

**Funktionelle Charakterisierung von
unklassifizierten hMSH2 Varianten
in *Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sven Boris Heick

aus Solingen

Düsseldorf, Januar 2014

aus dem Institut für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Johannes Hegemann

Korreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.14

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung.....	9
Summary.....	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Genetische Instabilität	13
1.2 Die DNA-Replikation	14
1.2.1 Die Genauigkeit der DNA-Replikation	15
1.2.2 Die Fehlpaarungsreparatur.....	16
1.2.2.1 Die Fehlpaarungsreparatur in <i>E. coli</i>	17
1.2.2.2 Die humane Fehlpaarungsreparatur.....	17
1.2.2.3 Die Rolle von ATP bei der Reparaturinitiation	21
1.2.3 Das humane Fehlpaarungsreparaturprotein MSH2	24
1.3 Lynch-Syndrom.....	25
1.3.1 Charakterisierung von unklassifizierten Varianten	27
1.4 Testsysteme für unklassifizierte Varianten von Fehlpaarungsreparaturproteinen.....	29
1.4.1 <i>In vitro</i> Systeme	29
1.4.2 <i>In vivo</i> Systeme.....	31
1.4.2.1 Hefe-Mensch-Msh2-Hybriden.....	34
1.5 Alterung	35
1.5.1 Replikative Alterung	35
1.5.2 Chronologische Alterung	37
1.5.3 Genomische Instabilität mit steigendem Alter	37
1.6 Zielsetzung	38
2 Materialien	39
2.1 Gebrauchsartikel.....	39
2.2 Geräte.....	39
2.3 Chemikalien.....	40
2.4 Enzyme	41
2.4.1 Restriktionsenzyme.....	41

2.4.2	Polymerasen	41
2.4.3	Sonstige Enzyme	41
2.5	Antikörper	41
2.5.1	Primärantikörper.....	41
2.5.2	Sekundärantikörper	42
2.6	Fluoreszenzfarbstoffe	42
2.7	Größenstandards	42
2.7.1	DNA	42
2.7.2	Protein.....	42
2.8	Kits	42
2.9	Synthetische Oligonukleotide	42
2.10	Plasmide	45
2.11	Zellen.....	47
2.11.1	<i>Escherichia coli</i>	47
2.11.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
2.12	Medien.....	48
2.12.1	Medien für <i>E. coli</i>	48
2.12.2	Medien für <i>S. cerevisiae</i>	48
2.12.2.1	Aminosäure-Mix	49
3	Methoden	50
3.1	Methoden für <i>E. coli</i>.....	50
3.1.1	Anzucht	50
3.1.2	Transformation	50
3.1.2.1	Ein-Minuten-Transformation	50
3.1.2.2	Elektroporation	50
3.1.3	Plasmid-DNA Präparation aus <i>E. coli</i>	51
3.1.3.1	Mini-Präparation.....	51
3.1.3.2	Midi-Präparation.....	51
3.2	Methoden für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	51
3.2.1	Anzucht	51

3.2.2	Transformation.....	52
3.2.3	Gesamt-DNA-Isolation aus <i>S. cerevisiae</i>	53
3.2.4	Klonieren mit <i>S. cerevisiae</i>	53
3.2.4.1	Klonieren von Hefe-Mensch- <i>MSH2</i> Hybriden	54
3.2.5	Mutationsratenbestimmung mit dem <i>lys2_{A14}</i> -Reportersystem	55
3.2.5.1	Durchführung der Mutationsratenbestimmung von yhMsh2-Hybriden (bzw. Allelen) 55	
3.2.5.1.1	Statistische Analyse der Mutationsratenbestimmung nach Lea und Coulson mittels FALCOR	56
3.2.5.2	Auslösung eines dominant-negativen Mutatorphänotyps durch Koexpression von hMSH2 und hMSH6	59
3.2.6	Alterungsexperimente	59
3.2.6.1	Isolierung von replikativ gealterten Hefezellen mittels Biotinylierung und paramagnetischer Sortierung.....	59
3.2.6.1.1	Kultivierung	60
3.2.6.1.2	Biotinylierung	61
3.2.6.1.3	Paramagnetische Markierung und Sortierung	61
3.2.6.1.4	Bestimmung der <i>LYS2</i> -Revertanzahl von biotinylierten Mutterzellen des Wildtyp-Stamms E134	62
3.2.6.1.5	Bestimmung der <i>LYS2</i> -Revertanzahl von biotinylierten Mutterzellen des Δ <i>msh2</i> -Stamms Dag60.....	62
3.2.6.1.6	Herstellen von Gesamtzellproteinextrakten	63
3.2.6.2	Bestimmung von <i>LYS2</i> -Revertanten während des chronologischen Alterns 64	
3.2.7	Färben von lebenden und toten Zellen	65
3.2.8	Färbung von Knospungsnarben mit Calcofluor White.....	65
3.3	Molekularbiologische Methoden	66
3.3.1	Photometrische DNA-Mengenbestimmung.....	66
3.3.2	DNA Restriktionsanalysen.....	66
3.3.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarose-Gelelektrophorese	66
3.3.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	66
3.3.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	66
3.3.5.1	Herstellen von DNA-Fragmenten zur Klonierung.....	67
3.3.5.2	Herstellen von Marker-Kassetten zur genomischen Integration.....	67

3.3.5.3	PCR auf Hefe-Zellen (Kolonie-PCR)	67
3.3.5.4	Herstellen von Punktmutationen.....	68
3.3.5.5	Integration von humanen <i>MSH2</i> -Sequenzen in den Hefe- <i>MSH2</i> Lokus ...	69
3.3.5.6	Integration von humanen <i>MSH2</i> -Sequenzen in den Hefe- <i>MSH2</i> Lokus mittels Plasmid-Restriktion.....	71
3.3.5.7	DNA-Sequenzierung	73
3.4	Biochemische Methoden	73
3.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford	73
3.4.2	Zellyse von <i>S. cerevisiae</i>	74
3.4.3	Co-Immunopräzipitation von hMSH2 und seinen Interaktionspartnern	74
3.4.4	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	75
3.4.4.1	Herstellung des Trenngels	75
3.4.4.2	Herstellung des Sammelgels.....	76
3.4.4.3	SDS-Gelelektrophorese	76
3.4.4.3.1	Coomassie-Färbung von Proteingelen	76
3.4.4.4	Western-Blot-Analyse.....	76
3.4.4.4.1	Aufbau der Blotapparatur	76
3.4.4.4.2	Abbau der Blotapparatur	77
3.4.4.4.3	Antikörperreaktion auf der Nylonmembran	77
3.4.4.4.4	Farb-Entwicklung von Western-Blots mittels alkalischer Phosphatase ..	77
3.5	Durchflusszytometrie.....	78
3.5.1	Quantifizierung von biotinylierten Zellen.....	78
3.5.2	Sortieren von lebenden und toten Zellen.....	78
3.6	Bioinformatische Analysen.....	78
3.6.1	Sequenzvergleiche.....	78
3.6.2	Quantifizierung von Western-Blots	78
3.6.2.1	Quantifizierung von yhMsh2-Hybriden.....	79
3.6.3	<i>In silico</i> Analyse von hMSH2-Allelen mit SIFT, PolyPhen2 und MAPP-MMR...79	
4	Ergebnis.....	80
4.1	Funktionelle Analyse von hMSH2 Allelen.....	80
4.1.1	Sequenzvergleiche von hMSH2 und Hefe-Msh2p und Konstruktion von yhMsh2-Hybriden	80
4.1.1.1	Sequenzvergleich von Aminosäure 1 bis 124.....	80

4.1.1.2	Sequenzvergleich von Aminosäure 125 bis 297	82
4.1.1.3	Sequenzvergleich von Aminosäure 298 bis 600	83
4.1.1.4	Sequenzvergleich der Aminosäuren 600 bis 964 (bzw. 934 bei hMSH2)..	83
4.1.1.5	Funktioneller Test der Fehlpaarungsreparaturaktivität der konstruierten Hefe-Mensch-Msh2 Hybriden	84
4.1.1.6	Proteinmengenbestimmung der untersuchten Hybriden	85
4.1.1.7	Quantitative Analyse der funktionellen Hefe-Mensch-Msh2 Hybride.....	89
4.1.1.8	Analyse von yMsh2p_1 unter endogenen Bedingungen.....	91
4.1.1.9	Analyse von yhMsh2_5 und yhMsh2_14 unter endogenen Bedingungen.	95
4.1.2	<i>In vivo</i> Analyse von 10 hMSH2-Allelen in yhMsh2 Hybriden.....	98
4.1.2.1	Funktionelle Analyse von Allelen im hMSH2 N-Terminus mit einem yhMsh2 Hybridprotein	99
4.1.2.2	Funktionelle Analyse von Allelen des hMSH2 C-Terminus mit einem yhMsh2 Hybridprotein	101
4.1.2.3	<i>In vivo</i> Funktionsanalyse von yhMsh2-Allelen durch Auslösen eines dominant-negativen Mutatorphänotyps	104
4.1.2.4	Analyse der Funktionalität von yhMsh2-Allelen unter endogenen Bedingungen	106
4.1.2.5	Lokalisation von Allelen des C-Terminus	109
4.1.3	<i>In vivo</i> Funktionsanalyse von hMSH2-Allelen durch Auslösen eines dominant-negativen Mutatorphänotyps	111
4.1.4	Interaktionsnachweis der hMSH2-Allele mittels Co-Immunopräzipitation.....	113
4.1.5	<i>In silico</i> Analyse von humanen MSH2 Allelen.....	116
4.2	Der Einfluss des replikativen Alterns auf die Fehlpaarungsreparatur	117
4.2.1	Überprüfung des experimentellen Systems zur Gewinnung von alten Mutterzellen.....	118
4.2.2	Mit steigendem replikativem Alter nehmen <i>LYS2</i> -Revertanten zu	122
4.2.3	Wie verändert sich die Proteinmenge von Hefe-Msh2p über das Alter hinweg? 124	
4.2.4	Beeinflussen tote Mutterzellen die Proteinmenge von Hefe-Msh2p?	125
4.2.4.1	Lebend/Tot-Situation von replikativ gealterten Zellen	125
4.2.4.2	Aussortieren von lebenden alten Mutterzellen mit anschließender Hefe-Msh2p Mengenanalyse.....	128
4.3	Der Einfluss des chronologischen Alters auf die Fehlpaarungsreparatur.....	130

5	Diskussion.....	134
5.1	Funktionelle Analyse von unklassifizierten hMSH2 Varianten.....	134
5.1.1	Hefe-Mensch-Msh2 Hybriden als <i>in vivo</i> Testsystem	135
5.1.1.1	Hybride mit humanen N-terminalen Sequenzen sind funktionell.....	135
5.1.1.2	Hybride mit humaner „connector“-Domäne sind nicht funktionell.....	138
5.1.1.3	Hybride im mittleren Teil des Proteins	138
5.1.1.4	Hybride in der ATPase Domäne.....	139
5.1.1.5	Kombinierte Hybridvarianten sind teilweise funktionell	140
5.1.1.6	Weiterentwicklungen der Humanisierung der Hefe-MMR	140
5.1.2	Zusammenfassung der hMSH2-Allel-Analysen	142
5.1.2.1	Analysen von Mutationen des N-Terminus	143
5.1.2.2	Analysen von Mutationen des C-Terminus	144
5.1.2.3	Nachteile der Analyse von Mutationen in <i>S. cerevisiae</i>	150
5.2	Einfluss der Alterung auf die Fehlpaarungsreparatur	151
5.2.1	Steigendes replikatives Alter ist mit einer erhöhten Mutationszahl verbunden	
	152	
5.2.1.1	Nachteile des verwendeten Testsystems	156
5.2.2	Die <i>LYS2</i> -Reversion ist mit steigendem chronologischem Alter unterschiedlich stark ausgeprägt	156
6	Anhang.....	158
6.1	Sequenzvergleiche von yMsh2p und hMSH2.....	158
6.1.1	yMsh2p AS 14-109 gegen hMSH2 AS 14-103.....	158
6.1.2	yMsh2p AS 14-286 gegen hMSH2 AS 14-291.....	158
6.1.3	yMsh2p AS 341-375 gegen hMSH2 AS 329-363.....	159
6.1.4	yMsh2p AS 341-410 gegen hMSH2 AS 329-398.....	159
6.1.5	yMsh2p AS 599-645 gegen hMSH2 AS 581-627.....	159
6.1.6	yMsh2p AS 685-785 gegen hMSH2 AS 666-766.....	159
6.1.7	yMsh2p AS 647-785 gegen hMSH2 AS 628-766.....	160
6.1.8	yMsh2p AS 647-823 gegen hMSH2 AS 628-804.....	160
6.1.9	yMsh2p AS 836-888 gegen hMSH2 AS 808-860.....	160

6.2	Aminosäuresequenzen der nukleären Lokalisierungssignale (NLS) von Hefe-Msh2p	161
6.3	Plasmidkarten	161
6.4	Darstellung von biotinylierten Hefezellen in der Durchflusszytometrie	162
6.5	Sinkende Lebendzellzahl mit steigendem replikativen Alter	163
6.6	Mikroskopie von replikativ alten Hefezellen	163
7	Abbildungsverzeichnis	164
8	Literatur	166
9	Danksagung	182
10	Erklärung	183

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg, mg, g	(Mikro-, Milli,-) Gramm
µl, ml, L	(Mikro-, Milli,-) Liter
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
(k)bp	(Kilo)Basenpaar
CFU	Colony Forming Unit
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FALCOR	Fluctuation AnaLysis CalculatOR
G	Generation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
ggü.	Gegenüber
h	Stunden
hMSH2	Humanes MSH2
IDL	Insertion-/Deletion loop (Insertions-/Deletionsschleife)
kDa, Da	(Kilo-) Dalton
LOH	Loss of heterozygosity
LS	Lynch-Syndrom
mA	Milliampere
min	Minuten
MLH	Mut L Homolog
mM, M	Millimol, Mol
MMR	Mismatch repair (Fehlpaarungsreparatur)
MSH	Mut S Homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nt	Nukleotid
OD _x	Optische Dichte bei x nm
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
pH	<i>pondus Hydrogenidi</i>
PMS	Post Meiotic Segregation
Pol	Polymerase
PolyPhen	Polymorphism Phenotyping
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rNMP	Ribonukleosidmonophosphat
rpm	Rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
S.	Seite
sek	Sekunde
SIFT	Sorting Intolerant from Tolerant
Strep-APC	Streptavidin-Allophycocyanin
Tab.	Tabelle
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
üN	über Nacht
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
w/v	weight/volume (Gewicht pro Volumen)
yhMsh2	Hefe-Mensch Msh2
yMsh2p	Hefe-Msh2p
z.B.	zum Beispiel
Δ	Deletion
Σ	Summe

Zusammenfassung

Die korrekte Replikation der Erbinformation ist essentiell, um genomische Stabilität zu gewährleisten. Der *in vivo* Prozess der DNA-Replikation geschieht dabei mit einer Genauigkeit von ca. 1×10^{10} . Diese hohe Genauigkeit wird durch die „Proofreading“-Funktion der DNA-Polymerase selbst sowie über den postreplikativen Mechanismus der DNA-Fehlpaarungsreparatur (Mismatch repair = MMR) erreicht. Falsch eingebaute Nukleotide im neusynthetisierten Tochterstrang resultieren in Basenfehlpaarungen (Mismatch), welche durch die „Proofreading“-Funktion teilweise nicht erkannt werden. In Humanzellen werden diese Fehler dann durch den hMutS α -Komplex erkannt, einem Heterodimer bestehend aus den Proteinen hMSH2 und hMSH6. Durch die Interaktion mit weiteren Proteinen resultiert dies im Abbau des fehlerhaften Stranges sowie dessen Neusynthese. Mutationen in Genen der humanen Fehlpaarungsreparatur, welche in einer reduzierten oder inaktiven Proteinfunktion resultieren, führen zum Lynch-Syndrom, einem vererbbaarem Krebsleiden. Ca. 20% aller Mutationen in dem Fehlpaarungsreparaturgen *hMSH2* sind „Missense“-Mutationen. Der Einfluss dieser Art von Mutation ist nicht vorhersagbar, so dass funktionelle Testsysteme angewendet werden müssen, um eine Aussage über die Funktionalität zu erhalten. Ziel dieser Arbeit war es, „Missense“-Mutationen von Patienten des deutschen HNPCC-Konsortiums auf Funktionalität zu charakterisieren.

