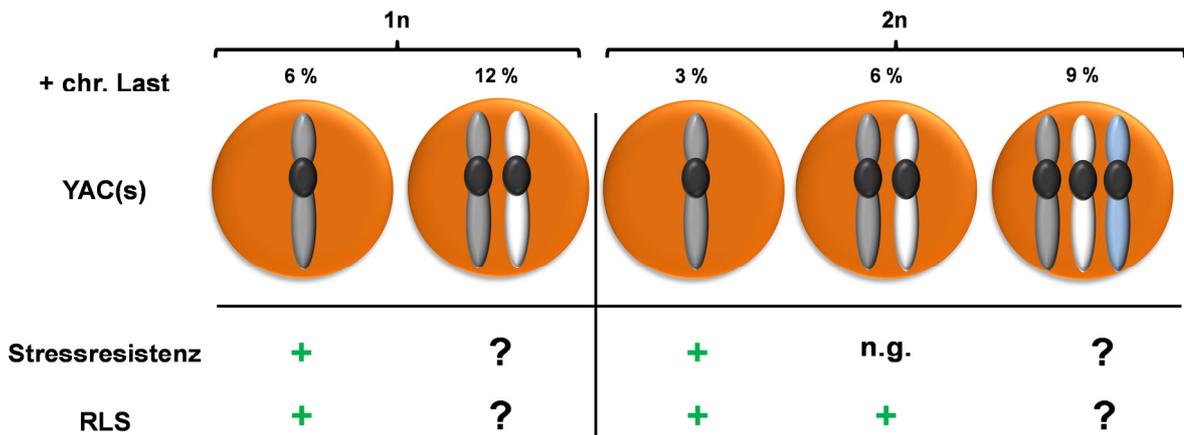
endogenes Chromosom realisieren. Auf diese Weise könnte überprüft werden, ob *SUP11* auch die RLS diploider Hefezellen verkürzen kann.

Der Befund, dass sich eine durch Aneuploidie vermittelte Gendosisveränderung nachteilig auf die RLS auswirken kann, ähnelt den Ergebnissen einer Studie mit haploiden Hefezellen, die aufgrund einer Disomie für endogene Chromosomen in der Regel eine verkürzte CLS aufwiesen (Torres *et al.* 2007). Die Verkürzung der CLS (und weitere Phänotypen) durch Disomien wird auf den erhöhten Energiebedarf der aneuploiden Zellen zurückgeführt, der für die Transkription der zusätzlichen Gene, der Translation und Degradation überschüssiger Proteine benötigt wird. Zwar sind replikative und chronologische Alterung nicht direkt vergleichbar, doch es ist möglich, dass durch die *ochre*-Suppressor-tRNA<sub>TYR</sub> fehlerhaft gebildete Proteine degradiert bzw. ersetzt werden müssen, was ebenfalls in einem erhöhten Energiebedarf resultieren könnte. Das würde, neben eventuellen Funktionsverlusten zellulärer Prozesse durch fehlerhafte Proteine, die Verkürzung der RLS erklären.

### 4.2.3 Die Anwesenheit bestimmter YACs *per se* hat keinen Einfluss auf die RLS oder Stresssensitivität

Eine Erhöhung der chromosomalen Last um 6 % durch ein YAC ohne *SUP11* (Y (Y/U/T/ $\Delta$ *sup11*)) verursachte im haploiden Stamm keine Verkürzung der RLS (Abb. 4-2). Im diploiden Stamm führte die gleichzeitige Anwesenheit von zwei YACs ((Y (U/T/S)) und (Y (L/H))), was dort ebenso einer Erhöhung der chromosomalen Last um 6 % entspricht, ebenfalls nicht zu erhöhter Stresssensitivität oder einer verkürzten RLS (Abb. 4-2).

Es kann also festgehalten werden, dass eine reine Erhöhung der chromosomalen Last um bis zu 6 % keine Auswirkungen auf die RLS von *S. cerevisiae* Zellen hat. Davon war trotz der (mit Ausnahme der Selektionsmarker) fehlenden Hefegene nicht zwangsläufig auszugehen, denn es ist bekannt, dass exogene Chromosomen durchaus den Zellmetabolismus beeinflussen können. In *S. cerevisiae* weisen zahlreiche Gene der endogenen Chromosomen durch die Anwesenheit von YACs unter Phosphat limitierten Bedingungen eine veränderte Expression auf (Torres *et al.* 2007). Ähnliches wurde auch in der Spalthefe *S. pombe* beobachtet, wo haploide Zellen, die ein zusätzliches kurzes Chromosom ohne Protein kodierende Sequenzen enthielten, auf den übrigen Chromosomen eine erhöhte Expression subtelomerisch lokalisierter Gene aufwiesen (Chikashige *et al.* 2007).



**Abb. 4-2 Die Auswirkungen erhöhter chromosomaler Last *per se* auf Stressresistenz und RLS haploider und diploider *S. cerevisiae* Zellen.**

Schematische Darstellung haploider (1n) und diploider (2n) *S. cerevisiae* Zellen (braun), die ein, zwei, oder drei verschiedene YAC(s) (hellgrau, weiß oder blau, mit Zentromer, (dunkelgrau)) tragen. Die prozentuale Erhöhung der chromosomalen Last (+ chr. Last) ist über den Zellen angegeben. Die Folgen der Anwesenheit des/der exogenen Chromosomen auf Stressresistenz und RLS sind darunter dargestellt. Eine Erhöhung der chromosomalen Last um 6 % hat keinen Effekt (+) auf Stressresistenz und RLS haploider Zellen, die Folgen einer Erhöhung der Last um 12 % durch 2 YACs sind nicht bekannt (?). In diploiden Zellen hat weder die Anwesenheit eines YACs (3 % Erhöhung der chr. Last) noch von zwei YACs (6 % Erhöhung der chr. Last) eine Auswirkung auf die RLS (oder Stressresistenz bei einem YAC). Die Folgen einer Erhöhung der chr. Last um 9 % durch ein drittes YAC sind nicht bekannt. n.g.: nicht getestet.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Größe des extra Chromosoms für die Auswirkungen auf die RLS von Bedeutung ist. Die in dieser Arbeit verwendeten YACs sind mit 360 Kbp im Vergleich zu den meisten der 16 endogenen Hefechromosomen, die bis zu 2200 Kbp groß sind, eher klein. Die DNA eines YACs muss repliziert werden, was einen erhöhten Energiebedarf nach sich zieht. In Anbetracht des Größenunterschieds zu den meisten endogenen Chromosomen spielt dieser erhöhte Energieverbrauch für die 360 Kbp YACs vermutlich eine untergeordnete Rolle. Es ist jedoch vorstellbar, dass der Einsatz größerer YACs die RLS nachteilig beeinflussen könnte. Dies könnte beispielsweise durch die Transferierung eines publizierten 1600 Kbp großen YACs in den haploiden Kontrollstamm ohne YAC (1n) mit anschließender Bestimmung der RLS überprüft werden (Huang und Koshland 2003). Nur die Anwesenheit dieses größten von sieben getesteten YACs verursachte erhöhte Sensitivität gegenüber Hygromycin, einem Translationsinhibitor, was impliziert, dass die Anwesenheit des YACs einen starken Einfluss auf das Proteom und dadurch möglicherweise auch auf die RLS ausüben könnte (Torres *et al.* 2007).

Neben der Größe könnte auch die Anzahl exogener Chromosomen in einem Hefestamm ein Faktor sein, der den Einfluss von YACs auf die Lebensspanne bestimmt. Zum einen erfordert eine erhöhte Anzahl exogener Chromosomen mehr Energie für die Replikation, zum anderen ist bekannt, dass eine durch *CEN*-Plasmide vermittelte Erhöhung der Anzahl der Zentromere um mehr als 10 auf *S. cerevisiae* Zellen toxisch wirken und einen

2 bis 6-fach erhöhten Verlust endogener Chromosomen auslösen kann (Futcher und Carbon 1986). Vermutet wird, dass die Zentromere um Proteine konkurrieren, die für die korrekte Chromosomensegregation benötigt werden. Beispielsweise bindet in *S. cerevisiae* während der Mitose nur ein Spindelmikrotubulus an jedes Zentromer (Peterson und Ris 1976), und es ist fraglich, ob bei einem Überschuss an Zentromeren genügend Mikrotubuli synthetisiert werden können, um den erhöhten Bedarf zu decken. Dazu passt der Befund, dass haploide *S. cerevisiae* Zellen eine bis zu 50 %ige Erhöhung von Zentromeren durch *CEN*-Plasmide tolerieren, während diploide Zellen eine Erhöhung von maximal 6 % akzeptieren und in tri- oder tetraploiden Zellen die Toleranz noch weiter herabgesetzt ist (Mayer und Aguilera 1990). Demnach könnte bereits die Anwesenheit eines dritten YACs (Erhöhung der chromosomalen Last um 9 % (Abb. 4-2)) ausreichend sein, um im diploiden Hefestamm die Zellfitness und RLS zu senken.

In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant zu untersuchen, ob eine möglicherweise durch die hohe Anzahl exogener Chromosomen zunehmende Fehlverteilung endogener Chromosomen Auslöser einer verkürzten RLS sein kann. Dies könnte durch Analyse des Chr. III Verlusts (quantitativer Paarungsversuch) in replikativ alternden diploiden Zellen mit drei YACs, die über paramagnetische Sortierung isoliert werden, überprüft werden.

Zusammengefasst haben die in dieser Arbeit eingesetzten exogenen Chromosomen *per se* keinen Einfluss auf die RLS haploider und diploider Hefezellen. In Zukunft muss überprüft werden, ob eine Erhöhung der chromosomalen Last durch weitere und/oder größere YACs die erhaltenen Ergebnisse bestätigen oder relativieren kann.

### 4.3 Ein endogenes Minichromosom verlängert die chronologische Lebensspanne in *S. pombe*

In der Spaltheefe *S. pombe* existierten bislang keine Studien, in denen die Auswirkungen von Aneuploidie auf die Alterung untersucht wurden. Ich habe *S. pombe* erstmals eingesetzt, um die Folgen endogener Aneuploidie auf die chronologische Lebensspanne zu bestimmen. Es stellte sich überraschenderweise heraus, dass die Anwesenheit des Minichromosoms Ch16, einer verkürzten Variante von Chr. III, die CLS reproduzierbar um mehr als das Zweifache gegenüber dem haploiden Kontrollstamm verlängert und dieser Effekt teilweise auf den Ch16 lokalisierten ORF des Gens *cig1*<sup>+</sup> zurückzuführen ist.

Dieses Resultat ist bemerkenswert, da alle uns bekannten Studien in der Regel einen nachteiligen Effekt endogener Aneuploidie auf die Lebensspanne nahegelegt oder nachgewiesen haben. So zeigen Menschen mit der Trisomie 21 Zeichen vorzeitiger Alterung und haben eine geringere Lebenserwartung (Martin 1978; Scarbrough *et al.* 1982). Auch in Mäusen mit einer verringerten Menge des Spindelkontrollpunktproteins BubR1, die durch Fehler in der Chromosomensegregation erhöhte Aneuploidie aufweisen, wurde die Lebensspanne deutlich reduziert (Baker *et al.* 2004). In haploiden *S. cerevisiae* Zellen führten 11 von 13 getesteten Disomien für verschiedene endogene Chromosomen zu einer verkürzten CLS, eine gleichzeitige Disomie mehrerer Chromosomen verkürzte die CLS grundsätzlich (Torres *et al.* 2007).

Darüber hinaus verursachten Disomien in haploiden *S. cerevisiae* Zellen erhöhte Chromosomenverluste und spezifische Stresssensitivität (Torres *et al.* 2007; Sheltzer *et al.* 2011). Auch hier unterscheiden sich die von mir gewonnenen Daten: Die Genauigkeit der Chromosomensegregation wurde durch die Anwesenheit von Ch16 nicht beeinträchtigt. Die Anwesenheit des Minichromosoms führt zu einer verstärkten Expression von 27 stressspezifischen Genen (Chikashige *et al.* 2007). Entsprechend wies der Ch16 tragende Stamm in meiner seriellen Tropftestanalyse eine erhöhte Sensitivität gegenüber Salzstress und der Mikrotubuli destabilisierenden Substanz TBZ auf. Verwunderlich ist jedoch, dass oxidativer Stress im aneuploiden *S. pombe* Stamm ebenfalls zu verstärkten Wachstumsdefekten führte. Oxidativer Stress hatte bei disomischen *S. cerevisiae* Zellen keinen Einfluss auf die Zellfitness (Torres *et al.* 2007), und in der Regel weisen langlebige Organismen eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress auf, da mit dem Alter akkumulierende Sauerstoffradikale (ROS) die DNA schädigen und lebensverkürzend wirken (Longo *et al.* 1996; Fabrizio *et al.* 2001; Johnson *et al.* 2002; Vermeulen und Loeschcke 2007; Chen *et al.* 2010).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Auswirkungen des Minichromosoms insbesondere auf die CLS in *S. pombe* sich deutlich von den in der Literatur beschriebenen Folgen von Aneuploidie unterscheiden. Die möglichen Gründe werden im Folgenden diskutiert.

### 4.3.1 Aneuploidie als Überlebensvorteil?

In der Regel wirkt sich Aneuploidie nachteilig auf eine Zelle oder einen Organismus aus, was sich beispielsweise darin zeigt, dass Aneuploidie ein Kennzeichen nahezu aller Krebsarten ist (Fojer 2010; Fang und Zhang 2011). Obwohl diese Aussage richtig ist, sind einige Ausnahmen von dieser Regel bekannt, bei denen Aneuploidie unter bestimmten Voraussetzungen vorteilhaft sein kann (Sheltzer und Amon 2011).

So zeichnen sich aneuploide Krebszellen, obgleich dies den betroffenen Organismus vor Probleme stellt, durch einen proliferativen Vorteil aus (Vander Heiden *et al.* 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass trotz der zahlreichen schädlichen Auswirkungen einer Trisomie 21 Menschen mit dem Down-Syndrom ein deutlich verringertes Risiko aufweisen, an einer Form eines Gewebetumors sowie Retinopathie oder Arteriosklerose zu erkranken (Murdoch *et al.* 1977; Fulcher *et al.* 1998; Hasle *et al.* 2000; Corsi *et al.* 2009). Diese Effekte werden auf die erhöhte Gendosis durch die dritte Kopie eines oder mehrerer der 231 Gene auf Chr. 21 zurückgeführt, und kürzlich wurden *DSCR1*, das für einen Suppressor der Angiogenese kodiert, sowie 5 weitere krebshemmende Gene auf Chr. 21 identifiziert (Baek *et al.* 2009; De Vita *et al.* 2010; Reynolds *et al.* 2010). Auch das häufige Auftreten von Aneuploidie in somatischen menschlichen Zellen einschließlich des Gehirns wird als vorteilhaft für die genetische Variation angesehen, wobei eine funktionelle Signifikanz bislang nicht nachgewiesen wurde (Yurov *et al.* 2007; Duncan *et al.* 2010).

Besonders unter speziellen Stressbedingungen wie limitierten Nährstoffen oder der Einwirkung von Antimykotika können bei Mikroorganismen wie *S. cerevisiae* oder *C. albicans* aneuploide Zellen entstehen, die sich unter diesen Voraussetzungen durch eine erhöhte Fitness auszeichnen (Dunham *et al.* 2002; Selmecki *et al.* 2006; Gresham *et al.* 2008; Rancati *et al.* 2008; Selmecki *et al.* 2008). Für einige aneuploide *S. cerevisiae* Zellen wurde gezeigt, dass sie, vermutlich gendosisbedingt, unter Stressbedingungen über einen Adaptationsvorteil gegenüber euploiden Zellen verfügen (Pavelka *et al.* 2010). Während der stationären Phase müssen sich *S. pombe* Zellen ebenfalls an eine stressinduzierende Umgebung anpassen (Roux *et al.* 2010). Der pH Wert des Mediums sinkt nach wenigen Tagen in den sauren Bereich (Kap. 3.3.3). Für *S. cerevisiae* Zellen wurde gezeigt, dass mit zunehmendem chronologischen Alter akkumulierende Essigsäure toxisch wirkt und die Expression bestimmter Gene des Stoffwechsels (*SCH9*, *RAS2*), die auch in der Stressantwort involviert sind, das Überleben in der sauren Umgebung

beeinflusst (Burtner *et al.* 2009). Es ist also denkbar, dass die Anwesenheit bestimmter Gene auf dem Minichromosom Ch16 einen Fitnessvorteil nur in der stationären Phase oder beim Wiedereintritt in den Zellzyklus vermittelt. Unter anderen Voraussetzungen hingegen, wie durch die erhöhte Stresssensitivität in der seriellen Tropftestanalyse gezeigt wurde, wirkt sich die Anwesenheit des Minichromosoms nachteilig auf die Zellfitness aus. Vermutlich wird die erhöhte Stresssensitivität durch die generelle Gendosiserhöhung hervorgerufen, da die Anwesenheit der kürzeren Minichromosomvarianten ChR33 oder CH12LE, die weniger Gene enthalten, einen schwächeren Phänotyp in der seriellen Tropftestanalyse verursachte (Kap. 3.3.4.1).