Für eine funktionelle Analyse von 10 hMSH2-„Missense“-Mutationen wurde der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* genutzt. Da humanes MSH2 das Hefe-Msh2p nicht funktionell ersetzen kann, wurden dieser Arbeit 11 neuartige Hefe-Mensch-Msh2 Hybride entwickelt, die eine Analyse von Mutationen in der Fehlpaarungsreparatur *in vivo* ermöglichen sollten, da humane Testsysteme für solche Analysen bisher nicht verfügbar sind. Für die Konstruktion wurden Abschnitte des Hefe-Msh2p gegen entsprechende Abschnitte des humanen MSH2 ersetzt, um dort später Mutationen einzufügen und zu untersuchen. Von 11 Hybriden zeigten unter starker Überexpression 7 wildtypähnliche Funktionalität. Von diesen sieben und einem im Vorfeld konstruierten Hybrid konnten 3 erfolgreich genomisch in den *yMSH2*-Lokus integriert werden, um so eine Untersuchung unter endogenen Bedingungen vorzunehmen. Die wildtypähnliche Funktionalität konnte hier erneut bestätigt werden. In den humanen Abschnitt von 2 funktionellen Hefe-Mensch-Msh2-Hybriden wurden insgesamt 10 humane Mutationen einzeln integriert und auf Funktionalität geprüft. Drei Mutationen im N-Terminus zeigten nach Integration in ein N-terminales Hybrid wildtypische Aktivität. Von sieben untersuchten Mutationen im C-Terminus zeigten unter hohen Expressionsbedingungen 2 Mutationen wildtypische Aktivität, die restlichen 5 Mutationen waren nicht funktionell. Unter endogenen Bedingungen konnte für diese 2 wildtypischen Mutationen gezeigt werden, dass nur noch eine wildtypisch ist – die andere

zeigte kompletten Funktionsverlust. Da die Koexpression von wildtypischen humanem MSH2 mit seinem Interaktionspartner hMSH6 in der Hefe einen dominant-negativen Mutatorphänotyp auslöst, wurden hMSH2-Allele mit hMSH6 koexprimiert. Von 10 untersuchten Mutationen zeigten 4 wildtypische Funktionalität. Zum Nachweis der Interaktion wurde eine Co-Immunopräzipitation von hMSH2 mit hMSH6 durchgeführt. Es zeigte sich, dass für zwei Mutationen wildtypähnliche Mengen an hMSH2 kopräzipitiert wurden. Für die anderen 8 Mutationen zeigte sich eine reduzierte Menge des kopräzipitierten hMSH2, was darauf schließen lässt, dass die Interaktion reduziert ist. Neben weiteren Expressionsanalysen konnte insgesamt gezeigt werden, dass von 10 untersuchten Mutationen nur 2 als wildtypisch eingestuft werden konnten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde in 2 experimentellen Ansätzen untersucht, welchen Einfluss das Altern auf die Fehlpaarungsreparatur von Hefezellen nimmt. Mittels replikativer Alterung wurde untersucht, wie sich die Fehlpaarungsreparatur in Zellen verändert, die viele Teilungen durchlaufen haben. Biotinylierte alte Zellen wurden magnetisch von jungen Zellen getrennt und anschließend auf Mutationen mit steigender Generationenanzahl untersucht. Es zeigte sich, dass die Mutationszahl eines Wildtypstammes nach 19 Generationen im Vergleich zu Generation 0 um den Faktor 3,4 erhöht war, was auf einen Zusammenhang zwischen Alterung und der Genauigkeit der DNA-Replikation / Fehlpaarungsreparatur schließen lässt. Interessanterweise zeigte auch ein $\Delta msh2$ Stamm eine erhöhte Mutationszahl, wenn auch um den Faktor 2 niedriger als Wildtyp. Anschließend wurde in chronologisch alternenden Hefezellen geprüft, wie sich die Mutationsrate verändert, wenn die Zellteilung nach einer definierten chronologischen Alterung wieder einsetzt. Hier zeigte sich, dass Zellen, die sich nach 24 Tagen wieder zu teilen begannen, eine erhöhte Anzahl von Mutationen zeigten. Die Daten weisen darauf hin, dass das Alter einen Einfluss auf die Effizienz der Fehlpaarungsreparatur und/oder der DNA-Replikation nimmt.

Summary

The correct replication of DNA is essential to maintain genomic stability. *In vivo* DNA is replicated with a fidelity of approx. 1×10^{10} . This high fidelity is achieved by the proofreading function of the polymerase itself and a postreplicative mechanism called mismatch repair (MMR). The newly synthesized daughter strand contains misincorporated nucleotides, which partially were not recognized by the proofreading function of the polymerase, resulting in mismatched base pairs. In human cells, mismatches are recognized by a protein heterodimer called hMutS α which consists of the proteins hMSH2 and hMSH6. The downstream interaction with other proteins results in the degradation of a stretch of nucleotides including the wrongly-incorporated one in the daughter strand followed by resynthesis. Mutations in the human mismatch repair genes can lead to decreased or inactive protein function resulting in the Lynch syndrome, a hereditary cancer disease. About 20% of all mutations in the gene *hMSH2* are missense mutations. Unfortunately, the consequences of these mutations on the protein function are not predictable and therefore functional assays are needed to determine their impact on the MMR process. Unfortunately, functional *in vivo* MMR assays are not available in human cells.

The first aim of this work was to functionally characterize *hMSH2* missense mutations from patients of the German HNPCC consortium *in vivo* in the yeast model system. Because the human MSH2 protein cannot functionally replace the yeast Msh2p, new yeast-human-Msh2 hybrid proteins were created by exchanging yeast protein regions with the corresponding human regions. Seven of the 11 hybrid proteins created showed wildtype like MMR activity *in vivo* when expressed at high levels. Two of these and a previously created hybrid were successfully integrated into the chromosomal *yMSH2* locus to analyze their function under endogenous conditions. Again, these hybrids showed wildtype-like activity. Subsequently, ten hMSH2 mutations from the German HNPCC consortium were introduced into functional Msh2 hybrids to analyze their *in vivo* MMR function. Three mutations in the N-terminus showed wildtype-like activity, while only 2 of 7 mutations in the C-terminus showed full MMR activity. Subsequent expression under endogenous conditions showed that only 1 of these 2 mutations of the C-terminus was functional. For further analysis the 10 mutations were introduced individually into the human *MSH2* gene and co-expressed in yeast with its human interaction partner hMSH6. Expression of wildtype hMSH2 and hMSH6 causes a dominant negative mutator phenotype resulting in an increased mutation rate. Four of 10 mutations analyzed showed wildtype-like activity. Finally, to check their ability to interact with hMSH6, the 10 hMSH2 protein alleles were co-immunoprecipitated. Eight out of 10 mutant alleles showed reduced hMSH2 protein amounts suggesting that the interaction with hMSH6 is

affected. In summary, only 2 of the 10 mutations were classified as wildtype-like according to this functional analysis.

The second aim of this work was to analyze the influence of aging on DNA mismatch repair in two experimental settings in yeast. Replicative aging was used to analyze mismatch repair in replicatively aged cells. Wildtype cells were biotinylated and sorted magnetically to enrich old mother cells. Subsequently, the number of mutations was determined in cells of generation 0 compared to cells at generation 19. Interestingly, old cells showed 3.4-fold higher mutation numbers. Because a *Δmsh2* strain only showed an increase of about 1.4-fold, this suggests that possibly both the fidelity of replication and of the MMR decrease during aging. In a second approach, the effect of chronological aging of non-dividing cells was analyzed. Again, cells which re-entered the cell cycle after 24 or more days of rest, showed an increased number of mutations compared to day 0. In summary, replicative as well as chronological aging shows an influence on the number of mutations suggesting that DNA mismatch repair could be affected.

1 Einleitung

1.1 Genetische Instabilität

Das Erbgut jeder Zelle ist permanent der Reaktivität von Metaboliten und oxidativem Stress ausgesetzt, so dass die chemische Stabilität von DNA begrenzt ist. Diese Instabilität nimmt durch Hydrolyse, Oxidation sowie nicht-enzymatische Methylierung signifikante Formen an (Lindahl 1993). Bei Hydrolyse-Reaktionen, wie z.B. der Depurinierung, werden spontan die Purinbasen Adenin oder Guanin aus dem Nukleotid der DNA-Helix gespalten werden, so dass nur das Zucker-Phosphat zurückbleibt. Hingegen führen oxidative Effekte durch reaktive Sauerstoffprodukte z.B. zu der Oxidation von Guanin zu 8-Oxoguanin, was bei der Replikation in einer Fehlpaarung mit Adenin resultiert (Cheng, Cahill et al. 1992). Ebenso führen ungerichtete Methylierungen an Guanin zum Einbau von sowohl Cytosin als auch Thymidin im Gegenstrang durch die DNA-Polymerase (Woodside and Guengerich 2002). Diese und weitere Arten von DNA-Schäden treten ca. 20.000 Mal an der DNA pro Tag in einer humanen diploiden Zelle auf (Abb. 1A, Preston, Albertson et al. 2010).

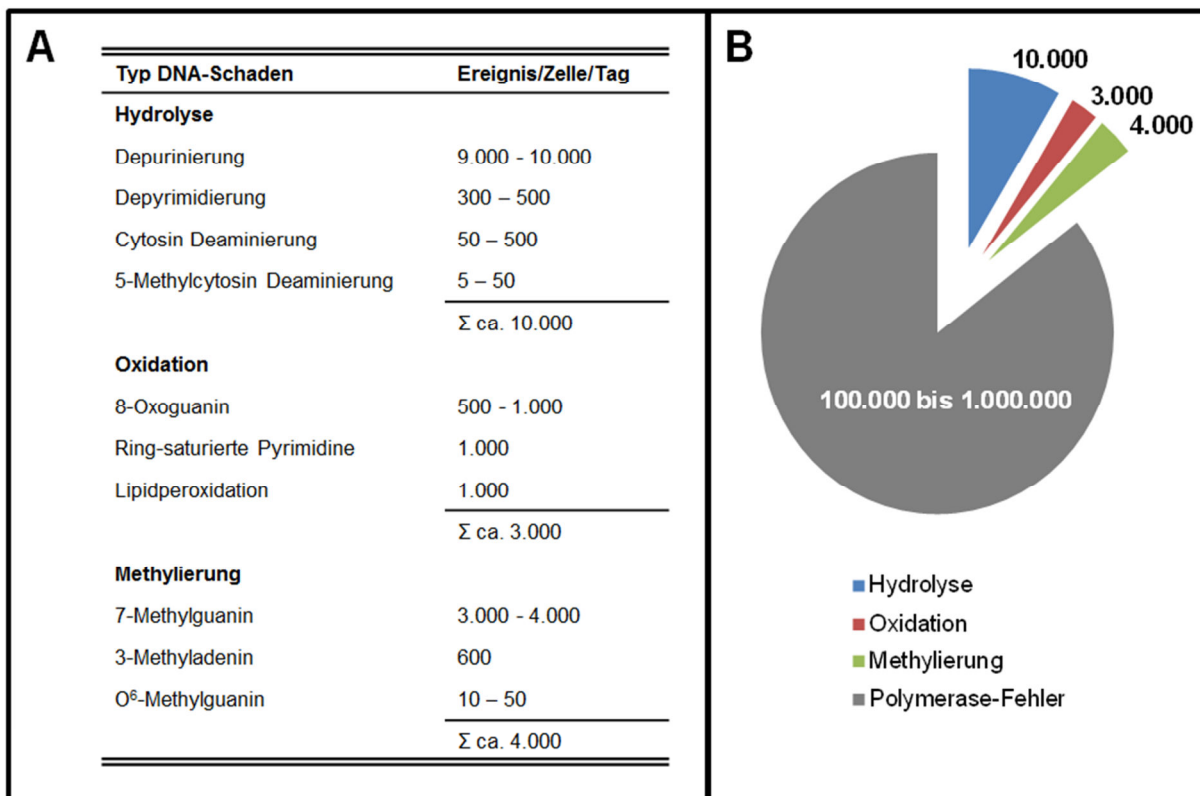


Abb. 1: Übersicht von spontanen DNA-Schäden und Polymerase-Fehlern im Zellzyklus. A) Angegeben sind jeweils Hydrolyse-, Oxidations- und Methylierungsereignisse pro Tag in einer diploiden Humanzelle. B) Verteilung von spontanen DNA-Schäden und Polymerase-Fehlern pro Tag in einer diploiden Zelle. Entnommen und modifiziert aus Preston, Albertson et al. 2010.

Die meisten dieser Fehler werden durch Enzyme der Basenexzisionsreparatur behoben (Barnes and Lindahl 2004; Meira, Burgis et al. 2005). Neben den beschriebenen chemischen Schäden treten zusätzlich 100.000 bis 1.000.000 Replikationsfehler auf, die durch DNA Polymerasen während der DNA-Replikation verursacht werden (Abb. 1B; Preston, Albertson et al. 2010). Der Umfang der Fehler hängt dabei von der Gensequenz und der Polymerase ab, welche die Sequenz repliziert.

1.2 Die DNA-Replikation

Vor der Mitose erfolgt die Verdopplung des Genoms, welche durch die DNA-Replikation bewerkstelligt wird, wobei diese erfordert, dass die DNA einzelsträngig ist. Die Entwindung erfolgt in Eukaryoten durch eine Helikase, was die Bindung des Einzelstrang-bindenden Proteins RPA ermöglicht (Ishimi 1997; Laskey and Madine 2003). Dieses sorgt dafür, dass die getrennten DNA-Moleküle nicht von Nukleasen angegriffen werden. Da die Synthese der DNA nur am freien 3'OH Ende von jedem Nukleotid stattfinden kann, erfolgt die Replikation immer in 3'-Richtung. Dies hat zur Konsequenz, dass ein DNA-Strang kontinuierlich repliziert wird (Leitstrang), hingegen die Replikation des anderen Strangs diskontinuierlich erfolgt (Abb. 2). Von 14 bekannten humanen DNA-Polymerasen sind die wichtigsten nukleären α , δ und ϵ (Morrison, Araki et al. 1990; Budd and Campbell 1993; Pavlov, Frahm et al. 2006; Makarova, Kazakov et al. 2012), Zum Start der Replikation bindet die Primase, ein Heterotetramer aus RNA- und α -DNA-Polymerase (Badaracco, Valsasini et al. 1986; Smith and Nasheuer 2002).

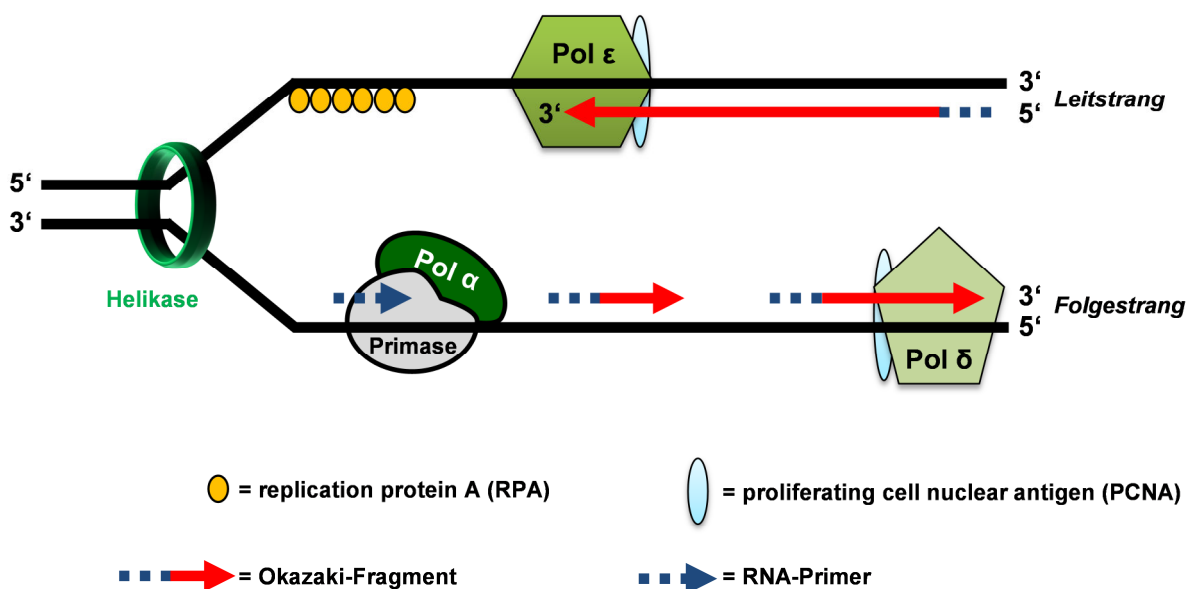


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der eukaryotischen DNA-Replikation. Da die Replikation in 5'-3' Richtung läuft, wird ein Strang kontinuierlich (Leitstrang), der andere diskontinuierlich repliziert (Folgestrang). Die Primase erzeugt RNA Primer, welche von der α -DNA-Polymerase-Untereinheit um wenige Desoxynukleotide verlängert wird. Dieses Fragment wird von den anderen Polymerasen

genutzt, um die Replikation eines Stranges zu beginnen. Details siehe Text, angelehnt an Preston, Albertson et al. 2010.

Die RNA-Polymerase Untereinheit synthetisiert ein RNA-Molekül von ca. 10 Nukleotiden Länge am einzelsträngigen Leit- und Folgestrang, wobei anschließend die α -DNA-Polymerase den RNA-Primer um ca. 20 Desoxynukleotide verlängert. Am Leitstrang wird die α -Polymerase durch die DNA-Polymerase ϵ ersetzt, welche die Replikation von großen Abschnitten des Leitstrangs übernimmt (Pursell, Isoz et al. 2007). Am Folgestrang hingegen werden die gebildeten RNA/DNA Primer durch die DNA-Polymerase δ um ca. 200 Nukleotide verlängert, was zur Bildung von vielen kleinen Fragmenten auf dem Folgestrang führt, den sogenannten Okazaki-Fragmenten (Nick McElhinny, Gordenin et al. 2008). Die Polymerasen δ und ϵ werden durch das Protein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) unterstützt, welches die Prozessivität der DNA-Replikation erhöht (Prelich, Tan et al. 1987; Burgers and Gerik 1998). Die durch die Primase erzeugten RNA-Fragmente werden anschließend durch RNase H entfernt und die daraus resultierenden Lücken werden durch die DNA-Polymerase mit komplementären dNTPs aufgefüllt. Nach der Synthese werden die Fragmente durch Ligation des Enzyms Lig1 verbunden (Arcangioli and Lescure 1986).

1.2.1 Die Genauigkeit der DNA-Replikation

Die eukaryotische Replikation der DNA geschieht bei den 3 wichtigsten DNA-Polymerasen (Pol) α , δ und ϵ mit einer Fehlerrate von 10^{-4} bis 10^{-5} . Typische Fehler, die während der Replikation entstehen, sind Fehlpaarungen. Darunter fallen Basenfehlpaarungen (der Einbau eines falschen Nukleotids, Abb. 3A) sowie Insertions- und Deletionsschleifen (insertion / deletion loop = IDL, Abb. 3B). Insertionsschleifen entstehen durch das Verrutschen („replication slippage“) des neusynthetisierten Strangs an repetitiven Sequenzen (wie z.B. Mono- oder Dinukleotidwiederholungen: Mikrosatelliten). Bei der Replikation von repetitiven Sequenzen pausiert die Polymerase für einen Moment, was zur Dissoziation des neusynthetisierten Strangs führt. Durch das erneute Anlagern beider Stränge kann es zu Ausschleifungen von repetitiven Einheiten kommen. Dabei können eine oder mehrere repetitive Einheiten aus dem neusynthetisierten Strang ausgeschleift werden, so dass nach der nächsten Replikation dieses Stranges sich die kodierende Sequenz um genau die Größe dieser ausgeschleiften Einheit verlängert. Deletionsschleifen hingegen entstehen, wenn der Matrizenstrang verrutscht und repetitive Einheiten ausschleift. Dies resultiert in einem Verlust von repetitiven Einheiten bei der nächsten Replikation des neusynthetisierten Strangs (Streisinger, Okada et al. 1966; Viguera, Canceill et al. 2001).

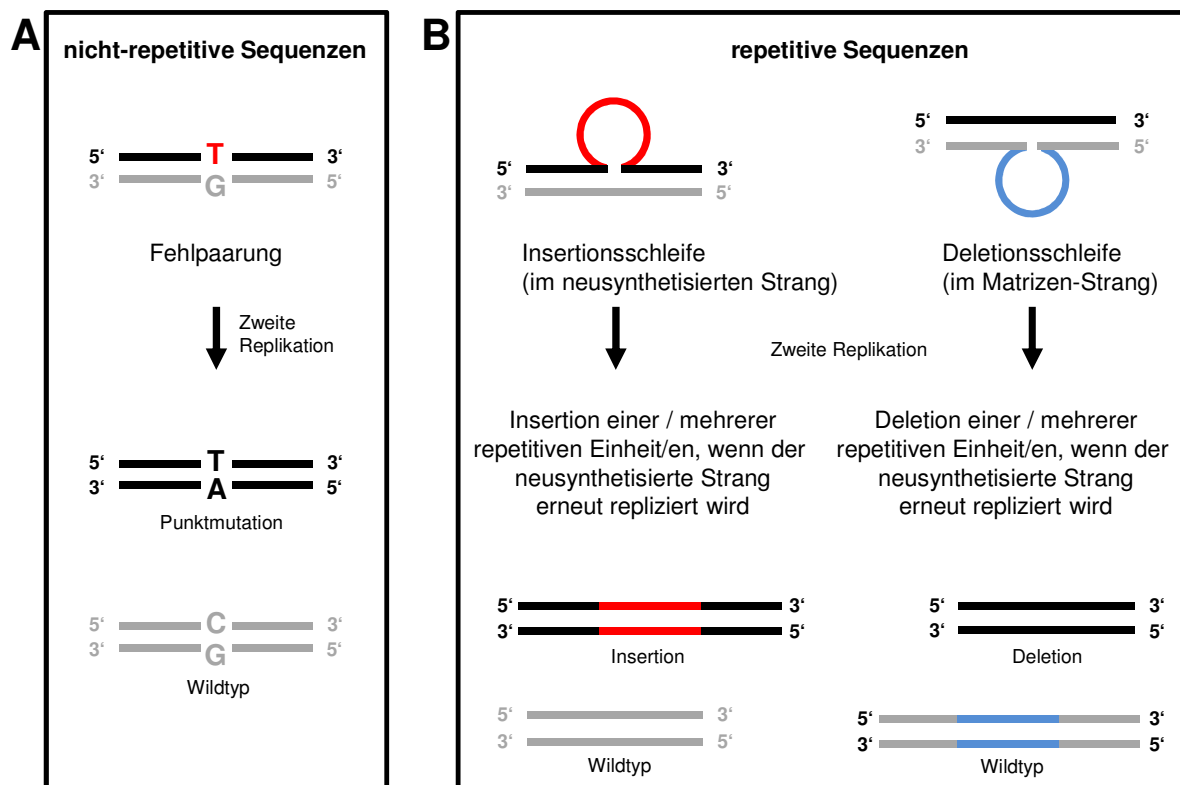


Abb. 3: Mögliche Fehler der DNA-Replikation. Die Matrizen-DNA ist grau darstellt, der neu synthetisierte Strang schwarz. A) Der Einbau eines falschen Nukleotids führt zu einer Fehlpaarung, welche in der nächsten Replikation in einer Punktmutation resultiert. B) Die Replikation repetitiver Sequenzen, sogenannte Mikrosatelliten, kann zu zwei verschiedenen Fehlern führen. Verrutscht der neusynthetisierte Strang, kommt es zur Bildung einer Insertionsschleife (rot). Geschieht dies mit der Matrizen-DNA, wird eine Deletionsschleife gebildet (blau). Dies führt bei der nächsten Replikation zur Insertion bzw. zur Deletion von repetitiven Einheiten.

Durch eine intrinsische „Proofreading“-Funktion von Pol δ und Pol ϵ , welche die eigentliche DNA-Replikation durchführen, werden Fehler erkannt, so dass sich die Genauigkeit auf 10^{-6} bis 10^{-7} erhöht (McCulloch and Kunkel 2008; Preston, Albertson et al. 2010). Die fehlende „Proofreading“-Funktion von Pol α wird wahrscheinlich durch Pol δ übernommen, welche die durch Pol α erzeugten Fehler behebt (Pavlov, Frahm et al. 2006). Interessanterweise verringert sich die „Proofreading“-Effizienz an repetitiven DNA-Sequenzen mit steigender Anzahl repetitiver Einheiten (Kroutil, Register et al. 1996). Der Einbau eines falschen Nukleotids kann neben der natürlichen Fehlerrate der Polymerasen u.a. zusätzlich durch Mutationen in der Nukleotid-Bindungstasche der Polymerase oder durch ein falsches Verhältnis von dNTPs zueinander ausgelöst werden (Saturno, Lazaro et al. 1997; Patel, Kawate et al. 2001; Kumar, Abdulovic et al. 2011).

1.2.2 Die Fehlpaarungsreparatur

Nicht behobene Fehler der „Proofreading“-Funktion der DNA-Polymerasen δ und ϵ können durch die postreplikative DNA-Fehlpaarungsreparatur (Mismatch repair = MMR) behoben

werden. Die ersten Beobachtungen zu diesem Mechanismus wurden in *E. coli* schon in den 70er Jahren gemacht (Wildenberg and Meselson 1975; Wagner and Meselson 1976; Rydberg 1978). Dabei ist der Ablauf der Reparatur eines solchen Fehlers in vielen Organismen konserviert (Eisen 1998). Die Fehlpaarung wird durch einen Proteinkomplex erkannt, welcher weitere Proteine rekrutiert, die den Fehler-enthaltenden Strang erkennen, schneiden und entfernen. Durch eine DNA-Polymerase wird der entfernte Strang neu synthetisiert und per Ligation mit dem Zuckerphosphatrückgrat des DNA-Moleküls verbunden.

1.2.2.1 Die Fehlpaarungsreparatur in *E. coli*

In *E. coli* wird die Fehlpaarungsreparatur mit der Bindung des Homodimer-Proteins MutS an die DNA initiiert (Abb. 4). MutS erkennt Basenfehlpaarungen sowie kleine und große IDLs (Su and Modrich 1986). Die molekulare Erkennung einer Basenfehlpaarung erfolgt dabei durch ein hochkonserviertes Phenylalanin (Phe) an Position 36 sowie ein Glutamat (Glu) an Position 38 in MutS, was in einem Knick der DNA nach Erkennung resultiert. Beide Aminosäuren bilden zusammen das charakteristische Phe-X-Glu Motiv (X = beliebige Aminosäure), wobei die Erkennung einer Fehlpaarung nur durch eine MutS Untereinheit geschieht (Lamers, Perrakis et al. 2000; Obmolova, Ban et al. 2000; Yamamoto; Schofield et al. 2000). Nach Erkennen der Fehlpaarung durch MutS erfolgt die Bindung des Homodimers MutL, welches darauf die Bindung und Aktivierung von MutH initiiert (Grafstrom and Hoess 1983; Grilley, Welsh et al. 1989; Hall and Matson 1999). MutH ist eine Endonuklease, welche den neusynthetisierten Strang anhand der Hemimethylierung von GATC Sequenzen erkennt (Radman 1980; Lahue, Su et al. 1987; Langle-Rouault, Maenhaut-Michel et al. 1987). Dies wird wahrscheinlich durch ein Tyrosin an Position 227 vermittelt (Friedhoff, Thomas et al. 2003). Der neusynthetisierte Strang wird bis zu einer Kilobase von der Fehlpaarung entfernt geschnitten, wobei dieser Einschnitt Eintrittspunkt für die MutL abhängige DNA-Helikase II ist, welche den Doppelstrang entwindet (Bruni, Martin et al. 1988; Mechanic, Frankel et al. 2000). Anschließend baut eine von 4 bekannten Exonukleasen (u.a. Exo1) den neuen Strang ab, wobei die Resynthese durch die DNA-Polymerase III erfolgt und die DNA durch die DNA Ligase A geschlossen wird (Lahue, Au et al. 1989; Burdett, Baitinger et al. 2001).