### 4.3.2 Die mögliche Rolle von *cig1<sup>+</sup>* bei der Verlängerung der CLS

Ein Gen, welches an der Verlängerung der CLS beteiligt ist, wurde durch 13 experimentell aufwendige Deletionsanalysen, bei denen der lebensverlängernde Bereich auf Ch16 schrittweise eingegrenzt wurde, unter den 165 Genen des Minichromosoms identifiziert. Es handelt sich um das evolutionär konservierte B-Typ Zyklin kodierende *cig1<sup>+</sup>*. B-Typ Zykline spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, sie aktivieren in *S. pombe* die Zyklin-abhängige Kinase (CDK) Cdc2p, die für die Einleitung von S-Phase und Mitose essentiell ist (Hayles *et al.* 1994; Martin-Castellanos *et al.* 1996). Bislang existieren nur wenige Studien über *cig1<sup>+</sup>*, insbesondere zu einer möglichen Funktion von *cig1<sup>+</sup>* in der stationären Phase wurden keine Untersuchungen durchgeführt. Entsprechend unklar ist, wie sich eine Überexpression dieses Gens auf den Zellzyklus und Zellmetabolismus auswirkt. *cig1<sup>+</sup>* ist nicht essentiell, es wird in erster Linie zusammen mit einem weiteren B-Typ Zyklin kodierenden Gen, *cig2<sup>+</sup>*, für den Übergang der G1 zur S-Phase und in der späten Mitose benötigt (Connolly und Beach 1994). Erst die Deletion beider Gene resultiert in einer verzögerten G1 Phase, die vermutlich aus Defekten in der Septierung des Zellkerns während der Zytokinese resultiert (Connolly und Beach 1994). Es wird daher angenommen, dass diese B-Typ Zykline in *S. pombe* eine funktionelle Redundanz aufweisen, die auch für die homologen B-Typ Zykline (kodiert von den *CLB* Genen) in *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Fitch *et al.* 1992; Connolly und Beach 1994). Es scheint auf den ersten Blick paradox, dass ein Regulator des Zellzyklus beim Überleben in der stationären Phase, in der der Zellzyklus nicht durchlaufen und der Metabolismus stark reduziert wird, von Bedeutung ist. Zum einen kann jedoch eine spezifische Funktion von Cig1p auch während der stationären Phase nicht ausgeschlossen werden. Eine lebensverlängernde Funktion könnte möglicherweise die Verhinderung des programmierten Zelltods sein, der in einer den höheren Eukaryoten

ähnlichen Form auch in der Hefe existiert (Fabrizio und Longo 2008; Low und Yang 2008). In Eiern des Krallenfroschs *Xenopus laevis* verhinderte eine verstärkte Aktivität des B-Typ Zyklins B1 die Aktivierung der pro-apoptotischen Kaspase 2, wodurch die Einleitung des programmierten Zelltods abgewendet wurde (Andersen *et al.* 2009). Ob B-Typ Zykline auch in *S. pombe* einen inhibierenden Einfluss auf den dort bislang wenig untersuchten programmierten Zelltod ausüben, beispielsweise durch die Unterdrückung einer Aktivierung der Metakaspase Pca1p, ist nicht bekannt (Low und Yang 2008).

Zum anderen könnte Cig1p möglicherweise nicht nur während der stationären Phase eine lebensverlängernde Wirkung hervorrufen: Die CLS wird über die Fähigkeit der Zellen bestimmt, nach einer bestimmten Zeit in der stationären Phase wieder in den Zellzyklus eintreten und Kolonien bilden zu können. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass D-Typ Zykline in höheren Eukaryoten für den Eintritt in den Zellzyklus benötigt werden (Sherr 1995; Mullany *et al.* 2008). Sie werden in Zellen von Säugetieren als Antwort auf extrazelluläre Mitogene (Zellteilung anregende Proteine) verstärkt gebildet und regen mit ihren assoziierten CDKs den Austritt aus G0 und den Eintritt in die G1 Phase an (Coller 2007). Dabei zeigen neuere Studien eine enge Verknüpfung zwischen dem Zellmetabolismus, der bei Verfügbarkeit von Nährstoffen massiv umgestellt wird, und G1 Zellzyklusregulatoren wie den D-Typ Zyklinen (Buchakjian und Kornbluth 2010). Beispielsweise lokalisiert die 6-Phosphofructo-2-Kinase (PFKFB3), ein Schlüsselenzym der Glykolyse, im Zellkern und ändert dort die Transkription diverser Zellzyklusregulatoren einschließlich des Zyklins D1, wodurch die Proliferation gefördert wird (Yalcin *et al.* 2009). Umgekehrt inhibiert Zyklin D1 direkt die Glykolyse sowie mitochondriale Funktionen und verhindert so vermutlich ein erneutes Durchlaufen der G1 Phase (Sakamaki *et al.* 2006). Zwar wurden für *S. pombe* bislang keine D-Typ Zykline beschrieben, doch durch die funktionelle Redundanz der *S. pombe* B-Typ Zykline und die starke Expression von *cig1*<sup>+</sup> und *cig2*<sup>+</sup> in der G1 Phase ist deren Beteiligung am Wiedereintritt in den Zellzyklus durchaus möglich (Connolly und Beach 1994). Auch eine direkte Verbindung von *cig1*<sup>+</sup> (oder anderen Genen auf dem Minichromosom) zum Zellmetabolismus kann nicht ausgeschlossen werden, da unter limitierter Glucose der Hauptteil (96 %) der Ch16 tragenden Population einen Überlebensvorteil gegenüber dem Kontrollstamm aufwies, während bei nicht limitierter Glucose nur eine Subpopulation von 8 % eine verlängerte CLS erreichte (Kap. 3.3.3). Um dies zu überprüfen, könnte die CLS des heterozygot *cig1*<sup>+</sup> deletierten Stamms unter Glucose limitierten Bedingungen mit der des Ch16 tragenden Stamms, auf dem *cig1*<sup>+</sup> nicht deletiert wurde, verglichen werden.

Es ist also vorstellbar, dass in alten Zellen mit Minichromosom die zusätzliche Expression von *cig1*<sup>+</sup> beim Verlassen der G0 Phase oder auch während der folgenden Mitose einen Wachstumsvorteil verschafft. Ein Proliferationsvorteil durch B-Typ Zykline wurde

beispielsweise in vielen menschlichen Krebsarten beobachtet. So wurde festgestellt, dass das Zyklin B1 in Darm-, Hirn- und Prostatakrebszellen überexprimiert wird (Wang *et al.* 1997; Kallakury *et al.* 1999; Allan *et al.* 2000), und die Stärke der Zyklin B Überexpression hat sich als Marker für die Proliferationsstärke in Patientinnen mit Brustkrebs bewährt (Rudolph *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2007; Koliadi *et al.* 2010). Tatsächlich wurde publiziert, dass *cig1<sup>+</sup>* bei Anwesenheit des Minichromosoms Ch16 während des vegetativen Wachstums gendosisbedingt etwa 50 % stärker exprimiert wird als in euploiden Zellen (Chikashige *et al.* 2007). Eine möglicherweise damit einhergehende größere Cig1p Proteinmenge könnte in alten Zellen den Zellzyklus stimulieren, der in euploiden Zellen bereits zum Erliegen gekommen ist.

Vor einer experimentellen Überprüfung dieser Vermutung müsste jedoch sichergestellt werden, dass es sich bei der durch Deletion des ORFs auf dem Minichromosom beobachteten Reduktion der CLS tatsächlich um einen reinen Gendosiseffekt handelt. Dies ließe sich durch die Integration einer zweiten Kopie dieses Gens in eines der 3 *S. pombe* Chromosomen im euploiden Kontrollstamm überprüfen. Die CLS dieses Stammes sollte bei einem reinen Gendosiseffekt ebenfalls verlängert werden.

### 4.3.3 Mehrere Gene auf Ch16 oder epigenetische Faktoren vermitteln eine Verlängerung der CLS

Die Abwesenheit des *cig1<sup>+</sup>* ORFs führte nicht zum vollständigen Verlust der Ch16 vermittelten Lebensverlängerung, was bedeutet, dass weitere Gene oder eine von einer Gendosis unabhängige Eigenschaft des Minichromosoms einen Einfluss auf die CLS ausüben müssen.

Nach Deletion eines 106 Kbp großen Abschnitts auf dem rechten Arm des Minichromosoms wurde die CLS des Stamms (1n + Ch16 ( $\Delta$ 106 Kbp)) vollständig auf das Niveau des euploiden Kontrollstamms reduziert. Demnach befinden sich vermutlich neben dem identifizierten Gen *cig1<sup>+</sup>* auf diesem Abschnitt weitere Gen(e), die für die Verlängerung der CLS benötigt werden. Meine Daten zeigen allerdings, dass mit Ausnahme von *cig1<sup>+</sup>* die Abwesenheit keines der 37 Gene dieses Abschnitts die CLS nachteilig beeinflusste. Es ist also möglich, dass erst eine gemeinsame Deletion eines dieser ORFs zusammen mit *cig1<sup>+</sup>* dessen Beteiligung an der Lebensverlängerung offenbart. Unter den 37 Genen befindet sich kein bekannter Interaktionspartner von *cig1<sup>+</sup>*. Geht man davon aus, dass weitere lebensverlängernde Gene wie *cig1<sup>+</sup>* im Zellzyklus involviert sind, so finden sich in dem Abschnitt in Frage kommende Gene der DNA Reparatur (*dfp1<sup>+</sup>*, *tel1<sup>+</sup>*, *nse3<sup>+</sup>*), der Replikation (*ssb3<sup>+</sup>*), des G2/M Übergangs (*srk1<sup>+</sup>*), des Spindelkontrollpunkts (*bub1<sup>+</sup>*) und der Zytokinese (*rgf1<sup>+</sup>*, *rgf3<sup>+</sup>*). Weitere möglicherweise

lebensverlängernde Gene dieses Abschnitts sind *arp6<sup>+</sup>* und *vgl1<sup>+</sup>* (Chromatinmodulierung) oder Gene, die für die Translation benötigt werden (*mrpl137<sup>+</sup>*, *rpl2302<sup>+</sup>*), da deren Genprodukte in der stationären Phase den Proteinhaushalt und dadurch die CLS, wie beispielsweise für den Translationsregulator Ssd1-V in *S. cerevisiae* gezeigt (Li *et al.* 2009), positiv beeinflussen könnten. Denkbar ist auch, dass Gene dieses Abschnitts, beispielsweise durch eine Verstärkung der Zellwand (*rgf1<sup>+</sup>*, *rgf3<sup>+</sup>*) oder der Stressantwort (*tel1<sup>+</sup>*, *srk1<sup>+</sup>*), eine erhöhte Resistenz gegenüber dem abfallenden pH Wert in der stationären Kultur vermitteln könnten. Das könnte den Befund erklären, dass nur eine Subpopulation des Ch16 tragenden Stamms die verlängerte CLS aufweist, während in der Literatur beschriebene Langlebigkeit meist den Großteil einer Population betrifft: Sowohl der Kontrollstamm als auch der Ch16 tragende Stamm zeigten einen ähnlichen Abfall in der Lebensfähigkeit bis etwa Tag 8 (Kap. 3.3.3). An Tag 11, an dem der pH Wert ein Minimum erreichte, starb der Kontrollstamm, während die Subpopulation des Ch16 tragenden Stamms im sauren Milieu überleben konnte. Für *S. cerevisiae* Zellen, in denen YAP1, ein Regulator der Stressantwort überexprimiert wird, wurde ähnlich wie beim Ch16 tragenden Stamm eine verlängerte CLS einer Subpopulation nach etwa 10 Tagen in der stationären Phase beobachtet (Herker *et al.* 2004). Yap1p vermindert die ROS Akkumulation im Alter und vermittelt so vermutlich einen Überlebensvorteil. Ob auch beim Ch16 tragenden Stamm durch verstärkte Expression eines Gens der Stressantwort im Alter weniger ROS akkumulieren, könnte durch Dihydrorhodamin 123 (DHR) Färbung mikroskopisch überprüft werden.

Nach Deletion möglicherweise relevanter Gene im heterozygoten  $\Delta cig1/cig1^+$  Stamm könnte festgestellt werden, ob eine Kombination von 2 oder mehr zusätzlichen Genen die verlängerte CLS des Ch16 tragenden Stamms verursacht.

Die Tatsache, dass die Abwesenheit des *cig1<sup>+</sup>* ORFs nur eine teilweise, des 106 Kbp Abschnitts jedoch eine vollständige Aufhebung des CLS verlängernden Effekts verursachte und nach allen anderen Deletionen die CLS nicht reduziert wurde, könnte auch auf einen von einer Gendosis unabhängigen, epigenetischen Effekt zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass die Chromatinstruktur einen starken Einfluss auf die Lebensspanne hat, was aufgrund ihrer Funktion in der Transkriptionsregulierung und bei der Chromosomensegregation nicht verwunderlich ist (Amor *et al.* 2004; Obuse *et al.* 2004; Feser und Tyler 2011). In Säugetieren wurden altersabhängige Veränderungen der Chromatinstruktur beschrieben, die sowohl zur Aktivierung als auch zur Repression zahlreicher Gene führen können (Villeponteau 1997; Imai und Kitano 1998; Zhang und Adams 2007). Es ist vorstellbar, dass Änderungen der Chromatinstruktur mit zunehmendem chronologischem Alter das Minichromosom in anderer Weise betreffen als Chr. III. Das könnte wiederum im Alter eine von Chr. III abweichende Transkription Ch16

lokalisierter Gene bewirken, die einen Fitnessvorteil verschaffen. Eine unterschiedliche Chromatinstruktur ist schwer nachzuweisen, doch ob eine veränderte Transkription in alten Ch16 tragenden Zellen im Vergleich zu jungen Zellen stattfindet, die beim Wildtyp nicht auftritt, könnte beispielsweise durch Real-Time PCR überprüft werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben grundlegend dazu beigetragen, die komplexen Zusammenhänge zwischen Aneuploidie und Alterung weiter aufzuklären. Es ist erstmals gelungen, einen experimentellen Nachweis für einen linearen Anstieg der Chromosomeninstabilität mit zunehmendem Alter in *S. cerevisiae* nachzuweisen und klare Hinweise auf die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu gewinnen. Des Weiteren zeigen meine Untersuchungen zur Auswirkung von Aneuploidie auf die Alterung, dass zusätzliche Chromosomen in *S. cerevisiae* nicht *per se* den Alterungsprozess beeinflussen, sondern gendosisabhängig die RLS reduzieren können. Ich habe zudem im Modellorganismus *S. pombe* erstmals bewiesen, dass ein durch Aneuploidie vermittelter Gendosiseffekt auch dazu führen kann, eine lebensverlängernde Wirkung auf einen Organismus auszuüben. Diese Ergebnisse können wesentlich zu einem besseren Verständnis des Einflusses von Aneuploidie auf die Entstehung und das Fortschreiten altersbedingter Krankheiten wie Krebs und Alzheimer sowie auf den natürlichen Alterungsprozess beitragen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Aguilaniu, H., L. Gustafsson, M. Rigoulet and T. Nystrom (2003). "Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis." *Science* **299**(5613): 1751-1753.
- Allan, K., R. C. Jordan, L. C. Ang, M. Taylor and B. Young (2000). "Overexpression of cyclin A and cyclin B1 proteins in astrocytomas." *Arch Pathol Lab Med* **124**(2): 216-220.
- Allen, C., S. Buttner, A. D. Aragon, J. A. Thomas, O. Meirelles, J. E. Jaetao, D. Benn, S. W. Ruby, M. Veenhuis, F. Madeo and M. Werner-Washburne (2006). "Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures." *J Cell Biol* **174**(1): 89-100.
- Amon, A. (1999). "The spindle checkpoint." *Curr Opin Genet Dev* **9**(1): 69-75.
- Amor, D. J., P. Kalitsis, H. Sumer and K. H. Choo (2004). "Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization." *Trends Cell Biol* **14**(7): 359-368.
- Andalis, A. A., Z. Storchova, C. Styles, T. Galitski, D. Pellman and G. R. Fink (2004). "Defects arising from whole-genome duplications in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **167**(3): 1109-1121.
- Andersen, J. L., C. E. Johnson, C. D. Freel, A. B. Parrish, J. L. Day, M. R. Buchakjian, L. K. Nutt, J. W. Thompson, M. A. Moseley and S. Kornbluth (2009). "Restraint of apoptosis during mitosis through interdomain phosphorylation of caspase-2." *Embo J* **28**(20): 3216-3227.
- Antonarakis, S. E., R. Lyle, E. T. Dermitzakis, A. Reymond and S. Deutsch (2004). "Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology." *Nat Rev Genet* **5**(10): 725-738.
- Aragon, A. D., A. L. Rodriguez, O. Meirelles, S. Roy, G. S. Davidson, P. H. Tapia, C. Allen, R. Joe, D. Benn and M. Werner-Washburne (2008). "Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures." *Mol Biol Cell* **19**(3): 1271-1280.
- Arcangioli, B. and S. Ben Hassine (2009). "Unrepaired oxidative DNA damage induces an ATR/ATM apoptotic-like response in quiescent fission yeast." *Cell Cycle* **8**(15): 2326-2331.
- Ashrafi, K., D. Sinclair, J. I. Gordon and L. Guarente (1999). "Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9100-9105.
- Aviv, H., M. Y. Khan, J. Skurnick, K. Okuda, M. Kimura, J. Gardner, L. Priolo and A. Aviv (2001). "Age dependent aneuploidy and telomere length of the human vascular endothelium." *Atherosclerosis* **159**(2): 281-287.
- Babu, J. R., K. B. Jeganathan, D. J. Baker, X. Wu, N. Kang-Decker and J. M. van Deursen (2003). "Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation." *J Cell Biol* **160**(3): 341-353.
- Baek, K. H., A. Zaslavsky, R. C. Lynch, C. Britt, Y. Okada, R. J. Siarey, M. W. Lensch, I. H. Park, S. S. Yoon, T. Minami, J. R. Korenberg, J. Folkman, G. Q. Daley, W. C. Aird, Z. Galdzicki and S. Ryeom (2009). "Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1." *Nature* **459**(7250): 1126-1130.
- Bahler, J., J. Q. Wu, M. S. Longtine, N. G. Shah, A. McKenzie, 3rd, A. B. Steever, A. Wach, P. Philippsen and J. R. Pringle (1998). "Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*." *Yeast* **14**(10): 943-951.
- Baker, D. J., K. B. Jeganathan, J. D. Cameron, M. Thompson, S. Juneja, A. Kopecka, R. Kumar, R. B. Jenkins, P. C. de Groen, P. Roche and J. M. van Deursen (2004). "BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice." *Nat Genet* **36**(7): 744-749.
- Baker, D. J., K. B. Jeganathan, L. Malureanu, C. Perez-Terzic, A. Terzic and J. M. van Deursen (2006). "Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice." *J Cell Biol* **172**(4): 529-540.
- Bakhoun, S. F., G. Genovese and D. A. Compton (2009). "Deviant kinetochore microtubule dynamics underlie chromosomal instability." *Curr Biol* **19**(22): 1937-1942.
- Bakhoun, S. F., S. L. Thompson, A. L. Manning and D. A. Compton (2009). "Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics." *Nat Cell Biol* **11**(1): 27-35.
- Balasubramanian, M. K., E. Bi and M. Glotzer (2004). "Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells." *Curr Biol* **14**(18): R806-818.
- Barber, T. D., K. McManus, K. W. Yuen, M. Reis, G. Parmigiani, D. Shen, I. Barrett, Y. Nouhi, F. Spencer, S. Markowitz, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, C. Lengauer and P. Hieter (2008). "Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(9): 3443-3448.
- Barker, M. G. and R. M. Walmsley (1999). "Replicative ageing in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Yeast* **15**(14): 1511-1518.
- Barnhart, E. L., R. K. Dorer, A. W. Murray and S. C. Schuyler (2011). "Reduced Mad2 expression keeps relaxed kinetochores from arresting budding yeast in mitosis." *Mol Biol Cell* **22**(14): 2448-2457.
- Bartlett, R. and P. Nurse (1990). "Yeast as a model system for understanding the control of DNA replication in Eukaryotes." *Bioessays* **12**(10): 457-463.
- Basi, G. and G. Draetta (1995). "p13<sup>suc1</sup> of *Schizosaccharomyces pombe* regulates two distinct forms of the mitotic cdc2 kinase." *Mol Cell Biol* **15**(4): 2028-2036.
- Belli, G., E. Gari, L. Piedrafita, M. Aldea and E. Herrero (1998). "An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast." *Nucleic Acids Res* **26**(4): 942-947.
- Belmont, A. S., F. Bignone and P. O. Ts'o (1986). "The relative intranuclear positions of Barr bodies in XXX non-transformed human fibroblasts." *Exp Cell Res* **165**(1): 165-179.