1.2.2.2 Die humane Fehlpaarungsreparatur

In Eukaryoten wurden Mut-Homologe identifiziert, die ähnliche Funktionen wie in *E. coli* erfüllen. Im Folgenden wird der Ablauf der humanen Fehlpaarungsreparatur (u.a. basierend auf Analysen in *S. cerevisiae*) beschrieben, welcher in allen Eukaryoten größtenteils identisch ist.

Während in *E. coli* das Erkennen von Fehlern allein durch das Homodimer MutS erfolgt, findet die Erkennung in Eukaryoten durch 2 verschiedene Heterodimere statt. Basenfehlpaarungen sowie kleine IDLs werden in Humanzellen durch den hMutS α Komplex erkannt, welcher aus den Proteinen hMSH2 (MSH = MutS Homolog) und hMSH6 besteht. Größere Insertions- und Deletionsschleifen von bis zu 16 Nukleotiden werden durch den hMutS β -Komplex erkannt, welcher aus den Proteinen hMSH2 und hMSH3 zusammengesetzt ist (Johnson, Kovvali et al. 1996; Genschel, Littman et al. 1998; McCulloch, Gu et al. 2003). Neuere Studien zeigen aber auch, dass hMutS β vereinzelt Basenfehlpaarungen erkennt, wobei der hMutS α -Komplex wahrscheinlich der primäre Komplex für Basenfehlpaarungen ist, was die 90%ige Assoziation von nukleärem hMSH2 mit hMSH6 vermuten lässt (Genschel, Littman et al. 1998; Harrington and Kolodner 2007). Die Erkennung einer Fehlpaarung geschieht, ähnlich wie in *E. coli*, durch ein hochkonserviertes Phenylalanin an Position 432 in hMSH6. Auch hier wird zusammen mit einem benachbarten Glutamat an Position 434 das Phe-X-Glu Motiv gebildet, welches entscheidend zur Genomstabilität beiträgt (Drotschmann, Yang et al. 2001; Schofield, Brownell et al. 2001; Junop, Yang et al. 2003). Das Erkennen und Binden einer Fehlpaarung durch den Heterodimerkomplex kann sowohl durch eindimensionales Gleiten auf der DNA als auch direkt durch einen nicht DNA-gebundenen MutS α -Komplex erfolgen (dreidimensionale Diffusion, Abb. 4). Dies konnte für yMutS α von *S. cerevisiae* gezeigt werden (Gorman, Wang et al. 2012). Problematisch ist, dass das Gleiten des Komplexes durch Nukleosomen behindert wird (Li, Tian et al. 2009; Gorman, Plys et al. 2010). Für eine barrierefreie Fehlpaarungsreparatur konnte aber gezeigt werden, dass nur ca. 15% Fehlpaarungsreparaturaktivität mit der Replikationsgabel assoziiert sind. Die Möglichkeit der ein- sowie dreidimensionalen Diffusion erklärt somit, wie die restlichen 85% Fehlpaarungsreparatur unabhängig von der Assoziation mit der Replikationsgabel stattfinden kann (Hombauer, Campbell et al. 2011; Gorman, Wang et al. 2012). Nachdem eine Fehlpaarung durch hMutS α erkannt wurde, bindet das Heterodimer hMutL α . Dieses besteht aus den Proteinen hMLH1 (MLH = MutL Homolog) und dem Protein hPMS2 (in *Saccharomyces cerevisiae* yPms1p = Post Meiotic Segregation). Es wurde bisher kein MutH Homolog in Eukaryoten identifiziert, welches folgend den Einzelstrangsnitt vornimmt. Jedoch zeigt der hMutL α Komplex (wie auch der yMutL α in *S. cerevisiae*) eine durch hPMS2 vermittelte latente Endonuklease Aktivität, welche in einer ATP- und PCNA- abhängigen Reaktion den neusynthetisierten Strang schneidet (Kadyrov, Dzantiev et al. 2006; Kadyrov, Holmes et al. 2007; Pluciennik, Dzantiev et al. 2010). Eine Strangunterscheidung durch Methylierung wie in *E. coli* wurde an den transkriptionsregulatorischen CpG Inseln untersucht, wobei ein Zusammenhang aber nicht bestätigt werden konnte (Drummond and

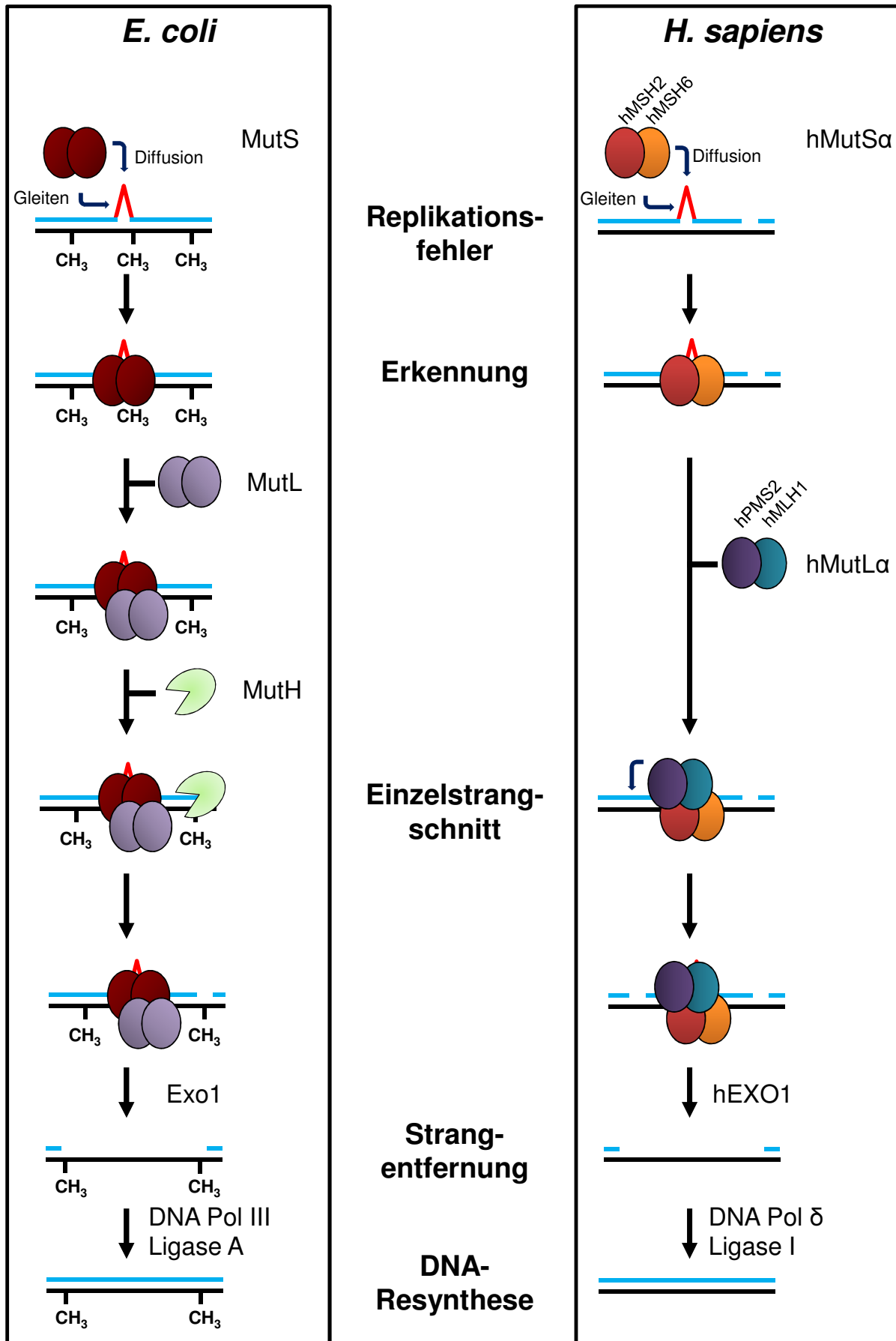


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der DNA-Fehlpaarungsreparatur mit den wichtigsten Schritten in *E. coli* und *H. sapiens*. Nach Entstehen des Replikationsfehlers wird dieser durch Gleiten oder Diffusion durch MutS/hMutSa erkannt. Das Binden weiterer Proteine erfolgt, so dass ein

Einzelstrangsnchnitt im neusynthetisierten Strang gesetzt wird. Die Strangunterscheidung erfolgt dabei in *E. coli* durch die Methylierung, in Humanzellen wahrscheinlich durch die Lücken im neusynthetisierten DNA-Strang. Der Strang mit dem enthaltenen Fehler wird durch eine Exonuklease entfernt, wobei anschließend die Neusynthese durch eine DNA-Polymerase und Ligase erfolgt. Details siehe Text, Grafik angelehnt an Larrea, Lujan et al. 2010.

Bellacosa 2001). Hinweise häufen sich, dass die Lücken der nicht ligierten DNA-Fragmente, die während der Replikation entstehen, als Strangunterscheidungssignal und somit als Eintrittspunkt für eine Exonuklease dienen (Constantin, Dzantiev et al. 2005). Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass der γ MutSa Komplex in *S. cerevisiae* mehr Fehlpaarungen im Folgestrang als im Leitstrang repariert (Pavlov, Mian et al. 2003). Zum andern zeigen neuste Untersuchungen in *S. cerevisiae* auch, dass Pol δ und Pol ϵ vereinzelt Ribonukleosidmonophosphate (rNMP) in die DNA bzw. Desoxynukleosidmonophosphatkette (dNMP) einbauen, wobei Pol ϵ (Leitstrangsynthese) dies mit einer 4fach höheren Wahrscheinlichkeit durchführt (ca. 1 rNMP / 1250 dNMPs; Nick McElhinny, Watts et al. 2010). Die rNMP-Moleküle werden durch das Protein RNase H2 entfernt, so dass die entstandene Lücke als Eintrittspunkt für γ Exo1p genutzt werden kann, um den neusynthetisierten Strang zu entfernen. Der alleinige Mechanismus der RNA-Inkorporation ist aber nicht alleine verantwortlich für die Strangunterscheidung, da eine Deletion des RNase H2-Gens *RNH201* die Fehlpaarungsreparaturgenauigkeit nur auf 76% reduziert, so dass weiterhin ein Einzelstrangsnchnitt durch hMutL α und die Lücken der DNA-Replikation eine Rolle spielen (Ghodgaonkar, Lazzaro et al. 2013). Das Setzen eines Einzelstrangsnchnitts durch hMutL α im neusynthetisierten Strang (oder das Entfernen eines rNMP-Moleküls durch RNase H2) ermöglicht Exonuklease I (hEXO1) den Zugang zum neusynthetisierten Strang. Dieser wird degradiert, wobei hEXO1 mit hMSH2 interagiert (Schmutte, Marinescu et al. 1998). Eine Helikase, die den DNA-Doppelstrang nach dem Einzelstrangsnchnitt von hMutL α entwindet, wurde bisher noch nicht identifiziert. Jedoch wird der Matrizeeinzelstrang vom DNA-bindenden Protein RPA (replication protein A) gebunden, um diesen vor Abbau durch Nukleasen zu schützen (Ramilo, Gu et al. 2002). Ebenso scheint hEXO1 nicht die einzige Exonuklease zu sein, die am Abbau des neusynthetisierten Strangs beteiligt ist, da Δ *exo1* Mutanten von *S. cerevisiae* und *Exo1*(-/-) Mäuse nur einen partiellen Defekt in der Fehlpaarungsreparatur zeigen (Amin, Nguyen et al. 2001, Wei, Clark et al. 2003). Der entfernte Strang wird durch die DNA-Polymerase δ resynthetisiert und anschließend durch die DNA Ligase I geschlossen (Zhang, Yuan et al. 2005; Constantin, Dzantiev et al. 2005).

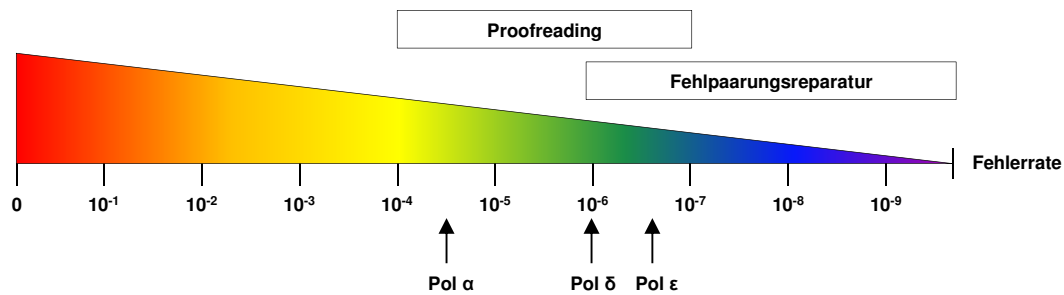


Abb. 5: Beitrag der einzelnen Mechanismen zur Erhöhung der Replikationsgenauigkeit. Unten angegeben sind Fehlerraten der bei der Replikation beteiligten DNA-Polymerasen. Angelehnt an Loeb and Monnat 2008 und modifiziert nach Arana and Kunkel 2010.

Durch die postreplikative Fehlpaarungsreparatur erhöht sich die Genauigkeit der DNA-Replikation von $10^{-6} / 10^{-7}$ auf $10^{-9} / 10^{-10}$ (Abb. 5). Verschiedene Arten von Fehlpaarungen werden in *E. coli* und Humanzellen mit unterschiedlicher Effizienz erkannt und behoben. Der Fehler G/T wird mit hoher Effizienz repariert, wohingegen eine C/C Fehlpaarung am schlechtesten erkannt und behoben wird (Tab. 1; Kramer, Kramer et al. 1984, Fang and Modrich 1993).

Fehlpaarung in					Reparatur-Effizienz
<i>E. coli</i> ¹			<i>H. sapiens</i> ²		
T/G	C/A	G/G	G/T	A/A G/G C/T	Hoch
A/A			A/C	A/G T/T	Mittel
G/A	A/G T/T	C/C T/C	C/C		Niedrig

Tab. 1: Reparaturreffizienzen von verschiedenen DNA-Fehlpaarungen in *E. coli* und *H. sapiens*. Der erste Buchstabe gibt den Fehler im neusynthetisierten Strang an. ¹Kramer, Kramer et al. 1984; ²Fang and Modrich 1993.