- Ben-Aroya, S., N. Agmon, K. Yuen, T. Kwok, K. McManus, M. Kupiec and P. Hieter (2010). "Proteasome nuclear activity affects chromosome stability by controlling the turnover of Mms22, a protein important for DNA repair." *PLoS Genet* **6**(2): e1000852.
- Bergman, R. J., D. Gazit, A. J. Kahn, H. Gruber, S. McDougall and T. J. Hahn (1996). "Age-related changes in osteogenic stem cells in mice." *J Bone Miner Res* **11**(5): 568-577.
- Berry, L. D. and K. L. Gould (1997). "Fission yeast dim1(+) encodes a functionally conserved polypeptide essential for mitosis." *J Cell Biol* **137**(6): 1337-1354.
- Bhaskara, V., A. Dupre, B. Lengsfeld, B. B. Hopkins, A. Chan, J. H. Lee, X. Zhang, J. Gautier, V. Zakian and T. T. Paull (2007). "Rad50 adenylate kinase activity regulates DNA tethering by Mre11/Rad50 complexes." *Mol Cell* **25**(5): 647-661.
- Bickel, S. E. (2005). "Aging (not so) gracefully." *Nat Genet* **37**(12): 1303-1304.
- Biswas-Fiss, E. E., S. M. Khopde and S. B. Biswas (2005). "The Mcm467 complex of *Saccharomyces cerevisiae* is preferentially activated by autonomously replicating DNA sequences." *Biochemistry* **44**(8): 2916-2925.
- Blow, J. J. and A. Dutta (2005). "Preventing re-replication of chromosomal DNA." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(6): 476-486.
- Blow, J. J. and T. U. Tanaka (2005). "The chromosome cycle: coordinating replication and segregation. Second in the cycles review series." *EMBO Rep* **6**(11): 1028-1034.
- Bond, D. J. and A. C. Chandley (1983). *Aneuploidy*. Oxford, Oxford University Press.
- Boselli, M., J. Rock, E. Unal, S. S. Levine and A. Amon (2009). "Effects of age on meiosis in budding yeast." *Dev Cell* **16**(6): 844-855.
- Botstein, D. and G. R. Fink (1988). "Yeast: an experimental organism for modern biology." *Science* **240**(4858): 1439-1443.
- Boveri, T. (1914). *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Jena, Gustav Fisher Verlag.
- Brenner, S., L. Barnett, E. R. Katz and F. H. Crick (1967). "UGA: a third nonsense triplet in the genetic code." *Nature* **213**(5075): 449-450.
- Brenner, S., A. O. Stretton and S. Kaplan (1965). "Genetic code: the 'nonsense' triplets for chain termination and their suppression." *Nature* **206**(988): 994-998.
- Buchakjian, M. R. and S. Kornbluth (2010). "The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(10): 715-727.
- Bueno, A., H. Richardson, S. I. Reed and P. Russell (1991). "A fission yeast B-type cyclin functioning early in the cell cycle." *Cell* **66**(1): 149-159.
- Burke, D. T., G. F. Carle and M. V. Olson (1987). "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors." *Science* **236**(4803): 806-812.
- Burtner, C. R., C. J. Murakami, B. K. Kennedy and M. Kaeberlein (2009). "A molecular mechanism of chronological aging in yeast." *Cell Cycle* **8**(8): 1256-1270.
- Byers, B. and L. Goetsch (1974). "Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **38**: 123-131.
- Cahill, D. P., K. W. Kinzler, B. Vogelstein and C. Lengauer (1999). "Genetic instability and darwinian selection in tumours." *Trends Cell Biol* **9**(12): 57-60.
- Cahill, D. P., C. Lengauer, J. Yu, G. J. Riggins, J. K. Willson, S. D. Markowitz, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers." *Nature* **392**(6673): 300-303.
- Chaffer, C. L. and R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." *Science* **331**(6024): 1559-1564.
- Chandhok, N. S. and D. Pellman (2009). "A little CIN may cost a lot: revisiting aneuploidy and cancer." *Curr Opin Genet Dev* **19**(1): 74-81.
- Cheeseman, I. M., D. G. Drubin and G. Barnes (2002). "Simple centromere, complex kinetochore: linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast." *J Cell Biol* **157**(2): 199-203.
- Chen, C., S. Dewaele, B. Braeckman, L. Desmyter, J. Verstraelen, G. Borgonie, J. Vanfleteren and R. Contreras (2003). "A high-throughput screening system for genes extending life-span." *Exp Gerontol* **38**(10): 1051-1063.
- Chen, Y. F., C. Y. Wu, C. H. Kao and T. F. Tsai (2010). "Longevity and lifespan control in mammals: lessons from the mouse." *Ageing Res Rev* **9** Suppl 1: S28-35.
- Chiang, T., F. E. Duncan, K. Schindler, R. M. Schultz and M. A. Lampson (2010). "Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes." *Curr Biol* **20**(17): 1522-1528.
- Chieffi, P., L. Cozzolino, A. Kisslinger, S. Libertini, S. Staibano, G. Mansueto, G. De Rosa, A. Villacci, M. Vitale, S. Linardopoulos, G. Portella and D. Tramontano (2006). "Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation." *Prostate* **66**(3): 326-333.
- Chikashige, Y., C. Tsutsumi, K. Okamasa, M. Yamane, J. Nakayama, O. Niwa, T. Haraguchi and Y. Hiraoka (2007). "Gene expression and distribution of Swi6 in partial aneuploids of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Cell Struct Funct* **32**(2): 149-161.
- Cimini, D. (2007). "Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners." *Cell Cycle* **6**(13): 1558-1564.
- Cimini, D. (2008). "Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer." *Biochim Biophys Acta* **1786**(1): 32-40.
- Cimini, D., L. A. Cameron and E. D. Salmon (2004). "Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes." *Curr Biol* **14**(23): 2149-2155.

- Cimini, D. and F. Degross (2005). "Aneuploidy: a matter of bad connections." *Trends Cell Biol* **15**(8): 442-451.
- Cimini, D., B. Howell, P. Maddox, A. Khodjakov, F. Degross and E. D. Salmon (2001). "Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells." *J Cell Biol* **153**(3): 517-527.
- Cimini, D., X. Wan, C. B. Hirel and E. D. Salmon (2006). "Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors." *Curr Biol* **16**(17): 1711-1718.
- Ciosk, R., W. Zachariae, C. Michaelis, A. Shevchenko, M. Mann and K. Nasmyth (1998). "An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast." *Cell* **93**(6): 1067-1076.
- Clarke, L. and J. Carbon (1980). "Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes." *Nature* **287**(5782): 504-509.
- Cocker, J. H., S. Piatti, C. Santocanale, K. Nasmyth and J. F. Diffley (1996). "An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast." *Nature* **379**(6561): 180-182.
- Cohen, D. E. and J. T. Lee (2002). "X-chromosome inactivation and the search for chromosome-wide silencers." *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 219-224.
- Coller, H. A. (2007). "What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(8): 667-670.
- Collins, S. R., K. M. Miller, N. L. Maas, A. Roguev, J. Fillingham, C. S. Chu, M. Schuldiner, M. Gebbia, J. Recht, M. Shales, H. Ding, H. Xu, J. Han, K. Ingvarsdottir, B. Cheng, B. Andrews, C. Boone, S. L. Berger, P. Hieter, Z. Zhang, G. W. Brown, C. J. Ingles, A. Emili, C. D. Allis, D. P. Toczyski, J. S. Weissman, J. F. Greenblatt and N. J. Krogan (2007). "Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map." *Nature* **446**(7137): 806-810.
- Connolly, T. and D. Beach (1994). "Interaction between the Cig1 and Cig2 B-type cyclins in the fission yeast cell cycle." *Mol Cell Biol* **14**(1): 768-776.
- Corsi, M. M., G. Dogliotti, F. Pedroni, E. Galliera, A. E. Malavazos, R. Villa, M. Chiappelli and F. Licastro (2009). "Adipocytokines in Down's syndrome, an atheroma-free model: Role of adiponectin." *Arch Gerontol Geriatr* **48**(1): 106-109.
- Dai, W., Q. Wang, T. Liu, M. Swamy, Y. Fang, S. Xie, R. Mahmood, Y. M. Yang, M. Xu and C. V. Rao (2004). "Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency." *Cancer Res* **64**(2): 440-445.
- Daniel, J., J. Coulter, J. H. Woo, K. Wilsbach and E. Gabrielson (2011). "High levels of the Mps1 checkpoint protein are protective of aneuploidy in breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(13): 5384-5389.
- Daniel, J. A., B. E. Keyes, Y. P. Ng, C. O. Freeman and D. J. Burke (2006). "Diverse functions of spindle assembly checkpoint genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **172**(1): 53-65.
- Davidson, G. S., R. M. Joe, S. Roy, O. Meirelles, C. P. Allen, M. R. Wilson, P. H. Tapia, E. E. Manzanilla, A. E. Dodson, S. Chakraborty, M. Carter, S. Young, B. Edwards, L. Sklar and M. Werner-Washburne (2011). "The proteomics of quiescent and nonquiescent cell differentiation in yeast stationary-phase cultures." *Mol Biol Cell* **22**(7): 988-998.
- De Vita, S., C. Canzonetta, C. Mulligan, F. Delom, J. Groet, C. Baldo, L. Vanes, F. Dagna-Bricarelli, A. Hoischen, J. Veltman, E. M. Fisher, V. L. Tybulewicz and D. Nizetic (2010). "Trisomic dose of several chromosome 21 genes perturbs haematopoietic stem and progenitor cell differentiation in Down's syndrome." *Oncogene* **29**(46): 6102-6114.
- De Wulf, P., A. D. McAinsh and P. K. Sorger (2003). "Hierarchical assembly of the budding yeast kinetochore from multiple subcomplexes." *Genes Dev* **17**(23): 2902-2921.
- DeLisi, L. E., U. Friedrich, J. Wahlstrom, A. Boccio-Smith, A. Forsman, K. Eklund and T. J. Crow (1994). "Schizophrenia and sex chromosome anomalies." *Schizophr Bull* **20**(3): 495-505.
- DeLuca, J. G., W. E. Gall, C. Ciferri, D. Cimini, A. Musacchio and E. D. Salmon (2006). "Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1." *Cell* **127**(5): 969-982.
- DePinho, R. A. (2000). "The age of cancer." *Nature* **408**(6809): 248-254.
- Deutschbauer, A. M., D. F. Jaramillo, M. Proctor, J. Kumm, M. E. Hillenmeyer, R. W. Davis, C. Nislow and G. Giaever (2005). "Mechanisms of haploinsufficiency revealed by genome-wide profiling in yeast." *Genetics* **169**(4): 1915-1925.
- Devault, A., E. A. Vallen, T. Yuan, S. Green, A. Bensimon and E. Schwob (2002). "Identification of Tah11/Sid2 as the ortholog of the replication licensing factor Cdt1 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Biol* **12**(8): 689-694.
- Dey, P. (2004). "Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation." *J Clin Pathol* **57**(12): 1245-1249.
- Diffley, J. F. (2004). "Regulation of early events in chromosome replication." *Curr Biol* **14**(18): R778-786.
- Draviam, V. M., I. Shapiro, B. Aldridge and P. K. Sorger (2006). "Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1- or APC-depleted cells." *Embo J* **25**(12): 2814-2827.
- Duensing, S. and K. Munger (2003). "Centrosomes, genomic instability, and cervical carcinogenesis." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **13**(1): 9-23.
- Duesberg, P., R. Li, A. Fabarius and R. Hehlmann (2006). "Aneuploidy and cancer: from correlation to causation." *Contrib Microbiol* **13**: 16-44.
- Duncan, A. W., M. H. Taylor, R. D. Hickey, A. E. Hanlon Newell, M. L. Lenzi, S. B. Olson, M. J. Finegold and M. Grompe (2010). "The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation." *Nature* **467**(7316): 707-710.

- Duncan, F. E., T. Chiang, R. M. Schultz and M. A. Lampson (2009). "Evidence that a defective spindle assembly checkpoint is not the primary cause of maternal age-associated aneuploidy in mouse eggs." *Biol Reprod* **81**(4): 768-776.
- Dunham, M. J., H. Badrane, T. Ferea, J. Adams, P. O. Brown, F. Rosenzweig and D. Botstein (2002). "Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 16144-16149.
- Eckstrand, K., A. M. Addington, T. Stromberg, B. Merriman, R. Miller, P. Gochman, R. Long, A. Dutra, Z. Chen, P. Meltzer, S. F. Nelson and J. L. Rapoport (2008). "Sex chromosome anomalies in childhood onset schizophrenia: an update." *Mol Psychiatry* **13**(10): 910-911.
- Ekwall, K., G. Cranston and R. C. Allshire (1999). "Fission yeast mutants that alleviate transcriptional silencing in centromeric flanking repeats and disrupt chromosome segregation." *Genetics* **153**(3): 1153-1169.
- Embleton, N. D., J. P. Wyllie, M. J. Wright, J. Burn and S. Hunter (1996). "Natural history of trisomy 18." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **75**(1): F38-41.
- Enyenihi, A. H. and W. S. Saunders (2003). "Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **163**(1): 47-54.
- Erjavec, N., M. Cvijovic, E. Klipp and T. Nystrom (2008). "Selective benefits of damage partitioning in unicellular systems and its effects on aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(48): 18764-18769.
- Erjavec, N. and T. Nystrom (2007). "Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(26): 10877-10881.
- Fabrizio, P., C. Gattazzo, L. Battistella, M. Wei, C. Cheng, K. McGrew and V. D. Longo (2005). "Sir2 blocks extreme life-span extension." *Cell* **123**(4): 655-667.
- Fabrizio, P. and V. D. Longo (2007). "The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*." *Methods Mol Biol* **371**: 89-95.
- Fabrizio, P. and V. D. Longo (2008). "Chronological aging-induced apoptosis in yeast." *Biochim Biophys Acta* **1783**(7): 1280-1285.
- Fabrizio, P., F. Pozza, S. D. Pletcher, C. M. Gendron and V. D. Longo (2001). "Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast." *Science* **292**(5515): 288-290.
- Faggioli, F., J. Vijg and C. Montagna (2011). "Chromosomal aneuploidy in the aging brain." *Mech Ageing Dev* **132**(8-9): 429-436.
- Fang, X. and P. Zhang (2011). "Aneuploidy and tumorigenesis." *Semin Cell Dev Biol* **22**(6): 595-601.
- Fenech, M. and A. A. Morley (1985). "The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei." *Mutat Res* **148**(1-2): 99-105.
- Feng, Z., W. Hu, A. K. Teresky, E. Hernando, C. Cordon-Cardo and A. J. Levine (2007). "Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(42): 16633-16638.
- Ferri, C. P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer and M. Sczufca (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." *Lancet* **366**(9503): 2112-2117.
- Feser, J. and J. Tyler (2011). "Chromatin structure as a mediator of aging." *FEBS Lett* **585**(13): 2041-2048.
- Finesilver, C. (2002). "A new age for childhood diseases. Down syndrome." *RN* **65**(11): 43-48; quiz 49.
- Fitch, I., C. Dahmann, U. Surana, A. Amon, K. Nasmyth, L. Goetsch, B. Byers and B. Futcher (1992). "Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **3**(7): 805-818.
- Fitzgerald, P. H. and C. M. McEwan (1977). "Total aneuploidy and age-related sex chromosome aneuploidy in cultured lymphocytes of normal men and women." *Hum Genet* **39**(3): 329-337.
- FitzPatrick, D. R. (2005). "Transcriptional consequences of autosomal trisomy: primary gene dosage with complex downstream effects." *Trends Genet* **21**(5): 249-253.
- Fleig, U., M. Sen-Gupta and J. H. Hegemann (1996). "Fission yeast mal2+ is required for chromosome segregation." *Mol Cell Biol* **16**(11): 6169-6177.
- Fodde, R., J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J. H. Van es, C. Breukel, J. G. Wiegant, R. H. and H. Clevers (2001). "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability." *Nature Cell Biology* **3**: 433-438.
- Foijer, F. (2010). "CiNister thoughts." *Biochem Soc Trans* **38**(6): 1715-1721.
- Ford, J. H. and J. A. Russell (1985). "Differences in the error mechanisms affecting sex and autosomal chromosomes in women of different ages within the reproductive age group." *Am J Hum Genet* **37**(5): 973-983.
- Fulcher, T., M. Griffin, S. Crowley, R. Firth, R. Acheson and N. O'Meara (1998). "Diabetic retinopathy in Down's syndrome." *Br J Ophthalmol* **82**(4): 407-409.
- Furuya, K., K. Takahashi and M. Yanagida (1998). "Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase." *Genes Dev* **12**(21): 3408-3418.
- Futcher, B. and J. Carbon (1986). "Toxic effects of excess cloned centromeres." *Mol Cell Biol* **6**(6): 2213-2222.
- Galipeau, P. C., D. S. Cowan, C. A. Sanchez, M. T. Barrett, M. J. Emond, D. S. Levine, P. S. Rabinovitch and B. J. Reid (1996). "17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7081-7084.
- Galitski, T., A. J. Saldanha, C. A. Styles, E. S. Lander and G. R. Fink (1999). "Ploidy regulation of gene expression." *Science* **285**(5425): 251-254.

- Ganley, A. R., S. Ide, K. Saka and T. Kobayashi (2009). "The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to aging." *Mol Cell* **35**(5): 683-693.
- Gardiner, K. (2004). "Gene-dosage effects in Down syndrome and trisomic mouse models." *Genome Biol* **5**(10): 244.
- Gemma, A., M. Seike, Y. Seike, K. Uematsu, S. Hibino, F. Kurimoto, A. Yoshimura, M. Shibuya, C. C. Harris and S. Kudoh (2000). "Somatic mutation of the hBUB1 mitotic checkpoint gene in primary lung cancer." *Genes Chromosomes Cancer* **29**(3): 213-218.
- Gerring, S. L., F. Spencer and P. Hieter (1990). "The CHL 1 (CTF 1) gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is important for chromosome transmission and normal cell cycle progression in G2/M." *Embo J* **9**(13): 4347-4358.
- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems and R. A. Woods (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." *Yeast* **11**(4): 355-360.
- Glasson, E. J., S. G. Sullivan, R. Hussain, B. A. Petterson, P. D. Montgomery and A. H. Bittles (2002). "The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling." *Clin Genet* **62**(5): 390-393.
- Goodman, H. M., M. V. Olson and B. D. Hall (1977). "Nucleotide sequence of a mutant eukaryotic gene: the yeast tyrosine-inserting ochre suppressor SUP4-o." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5453-5457.
- Gorbosky, G. J. (2001). "The mitotic spindle checkpoint." *Curr Biol* **11**(24): R1001-1004.
- Gorbunova, V., A. Seluanov, Z. Mao and C. Hine (2007). "Changes in DNA repair during aging." *Nucleic Acids Res* **35**(22): 7466-7474.
- Grade, M., P. Hormann, S. Becker, A. B. Hummon, D. Wangsa, S. Varma, R. Simon, T. Liersch, H. Becker, M. J. Difilippantonio, B. M. Ghadimi and T. Ried (2007). "Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy-dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node-negative and lymph node-positive colon carcinomas." *Cancer Res* **67**(1): 41-56.
- Granic, A., J. Padmanabhan, M. Norden and H. Potter (2010). "Alzheimer A $\beta$  peptide induces chromosome mis-segregation and aneuploidy, including trisomy 21: requirement for tau and APP." *Mol Biol Cell* **21**(4): 511-520.
- Green, R. A. and K. B. Kaplan (2003). "Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC." *J Cell Biol* **163**(5): 949-961.
- Gresham, D., M. M. Desai, C. M. Tucker, H. T. Jenq, D. A. Pai, A. Ward, C. G. DeSevo, D. Botstein and M. J. Dunham (2008). "The repertoire and dynamics of evolutionary adaptations to controlled nutrient-limited environments in yeast." *PLoS Genet* **4**(12): e1000303.
- Guacci, V., D. Koshland and A. Strunnikov (1997). "A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*." *Cell* **91**(1): 47-57.
- Guarente, L. (1997). "Aging. What makes us tick?" *Science* **275**(5302): 943-944.
- Guo, M., D. Davis and J. A. Birchler (1996). "Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series." *Genetics* **142**(4): 1349-1355.
- Gupta, A., S. Inaba, O. K. Wong, G. Fang and J. Liu (2003). "Breast cancer-specific gene 1 interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1." *Oncogene* **22**(48): 7593-7599.
- Gupta, G. P. and J. Massague (2006). "Cancer metastasis: building a framework." *Cell* **127**(4): 679-695.
- Guttenbach, M., B. Koschorz, U. Bernthaler, T. Grimm and M. Schmid (1995). "Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei." *Am J Hum Genet* **57**(5): 1143-1150.
- Guttenbach, M., R. Schakowski and M. Schmid (1994). "Aneuploidy and ageing: sex chromosome exclusion into micronuclei." *Hum Genet* **94**(3): 295-298.
- Hagan, I. M. and J. S. Hyams (1988). "The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *J Cell Sci* **89**(Pt 3): 343-357.
- Hamerton, J. L., A. I. Taylor, R. Angell and V. M. McGuire (1965). "Chromosome investigations of a small isolated human population: chromosome abnormalities and distribution of chromosome counts according to age and sex among the population of Tristan da Cunha." *Nature* **206**(990): 1232-1234.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hando, J. C., J. Nath and J. D. Tucker (1994). "Sex chromosomes, micronuclei and aging in women." *Chromosoma* **103**(3): 186-192.
- Harrison, D. E., R. Strong, Z. D. Sharp, J. F. Nelson, C. M. Astle, K. Flurkey, N. L. Nadon, J. E. Wilkinson, K. Frenkel, C. S. Carter, M. Pahor, M. A. Javors, E. Fernandez and R. A. Miller (2009). "Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice." *Nature* **460**(7253): 392-395.
- Hartwell, L. H., S. K. Dutcher, J. S. Wood and B. Garvik (1982). "The fidelity of mitotic chromosome reproduction of *Saccharomyces cerevisiae*." *Rec. Adv. Yeast Mol. Biol.* **1**: 28-38.
- Hartwell, L. H. and D. Smith (1985). "Altered fidelity of mitotic chromosome transmission in cell cycle mutants of *S. cerevisiae*." *Genetics* **110**(3): 381-395.
- Hasle, H., I. H. Clemmensen and M. Mikkelsen (2000). "Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome." *Lancet* **355**(9199): 165-169.
- Hassold, T., N. Chen, J. Funkhouser, T. Jooss, B. Manuel, J. Matsuura, A. Matsuyama, C. Wilson, J. A. Yamane and P. A. Jacobs (1980). "A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions." *Ann Hum Genet* **44**(Pt 2): 151-178.
- Hassold, T. and P. Hunt (2001). "To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy." *Nat Rev Genet* **2**(4): 280-291.

- Hassold, T., D. Warburton, J. Kline and Z. Stein (1984). "The relationship of maternal age and trisomy among trisomic spontaneous abortions." *Am J Hum Genet* **36**(6): 1349-1356.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Hayles, J., D. Fisher, A. Woollard and P. Nurse (1994). "Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex." *Cell* **78**(5): 813-822.
- Hegemann, J. H., S. Klein, S. Heck, U. Guldener, R. K. Niedenthal and U. Fleig (1999). "A fast method to diagnose chromosome and plasmid loss in *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Yeast* **15**(10B): 1009-1019.
- Herker, E., H. Jungwirth, K. A. Lehmann, C. Maldener, K. U. Frohlich, S. Wissing, S. Buttner, M. Fehr, S. Sigrist and F. Madeo (2004). "Chronological aging leads to apoptosis in yeast." *J Cell Biol* **164**(4): 501-507.
- Hieter, P., C. Mann, M. Snyder and R. W. Davis (1985). "Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss." *Cell* **40**(2): 381-392.
- Hieter, P., D. Pridmore, J. H. Hegemann, M. Thomas, R. W. Davis and P. Philippsen (1985). "Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA." *Cell* **42**(3): 913-921.
- Hodges, C. A., E. Revenkova, R. Jessberger, T. J. Hassold and P. A. Hunt (2005). "SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction." *Nat Genet* **37**(12): 1351-1355.
- Hoffman, C. S. and F. Winston (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*." *Gene* **57**(2-3): 267-272.
- Holliday, R. (1989). "Chromosome error propagation and cancer." *Trends Genet* **5**(2): 42-45.
- Hook, E. B., Hamerton, J. L. (1977). The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies – differences between studies – results by sex and severity of phenotypic involvement. *in: Population Cytogenetics*. I. H. Porter, E. B. Hook. New York, National Academy Press: 63– 79.
- Horsman, D. E., F. J. Dill, B. C. McGillivray and D. K. Kalousek (1987). "X chromosome aneuploidy in lymphocyte cultures from women with recurrent spontaneous abortions." *Am J Med Genet* **28**(4): 981-987.
- Hoyt, M. A., L. Totis and B. T. Roberts (1991). "S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function." *Cell* **66**(3): 507-517.
- Hsu, L. Y. (1998). "Genetic Disorders and the Fetus." *Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore*.
- Huang, D. and D. Koshland (2003). "Chromosome integrity in *Saccharomyces cerevisiae*: the interplay of DNA replication initiation factors, elongation factors, and origins." *Genes Dev* **17**(14): 1741-1754.
- Hunt, P. A. and T. J. Hassold (2002). "Sex matters in meiosis." *Science* **296**(5576): 2181-2183.
- Hyman, B. T. (1992). "Down syndrome and Alzheimer disease." *Prog Clin Biol Res* **379**: 123-142.
- Imai, S. and H. Kitano (1998). "Heterochromatin islands and their dynamic reorganization: a hypothesis for three distinctive features of cellular aging." *Exp Gerontol* **33**(6): 555-570.
- Iourov, I. Y., S. G. Vorsanova, T. Liehr and Y. B. Yurov (2009). "Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning." *Neurobiol Dis* **34**(2): 212-220.
- Iourov, I. Y., S. G. Vorsanova and Y. B. Yurov (2011). "Genomic landscape of the Alzheimer's disease brain: chromosome instability--aneuploidy, but not tetraploidy--mediates neurodegeneration." *Neurodegener Dis* **8**(1-2): 35-37; discussion 38-40.
- Ish Horowicz, D. and J. F. Burke (1981). "Rapid and efficient cosmid cloning." *Nucleic Acids Res* **9**(13): 2989-2998.
- Jacobs, P. A., M. Brunton, W. M. Court Brown, R. Doll and H. Goldstein (1963). "Change of human chromosome count distribution with age: evidence for a sex differences." *Nature* **197**: 1080-1081.
- Jacobs, P. A., W. M. Court Brown and R. Doll (1961). "Distribution of human chromosome counts in relation to age." *Nature* **191**: 1178-1180.
- Jarvik, L. F., F. S. Yen, T. K. Fu and S. S. Matsuyama (1976). "Chromosomes in old age: a six year longitudinal study." *Hum Genet* **33**(1): 17-22.
- Jaspersen, S. L. and M. Winey (2004). "The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 1-28.
- Javerzat, J. P., G. Cranston and R. C. Allshire (1996). "Fission yeast genes which disrupt mitotic chromosome segregation when overexpressed." *Nucleic Acids Res* **24**(23): 4676-4683.
- Johnson, F. B., D. A. Sinclair and L. Guarente (1999). "Molecular biology of aging." *Cell* **96**(2): 291-302.
- Johnson, T. E., S. Henderson, S. Murakami, E. de Castro, S. H. de Castro, J. Cypser, B. Rikke, P. Tedesco and C. Link (2002). "Longevity genes in the nematode *Caenorhabditis elegans* also mediate increased resistance to stress and prevent disease." *J Inherit Metab Dis* **25**(3): 197-206.
- Jones, K. T. (2008). "Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age." *Hum Reprod Update* **14**(2): 143-158.
- Juberg, R. C. and P. N. Mowrey (1983). "Origin of nondisjunction in trisomy 21 syndrome: all studies compiled, parental age analysis, and international comparisons." *Am J Med Genet* **16**(1): 111-116.
- Kaerberlein, M. (2010). "Lessons on longevity from budding yeast." *Nature* **464**(7288): 513-519.
- Kaerberlein, M., M. McVey and L. Guarente (1999). "The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms." *Genes Dev* **13**(19): 2570-2580.

- Kaeberlein, M., R. W. Powers, 3rd, K. K. Steffen, E. A. Westman, D. Hu, N. Dang, E. O. Kerr, K. T. Kirkland, S. Fields and B. K. Kennedy (2005). "Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients." *Science* **310**(5751): 1193-1196.
- Kahlem, P. (2006). "Gene-dosage effect on chromosome 21 transcriptome in trisomy 21: implication in Down syndrome cognitive disorders." *Behav Genet* **36**(3): 416-428.
- Kallakury, B. V., C. E. Sheehan, S. J. Rhee, H. A. Fisher, R. P. Kaufman, Jr., M. D. Rifkin and J. S. Ross (1999). "The prognostic significance of proliferation-associated nucleolar protein p120 expression in prostate adenocarcinoma: a comparison with cyclins A and B1, Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, and p34cdc2." *Cancer* **85**(7): 1569-1576.
- Kennedy, B. K., E. D. Smith and M. Kaeberlein (2005). "The enigmatic role of Sir2 in aging." *Cell* **123**(4): 548-550.
- Kingsbury, M. A., Y. C. Yung, S. E. Peterson, J. W. Westra and J. Chun (2006). "Aneuploidy in the normal and diseased brain." *Cell Mol Life Sci* **63**(22): 2626-2641.
- Kirkwood, T. B. and S. N. Austad (2000). "Why do we age?" *Nature* **408**(6809): 233-238.
- Kitada, K., E. Yamaguchi and M. Arisawa (1996). "Isolation of a *Candida glabrata* centromere and its use in construction of plasmid vectors." *Gene* **175**(1-2): 105-108.
- Klein, H. L. (2001). "Spontaneous chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by DNA damage checkpoint functions." *Genetics* **159**(4): 1501-1509.
- Knop, M. and E. Schiebel (1997). "Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p." *Embo J* **16**(23): 6985-6995.
- Knowlton, A. L., W. Lan and P. T. Stukenberg (2006). "Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK." *Curr Biol* **16**(17): 1705-1710.
- Koehler, G. (2005). Funktionelle Charakterisierung der Kinetochorproteine Ame1p und Iml3p sowie des Folsäurebiosyntheseproteins Fol1p in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation HHU Düsseldorf.
- Koliadi, A., C. Nilsson, M. Holmqvist, L. Holmberg, M. de La Torre, F. Warnberg and M. L. Fjallskog (2010). "Cyclin B is an immunohistochemical proliferation marker which can predict for breast cancer death in low-risk node negative breast cancer." *Acta Oncol* **49**(6): 816-820.
- Kops, G. J., D. R. Foltz and D. W. Cleveland (2004). "Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8699-8704.
- Korzeniewski, N., N. Spardy, A. Duensing and S. Duensing (2011). "Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses." *Cancer Lett* **305**(2): 113-122.
- Kouprina, N., M. Eldarov, R. Moyzis, M. Resnick and V. Larionov (1994). "A model system to assess the integrity of mammalian YACs during transformation and propagation in yeast." *Genomics* **21**(1): 7-17.
- Kouprina, N., O. B. Pashina, N. T. Nikolaishvili, A. M. Tsouladze and V. L. Larionov (1988). "Genetic control of chromosome stability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **4**(4): 257-269.
- Kouprina, N., A. Tsouladze, M. Koryabin, P. Hieter, F. Spencer and V. Larionov (1993). "Identification and genetic mapping of CHL genes controlling mitotic chromosome transmission in yeast." *Yeast* **9**(1): 11-19.
- Kourtis, N. and N. Tavernarakis (2011). "Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships." *Embo J* **30**(13): 2520-2531.
- Kudryavtsev, B. N., M. V. Kudryavtseva, G. A. Sakuta and G. I. Stein (1993). "Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **64**(6): 387-393.
- Lai, C. Y., E. Jaruga, C. Borghouts and S. M. Jazwinski (2002). "A mutation in the ATP2 gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **162**(1): 73-87.
- Larionov, V. L., T. S. Karpova, N. Y. Kouprina and G. A. Jouravleva (1985). "A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with impaired maintenance of centromeric plasmids." *Curr Genet* **10**(1): 15-20.
- Laun, P., A. Pichova, F. Madeo, J. Fuchs, A. Ellinger, S. Kohlwein, I. Dawes, K. U. Frohlich and M. Breitenbach (2001). "Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis." *Mol Microbiol* **39**(5): 1166-1173.
- Laun, P., M. Rinnerthaler, E. Bogengruber, G. Heeren and M. Breitenbach (2006). "Yeast as a model for chronological and reproductive aging - a comparison." *Exp Gerontol* **41**(12): 1208-1212.
- Lee, H. (2003). "Impaired phosphorylation and mis-localization of Bub1 and BubR1 are responsible for the defective mitotic checkpoint function in Brca2-mutant thymic lymphomas." *Exp Mol Med* **35**(5): 448-453.
- Lengauer, C. and Z. Wang (2004). "From spindle checkpoint to cancer." *Nat Genet* **36**(11): 1144-1145.
- Li, J. J. and S. A. Li (2006). "Mitotic kinases: the key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis." *Pharmacol Ther* **111**(3): 974-984.
- Li, L., Y. Lu, L. X. Qin, Z. Bar-Joseph, M. Werner-Washburne and L. L. Breeden (2009). "Budding yeast SSD1-V regulates transcript levels of many longevity genes and extends chronological life span in purified quiescent cells." *Mol Biol Cell* **20**(17): 3851-3864.
- Li, R. (1999). "Bifurcation of the mitotic checkpoint pathway in budding yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 4989-4994.
- Li, R. and A. W. Murray (1991). "Feedback control of mitosis in budding yeast." *Cell* **66**(3): 519-531.
- Lin, H. and T. Schagat (1997). "Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells." *Trends Genet* **13**(1): 33-39.