1.2.2.3 Die Rolle von ATP bei der Reparaturinitiation

Die benötigten Komponenten sowie die chronologischen Schritte, die zur Reparatur einer Fehlpaarung erfolgen, sind größtenteils aufgeklärt. Hingegen ist noch nicht richtig verstanden, welche Rolle ATP bei der Reparaturinitiation spielt. Die einzelnen Moleküle des MutS Homodimer aus *E. coli* als auch des Heterodimers hMutSa des Menschen besitzen zum einen beide unterschiedliche Affinitäten zu ATP und ADP (Bjornson and Modrich 2003; Mazur, Mendillo et al. 2006; Mukherjee, Law et al. 2009). Zum andern ist aber nicht genau verstanden, welche Rolle die Aufnahme sowie Hydrolyse von ATP in der Fehlpaarungsreparaturinitiation durch MutS / MutSa spielt. Ebenso ist unklar, wie die Distanz des Strangunterscheidungssignals zur Fehlpaarung überbrückt wird, da diese eine räumliche Entfernung von bis zu 1000 bp entsprechen kann. Insbesondere bei der Replikation des Leitstranges stellt sich diese berechnete Frage. Die Rolle von ATP und die Suche nach dem Strangunterscheidungssignal wird in 2 verschiedenen Modellen postuliert (Abb. 6).

1. „Moving“

1.1 „Translocation“

Durch die Hydrolyse von ATP kann sich der *E. coli* MutS-Komplex in Form einer „sliding clamp“ bidirektional von der Fehlpaarung wegbewegen, was in der Bildung einer Schleife resultiert, in der die Fehlpaarung lokalisiert. Das Strangunterscheidungssignal (GATC) wird dabei in räumliche Nähe von MutS gebracht, welches dann nach Interaktion von MutL und MutH erkannt wird (Allen, Makhov et al. 1997).

1.2 „Molecular switch“

Für den humanen MutS α -Komplex konnte gezeigt werden, dass dieser mit gebundenem ADP an die Fehlpaarung bindet. Die Bindung einer Fehlpaarung ermöglicht den Austausch von ADP zu ATP, welche dann schließlich in der Bildung einer „sliding clamp“ resultiert und weitere Mut Proteine rekrutiert. Hier bewirkt die Bindung, nicht die Hydrolyse von ATP die Bildung der „sliding clamp“. Dieser gesamte Komplex ist dann auf der Suche nach einem Strangunterscheidungssignal. Dadurch, dass die Fehlpaarung wieder frei wird, können weitere MutS Komplexe den Fehler erkennen. Deren Akkumulierung initiiert die Reparaturinitiation (Gradia, Acharya et al. 1997; Lebbink, Acharya, Foster et al. 2003; Fish et al. 2010). Dieses Modell wurde durch neue Arbeiten bekräftigt, da visuell bewiesen werden konnte, dass durch das Binden von ATP sich der γ MutS α Komplex von der Fehlpaarung löst und auf der DNA weiterläuft. Dieser Komplex ist aber nicht mehr in der Lage, neue Fehlpaarungen zu erkennen, so dass die Information des ersten Fehlers im Komplex gespeichert wird (Gorman, Wang et al. 2012).

2. „Stationary“

Die Erkennung einer Fehlpaarung geschieht durch gebundenes ATP, wobei die Affinität zu einer Fehlpaarung im Gegensatz zur Homoduplex-DNA erhöht wird. Der Komplex verweilt auf der Fehlpaarung, während die anderen benötigten Komponenten die Strangunterscheidung vorgenommen haben und durch Biegung der DNA die Komplexe in räumliche Nähe gebracht werden (Junop, Obmolova et al. 2001; Wang and Hays 2004).

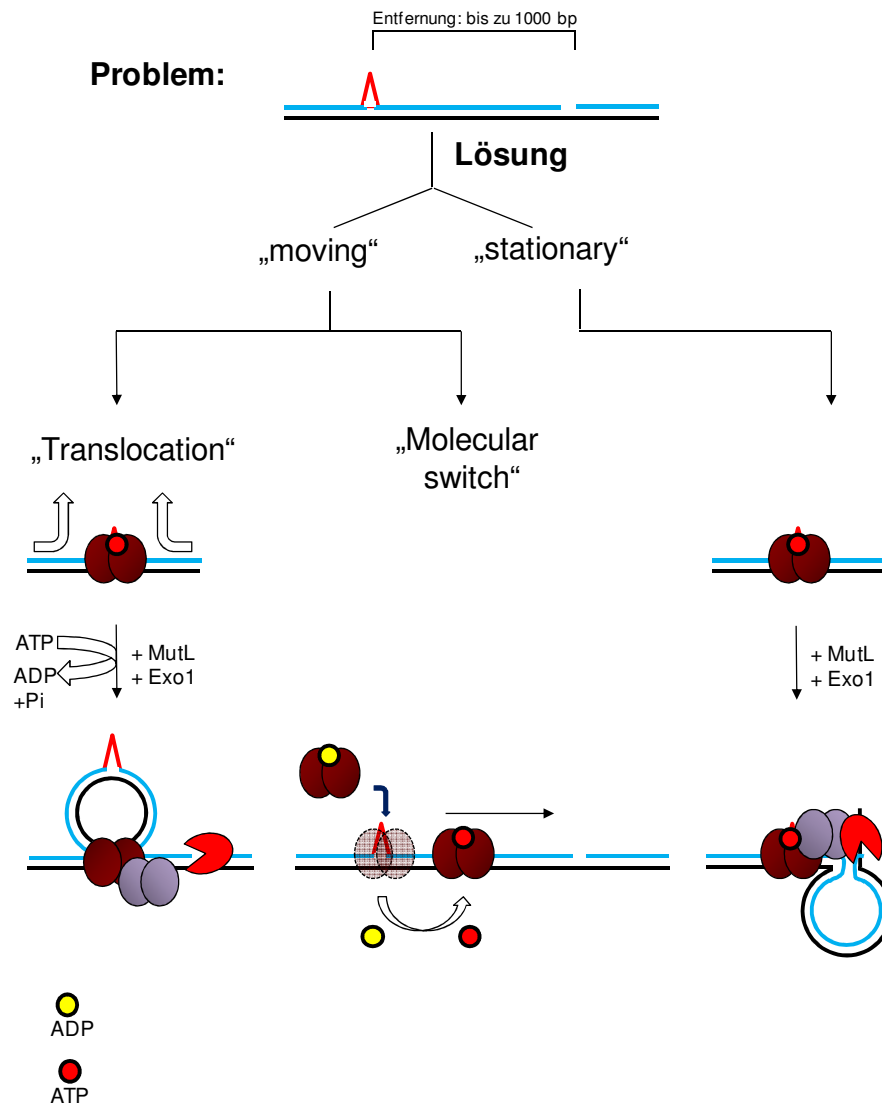


Abb. 6: Modelle zur Rolle von ATP zur Reparaturinitiation und zur Suche des Strangunterscheidungssignals. Das „moving“ Modell unterscheidet zwischen einem „translocation“ Modell, bei dem ATP-Hydrolyse-abhängig eine Schlaufe gebildet wird, und dem „molecular switch“ Modell. Hier diffundiert der Komplex ebenfalls vom Fehler weg, wobei weitere Proteine rekrutiert werden und das Strangunterscheidungssignal finden. Im „stationary“ Modell werden durch die Interaktion des MutS Komplexes mit MutL sowie Exo1 die Fehlpaarung und das Strangunterscheidungssignal in räumliche Nähe gebracht. Details siehe Text, Grafik angelehnt an Li 2008.

Beide Modelle werden durch die Beobachtung unterstützt, dass eine künstlich eingeführte Blockade zwischen der Fehlpaarung und einem Einzelstrang-Schnitt

1. die Fehlpaarungsreparatur *in vitro* inhibiert (was für das „Moving“ Modell spricht; Pluciennik and Modrich 2007);
2. im Gegensatz aber auch eine künstliche Blockade die Reparatur einer Fehlpaarung nicht beeinträchtigt („Stationary“ begünstigt; Wang and Hays 2004).

Warum zwei im Ansatz ähnliche Experimente unterschiedliche Ergebnisse liefern, muss im Detail noch geklärt werden, wobei das „molecular switch“ Modell durch aktuelle Arbeiten gestützt wird (Gorman, Wang et al. 2012). Sicher ist, dass durch das Wechselspiel von ADP

und ATP eine Konformationsänderung in MutS sowie den MSH2-Homologen entsteht. Diese führt dazu, dass der Komplex von einem nicht-spezifischen DNA-Kontakt in eine spezifische Wechselwirkung mit der Fehlpaarung wechseln kann.

1.2.3 Das humane Fehlpaarungsreparaturprotein MSH2

Erstmals im Jahr 1992 wurde *MSH2*, das eukaryotische Homolog zum bakteriellen *mutS*-Gen, aus *S. cerevisiae* isoliert (*yMSH2*; Reenan and Kolodner 1992). Nur 1 Jahr später identifizierten zeitgleich 2 Arbeitsgruppen das humane *MSH2* Gen (*hMSH2*; Fishel, Lescoe et al. 1993; Leach, Nicolaidis et al. 1993). Das Gen *hMSH2* ist auf Chromosom 2 kodiert und umfasst eine Größe von 80162 bp, wovon nach dem Splicen eine kodierende mRNA von 2805 Nukleotiden übrig bleibt. Das Protein ist 105 kDa schwer, 934 Aminosäuren groß und unterteilt sich in 5 funktionelle Domänen und ein C-terminales Helix-turn-Helix Motiv (Warren, Pohlhaus et al. 2007, Abb. 7). Aminosäure 1 bis 124 bildet die „Mismatch binding“ Domäne, welche einen unspezifischen Kontakt mit der DNA herstellt. Von Aminosäure 125 bis 297 liegt die „connector“-Domäne, welche wahrscheinlich in der Allosterie zwischen Domäne 3 („lever“) und 5 („ATPase“) eine Rolle spielt. Die „lever“-Domäne umfasst die Aminosäuren 298 bis 456 sowie die Aminosäuren 554 bis 619. Die „clamp“ Domäne ist in die „lever“ Domäne integriert und umfasst die Aminosäuren 457 bis 553. Diese Domäne stellt signifikanten nicht-spezifischen DNA-Kontakt mit Basen auf beiden Seiten der Fehlpaarung her. Die hochkonservierte ATPase-Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins umfasst die Aminosäuren 620 bis 934, welche mit der ATPase Domäne von hMSH6 stabil durch ein C-terminal lokalisiertes Helix-turn-Helix Motiv interagiert. Die ATPase Domänen von hMSH2 und hMSH6 weisen unterschiedliche Affinitäten zu ATP auf, wobei für die Bindung von ATP und ADP das Walker A-Motiv verantwortlich ist (Antony and Hingorani 2003; Antony, Khubchandani et al. 2006). In Abhängigkeit von einem zweiwertigen Kation wird für die Hydrolyse von ATP das Walker B Motiv benutzt. Diese nukleotidbindenden Motive sind auch in Mitgliedern der ABC ATPase Superfamilie vorhanden, wobei diese über 1000 Mitglieder hat und wahrscheinlich die größte Proteinfamilie aller lebenden Organismen ist (Gorbalenya and Koonin 1990; Holland and Blight 1999). Die ATPase Aktivität hängt von der Dimerisierung der ATPase Domänen von hMSH2 und hMSH3/hMSH6 ab. Wie unter 1.2.2 beschrieben, führt die Bindung von ATP, ADP und die Hydrolyse von ATP zu Konformationsänderungen im Protein, welche die Interaktion mit DNA, einer darin befindlichen Fehlpaarung und nachfolgenden Proteinkomplexen im Reparaturablauf ermöglichen (Junop, Obmolova et al. 2001; Lamers, Winterwerp et al. 2003; Warren, Pohlhaus et al. 2007; Mukherjee and Feig 2009; Gorman, Wang et al. 2012). Wie bereits besprochen, ist dieser Vorgang nicht hinreichend geklärt.

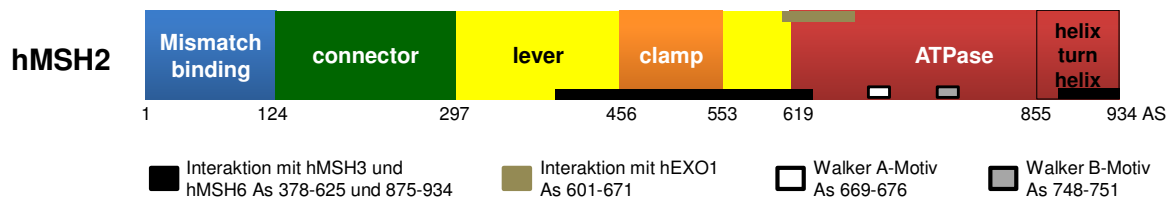


Abb. 7: Aufbau des humanen MSH2 Proteins. Die Größe der einzelnen Proteindomänen ist durch die unten angegebenen Zahlen dargestellt. Das Walker A-Motiv ist für die Bindung von ATP/ADP verantwortlich, wohingegen das Walker-B Motiv zweiwertige Kationen bindet, welche für die Hydrolyse von ATP benötigt werden. „Mismatch binding“ = Fehlpaarungsbinde-Domäne, „connector“ = Verbindungsdomäne, „lever“ = Hebel-domäne, „clamp“ = Klammerdomäne, ATPase = ATPase Domäne, AS = Aminosäure. Darstellung abgewandelt nach Guerrette, Wilson et al. 1998, Drotschmann, Clark et al. 1999 und Warren, Pohlhaus et al. 2007.

1.3 Lynch-Syndrom

In Humanzellen führen Störungen der Fehlpaarungsreparatur zum Lynch-Syndrom (LS), einem vererbaren autosomalen Krebsleiden, bei dem eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, Dickdarmkrebs (Lynch-Syndrom Typ I) und zusätzlich Tumore in anderen Geweben zu entwickeln (Lynch-Syndrom Typ II; Boland and Troncale 1984; Fishel, Lescoe et al. 1993; Leach, Nicolaides et al. 1993; Marra and Boland 1995; Vasen, Sanders et al. 1996; de la Chapelle 2004). Das Lynch-Syndrom wurde und wird auch teilweise immer noch als HNPCC-Syndrom bezeichnet (hereditäres, nicht polypöses Kolonkarzinom), da bei Karzinomen im Darm, im Gegensatz zu anderen vererbaren Krebsarten, sehr wenig Vorstufen wie Polypen vorhanden sind (Lynch, Shaw et al. 1966; Boland and Troncale 1984; Lynch, Drouhard et al. 1985). Beide Begriffe werden mittlerweile synonym verwendet, wobei Lynch-Syndrom bevorzugt werden sollte, um den Fokus nicht auf kolorektale Karzinome zu beschränken (Jass 2006). Der erste dokumentierte Fall der vererbaren Natur des Lynch-Syndroms wurde 1913 festgehalten, bei dem eine junge Frau ihrem Arzt mitteilte, dass sie an einer Krebserkrankung sterben würde, da bereits Familienmitglieder an dieser verstorben waren (Warthin 1913). Patienten mit LS haben bessere Heilungschancen als Patienten mit sporadischem Krebs, weil LS-assoziierte Tumore wahrscheinlich weniger metastasieren (Sankila, Aaltonen et al. 1996; Schneider et al. 2012). LS-Patienten tragen typischerweise eine Keimbahnmutation in den Fehlpaarungsreparaturgenen *hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1* oder *hPMS2*. Eine zusätzliche Mutationen oder Deletion in dem Wildtypallel des entsprechenden Gens oder die Hypermethylierung des *hMLH1*-Promotors inaktivieren dann die Fehlpaarungsreparatur (Cunningham 1998, Peltomaki 2001, Nagasaka 2010).

DNA Reparatur		DNA Schaden Signalwege & Apoptose		Signal- Transduktion		Transkriptions- regulation	
<i>MRE11</i>	73%	<i>CASP5</i>	48%	<i>ACVR2</i>	86%	<i>TCF4</i>	83%
<i>POLD3</i>	43%	<i>BAX</i>	42%	<i>TGFBR2</i>	75%	<i>TAF1B</i>	79%
<i>MSH3</i>	42%	<i>ATR</i>	25%	<i>EPHB2</i>	42%	<i>CREBBP</i>	29%
<i>RAD50</i>	31%	<i>CHEK1</i>	12%	<i>PTEN</i>	31%	<i>HDAC2</i>	23%
<i>BRCA2</i>	27%	<i>CDC25</i>	11%	<i>PIK3CA</i>	21%	<i>PRDM2</i>	18%
<i>MSH6</i>	26%	<i>BCL10</i>	10%	<i>IGF2R</i>	20%		
<i>MBD4</i>	23%			<i>WISP3</i>	19%		
<i>PRKDC</i>	21%						
<i>MLH3</i>	17%						
<i>BLM</i>	17%						
<i>LIGASE 3</i>	13%						
<i>REV1L</i>	13%						
<i>REV3L</i>	13%						

Abb. 8: Humane Gene, die Mikrosatelliten tragen. Defekte in der Fehlpaarungsreparatur resultieren in der häufigen Mutation von Genen, welche Mikrosatelliten enthalten. Angegeben sind Gene verschiedener zellulärer Prozesse und Signalwege, die im Verdacht stehen, eine kritische Rolle in der Tumorentstehung oder Progression zu spielen. Die Prozentzahlen geben an, in wie viel Prozent der untersuchten kolorektalen Karzinome eine Mutation in dem entsprechenden Gen vorlag. Entnommen und modifiziert aus Zaanan, Meunier et al. 2011.

Dieser Defekt resultiert in einer reduzierten oder defekten Fehlpaarungsreparatur und somit in einer erhöhten Mutationsrate, welche sich in LS-Tumoren in erhöhten Basenpaarmutationen und in einer erhöhten Mikrosatelliteninstabilität (MSI-High) widerspiegelt (Ionov, Peinado et al. 1993). Im Gegensatz zu somatischen Zellen ist die Mikrosatelliteninstabilität in 90 % der LS-Tumoren erhöht. Bei spontanen Kolonkarzinomen ist dies nur in 15% der Fälle zu beobachten (Aaltonen, Peltomaki et al. 1994; Percesepe, Kristo et al. 1998). Das Akkumulieren von Mutationen in Mikrosatelliten-tragenden Genen wird als Hauptgrund vermutet, warum Fehlpaarungsreparatur-defiziente Zellen eine onkogene Transformation durchlaufen. Darunter fallen Gene, die u.a. für die DNA-Reparatur, Apoptose oder die Transkriptionsregulation verantwortlich sind (Zaanan, Meunier et al. 2011; Abb. 8).

Mutationen der Fehlpaarungsreparaturgene, wie z.B. Deletionen, vorzeitige Stop-Kodons („Nonsense“-Mutation) oder Leserasterverschiebungen, führen offensichtlich in den meisten Fällen zu nicht-funktionellen Proteinen. Die häufigsten Mutationen sind Leserasterverschiebungen, gefolgt von „Nonsense“-Mutationen. „Missense“-Mutationen treten in *hMSH2* zu 17 % auf. Hingegen sind bei *hMLH1* und *hMSH6* fast doppelt soviel „Missense“-Mutationen zu beobachten (32 % und 38 %, Abb. 9; de la Chapelle 2004). Bei dieser Art von Mutation, welche in dem Austausch einer einzigen Aminosäure des Proteins resultiert, lässt sich die Funktionsfähigkeit des Proteins nicht vorhersagen. So kann der Austausch zu einem voll funktionsfähigen Allel führen, ebenso aber kann die Funktion reduziert sein oder komplett ausfallen. Diese nicht-charakterisierten Mutationen werden als unklassifizierte Varianten (UV) bezeichnet und stellen die Diagnostik und damit eine mögliche Therapie vor große Probleme.

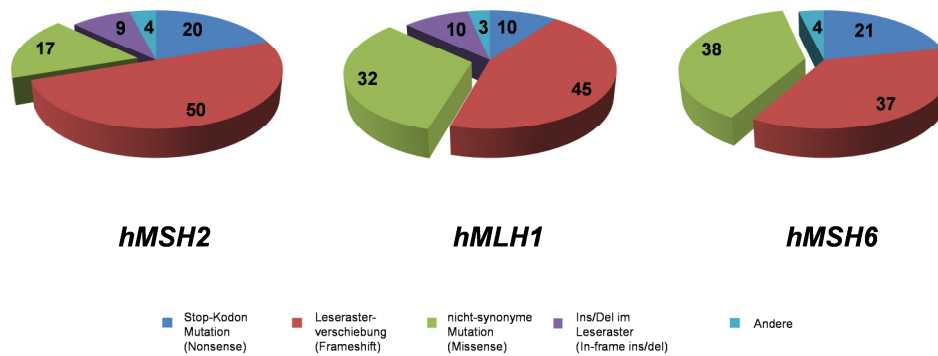


Abb. 9: Prozentuale Verteilung von Mutationen in den humanen DNA-Fehlpaarungsreparaturgenen *hMSH2*, *hMLH1* und *hMSH6*. Die genannten Gene sind am häufigsten beim Lynch-Syndrom mutiert. Der prozentuale Anteil an „Missense“-Mutationen ist separiert dargestellt (grün). Ins/del = Insertion / Deletion. Daten entnommen und Grafik modifiziert aus de la Chapelle 2004.

1.3.1 Charakterisierung von unklassifizierten Varianten

Eine internationale Datenbank erfasst Ergebnisse der Analysen von „Missense“-Mutationen der Fehlpaarungsreparaturgene und stellt diese zur Verfügung (Ou, Niessen et al. 2008; <http://www.mmrv.info>). In Deutschland werden durch das Verbundprojekt der Deutschen Krebshilfe „Familiärer Darmkrebs“ Patienten und Familien mit Verdacht auf Lynch-Syndrom behandelt und registriert. Die Datenerfassung erfolgt bundesweit in sechs universitären Zentren, wobei das Projekt durch das IMISE (Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie Leipzig) bei der Dokumentation und Verwaltung der Daten unterstützt wird. Ziel des Projektes ist es, Früherkennungsmaßnahmen durchzuführen und die fachlichen Standards für Diagnostik und Früherkennung zu verbessern. In dieser Datenbank sind 5314 Familien mit HNPCC-Verdacht erfasst, wovon in 1135 Familien bereits eine pathogene Mutation in einem Fehlpaarungsreparaturgen nachgewiesen werden konnte. Davon tragen 543 Familien eine Mutation im *hMSH2*-Gen (letzter Stand 28.11.2012, persönliche Auskunft von Dr. Christoph Engel vom 02.12.2012, IMISE).

Zur Klassifizierung von Mutationen in Genen, die mit der Krebsentstehung assoziiert sind, wurde 2008 das „Three-Step-Model“ vorgeschlagen, bei dem in 3 Schritten geklärt werden soll, ob eine nicht-funktionelle Variante vorliegt. Dieses Modell kann sowohl Anwendung bei der Analyse von Fehlpaarungsreparaturgenen wie *hMSH2* oder *hMLH1* finden, aber auch z.B. bei *BRCA1* (Brustkrebs; Couch, Rasmussen et al. 2008). Zu Beginn der Analyse wird aufgrund der Familienhistorie bestimmt, ob, wie im Fall des Lynch-Syndroms, durch Immunohistochemie (IHC) Fehlpaarungsreparaturproteine nachgewiesen werden können.

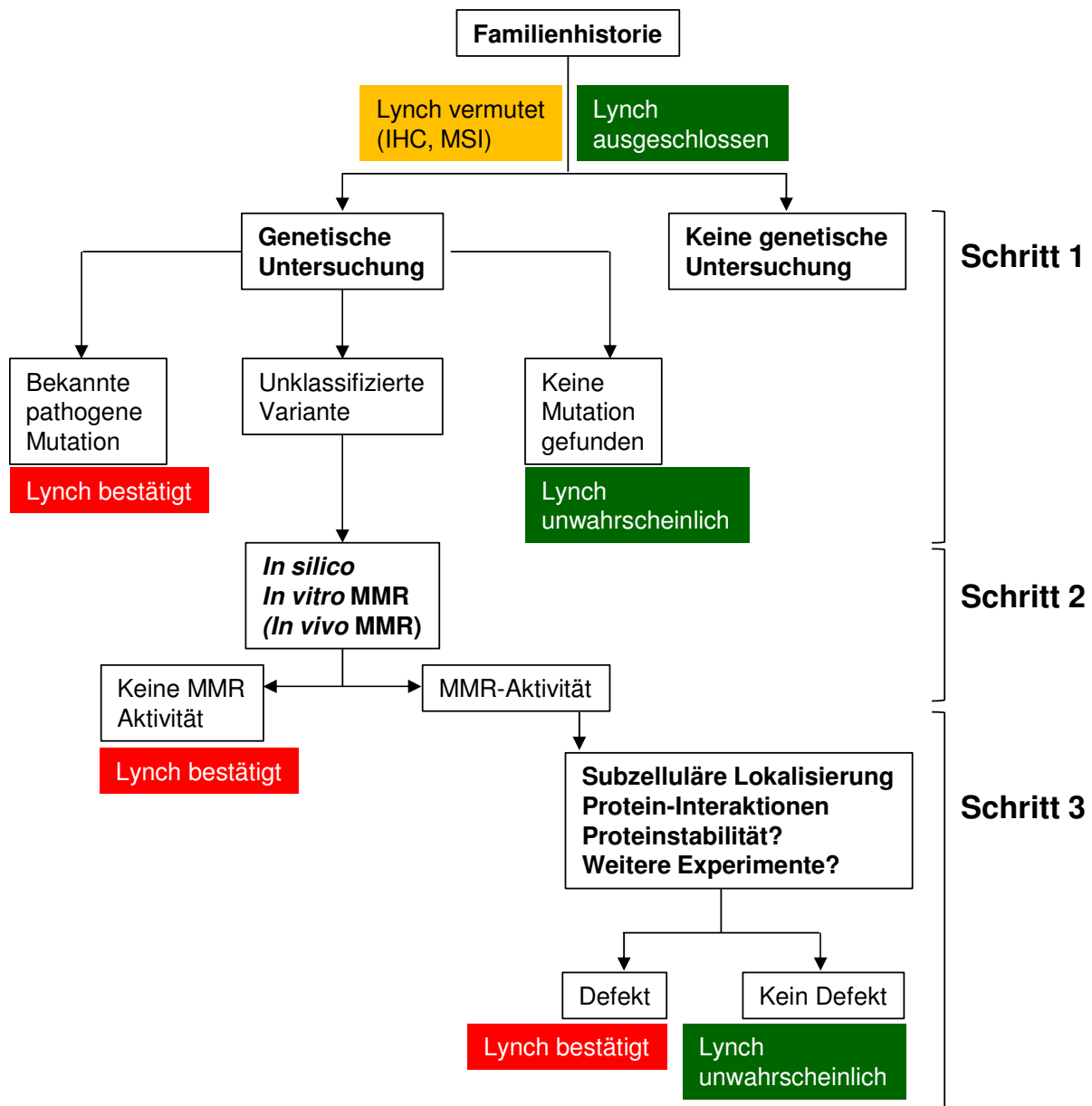


Abb. 10: Das „Three-Step Model“ für die Analyse von unklassifizierten Varianten (UV) von Fehlpaarungsreparaturgenen. Das entwickelte Flußschema soll eine gerichtete Analyse von unklassifizierten Varianten ermöglichen. IHC = Immunohistochemie; MSI = Mikrosatelliteninstabilität. Details siehe Text. Grafik angelehnt an Couch, Rasmussen et al. 2008.

Ebenfalls wird untersucht, ob Zellen Mikrosatelliteninstabilität (MSI) aufweisen. Geben eine oder beide Untersuchungen Hinweise auf das Lynch-Syndrom, so beginnt die Klassifizierung einer Mutation mit Schritt 1 (Abb. 10). Hier erfolgt die molekulargenetische Analyse der Fehlpaarungsreparaturgene, um zu prüfen, ob eine Mutation in den Genen *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* oder *PMS2* vorhanden ist. Wird eine Mutation gefunden, bei der bekannt ist, dass diese mit dem Lynch-Syndrom assoziiert ist, so ist der Befund eindeutig. Wird eine Mutation gefunden, die noch nicht funktionell charakterisiert ist (variant of unclassified significance, VUS = unklassifizierte Variante, UV), soll diese zunächst in *in silico* und in *in vitro* MMR Analysen untersucht werden (Schritt 2). Bei der *in vitro* Fehlpaarungsreparatur werden

beispielsweise Proteinextrakte von Zelllinien, welche z.B. mutant für *hMLH1* sind, mit der zu untersuchenden rekombinanten *hMLH1*-Proteinvariante versetzt. Hier wird nun ein künstliches DNA-Substrat zugegeben, welches eine Fehlpaarung enthält. Durch stattfindende Reparatur entsteht eine Restriktionsschnittstelle, die nach Restriktion für eine aktive Fehlpaarungsreparatur spricht. Dieser experimentelle Ansatz wurde für *MLH1*, *MSH2* und *MSH6* etabliert (Trojan 2002; Raevaara, Korhonen et al. 2005; Drost, Zonneveld et al. 2012). Wird MMR-Aktivität *in vitro* festgestellt, so wird diese Mutation in weiteren Analysen z.B. auf Proteinlokalisierung oder Proteininstabilität untersucht (Schritt 3). Da biochemische und andere *in vitro* Analysen nur unvollständig die *in vivo* Situation nachstellen können, muss für Schritt 2 des Modells auch der Einsatz von *in vivo* MMR Experimenten angestrebt werden. Daher wurde Schritt 2 um den Punkt *in vivo* MMR ergänzt. Für eine *in vivo* Analyse sind bislang noch keine Testsysteme in Humanzellen etabliert worden, so dass zurzeit die Untersuchung nur in Modellorganismen stattfindet. Die genaue Bedeutung der *in vivo* MMR wird unter 1.4.2 beschrieben. Stellt sich kein Defekt in den Experimenten von Schritt 2 heraus, wird von einer wildtypischen Mutation ausgegangen, welche das Lynch-Syndrom ausschließt (Couch, Rasmussen et al. 2008).