- Lin, S. J., P. A. Defossez and L. Guarente (2000). "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* **289**(5487): 2126-2128.
- Lin, S. J., M. Kaerberlein, A. A. Andalis, L. A. Sturtz, P. A. Defossez, V. C. Culotta, G. R. Fink and L. Guarente (2002). "Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration." *Nature* **418**(6895): 344-348.
- Lingle, W. L. and J. L. Salisbury (1999). "Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors." *Am J Pathol* **155**(6): 1941-1951.
- Lo, Y. L., J. C. Yu, S. T. Chen, G. C. Hsu, Y. C. Mau, S. L. Yang, P. E. Wu and C. Y. Shen (2007). "Breast Cancer Risk Associated with Genotypic Polymorphism of the Mitotic Checkpoint Genes: a Multigenic Study on Cancer Susceptibility." *Carcinogenesis*.
- Longo, V. D., E. B. Gralla and J. S. Valentine (1996). "Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo." *J Biol Chem* **271**(21): 12275-12280.
- Lott, I. T. and E. Head (2005). "Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis." *Neurobiol Aging* **26**(3): 383-389.
- Louis, E. J. and J. E. Haber (1989). "Nonrecombinant meiosis I nondisjunction in *Saccharomyces cerevisiae* induced by tRNA ochre suppressors." *Genetics* **123**(1): 81-95.
- Low, C. P. and H. Yang (2008). "Programmed cell death in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Biochim Biophys Acta* **1783**(7): 1335-1349.
- Lushnikova, T., A. Bouska, J. Odvody, W. D. Dupont and C. M. Eischen (2011). "Aging mice have increased chromosome instability that is exacerbated by elevated Mdm2 expression." *Oncogene*.
- Maine, G. T., P. Sinha and B. K. Tye (1984). "Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes." *Genetics* **106**(3): 365-385.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982). "Molecular cloning. A laboratory manual.". Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual.". Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martin-Castellanos, C., K. Labib and S. Moreno (1996). "B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25rum1 cdk inhibitor." *Embo J* **15**(4): 839-849.
- Martin, G. M. (1978). "Genetic syndromes in man with potential relevance to the pathobiology of aging." *Birth Defects Orig Artic Ser* **14**(1): 5-39.
- Martin, G. M., A. C. Smith, D. J. Ketterer, C. E. Ogburn and C. M. Disteché (1985). "Increased chromosomal aberrations in first metaphases of cells isolated from the kidneys of aged mice." *Isr J Med Sci* **21**(3): 296-301.
- Matecic, M., D. L. Smith, X. Pan, N. Maqani, S. Bekiranov, J. D. Boeke and J. S. Smith (2010). "A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors." *PLoS Genet* **6**(4): e1000921.
- Mattevi, M. S. and F. M. Salzano (1975). "Senescence and human chromosome changes." *Humangenetik* **27**(1): 1-8.
- Mayer, V. W. and A. Aguilera (1990). "High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mutat Res* **231**(2): 177-186.
- McAinsh, A. D., J. D. Tytell and P. K. Sorger (2003). "Structure, function, and regulation of budding yeast kinetochores." *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 519-539.
- McConnell, M. J., D. Kaushal, A. H. Yang, M. A. Kingsbury, S. K. Rehen, K. Treuner, R. Helton, E. G. Annas, J. Chun and C. Barlow (2004). "Failed clearance of aneuploid embryonic neural progenitor cells leads to excess aneuploidy in the *Atm*-deficient but not the *Trp53*-deficient adult cerebral cortex." *J Neurosci* **24**(37): 8090-8096.
- McCulley, J. L. and T. D. Petes (2010). "Chromosome rearrangements and aneuploidy in yeast strains lacking both *Tel1p* and *Mec1p* reflect deficiencies in two different mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(25): 11465-11470.
- McKinnon, P. J. (2004). "ATM and ataxia telangiectasia." *EMBO Rep* **5**(8): 772-776.
- McMurray, M. A. and D. E. Gottschling (2003). "An age-induced switch to a hyper-recombinational state." *Science* **301**(5641): 1908-1911.
- McMurray, M. A. and D. E. Gottschling (2004). "Aging and genetic instability in yeast." *Curr Opin Microbiol* **7**(6): 673-679.
- Medvedev, Z. A. (1990). "An attempt at a rational classification of theories of ageing." *Biol Rev Camb Philos Soc* **65**(3): 375-398.
- Meraldi, P., V. M. Draviam and P. K. Sorger (2004). "Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression." *Dev Cell* **7**(1): 45-60.
- Meraldi, P., A. D. McAinsh, E. Rheinbay and P. K. Sorger (2006). "Phylogenetic and structural analysis of centromeric DNA and kinetochore proteins." *Genome Biol* **7**(3): R23.
- Miao, Y. L., Q. Y. Sun, X. Zhang, J. G. Zhao, M. T. Zhao, L. Spate, R. S. Prather and H. Schatten (2009). "Centrosome abnormalities during porcine oocyte aging." *Environ Mol Mutagen* **50**(8): 666-671.
- Michaelis, C., R. Ciosk and K. Nasmyth (1997). "Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids." *Cell* **91**(1): 35-45.
- Michel, L. S., V. Liberal, A. Chatterjee, R. Kirchwegger, B. Pasche, W. Gerald, M. Dobles, P. K. Sorger, V. V. Murty and R. Benezra (2001). "MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells." *Nature* **409**(6818): 355-359.

- Migliore, L., N. Botto, R. Scarpato, L. Petrozzi, G. Cipriani and U. Bonuccelli (1999). "Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients." *Cytogenet Cell Genet* **87**(1-2): 41-46.
- Migliore, L., F. Coppede, M. Fenech and P. Thomas (2011). "Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases." *Mutagenesis* **26**(1): 85-92.
- Moreno, S., A. Klar and P. Nurse (1991). "Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Methods Enzymol* **194**: 795-823.
- Morrison, E. E. (2009). "The APC-EB1 interaction." *Adv Exp Med Biol* **656**: 41-50.
- Mortimer, R. K. and J. R. Johnston (1959). "Life span of individual yeast cells." *Nature* **183**(4677): 1751-1752.
- Mukherjee, A. B. and S. Thomas (1997). "A longitudinal study of human age-related chromosomal analysis in skin fibroblasts." *Exp Cell Res* **235**(1): 161-169.
- Mullany, L. K., P. White, E. A. Hanse, C. J. Nelsen, M. M. Goggin, J. E. Mullany, C. K. Anttila, L. E. Greenbaum, K. H. Kaestner and J. H. Albrecht (2008). "Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo." *Cell Cycle* **7**(14): 2215-2224.
- Muller, I., M. Zimmermann, D. Becker and M. Flomer (1980). "Calendar life span versus budding life span of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mech Ageing Dev* **12**(1): 47-52.
- Murdoch, J. C., J. C. Rodger, S. S. Rao, C. D. Fletcher and M. G. Dunnigan (1977). "Down's syndrome: an atheroma-free model?" *Br Med J* **2**(6081): 226-228.
- Murray, A. W. and J. W. Szostak (1983). "Construction of artificial chromosomes in yeast." *Nature* **305**(5931): 189-193.
- Nabeshima, K., T. Nakagawa, A. F. Straight, A. Murray, Y. Chikashige, Y. M. Yamashita, Y. Hiraoka and M. Yanagida (1998). "Dynamics of centromeres during metaphase-anaphase transition in fission yeast: Dis1 is implicated in force balance in metaphase bipolar spindle." *Mol Biol Cell* **9**(11): 3211-3225.
- Nasmyth, K. (1993). "Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase." *Curr Opin Cell Biol* **5**(2): 166-179.
- Neurath, P., K. DeRemer, B. Bell, Jarvik and T. Kato (1970). "Chromosome loss compared with chromosome size, age and sex of subjects." *Nature* **225**(5229): 281-282.
- Newell, G. R., M. R. Spitz and J. G. Sider (1989). "Cancer and age." *Semin Oncol* **16**(1): 3-9.
- Nguyen, V. Q., C. Co and J. J. Li (2001). "Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms." *Nature* **411**(6841): 1068-1073.
- Nicholls, P., J. M. Martin and J. Kahn (1978). "A mathematical model predicting chromosome loss in cultured cells of young adults." *J Theor Biol* **73**(2): 237-245.
- Nikolaus, S. and S. Schreiber (2004). "[Molecular mechanisms for the control of life-expectancy]." *Dtsch Med Wochenschr* **129**(16): 903-907.
- Niu, W., Z. Li, W. Zhan, V. R. Iyer and E. M. Marcotte (2008). "Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*." *PLoS Genet* **4**(7): e1000120.
- Niwa, O., T. Matsumoto, Y. Chikashige and M. Yanagida (1989). "Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome deletion derivatives and a functional allocation of their centromere." *Embo J* **8**(10): 3045-3052.
- Niwa, O., T. Matsumoto and M. Yanagida (1986). "Construction of a mini-chromosome by deletion and its mitotic and meiotic behaviour in fission yeast." *Mol Gen Genet* **203**(203): 397-405.
- Niwa, O. and M. Yanagida (1985). "Triploid Meiosis and Aneuploidy in *Schizosaccharomyces-Pombe* - an Unstable Aneuploid Disomic for Chromosome-11." *Current Genetics* **9**(6): 463-470.
- Nowak-Wegrzyn, A., T. O. Crawford, J. A. Winkelstein, K. A. Carson and H. M. Lederman (2004). "Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia." *J Pediatr* **144**(4): 505-511.
- Nowinski, G. P., D. L. Van Dyke, B. C. Tilley, G. Jacobsen, V. R. Babu, M. J. Worsham, G. N. Wilson and L. Weiss (1990). "The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history." *Am J Hum Genet* **46**(6): 1101-1111.
- Obuse, C., O. Iwasaki, T. Kiyomitsu, G. Goshima, Y. Toyoda and M. Yanagida (2004). "A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1." *Nat Cell Biol* **6**(11): 1135-1141.
- Ohshima, K., S. Haraoka, S. Yoshioka, M. Hamasaki, T. Fujiki, J. Suzumiya, C. Kawasaki, M. Kanda and M. Kikuchi (2000). "Mutation analysis of mitotic checkpoint genes (hBUB1 and hBUBR1) and microsatellite instability in adult T-cell leukemia/lymphoma." *Cancer Lett* **158**(2): 141-150.
- Okazaki, K., N. Okazaki, K. Kume, S. Jinno, K. Tanaka and H. Okayama (1990). "High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*." *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6485-6489.
- Olson, M. I. and C. M. Shaw (1969). "Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism." *Brain* **92**(1): 147-156.
- Ouspenski, I. S. J. Elledge and B. R. Brinkley (1999). "New yeast genes important for chromosome integrity and segregation identified by dosage effects on genome stability." *Nucleic Acids Res* **27**(15): 3001-3008.
- Pai, G. S., R. C. Lewandowski and D. S. Bargaonkar (2003). *Handbook of chromosomal syndromes*. New York, John Wiley & Sons.
- Pan, H., P. Ma, W. Zhu and R. M. Schultz (2008). "Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs." *Dev Biol* **316**(2): 397-407.
- Papp, B., C. Pal and L. D. Hurst (2003). "Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast." *Nature* **424**(6945): 194-197.

- Pavan, W. J., P. Hieter and R. H. Reeves (1990). "Generation of deletion derivatives by targeted transformation of human-derived yeast artificial chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(4): 1300-1304.
- Pavelka, N., G. Rancati, J. Zhu, W. D. Bradford, A. Saraf, L. Florens, B. W. Sanderson, G. L. Hattem and R. Li (2010). "Aneuploidy confers quantitative proteome changes and phenotypic variation in budding yeast." *Nature* **468**(7321): 321-325.
- Pearson, H. A. and C. Peers (2006). "Physiological roles for amyloid beta peptides." *J Physiol* **575**(Pt 1): 5-10.
- Penrose, L. S. (1933). "The relative effects of paternal and maternal age in mongolism." *Journal of Genetics* **27**: 219-224.
- Percy, M. E., V. D. Markovic, A. J. Dalton, D. R. McLachlan, J. M. Berg, A. C. Rusk, M. J. Somerville, B. Chodakowski and D. F. Andrews (1993). "Age-associated chromosome 21 loss in Down syndrome: possible relevance to mosaicism and Alzheimer disease." *Am J Med Genet* **45**(5): 584-588.
- Petersen, M. B. and M. Mikkelsen (2000). "Nondisjunction in trisomy 21: origin and mechanisms." *Cytogenet Cell Genet* **91**(1-4): 199-203.
- Peterson, J. B. and H. Ris (1976). "Electron-microscopic study of the spindle and chromosome movement in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Sci* **22**(2): 219-242.
- Pihan, G. A., J. Wallace, Y. Zhou and S. J. Doxsey (2003). "Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas." *Cancer Res* **63**(6): 1398-1404.
- Piper, P. W. (2006). "Long-lived yeast as a model for ageing research." *Yeast* **23**(3): 215-226.
- Piper, P. W., N. L. Harris and M. MacLean (2006). "Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast." *Mech Ageing Dev* **127**(9): 733-740.
- Poddar, A., N. Roy and P. Sinha (1999). "MCM21 and MCM22, two novel genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are required for chromosome transmission." *Mol Microbiol* **31**(1): 349-360.
- Poste, G. and I. J. Fidler (1980). "The pathogenesis of cancer metastasis." *Nature* **283**(5743): 139-146.
- Pot, I., J. Knockleby, V. Aneliunas, T. Nguyen, S. Ah-Kye, G. Liszt, M. Snyder, P. Hieter and J. Vogel (2005). "Spindle checkpoint maintenance requires Ame1 and Okp1." *Cell Cycle* **4**(10): 1448-1456.
- Potter, H. (1991). "Review and hypothesis: Alzheimer disease and Down syndrome--chromosome 21 nondisjunction may underlie both disorders." *Am J Hum Genet* **48**(6): 1192-1200.
- Powers, R. W., 3rd, M. Kaerberlein, S. D. Caldwell, B. K. Kennedy and S. Fields (2006). "Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling." *Genes Dev* **20**(2): 174-184.
- Pressemitteilung (2008). Mitteilung an die Presse - 2876. *Beschäftigung, Sozialpolitik, Gesundheit und Verbraucherschutz*. Luxemburg, Rat der Europäischen Union.
- Pringle, J. R., R. A. Preston, A. E. Adams, T. Stearns, D. G. Drubin, B. K. Haarer and E. W. Jones (1989). "Fluorescence microscopy methods for yeast." *Methods Cell Biol* **31**: 357-435.
- Rajagopalan, H. and C. Lengauer (2004). "Aneuploidy and cancer." *Nature* **432**(7015): 338-341.
- Raji, N. S. and K. S. Rao (1998). "Trisomy 21 and accelerated aging: DNA-repair parameters in peripheral lymphocytes of Down's syndrome patients." *Mech Ageing Dev* **100**(1): 85-101.
- Rancati, G., N. Pavelka, B. Fleharty, A. Noll, R. Trimble, K. Walton, A. Perera, K. Staehling-Hampton, C. W. Seidel and R. Li (2008). "Aneuploidy underlies rapid adaptive evolution of yeast cells deprived of a conserved cytokinesis motor." *Cell* **135**(5): 879-893.
- Rehder, H. (1981). "Pathology of trisomy 21--with particular reference to persistent common atrioventricular canal of the heart." *Hum Genet Suppl* **2**: 57-73.
- Rehen, S. K., Y. C. Yung, M. P. McCreight, D. Kaushal, A. H. Yang, B. S. Almeida, M. A. Kingsbury, K. M. Cabral, M. J. McConnell, B. Anliker, M. Fontanoz and J. Chun (2005). "Constitutional aneuploidy in the normal human brain." *J Neurosci* **25**(9): 2176-2180.
- Reid, R. J., I. Sunjevaric, W. P. Voth, S. Ciccone, W. Du, A. E. Olsen, D. J. Stillman and R. Rothstein (2008). "Chromosome-scale genetic mapping using a set of 16 conditionally stable *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes." *Genetics* **180**(4): 1799-1808.
- Reynolds, L. E., A. R. Watson, M. Baker, T. A. Jones, G. D'Amico, S. D. Robinson, C. Joffre, S. Garrido-Urbani, J. C. Rodriguez-Manzaneque, E. Martino-Echarri, M. Aurrand-Lions, D. Sheer, F. Dagna-Bricarelli, D. Nizetic, C. J. McCabe, A. S. Turnell, S. Kermorgant, B. A. Imhof, R. Adams, E. M. Fisher, V. L. Tybulewicz, I. R. Hart and K. M. Hodivala-Dilke (2010). "Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome." *Nature* **465**(7299): 813-817.
- Rieder, C. L., R. W. Cole, A. Khodjakov and G. Sluder (1995). "The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores." *J Cell Biol* **130**(4): 941-948.
- Roth, G. S., D. K. Ingram and M. A. Lane (1999). "Calorie restriction in primates: will it work and how will we know?" *J Am Geriatr Soc* **47**(7): 896-903.
- Roubertoux, P. L. and B. Kerdelhue (2006). "Trisomy 21: from chromosomes to mental retardation." *Behav Genet* **36**(3): 346-354.
- Roux, A. E., P. Chartrand, G. Ferbeyre and L. A. Rokeach (2010). "Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**(1): 1-8.
- Roux, A. E., A. Leroux, M. A. Alaamery, C. S. Hoffman, P. Chartrand, G. Ferbeyre and L. A. Rokeach (2009). "Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast." *PLoS Genet* **5**(3): e1000408.
- Roux, A. E., A. Quissac, P. Chartrand, G. Ferbeyre and L. A. Rokeach (2006). "Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2." *Ageing Cell* **5**(4): 345-357.