1.4 Testsysteme für unklassifizierte Varianten von Fehlpaarungsreparaturproteinen

Um eine umfassende Betrachtung einer Mutation sowie keine falsch negativen/positiven Ergebnisse in der *in vitro* Fehlpaarungsreparatur zu erhalten, sind weitere Ansätze nötig. Eine direkte Analyse von humanen *MSH2* Allelen unter endogenen Bedingungen in Humanzellen ist experimentell zurzeit nicht möglich. Die präzise Integration eines Allels in den humanen *MSH2* Locus unter Kontrolle des endogenen *hMSH2*-Promotors ist aufgrund ineffizienter homologer Rekombination nicht möglich. Die ebenso anspruchsvolle Kultivierung und Handhabung von humanen Zelllinien erschwert zusätzlich die Analyse von Allelen. Mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Testsystemen in Modellorganismen wird deshalb versucht, eine unklassifizierte Variante funktionell zu charakterisieren. Mittlerweile gibt es eine Reihe von funktionellen Testsystemen, um die funktionelle Charakterisierung von MMR-Proteinen voranzutreiben. Im Folgenden wird der Fokus auf die Analyse von *hMSH2* gelegt.

1.4.1 *In vitro* Systeme

Diese Systeme werden verwendet, um einzelne Parameter der Proteinfunktionalität in kurzer Zeit zu untersuchen. Hierbei spielt zunächst die Proteinmenge von *hMSH2*-Allelen eine wichtige Rolle. Eine Mindestmenge an Molekülen, die für eine wildtypische Fehlpaarungsreparatur benötigt wird, ist noch nicht definiert. Eine reduzierte Proteinmenge

oder sogar das Fehlen des Proteins weisen aber auf eine veränderte Biologie des Moleküls hin, die in einer veränderten Funktionsfähigkeit resultieren kann (Gammie, Erdeniz et al. 2007). Um Aussagen über die Proteinstabilität zu erhalten, werden sowohl Humanzellen mit transfizierten humanen MSH2-Allelen als auch deren konservierte Homologe in der Hefe untersucht (Brieger, Trojan et al. 2002; Ollila, Sarantaus et al. 2006; Gammie, Erdeniz et al. 2007; Lutzen, de Wind et al. 2008).

Neben der Menge des Proteins spielt die Interaktion mit dem Komplexpartner hMSH6 bzw. hMSH3 eine entscheidende Rolle. Für den Nachweis eignet sich die Hefe-2-Hybrid-Analyse, um die Interaktion von hMSH2 (als auch yMsh2p) mit seinen Komplexpartnern hMSH3 (yMsh3p) oder hMSH6 (yMsh6) zu testen (Gammie, Erdeniz et al. 2007; Lutzen, de Wind et al. 2008). Für die in Gammie et al. publizierte Hefe-2-Hybrid-Interaktion von Hefe-Msh2p mit den entsprechenden Komplexpartnern wurde eine yMsh2p-Version verwendet, die einen HA-Tag im Protein trägt. Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation zeigten jedoch, dass die Interaktion von yMsh2p ohne den integrierten HA-Tag mit seinem Interaktionspartner yMsh6p nicht mehr nachzuweisen war, weshalb die Hefe-2-Hybrid Analyse von Hefe-MMR Proteinen kritisch betrachtet werden sollte (Funk 2010). Ob die Hefe-2-Hybrid Analyse von humanem MSH2 mit seinen humanen Komplexpartnern im Hefe-2-Hybrid-System auch betroffen ist, bleibt zu klären. Alternativ können für weitere Interaktionsstudien GST-Pulldown Experimente mit rekombinanten Proteinen durchgeführt werden (Lutzen, de Wind et al. 2008).

Damit die Fehlpaarungsreparatur stattfinden kann, müssen die beteiligten Proteine in den Nukleus transportiert werden. Der Transport-Mechanismus ist für hMSH2 nicht genau geklärt, aber es konnte bereits nachgewiesen werden, dass hMSH2 mit dem Importin $\alpha 3$ interagiert (Knudsen, Nielsen et al. 2007). Interessanterweise verfügt das Hefe-Msh2p über NLS Sequenzen, welche einen Transport in den Nukleus ermöglichen (Hayes, Sevi et al. 2009). Die Untersuchung der Translokation von hMSH2-Allelen kann so genutzt werden, um eine Aussage über die Proteinlokalisierung zu erhalten und so Rückschlüsse auf die Funktionalität zu ziehen (Lutzen, de Wind et al. 2008).

In einem weiteren Testsystem wird das Bindungsverhalten eines hMSH2-Allels im hMutSa-Komplex an die DNA bzw. an eine Fehlpaarung analysiert. Durch Zugabe eines künstlichen DNA-Substrats (mit enthaltener Fehlpaarung) wird das Verhalten des Komplexes untersucht und mittels eines Proteingels analysiert (Ollila, Dermadi Bebek et al. 2008).

Neben experimentellen Ansätzen werden *in silico* Analysen genutzt. Internetbasierte Programme bieten die Möglichkeit, die spezifische Proteinsequenz zu untersuchen. Es wird anschließend berechnet, wie sich ein Aminosäureaustausch auf die Struktur und somit die Funktion des Proteins auswirken könnte (Yue, Melamud et al. 2006; Kumar, Henikoff et al. 2009; Adzhubei, Schmidt et al. 2010).

1.4.2 *In vivo* Systeme

Der entscheidende Nachteil von *in vitro* Systemen ist der fehlende Bezug zur Situation in der lebenden Zelle. Viele *in vitro* Ansätze zeichnen sich dadurch aus, dass Proteine in großer Menge rekombinant oder überexprimiert in der Zelle analysiert werden, so dass dessen Biologie aufgrund der hohen Proteinmenge verändert sein kann. Dies trifft vor allem auf Allele zu, deren Proteinstabilität möglicherweise beeinträchtigt ist, durch eine künstliche Überexpression aber stabilisiert wird und somit eine andere Biologie aufweist (Gammie, Erdeniz et al. 2007). Deshalb muss die Analyse um *in vivo*-Systeme erweitert werden, welche das Verhalten von hMSH2-Allelen in der Zelle, idealerweise sogar in der Fehlpaarungsreparatur selbst, untersuchen. Der Modellorganismus *S. cerevisiae* wird für solche *in vivo* Analysen bevorzugt verwendet, wobei die Technik der MMR-Analyse in Hefe grundsätzlich immer dieselbe ist. Um zu prüfen, wie funktionell die Fehlpaarungsreparatur ist, werden als Reporter Biosynthesegene verwendet, welche mit einem Mikrosatelliten versehen sind, wodurch das Gen nicht im richtigen Leseraster liegt. Dies resultiert in Auxotrophie für das entsprechende Produkt des Biosynthesewegs. Die Hefestämme Dag60 ($\Delta msh2$) und E134 (WT) verwenden ein solches System, bei denen eine abgeänderte Version des *LYS2*-Gens im Genom vorhanden ist. In den Leserahmen des *LYS2*-Gens wurde eine 70bp große Insertion integriert, welche einen Homopolymerstrang, bestehend aus 14 A=T Basenpaaren, trägt (Tran, Keen et al. 1997). Das *LYS2*-Leseraster ist hierdurch um ein Basenpaar verschoben (+1), was in einem verfrühten Stop-Kodon im Gen resultiert. Somit wird kein funktionelles Enzym für die Lysin-Biosynthese gebildet, was in Lysin-Auxotrophie resultiert (Abb. 11). Der replikationsbedingte Verlust („replication slippage“) eines einzelnen A=T Basenpaares im (A=T)₁₄-Strang führt zur Wiederherstellung eines korrekten Leserahmens und damit zu Lysin-Prototrophie. Mutierte Zellen, die ein A=T Basenpaar verloren haben, sind in der Lage, auf Medium ohne Lysin zu wachsen, während nicht-mutierte Zellen kein Wachstum zeigen. Der Verlust des A=T Basenpaares geschieht in Dag60 mit einer 10.000fach höheren Frequenz als im Wildtyp, da die Fehlpaarungsreparatur durch die *msh2*-Deletion inaktiviert wurde (Clark, Cook et al. 1999). Über das Verhältnis von Revertanten zur Lebendzellzahl kann so die Mutationsrate bestimmt werden und es können Rückschlüsse auf die Funktionalität des untersuchten Proteins gezogen werden.

Humane MSH2 Allele können durch Koexpression des Komplexpartners hMSH6 (=hMutS α -Komplex) mit diesem System in Hefe analysiert werden. Wildtypische hMSH2-Allele, koexprimiert mit hMSH6, stören die Fehlpaarungsreparatur eines wildtypischen Hefestamms und führen daher zu dominant negativen Mutatorphänotypen, d.h. zu stark beeinträchtigter Fehlpaarungsreparatur-Aktivität (Clark, Cook et al. 1999). Der humane, stark exprimierte MutS α -Komplex bindet wahrscheinlich an Replikationsfehler, so dass die Hefe-Fehlpaarungsreparatur abgeschirmt wird, da die nachfolgenden Hefe-Proteine des MMR-

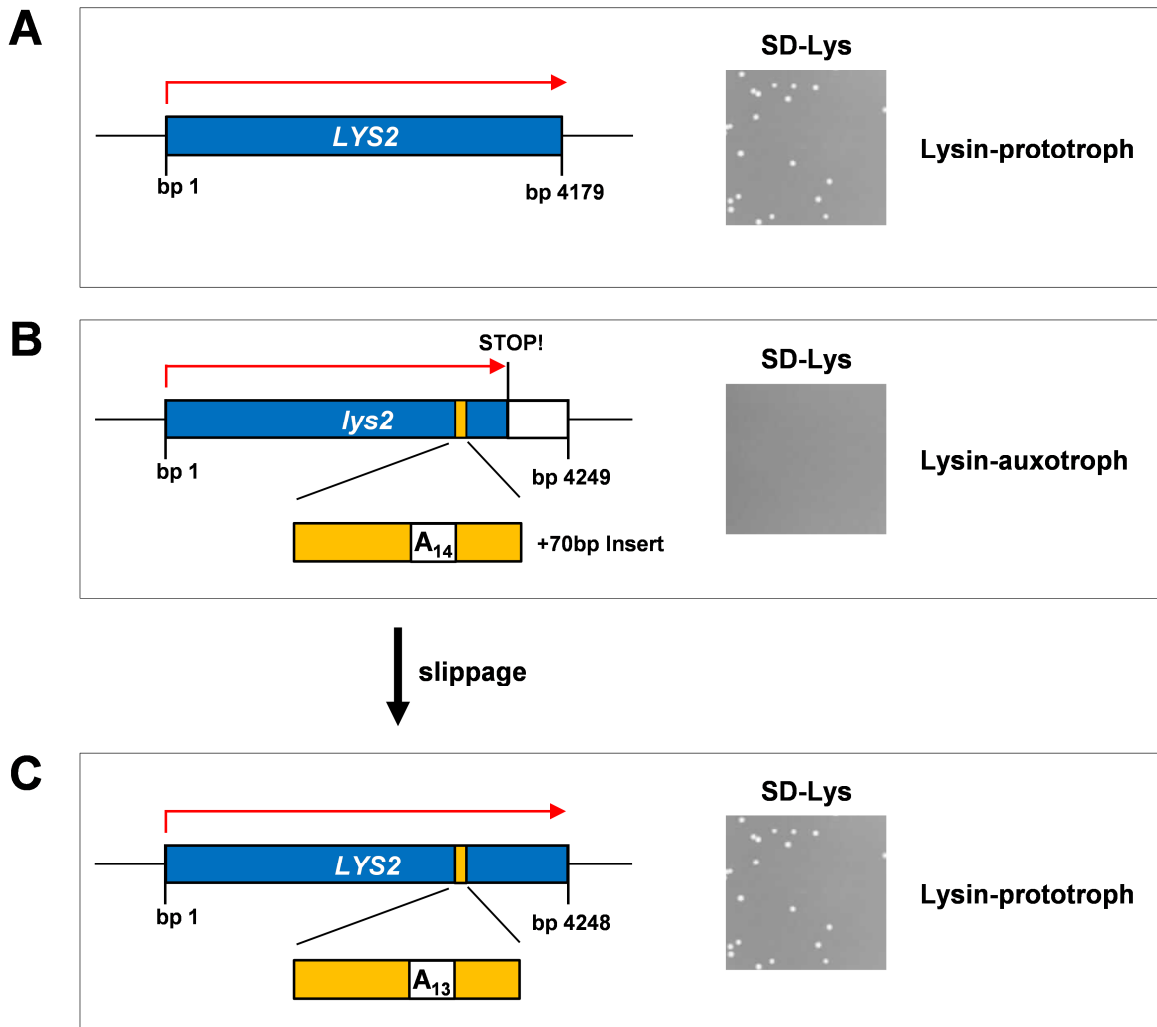


Abb. 11: Prinzip des *lys2_{A14}*-Reportersystems. Im Vergleich zum wildtypischen *LYS2*-Gen (A) tragen die Hefestämme Dag60 und E134 ein 70bp großes Fragment mit einer Abfolge von 14 A=T Basenpaaren im Gen, was zu einem vorzeitigen Stop-Kodon führt. Somit wird ein nicht-funktionelles Protein für die Lysin-Biosynthese gebildet (B). Durch replikationsbedingten Verlust („slippage“) eines A=T Basenpaares wird der vollständige Leserahmen des Gens wiederhergestellt, was in Lysin-Prototrophie resultiert (C). SD-Lys = Minimalmedium für *S. cerevisiae* ohne Lysin.