- Rudolph, P., H. Kuhling, P. Alm, M. Ferno, B. Baldetorp, H. Olsson and R. Parwaresch (2003). "Differential prognostic impact of the cyclins E and B in premenopausal and postmenopausal women with lymph node-negative breast cancer." *Int J Cancer* **105**(5): 674-680.
- Sakamaki, T., M. C. Casimiro, X. Ju, A. A. Quong, S. Katiyar, M. Liu, X. Jiao, A. Li, X. Zhang, Y. Lu, C. Wang, S. Byers, R. Nicholson, T. Link, M. Shemluck, J. Yang, S. T. Fricke, P. M. Novikoff, A. Papanikolaou, A. Arnold, C. Albanese and R. Pestell (2006). "Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo." *Mol Cell Biol* **26**(14): 5449-5469.
- Sandberg, A. A., M. M. Cohen, A. A. Rimm and M. L. Levin (1967). "Aneuploidy and age in a population survey." *Am J Hum Genet* **19**(5): 633-643.
- Sandell, L. L. and V. A. Zakian (1993). "Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss." *Cell* **75**(4): 729-739.
- Scarborough, P. R., W. H. Finley and S. C. Finley (1982). "A review of trisomies 21, 18, and 13." *Ala J Med Sci* **19**(2): 174-188.
- Schatten, H., A. Chakrabarti and J. Hedrick (1999). "Centrosome and microtubule instability in aging *Drosophila* cells." *J Cell Biochem* **74**(2): 229-241.
- Schwartz, D. C. and C. R. Cantor (1984). "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis." *Cell* **37**(1): 67-75.
- Schwartz, F. W. (2003). *Das Public Health Buch*, Elsevier, Urban&Fischer Verlag.
- Schwartz, K., K. Richards and D. Botstein (1997). "BIM1 Encodes a Microtubule-binding Protein in Yeast." *Mol Biol Cell* **8**(12): 2677-2691.
- Sears, D. D., J. H. Hegemann and P. Hieter (1992). "Meiotic recombination and segregation of human-derived artificial chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5296-5300.
- Sears, D. D., J. H. Hegemann, J. H. Shero and P. Hieter (1995). "Cis-acting determinants affecting centromere function, sister-chromatid cohesion and reciprocal recombination during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **139**(3): 1159-1173.
- Selesniemi, K., H. J. Lee, A. Muhlhauser and J. L. Tilly (2011). "Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(30): 12319-12324.
- Selman, C., J. M. Tullet, D. Wieser, E. Irvine, S. J. Lingard, A. I. Choudhury, M. Claret, H. Al-Qassab, D. Carmignac, F. Ramadani, A. Woods, I. C. Robinson, E. Schuster, R. L. Batterham, S. C. Kozma, G. Thomas, D. Carling, K. Okkenhaug, J. M. Thornton, L. Partridge, D. Gems and D. J. Withers (2009). "Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span." *Science* **326**(5949): 140-144.
- Selmecki, A., A. Forche and J. Berman (2006). "Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*." *Science* **313**(5785): 367-370.
- Selmecki, A., M. Gerami-Nejad, C. Paulson, A. Forche and J. Berman (2008). "An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, *ERG11* and *TAC1*." *Mol Microbiol* **68**(3): 624-641.
- Semsei, I. (2000). "On the nature of aging." *Mech Ageing Dev* **117**(1-3): 93-108.
- Sen, S. (2000). "Aneuploidy and cancer." *Curr Opin Oncol* **12**(1): 82-88.
- Shaw, J. (2008). "Trisomy 18: a case study." *Neonatal Netw* **27**(1): 33-41.
- Shcheprova, Z., S. Baldi, S. B. Frei, G. Gonnet and Y. Barral (2008). "A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding." *Nature* **454**(7205): 728-734.
- Sheltzer, J. M. and A. Amon (2011). "The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype." *Trends Genet* **27**(11): 446-453.
- Sheltzer, J. M., H. M. Blank, S. J. Pfau, Y. Tange, B. M. George, T. J. Humpton, I. L. Brito, Y. Hiraoka, O. Niwa and A. Amon (2011). "Aneuploidy drives genomic instability in yeast." *Science* **333**(6045): 1026-1030.
- Sherr, C. J. (1995). "D-type cyclins." *Trends Biochem Sci* **20**(5): 187-190.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **122**(1): 19-27.
- Sinclair, D. A. and L. Guarente (1997). "Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast." *Cell* **91**(7): 1033-1042.
- Sinclair, D. A., K. Mills and L. Guarente (1998). "Molecular mechanisms of yeast aging." *Trends Biochem Sci* **23**(4): 131-134.
- Skibbens, R. V. and P. Hieter (1998). "Kinetochores and the checkpoint mechanism that monitors for defects in the chromosome segregation machinery." *Annu Rev Genet* **32**: 307-337.
- Slegers, K., N. Brouwers, I. Gijssels, J. Theuns, D. Goossens, J. Wauters, J. Del-Favero, M. Cruts, C. M. van Duijn and C. Van Broeckhoven (2006). "APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy." *Brain* **129**(Pt 11): 2977-2983.
- Smeal, T., J. Claus, B. Kennedy, F. Cole and L. Guarente (1996). "Loss of transcriptional silencing causes sterility in old mother cells of *S. cerevisiae*." *Cell* **84**(4): 633-642.
- Smith, D. L., Jr., J. M. McClure, M. Matecic and J. S. Smith (2007). "Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins." *Aging Cell* **6**(5): 649-662.
- Smith, E. D., M. Tsuchiya, L. A. Fox, N. Dang, D. Hu, E. O. Kerr, E. D. Johnston, B. N. Tchao, D. N. Pak, K. L. Welton, D. E. Promislow, J. H. Thomas, M. Kaeberlein and B. K. Kennedy (2008). "Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species." *Genome Res* **18**(4): 564-570.

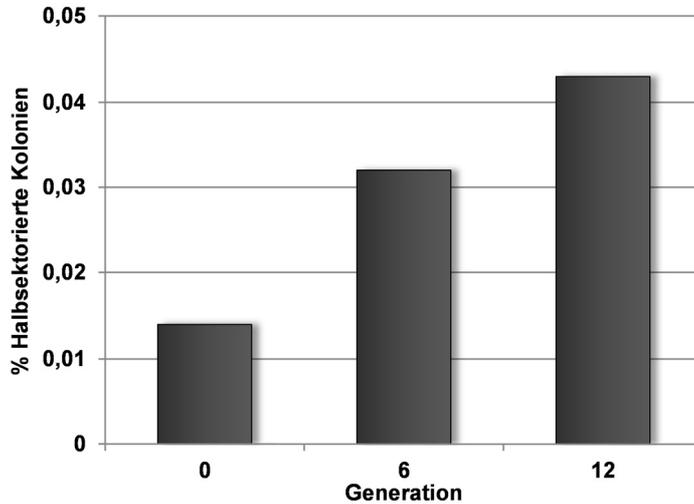
- Smith, G. F. and J. M. Berg (1976). Down's anomaly. New York, Churchill Livingstone.
- Smogorzewska, A. and T. de Lange (2002). "Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells." Embo J **21**(16): 4338-4348.
- Sohal, R. S. and R. Weindruch (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." Science **273**(5271): 59-63.
- Sorrentino, R., S. Libertini, P. L. Pallante, G. Troncone, L. Palombini, V. Bavetsias, D. Spalletti-Cernia, P. Laccetti, S. Linardopoulos, P. Chieffi, A. Fusco and G. Portella (2005). "Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation." J Clin Endocrinol Metab **90**(2): 928-935.
- Spencer, F., S. L. Gerring, C. Connelly and P. Hieter (1990). "Mitotic chromosome transmission fidelity mutants in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **124**(2): 237-249.
- St John, T. P., S. Scherer, M. W. McDonell and R. W. Davis (1981). "Deletion analysis of the *Saccharomyces GAL* gene cluster. Transcription from three promoters." J Mol Biol **152**(2): 317-334.
- Stahl, F. W. (1995). "The amber mutants of phage T4." Genetics **141**(2): 439-442.
- Stanfel, M. N., L. S. Shamieh, M. Kaeberlein and B. K. Kennedy (2009). "The TOR pathway comes of age." Biochim Biophys Acta **1790**(10): 1067-1074.
- Steffen, K. K., B. K. Kennedy and M. Kaeberlein (2009). "Measuring replicative life span in the budding yeast." J Vis Exp(28).
- Steinkraus, K. A., M. Kaeberlein and B. K. Kennedy (2008). "Replicative aging in yeast: the means to the end." Annu Rev Cell Dev Biol **24**: 29-54.
- Stern, B. M. and A. W. Murray (2001). "Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast." Curr Biol **11**(18): 1462-1467.
- Stirling, P. C., M. S. Bloom, T. Solanki-Patil, S. Smith, P. Sipahimalani, Z. Li, M. Kofoed, S. Ben-Aroya, K. Myung and P. Hieter (2011). "The complete spectrum of yeast chromosome instability genes identifies candidate CIN cancer genes and functional roles for ASTRA complex components." PLoS Genet **7**(4): e1002057.
- Storchova, Z. and D. Pellman (2004). "From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(1): 45-54.
- Strunnikov, A. V. and R. Jessberger (1999). "Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: conserved molecular properties for multiple biological functions." Eur J Biochem **263**(1): 6-13.
- Su, L. K., M. Burrell, D. E. Hill, J. Gyuris, R. Brent, R. Wiltshire, J. Trent, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1995). "APC binds to the novel protein EB1." Cancer Res **55**(14): 2972-2977.
- Subramanian, V. V. and S. E. Bickel (2008). "Aging predisposes oocytes to meiotic nondisjunction when the cohesin subunit SMC1 is reduced." PLoS Genet **4**(11): e1000263.
- Subramanian, V. V. and S. E. Bickel (2009). "Heterochromatin-mediated association of achiasmate homologs declines with age when cohesion is compromised." Genetics **181**(4): 1207-1218.
- Surralles, J., G. Falck and H. Norppa (1996). "In vivo cytogenetic damage revealed by FISH analysis of micronuclei in uncultured human T lymphocytes." Cytogenet Cell Genet **75**(2-3): 151-154.
- Suter, B., A. Tong, M. Chang, L. Yu, G. W. Brown, C. Boone and J. Rine (2004). "The origin recognition complex links replication, sister chromatid cohesion and transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **167**(2): 579-591.
- Suzuki, T., T. Urano, Y. Miki, T. Moriya, J. Akahira, T. Ishida, K. Horie, S. Inoue and H. Sasano (2007). "Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor." Cancer Sci **98**(5): 644-651.
- Takahashi, K., H. Yamada and M. Yanagida (1994). "Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality." Mol Biol Cell **5**(10): 1145-1158.
- Tanaka, T. U. (2010). "Kinetochore-microtubule interactions: steps towards bi-orientation." Embo J **29**(24): 4070-4082.
- Tanaka, T. U., M. J. Stark and K. Tanaka (2005). "Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(12): 929-942.
- Theis, J. F. and C. S. Newlon (1992). "The DNA sequence of a 762 bp fragment containing the SUP11-1 gene." Yeast **8**(3): 223-225.
- Thomas, P. and M. Fenech (2008). "Chromosome 17 and 21 aneuploidy in buccal cells is increased with ageing and in Alzheimer's disease." Mutagenesis **23**(1): 57-65.
- Thompson, S. L., S. F. Bakhoun and D. A. Compton (2010). "Mechanisms of chromosomal instability." Curr Biol **20**(6): R285-295.
- Thompson, S. L. and D. A. Compton (2011). "Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(44): 17974-17978.
- Tighe, A., V. L. Johnson and S. S. Taylor (2004). "Truncating APC mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability." J Cell Sci **117**(Pt 26): 6339-6353.
- Tirnauer, J. S. and B. E. Bierer (2000). "EB1 Proteins Regulate Microtubule Dynamics, Cell Polarity, and Chromosome Stability." J Cell Biol **149**(4): 761-766.
- Tirnauer, J. S., J. C. Canman, E. D. Salmon and T. J. Mitchison (2002). "EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules." Mol Biol Cell **13**(12): 4308-4316.
- Tissenbaum, H. A. and L. Guarente (2002). "Model organisms as a guide to mammalian aging." Dev Cell **2**(1): 9-19.

- Tomonaga, T. and F. Nomura (2007). "Chromosome instability and kinetochore dysfunction." *Histol Histopathol* **22**(2): 191-197.
- Tong, A. H., G. Lesage, G. D. Bader, H. Ding, H. Xu, X. Xin, J. Young, G. F. Berriz, R. L. Brost, M. Chang, Y. Chen, X. Cheng, G. Chua, H. Friesen, D. S. Goldberg, J. Haynes, C. Humphries, G. He, S. Hussein, L. Ke, N. Krogan, Z. Li, J. N. Levinson, H. Lu, P. Menard, C. Munyana, A. B. Parsons, O. Ryan, R. Tonikian, T. Roberts, A. M. Sdicu, J. Shapiro, B. Sheikh, B. Suter, S. L. Wong, L. V. Zhang, H. Zhu, C. G. Burd, S. Munro, C. Sander, J. Rine, J. Greenblatt, M. Peter, A. Bretscher, G. Bell, F. P. Roth, G. W. Brown, B. Andrews, H. Bussey and C. Boone (2004). "Global mapping of the yeast genetic interaction network." *Science* **303**(5659): 808-813.
- Torres, E. M., T. Sokolsky, C. M. Tucker, L. Y. Chan, M. Boselli, M. J. Dunham and A. Amon (2007). "Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast." *Science* **317**(5840): 916-924.
- Torres, E. M., B. R. Williams and A. Amon (2008). "Aneuploidy: cells losing their balance." *Genetics* **179**(2): 737-746.
- Tsuchiya, D., C. Gonzalez and S. Lacefield (2011). "The spindle checkpoint protein Mad2 regulates APC/C activity during prometaphase and metaphase of meiosis I in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **22**(16): 2848-2861.
- Tye, B. K. (1999). "MCM proteins in DNA replication." *Annu Rev Biochem* **68**: 649-686.
- Uhlmann, F. and K. Nasmyth (1998). "Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication." *Curr Biol* **8**(20): 1095-1101.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley and C. B. Thompson (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* **324**(5930): 1029-1033.
- Vermeulen, C. J. and V. Loeschcke (2007). "Longevity and the stress response in *Drosophila*." *Exp Gerontol* **42**(3): 153-159.
- Villeponteau, B. (1997). "The heterochromatin loss model of aging." *Exp Gerontol* **32**(4-5): 383-394.
- Vinh, D. B., J. W. Kern, W. O. Hancock, J. Howard and T. N. Davis (2002). "Reconstitution and characterization of budding yeast gamma-tubulin complex." *Mol Biol Cell* **13**(4): 1144-1157.
- Visootsak, J. and J. M. Graham, Jr. (2006). "Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies." *Orphanet J Rare Dis* **1**: 42.
- Wagner, M., B. Hampel, D. Bernhard, M. Hala, W. Zwerschke and P. Jansen-Durr (2001). "Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis." *Exp Gerontol* **36**(8): 1327-1347.
- Wang, A., N. Yoshimi, N. Ino, T. Tanaka and H. Mori (1997). "Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers." *J Cancer Res Clin Oncol* **123**(2): 124-127.
- Wang, C. C., Y. Kazuki, M. Oshimura, K. Ikey and T. Gojobori (2011). "Gene dosage imbalance of human chromosome 21 in mouse embryonic stem cells differentiating to neurons." *Gene* **481**(2): 93-101.
- Wang, Y., C. D. Putnam, M. F. Kane, W. Zhang, L. Edelmann, R. Russell, D. V. Carrion, L. Chin, R. Kucherlapati, R. D. Kolodner and W. Edelmann (2005). "Mutation in Rpa1 results in defective DNA double-strand break repair, chromosomal instability and cancer in mice." *Nat Genet* **37**(7): 750-755.
- Ward, B. E., R. H. Cook, A. Robinson and J. H. Austin (1979). "Increased aneuploidy in Alzheimer disease." *Am J Med Genet* **3**(2): 137-144.
- Wassmann, K. and R. Benezra (2001). "Mitotic checkpoints: from yeast to cancer." *Curr Opin Genet Dev* **11**(1): 83-90.
- Watanabe, Y. (2005). "Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres." *Trends Genet* **21**(7): 405-412.
- Weaver, B. A. and D. W. Cleveland (2006). "Does aneuploidy cause cancer?" *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 658-667.
- Weaver, B. A., A. D. Silk, C. Montagna, P. Verdier-Pinard and D. W. Cleveland (2007). "Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor." *Cancer Cell* **11**(1): 25-36.
- Weindruch, R. and R. L. Walford (1988). *The retardation of aging and disease by dietary restriction*. Springfield, Ill., U.S.A., C.C. Thomas.
- Wenger, S. L., W. L. Golden, S. P. Dennis and M. W. Steele (1984). "Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant?" *Am J Med Genet* **19**(4): 715-719.
- Wojda, A. and M. Witt (2003). "Manifestations of ageing at the cytogenetic level." *J Appl Genet* **44**(3): 383-399.
- Woods, A., T. Sherwin, R. Sasse, T. H. MacRae, A. J. Baines and K. Gull (1989). "Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies." *J Cell Sci* **93**(Pt 3): 491-500.
- Wullschleger, S., R. Loewith and M. N. Hall (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." *Cell* **124**(3): 471-484.
- Yalcin, A., B. F. Clem, A. Simmons, A. Lane, K. Nelson, A. L. Clem, E. Brock, D. Siow, B. Wattenberg, S. Telang and J. Chesney (2009). "Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases." *J Biol Chem* **284**(36): 24223-24232.
- Yen, K., P. Gitsham, J. Wishart, S. G. Oliver and N. Zhang (2003). "An improved tetO promoter replacement system for regulating the expression of yeast genes." *Yeast* **20**(15): 1255-1262.
- Yu, H. (2002). "Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint." *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 706-714.
- Yuen, K. W., C. D. Warren, O. Chen, T. Kwok, P. Hieter and F. A. Spencer (2007). "Systematic genome instability screens in yeast and their potential relevance to cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 3925-3930.

- Yurov, Y. B., I. Y. Iourov, V. V. Monakhov, I. V. Soloviev, V. M. Vostrikov and S. G. Vorsanova (2005). "The variation of aneuploidy frequency in the developing and adult human brain revealed by an interphase FISH study." *J Histochem Cytochem* **53**(3): 385-390.
- Yurov, Y. B., I. Y. Iourov, S. G. Vorsanova, T. Liehr, A. D. Kolotii, S. I. Kutsev, F. Pellestor, A. K. Beresheva, I. A. Demidova, V. S. Kravets, V. V. Monakhov and I. V. Soloviev (2007). "Aneuploidy and confined chromosomal mosaicism in the developing human brain." *PLoS One* **2**(6): e558.
- Yurov, Y. B., S. G. Vorsanova and I. Y. Iourov (2009). "GIN'n'CIN hypothesis of brain aging: deciphering the role of somatic genetic instabilities and neural aneuploidy during ontogeny." *Mol Cytogenet* **2**: 23.
- Zachariae, W., T. H. Shin, M. Galova, B. Obermaier and K. Nasmyth (1996). "Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* **274**(5290): 1201-1204.
- Zhang, N., G. Ge, R. Meyer, S. Sethi, D. Basu, S. Pradhan, Y. J. Zhao, X. N. Li, W. W. Cai, A. K. El-Naggar, V. Baladandayuthapani, F. S. Kittrell, P. H. Rao, D. Medina and D. Pati (2008). "Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35): 13033-13038.
- Zhang, R. and P. D. Adams (2007). "Heterochromatin and its relationship to cell senescence and cancer therapy." *Cell Cycle* **6**(7): 784-789.
- Zhao, Y. and H. B. Lieberman (1995). "Schizosaccharomyces pombe: a model for molecular studies of eukaryotic genes." *DNA Cell Biol* **14**(5): 359-371.
- Zinn, A. R., D. C. Page and E. M. Fisher (1993). "Turner syndrome: the case of the missing sex chromosome." *Trends Genet* **9**(3): 90-93.
- Zinn, A. R. and J. L. Ross (1998). "Turner syndrome and haploinsufficiency." *Curr Opin Genet Dev* **8**(3): 322-327.

## 6 Anhang

### 6.1 Zusätzliche Abbildungen und Tabellen



**Abb. 6-1** Mit zunehmendem replikativen Alter steigt die Chromosomeninstabilität in haploiden Hefezellen linear an.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil halbsektorierte Kolonien eines wildtypischen, YAC tragenden haploiden *S. cerevisiae* Stamms, die aus Zellen unterschiedlichen replikativen Alters (Generation) gebildet wurden. Aufgrund der geringen Lebensfähigkeit älterer Zellen war nur eine Isolation und Analyse von Zellen bis Generation 12 möglich.

**Tab. 6-1** Detaillierte Angaben zur Erstellung der homo- und heterozygoten Deletionen im diploiden, YAC tragenden *S. cerevisiae* Stamm.

Kapitel Nr.	S. c. Stamm Nr.	Stammbezeichnung im Ergebnisteil: 2n + Y (...)	Genetischer Marker	Deletions-Oligonukleotide Nr.	Verifikation	
					Primer für: 5' → 3' / 3' → 5'	PCR Produkt (Bp)
3.1.3.1	51	$\Delta mad2/\Delta mad2$	<i>ble<sup>R</sup></i>	1164+1165	1168+888	418
			<i>kan<sup>R</sup></i>	1166+1167	1169+889 1168+303 1169+290	299 1187 1080
3.1.3.13. 3.4.3.2	66	$\Delta bub3/\Delta bub3$	<i>ble<sup>R</sup></i>	1241+1242 <sup>1</sup>	1245+888	433
			<i>kan<sup>R</sup></i>	1243+1244 <sup>1</sup>	1246+889 1245+303 1246+290	376 1187 1080
3.1.3.1	62	$\Delta bub3/BUB3$	<i>ble<sup>R</sup></i>	1241+1242	1245+888 1246+889	433 376
3.1.3.2	64	$\Delta mcm21/\Delta mcm21$	<i>ble<sup>R</sup></i>	1235+1236 <sup>1</sup>	1239+888	433
			<i>kan<sup>R</sup></i>	1237+1238 <sup>1</sup>	1240+889 1239+303 1240+290	366 1221 1177
3.1.3.2	68	$\Delta ame1/AME1$	<i>ble<sup>R</sup></i>	*1319+*1320	1321+888 1322+889	433 316
3.1.3.3	63	$\Delta bim1/\Delta bim1$	<i>ble<sup>R</sup></i>	1229+1230	1233+888	433
			<i>kan<sup>R</sup></i>	1231+1232	1234+889 1233+303 1234+290	316 1187 1080
3.1.3.3	60	$\Delta bim1/BIM1$	<i>ble<sup>R</sup></i>	1231+1232	1233+303 1234+290	1187 1080
3.1.3.4	85	$\Delta smc1/SMC1$	<i>ble<sup>R</sup></i>	*1355+*1356	1357+888 1358+889	402 337
3.1.3.5	83	$\Delta spc97/SPC97$	<i>ble<sup>R</sup></i>	*1367+*1368	1369+888 1370+889	413 365
3.1.3.6	89	$\Delta mcm2/MCM2$	<i>ble<sup>R</sup></i>	*1359+*1360	1361+888	403
			<i>ble<sup>R</sup></i>	*1363+*1364	1362+889	497
3.1.3.6	82	$\Delta mcm7/MCM7$	<i>ble<sup>R</sup></i>	*1363+*1364	1365+888 1366+889	343 406

(Die Tabellenlegende befindet sich auf der folgenden Seite.)

**Tab. 6-1 Detaillierte Angaben zur Erstellung der homo- und heterozygoten Deletionen im diploiden, YAC tragenden *S. cerevisiae* Stamm.**

Die erstellten Mutanten sind mit zugeordneten Stammnummern, Bezeichnungen und den Kapiteln, in denen sie beschrieben wurden, dargestellt. Die Deletionsoligonukleotide wiesen 40 Bp bzw. 60 Bp (\*) Homologie zum Integrationsort auf, der sich direkt 40 (für die *kan<sup>R</sup>* Kasette) bzw. 80 Bp (für die *ble<sup>R</sup>* Kasette) vor und hinter den zu deletierenden ORFs befand. Die für die Erstellung der *ble<sup>R</sup>* bzw. *kan<sup>R</sup>* Deletionskasette verwendeten Oligonukleotide sowie die zur Überprüfung der Übergänge vom Integrationsort zur Deletionskasette eingesetzten Verifikationsoligonukleotide mit den erwarteten PCR-Produktgrößen sind angegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Kap. 2.9 aufgeführt. Y: YAC; R: Resistenz; Bp: Basenpaare.

Alle Stämme weisen neben der angegebenen Deletion folgenden Genotyp auf:

*ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1 his3 leu2* ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, *ura3-52' lys2-801 amber' ade2-101 ochre' trp1' his3' leu2'* ( $\Delta$ CEN6::CEN2 LEU2) [YAC12-UT (CEN4) URA3, SUP11, azentrischer Arm: TRP1],  $\alpha/\alpha$ ; *trp1 = trp1- $\Delta$ 1; his3 = his3- $\Delta$ 200; leu2 = leu2- $\Delta$ 1*

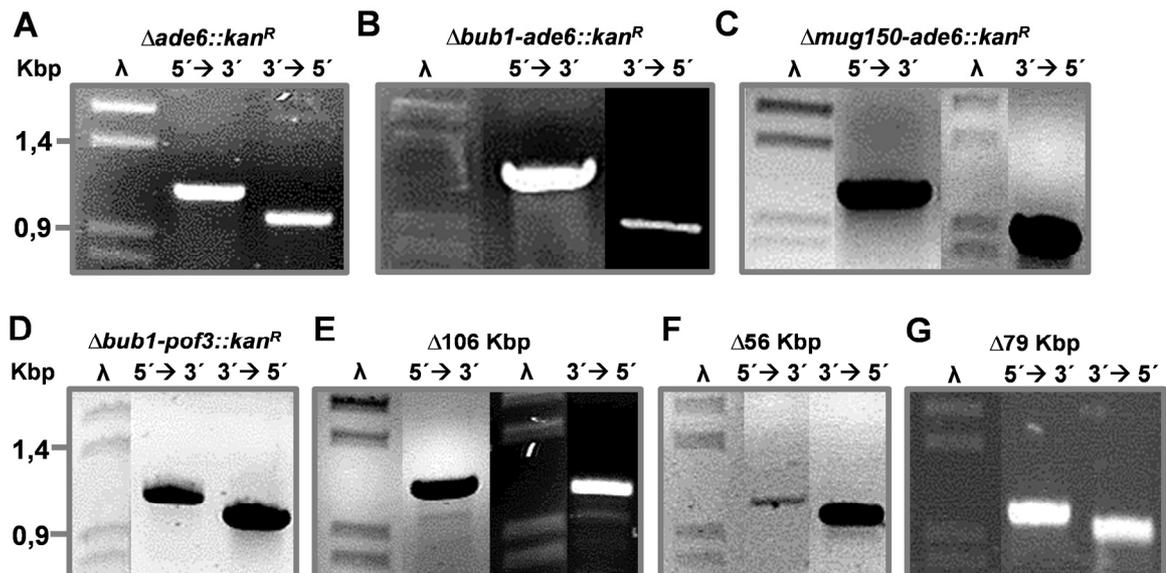
<sup>1</sup>Diese 3'→5'-orientierten Oligonukleotide beinhalten die letzten 30 Bp (*kan<sup>R</sup>*) des zu deletierenden ORFs bzw. die Homologie befand sich lediglich 50 Bp (*ble<sup>R</sup>*) hinter dem ORF, da die Expression des dicht angrenzende Gens durch eine mögliche Deletion von dessen Promotor/Terminatorbereich nicht beeinflusst werden sollte.

**Tab. 6-2 Detaillierte Angaben zur Erstellung der Deletionen im Minichromosom Ch16 tragenden *S. pombe* Stamm.**

Kapitel Nr.	Stamm Nr.	Stammbezeichnung im Ergebnisteil: 1n + Ch16 (...)	Koordinaten des Deletionsbereichs auf Chr. III*	Deletions-Oligonukleotide Nr.	Verifikation		
					Primer für: 5'→3' / 3'→5'	PCR Produkt (Bp)	PCR Produkte in Abb.
3.3.4.3.1	1516	$\Delta$ ade6::kan <sup>R</sup>	1316337-1317995	691 + 692	303 + 694 290 + 695	1147 1044	Abb. 6-2A
3.3.4.3.2	1538	$\Delta$ bub1-ade6::kan <sup>R</sup>	1312798-1317995	744 + 692	303 + 747 290 + 695	1177 1044	Abb. 6-2B
3.3.4.3.3	1626/1627	$\Delta$ mug150-ade6::kan <sup>R</sup>	1300640-1317995	861 + 692	303 + 862 290 + 695	1119 1044	Abb. 6-2C
3.3.4.3.3	1612/1613	$\Delta$ bub1-pof3::kan <sup>R</sup>	1312798-1347127	744 + 794	303 + 747 290 + 796	1177 1101	Abb. 6-2D
3.3.4.3.4	1633/1635	$\Delta$ 106 Kbp	1212008-1317995	875 + 692	303 + 878 290 + 695	1119 1044	Abb. 6-2E
3.3.4.3.5	1693/1694	$\Delta$ 56 Kbp	1261606-1317995	898 + 692	303 + 900 290 + 695	1095 1044	Abb. 6-2F
3.3.4.3.5	1692	$\Delta$ 79 Kbp	1239385-1317995	899 + 692	303 + 901 290 + 695	1088 1044	Abb. 6-2G
3.3.4.3.6	2028	$\Delta$ arp6-vgl1	1212008-1221017	1263 + 1264	303 + 1271 290 + 1272	1135 1126	Abb. 6-3A
3.3.4.3.6	2065-2067	$\Delta$ SPCC550.15c-cig1	1221616-1228792	1265 + 1266	303 + 1307 290 + 1274	1450 1211	Abb. 6-3B
3.3.4.3.6	2031	$\Delta$ gep4-nse3	1229724-1233171	1267 + 1268	303 + 1275 290 + 1276	1085 1073	Abb. 6-3C
3.3.4.3.6	2098	Disrupt. <i>myo2</i>	1235720-1235820	1396 + 1397	303 + 1398 290 + 1399	1120 1118	Abb. 6-3D
3.3.4.3.6	2111	$\Delta$ rec11::kan <sup>R</sup>	1223686-1226925	1454 + 1455	303 + 1456 290 + 1457	919 1184	Abb. 6-3E
3.3.4.3.6	2106	$\Delta$ cig1::kan <sup>R</sup>	1227545-1228792	1458 + 1266	303 + 1459 290 + 1274	1179 1211	Abb. 6-3F

Die erstellten Mutanten sind mit zugeordneten Stammnummern, Bezeichnungen und den Kapiteln, in denen sie beschrieben wurden, dargestellt. Alle Stämme weisen neben der angegebenen Deletion folgenden Genotyp auf: *ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16 [ade6-M216], h<sup>-</sup>*. Die Koordinaten des deletierten Bereichs, die für die Erstellung der Deletionskasette verwendeten Oligonukleotide sowie die zur Überprüfung der Übergänge vom Integrationsort zur Deletionskasette eingesetzten Verifikationsoligonukleotide mit den erwarteten PCR-Produktgrößen sind angegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Kap. 2.9 aufgeführt. Bp: Basenpaare. Kbp: Kilobasenpaare.

\* Die Koordinaten entsprechen den Nukleotidpositionen auf Chr. III. Die Sequenz von Ch16 ist zu einem Abschnitt von Chr. III identisch.



**Abb. 6-2 Verifikations-PCR zum Nachweis der Deletion chromosomaler Bereiche bis einschließlich des *ade6*-Allels auf dem Minichromosom Ch16.**

G418-resistente Transformanden wurden auf die Anwesenheit der beiden Übergänge (5'→3' und 3'→5') vom Integrationsort auf dem Minichromosom Ch16 zur *kan<sup>R</sup>*-Deletionskassette mittels PCR auf Zellen geprüft. Die PCR-Produkte wurden in einem 0,7 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und sind exemplarisch für einen Klon des angegebenen Genotyps auf einem Ausschnitt des Agarosegels dargestellt. **A** PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta ade6::kan^R$ ) sind in der erwarteten Höhe von etwa 1,1 bzw. 1 Kbp zu erkennen. **B** PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta bub1-ade6::kan^R$ ) sind in der erwarteten Höhe von etwa 1,2 bzw. 1 Kbp zu sehen. **C** Die PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta mug150-ade6::kan^R$ ) wiesen die erwartete Höhe von etwa 1,1 bzw. 1 Kbp auf. **D** PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta bub1-pof3::kan^R$ ) in der erwarteten Höhe von etwa 1,2 bzw. 1,1 Kbp. **E** Dargestellt sind die PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta 106$  Kbp) in der erwarteten Höhe von etwa 1,1 bzw. 1 Kbp. **F** Die PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta 56$  Kbp) liegen in der erwarteten Höhe von etwa 1,1 bzw. 1 Kbp. **G** Zu sehen sind PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta 79$  Kbp) in der erwarteten Höhe von etwa 1,1 bzw. 1 Kbp.

$\lambda$ :  $\lambda$ -Phagen-DNA Größenstandard, Kbp: Kilobasenpaare.

**Abb. 6-3 Verifikations-PCR zum Nachweis der Deletion chromosomaler Bereiche auf dem Minichromosom Ch16 bzw. Chr. III bei Anwesenheit der *ade6* Allele.**

Mit der *kan<sup>R</sup>*-Deletionskassette transformierte Zellen wurden auf die Anwesenheit der beiden Übergänge (5'→3' und 3'→5') vom Integrationsort auf dem Chromosom zur Kassette mittels PCR auf Zellen geprüft. Die Stämme enthielten das Minichromosom Ch16. Die PCR-Produkte wurden in einem 0,7 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR Produkte für einen Klon des angegebenen Genotyps sind exemplarisch auf einem Ausschnitt des Agarosegels dargestellt.

**A** Die PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta arp6-vgl1$ ) liegen in der erwarteten Höhe von etwa 1,1 Kbp. **B** Für die PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta SPCC550.15c-cig1$ ) wurden Banden in der erwarteten Höhe von etwa 1,5 bzw. 1,2 Kbp sichtbar. **C** Die PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta gep4-nse3$ ) sind in der erwarteten Höhe von etwa 1,1 Kbp zu erkennen. **D** Dargestellt sind die PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 (Disrupt. *myo2*). Sie liegen in der erwarteten Höhe von etwa 1,1 Kbp. **E** Die PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta rec11::kan^R$ ) sind in der erwarteten Höhe von etwa 0,9 bzw. 1,2 Kbp zu sehen. **F** Die PCR Produkte des Stamms 1n + Ch16 ( $\Delta cig1::kan^R$ ) weisen die erwartete Höhe von etwa 1,2 Kbp auf.

M: GeneRuler-Größenstandard, Kbp: Kilobasenpaare.

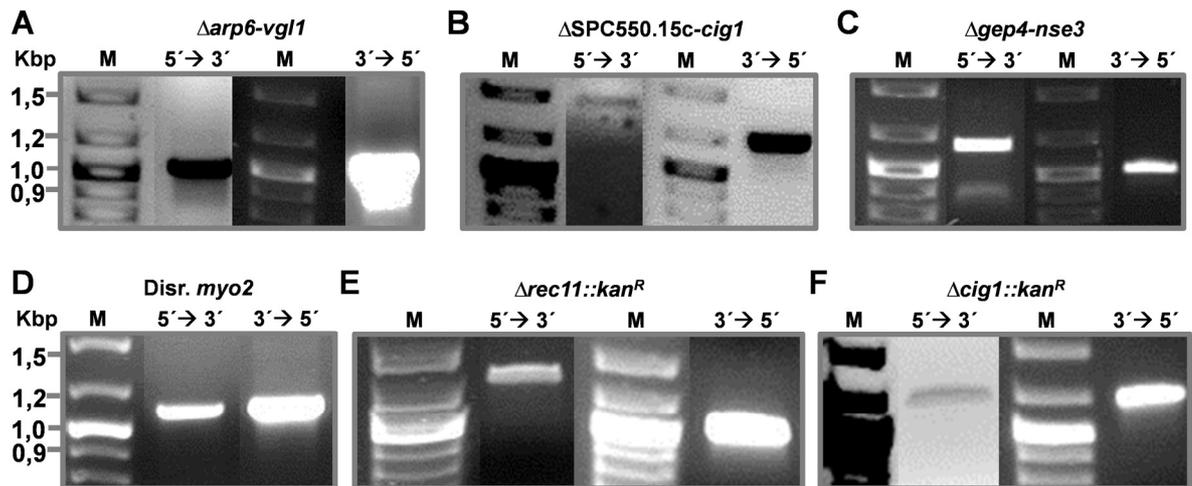


Abb. 6-3 Verifikations-PCR zum Nachweis der Deletion chromosomaler Bereiche auf dem Minichromosom Ch16 bzw. Chr. III bei Anwesenheit der *ade6* Allele. (Die Legende befindet sich auf der vorherigen Seite.)

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Der mögliche Zusammenhang zwischen Schadensakkumulation und Lebensspanne. ....	16
Abb. 1-2	Eine verringerte Kohäsion verursacht Aneuploidie in alten Eizellen. ....	24
Abb. 1-3	Die Auswirkungen von Aneuploidie auf Fitness und Lebensspanne von <i>S. cerevisiae</i> . ....	28
Abb. 1-4	Der Chromosomenzyklus in <i>S. cerevisiae</i> . ....	30
Abb. 1-5	Mögliche Wege zur Entstehung von Aneuploidie in <i>S. cerevisiae</i> . ....	32
Abb. 1-6	Replikative und chronologische Alterung in der Hefe. ....	35
Abb. 1-7	Die Akkumulation von Schäden verursacht replikative und chronologische Alterung in der Hefe. ....	38
Abb. 1-8	Das artifizielle Hefechromosom (YAC). ....	40
Abb. 1-9	Das Minichromosom Ch16. ....	41
Abb. 2-1	Aufbau für den Kapillartransfer von DNA auf eine Membran (Southern Blot) ....	67
Abb. 2-2	Schematische Darstellung der Deletion chromosomaler Bereiche von Chr. III bzw. Ch16 mittels Austausch durch eine G418-Resistenzkassette ( <i>Kan<sup>R</sup></i> ). ...	71
Abb. 2-3	Schematische Darstellung der Deletion eines ORFs in einem diploiden <i>S. cerevisiae</i> Stamm. ....	72
Abb. 2-4	Bestimmung der chronologischen Lebensspanne (CLS).....	78
Abb. 2-5	Schematische Darstellung der Isolation alter Mutterzellen durch paramagnetische Sortierung. ....	80
Abb. 2-6	Verlustanalyse von Chromosom III.....	84

---

Abb. 3-1	Untersuchung von Chromosomeninstabilität mit dem YAC-System in alternden diploiden Zellen.....	88
Abb. 3-2	Biotinylierungs- und Knospungsarbenanalyse isolierter Mutterzellen. ....	90
Abb. 3-3	Die replikative Lebensspanne (RLS) eines diploiden Wildtypstamms.....	91
Abb. 3-4	Mit zunehmendem replikativen Alter steigt die Chromosomenverlustrate linear an.....	92
Abb. 3-5	Defekte im Spindelkontrollpunkt verursachen eine Erhöhung der Anzahl, nicht aber der Rate halbsektorieller Kolonien.....	97
Abb. 3-6	Ohne <i>MCM21</i> treten vermehrt Chromosomenverluste und Chromosomenfehlverteilungen auf, der Anstieg mit dem Alter bleibt jedoch wildtypisch. ....	99
Abb. 3-7	Die homozygote Deletion von <i>BIM1</i> verursacht eine stark beeinträchtigte Lebensfähigkeit und erhöhte Chromosomeninstabilität. ....	100
Abb. 3-8	Bei Verlust einer Kopie des Kohäsingens <i>SMC1</i> verändert sich die Chromosomenstabilität im Vergleich zum Wildtyp nicht. ....	102
Abb. 3-9	Die Deletion einer Kopie des Spindelpolkkörpergens <i>SPC97</i> löst keine erhöhte Fehlerrate bei der Chromosomenweitergabe aus.....	103
Abb. 3-10	Die heterozygote Deletion von Komponenten des prä-replikativen Komplexes bewirkt einen Anstieg der chromosomalen Instabilität. ....	104
Abb. 3-11	Mit Ausnahme der Replikationsmutante ist der Verlust von Chromosom III in allen Deletionsstämmen erhöht.....	107
Abb. 3-12	Die RLS steht in negativer Korrelation zur beobachteten Chromosomeninstabilität in G0. ....	108
Abb. 3-13	Die Erhöhung der Chromosomeninstabilität mit steigendem replikativen Alter ist beim Wildtyp und bei Chromosomenzyklusmutanten meist linear.....	110
Abb. 3-14	Die Anwesenheit eines YACs verkürzt die RLS und erhöht die Stresssensitivität. ....	112
Abb. 3-15	Die Anwesenheit eines YACs hat keinen Einfluss auf RLS und Stresssensitivität eines diploiden Stamms.....	113
Abb. 3-16	Zwei YACs beeinflussen nicht die RLS eines diploiden Hefestamms.....	114
Abb. 3-17	Uracil- und Tryptophanprototrophie verursachen keine KCl-Sensitivität. ....	115
Abb. 3-18	Durch die Anwesenheit eines YACs ohne <i>SUP11</i> werden das Wachstum unter Stress und die RLS nicht beeinträchtigt.....	116
Abb. 3-19	Schematische Darstellung der YAC-spezifischen Deletion des Gens <i>SUP11</i> und Nachweis der Deletion mittels Southern Blot.....	117
Abb. 3-20	Die Anwesenheit eines YACs mit deletiertem <i>SUP11</i> Gen beeinträchtigt nicht das Wachstum unter Stress und die RLS.....	118

---

Abb. 3-21	Adeninprototrophie hat keinen Einfluss auf Stresssensitivität haploider und diploider sowie auf die RLS haploider Hefezellen.....	120
Abb. 3-22	YAC-kodierte <i>SUP11</i> tRNA <sub>TYR</sub> verkürzt die RLS in einem haploiden Stamm mit wildtypischem <i>ADE2</i> Gen um 35 %.....	121
Abb. 3-23	Die Anwesenheit des Minichromosoms Ch16 verursacht erhöhte Stresssensitivität. ....	124
Abb. 3-24	Die Anwesenheit des Minichromosoms verursacht keine Chr. I Fehlsegregation. ....	125
Abb. 3-25	Das zusätzliche Chromosom Ch16 verlängert die chronologische Lebensspanne. ....	126
Abb. 3-26	Kalorienrestriktion verstärkt die durch Ch16 verbesserte Lebensfähigkeit...	127
Abb. 3-27	pH Wert und Zellzahl chronologisch alternder Kulturen.....	127
Abb. 3-28	Schematische Darstellung des Minichromosoms Ch16.....	128
Abb. 3-29	Das Minichromosom Ch16 und die verkürzten Varianten CH12LE und ChR33. ....	129
Abb. 3-30	Die Anwesenheit der Minichromosomvarianten ChR33 und CH12LE verursacht erhöhte Stresssensitivität.....	130
Abb. 3-31	Die Anwesenheit von ChR33 verlängert die CLS, die Präsenz von CH12LE hingegen nicht. ....	131
Abb. 3-32	Unterschiedliche Rosatöne dienen zur Unterscheidung einer Deletion auf Chr. III bzw. Ch16.....	132
Abb. 3-33	Adeninauxotrophie verringert die durch Ch16 vermittelte längere CLS nicht. ....	133
Abb. 3-34	Die Abwesenheit eines Ch16 kodierten <i>bub1</i> <sup>+</sup> ORFs vermindert nicht die durch Ch16 vermittelte längere CLS. ....	134
Abb. 3-35	Der lebensverlängernde Bereich auf Ch16 befindet sich nicht im 46 Kbp Bereich von <i>mug150</i> <sup>+</sup> bis <i>pof3</i> <sup>+</sup> . ....	135
Abb. 3-36	Deletion von 106 Kbp des Minichromosoms und Nachweis mittels CHEF-Gel. ....	136
Abb. 3-37	Bei Abwesenheit eines Bereichs von 106 Kbp auf dem Minichromosom verkürzt sich die CLS auf das Niveau des Kontrollstamms.....	137
Abb. 3-38	Reduktion des Bereichs für eine Lebensverlängerung auf 27 Kbp. ....	137
Abb. 3-39	Ein DNA-Abschnitt mit drei Genen hat einen Effekt auf die Langlebigkeit. ...	139
Abb. 3-40	Die Abwesenheit des <i>cig1</i> <sup>+</sup> ORFs reduziert die Ch16 vermittelte Langlebigkeit. ....	140
Abb. 3-41	Übersicht der erstellten Minichromosomvarianten und ihre Auswirkung auf die CLS.....	141

Abb. 4-1	Die Auswirkungen der Anwesenheit eines <i>SUP11</i> enthaltenden YACs und Adeninprototrophie auf Stressresistenz und RLs in haploiden und diploiden <i>S. cerevisiae</i> Zellen. ....	153
Abb. 4-2	Die Auswirkungen erhöhter chromosomaler Last <i>per se</i> auf Stressresistenz und RLS haploider und diploider <i>S. cerevisiae</i> Zellen. ....	156
Abb. 6-1	Mit zunehmendem replikativen Alter steigt die Chromosomeninstabilität in haploiden Hefezellen linear an. ....	179
Abb. 6-2	Verifikations-PCR zum Nachweis der Deletion chromosomaler Bereiche bis einschließlich des <i>ade6</i> -Allels auf dem Minichromosom Ch16. ....	181
Abb. 6-3	Verifikations-PCR zum Nachweis der Deletion chromosomaler Bereiche auf dem Minichromosom Ch16 bzw. Chr. III bei Anwesenheit der <i>ade6</i> Allele. .	182

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1	Verdünnungsreihe für einen Sondentest.....	66
Tab. 2-2	Genotypbestimmung durch Analyse des Phänotyps .....	74
Tab. 3-1	Rate paarungsfähiger Zellen ausgewählter Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp. ....	106
Tab. 6-1	Detaillierte Angaben zur Erstellung der homo- und heterozygoten Deletionen im diploiden, YAC tragenden <i>S. cerevisiae</i> Stamm. ....	179
Tab. 6-2	Detaillierte Angaben zur Erstellung der Deletionen im Minichromosom Ch16 tragenden <i>S. pombe</i> Stamm. ....	180

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mir während meiner Promotion in den letzten Jahren unterstützend zur Seite gestanden haben.

Ich bedanke mich an erster Stelle bei Frau Dr. Ursula Fleig und Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann, die mir das Vertrauen schenkten und die Möglichkeit gaben, neben meiner Diplomarbeit auch meine Doktorarbeit in ihrem Institut anfertigen zu dürfen. Die hilfreichen Diskussionen insbesondere bei den „Aging-Treffen“ haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein ganz besonderer Dank gilt Ursula, die es immer wieder geschafft hat, mein halb leeres Glas durch aufmunternde Worte halb zu füllen. Ich bedanke mich darüber hinaus für das geduldige und zügige Lesen meiner Manuskriptvarianten, und dass mir die Möglichkeit eröffnet wurde, an zwei internationalen Kongressen in Leuven und Boston teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Joachim Ernst danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferats sowie die Begutachtung dieser Arbeit innerhalb kürzester Zeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Laborkollegen. Ein großes Dankeschön gilt Stefanie Kobus! Danke für die unbezahlbare Hilfe, die Du bei der Durchführung zahlreicher zeitaufwendiger Alterungsexperimente, auch noch auf den letzten Metern zum Ziel, geleistet hast, und die unzähligen Stunden, in denen Du mir während des Kolonien Zählens geholfen hast, nicht wie Mr. Filter zu enden.

Danke auch an alle weiteren aktuellen und ehemaligen Laborkollegen, Andrea, Anne, Boris (Kaffee? Kaffee!), Eva, Jenni (Wham!), Pascal und Visnja (böses Pieksen!) für viele lustige Stunden und niveauvolle (auch nichtwissenschaftliche) Gespräche und hilfreiche Diskussionen. Ein Dankeschön auch an die „Hegemänner“ für die bereitwillige Hilfe bei meinen Bäckerhefeproblemchen und die schöne gemeinsame Zeit, sowohl im Labor als auch in der Mensa, der Kaffeepause oder außerhalb der Universität.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Geschwistern, die mich immer aufgebaut und motiviert haben, sowie all meinen Freunden danke ich für die großartige Unterstützung. Ein besonderer Dank geht auch an Maria für ihre Frieda-Unterstützung in diesem Jahr!

Mein größter Dank gilt Anna für das fortwährende Ertragen meiner Launen und die vielen aufbauenden Worte und Ermutigungen, ohne die all dies nicht möglich gewesen wäre. Danke Anna! Und Frieda, auch wenn Du das noch nicht lesen kannst, danke ich Dir dafür, dass Du es immer wieder auch ohne Worte geschafft hast, mich trotz mancher Verzweiflung zum Lachen zu bringen und mich zu ermutigen.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst habe. Diese Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

---

Markus Langen