Systems nicht mit dem humanem MutS α -Komplex interagieren können (Abb. 12). Dies spiegelt sich in einer massiven Erhöhung der Mutationsrate des verwendeten Hefestamms wider, welche anhand der oben beschriebenen Reportergene bestimmt werden kann. Humane MSH2-Allele, die einen Einfluss auf Expression, Struktur, Interaktion und/oder Funktion haben, werden in der Hefe entweder nicht exprimiert, können nicht mit hMSH6 interagieren oder nicht länger an Fehlpaarungen binden. Dadurch ist der wildtypische Hefe-MutS α -Komplex wieder in der Lage, den Fehler zu binden und die Reparatur zu initiieren, was sich in einer wildtypischen Mutationsrate des Hefestamms widerspiegelt (Clark, Cook et al. 1999). Viele Parameter wie Expression, Interaktion und Fehlpaarungserkennung können in diesem Ansatz gleichzeitig *in vivo* untersucht werden. Ob die Koexpression des Hefe-MutS α -Komplexes auch dominant-negativ ist, wurde bisher nicht untersucht. Es zeigte sich

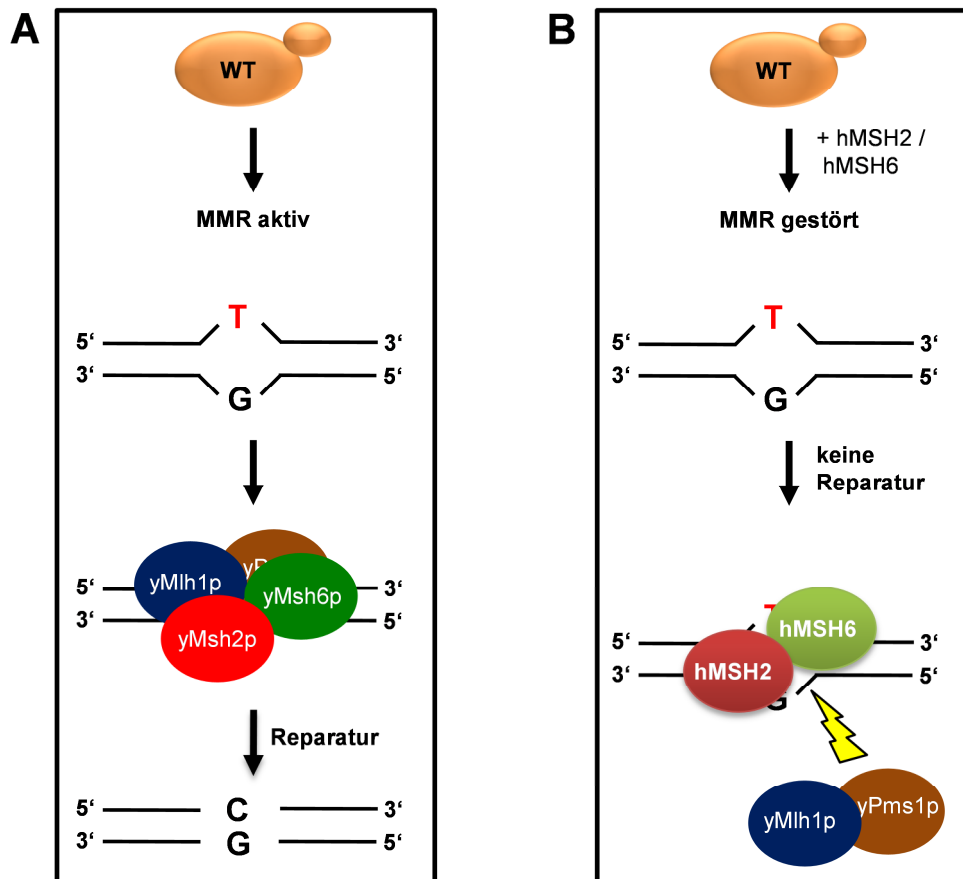


Abb. 12: Modell des dominant-negativen Mutatorphänotyps, ausgelöst durch die Koexpression von humanem MSH2 und MSH6. (A) Eine durch die DNA-Replikation entstandene Fehlpaarung (als Beispiel: G-T) wird durch die Hefe-Fehlpaarungsreparatur erkannt und behoben (hier schematisch die ersten Schritte). (B) Die Koexpression von humanen MSH2 und MSH6 bewirkt, dass der gebildete Komplex an Fehlpaarungen im Hefe-Genom bindet und diese von der Hefe-Fehlpaarungsreparatur abschirmt. Der Replikationsfehler kann nicht behoben werden (Clark, Cook et al. 1999). MMR = Mismatch repair (Fehlpaarungsreparatur).

aber, dass die alleinige Überexpression von wildtypischem Hefe-Msh2p in eine Wildtyp-Hefestamm die Fehlpaarungsreparatur nicht beeinträchtigt (Drotschmann, Clark et al. 1999, Herbst 2006). Trotzdem ist ein dominant-negativer Mutatorphänotyp für Hefe-Msh2p-Allele möglich, welche die Bindung/Spaltung von ATP im Walker A/B Motiv koordinieren (Drotschmann, Clark et al. 1999). Für wildtypisches hMLH1 konnte gezeigt werden, dass dessen alleinige Expression einen Mutatorphänotyp in *S. cerevisiae* auslöst, so dass mit diesem System bereits weit über hundert Mutationen in hMLH1 untersucht wurden (Shimodaira, Filosi et al. 1998; Takahashi, Shimodaira et al. 2007; Hardt, Heick et al. 2011). Eine präzisere Analyse von Allelen des humanen MSH2 Proteins ist dann möglich, wenn es sich um konservierte Aminosäuren handelt. Diese werden in yMsh2p durch die entsprechende humane Mutation ersetzt und anschließend auf Funktionalität mittels eines Reportergens getestet (Polaczek, Putzke et al. 1998; Drotschmann et al. 1999; Drotschmann, Clark et al. 1999; Gammie, Erdeniz et al. 2007). Der entscheidende Vorteil dabei ist, dass die Mutationsrate eines $\Delta msh2$ -Stamms gegenüber dem Wildtyp um den

Faktor 10.000 erhöht ist (Clark, Cook et al. 1999). Somit ist für die funktionelle Analyse von Allelen ein großes Analysefenster gegeben. Die Analyse von Mutationen ist dabei nicht nur auf yMsh2p beschränkt, sondern auch yMsh3p und yMlh1p wurden mit konservierten Aminosäureaustauschen untersucht, um neben der Funktionalität einer Mutation auch mehr über die Biologie der Fehlpaarungsreparatur zu erfahren (Luhr, Scheller et al. 1998; Shcherbakova and Kunkel 1999; Das Gupta and Kolodner 2000; Wanat, Singh et al. 2007). Leider ist der Austausch von konservierten Aminosäuren auf die Positionen beschränkt, die zwischen humanem und yMsh2p identisch sind. So können nicht alle humanen Aminosäuremutationen analysiert werden. Theoretisch ist die Analyse auf ca. 382 humane Aminosäurepositionen beschränkt, da die Proteine hMSH2 und yMsh2p eine Identität von 41% und eine Homologie von 62% aufweisen. Somit können 552 Aminosäurepositionen von humanem MSH2 nicht mit dem beschriebenen System untersucht werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht, einen $\Delta msh2$ Hefestamm durch *hMSH2* funktionell zu komplementieren. Jedoch zeigte sich, dass humanes MSH2 in Hefe nicht funktionell ist (Clark, Cook et al. 1999).

1.4.2.1 Hefe-Mensch-Msh2-Hybriden

Aufgrund der fehlenden Funktionalität von hMSH2 in Hefe mussten andere Wege gesucht werden, um auch nicht-konservierte Aminosäuren im hMSH2 für eine Analyse in Hefe zugänglich zu machen. Das gleiche Problem zeigte sich auch bei der funktionellen *in vivo* Analyse von humanen MLH1-Allelen. Dies wurde durch die „Humanisierung“ von Hefe-Mlh1p gelöst. Proteinabschnitte von Hefe-Mlh1p wurden gegen homologe Bereiche von humanem MLH1 ausgetauscht. Die so konstruierten Hefe-Mensch-Mlh1-Hybride wurden dann für funktionelle *in vivo* Analysen von hMLH1 „Missense“-Mutationen genutzt (Ellison, Lofing et al. 2001). Da diese yhMlh1-Hybride Funktionalität zeigten, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Idee der „Humanisierung“ für yMsh2p umgesetzt.

Hierfür wurde in unserer Arbeitsgruppe erstmals ein funktionelles Hefe-Mensch-Msh2 Hybridprotein entwickelt, bei dem ein 101 Aminosäuren großes Fragment des C-Terminus von yMsh2p gegen den entsprechenden humanen Proteinabschnitt ersetzt wurde. Der Austausch der Aminosäuren 685 bis 785 (Identität: 86%, Homologie: 94%) der ATPase Domäne von Hefe-Msh2p gegen die entsprechenden humanen Aminosäuren 666 bis 766 führten zu einem funktionellen yhMsh2-Hybrid (Herbst 2006, Abb. 13). Dieses Hybrid eröffnet die Möglichkeit, jede beliebige humane Aminosäureposition zwischen AS 666 und AS 766 in einem humanen Kontext auf Funktionalität zu untersuchen. Momentan sind auf der Internetseite www.mmrmissense.info 30 Aminosäureaustausche zum Teil funktionell *in vitro* charakterisiert, die in diesem Hybrid-Konstrukt nun erneut auf ihre *in vivo* Funktionalität getestet werden könnten (Stand 31.07.13).

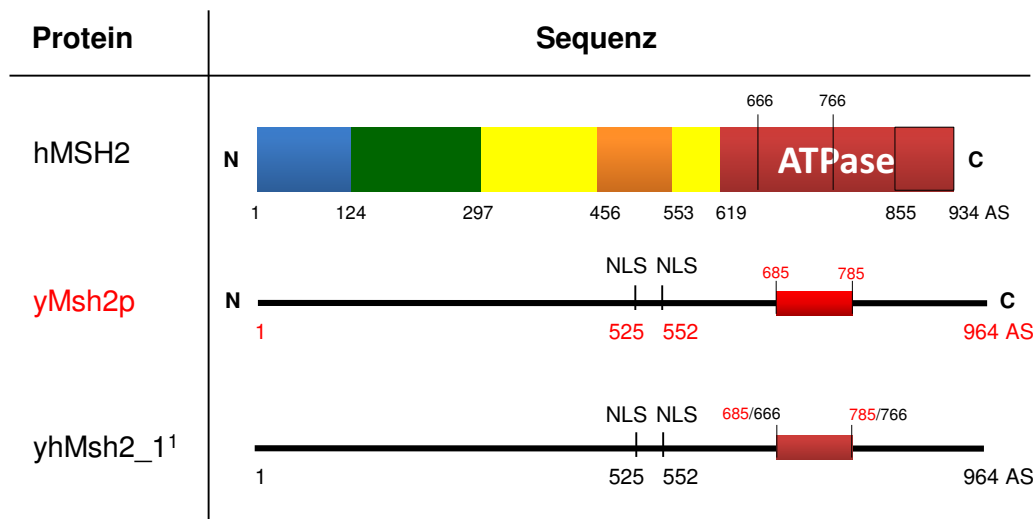


Abb. 13: Das erste Hefe-Mensch-Msh2 Hybrid. Der Austausch eines 101 Aminosäuren großen Fragements im C-Terminus von Hefe-Msh2p gegen die entsprechenden humanen Aminosäuren ermöglichte die Konstruktion eines funktionellen Hybrids (¹Herbst, 2006). Die beim Hybrid angegebenen Zahlen zeigen, welcher Hefe-Abschnitt (Zahl 1, rot) durch den entsprechenden humanen Proteinabschnitt ersetzt wurde (Zahl 2, schwarz). Die Lage der Domänen von humanem MSH2 ist durch die entsprechenden Nummern unter der Proteinsequenz angegeben. Die entsprechenden genauen Domänengrenzen von yMsh2p sind nicht bekannt. NLS = nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal).

1.5 Alterung

Altern ist ein Prozess, bei dem über einen Zeitraum hinweg multiple interne und externe Faktoren Einfluss auf das Genom und Proteom nehmen, was in einer Veränderung der Genexpression und Schädigung der Zelle resultiert (Semsei 2000; Kourtis and Tavernarakis 2011). Bei der Alterung kann zwischen zwei Alterungsprozessen unterschieden werden. Die replikative Alterung beschreibt, wie Zellen, die sich fortwährend teilen, mit jeder Zellteilung älter werden. Zum anderen beschreibt die chronologische Alterung die Überlebenszeit von Zellen, welche sich in einem postmitotischen Zustand befinden. Dies entspricht bei höheren Eukaryoten ausdifferenzierten Zellen, welche sich nicht mehr teilen und dabei eine spezialisierte Funktion ausüben. Um diese 2 verschiedenen Prozesse zu untersuchen, wird die Hefe *S. cerevisiae* als bewährter Modellorganismus in der Alterungsforschung verwendet (Laun, Rinnerthaler et al. 2006; Steinkraus, Kaeberlein et al. 2008).

1.5.1 Replikative Alterung

Da Hefe sich asymmetrisch durch Knospung teilt, ist die replikative Lebensspanne in Hefe im Vergleich zu der von Humanzellen leicht zu untersuchen. Es wird bestimmt, wieviele Tochterzellen eine Mutterzelle durch Knospung erzeugt, bevor sie sich nicht mehr teilt (Mortimer and Johnston 1959; Muller, Zimmermann et al. 1980). Bei jeder Zytokinese einer Tochter- von der Mutterzelle bleibt eine entsprechende Knospungsnarbe auf der Mutterzelle

zurück, so dass sich durch Anfärbung dieser Narbe junge und alte Mutterzellen identifizieren lassen (Bacon, Davidson et al. 1966; Hartwell and Unger 1977; Abb. 14). Zu den weiteren asymmetrischen Teilungsfaktoren zählen intrinsische Alterungsfaktoren, die in der Mutterzelle zurückbleiben. Der dabei bekannteste Alterungsfaktor in *S. cerevisiae* sind extrachromosomale, ringförmige ribosomale DNA-Moleküle (extrachromosomal ribosomal DNA circles = ERC). Mit steigendem replikativen Alter sind sie das Ergebnis einer zunehmenden Rekombination der chromosomalen DNA-Abschnitte, welche für ribosomale RNA kodieren (Philippsen, Thomas et al. 1978; Sinclair and Guarente 1997). In sehr alten Mutterzellen wurde zudem eine erhöhte Konzentration von Sauerstoffradikalen festgestellt, welche dem Mitochondrium entstammen. Diese führen zu einem hohen Anteil an oxidativ geschädigten Proteinen in der alten Mutterzelle (Aquilaniu, Gustafsson et al. 2003; Reverter-Branchat, Cabiscol et al. 2004; Erjavec and Nystrom 2007). Dadurch, dass die genannten Faktoren in der alten Mutterzelle größtenteils zurückgehalten werden, kann eine junge Tochterzelle generiert werden (Zhou, Slaughter et al. 2011). Jedoch scheint dieser Mechanismus ab einem bestimmten Alter der Mutterzelle schlechter zu funktionieren, da die ab diesem Zeitpunkt erzeugte Tochterzelle eine verkürzte Lebensspanne zeigt (Kennedy, Austriaco et al. 1994).

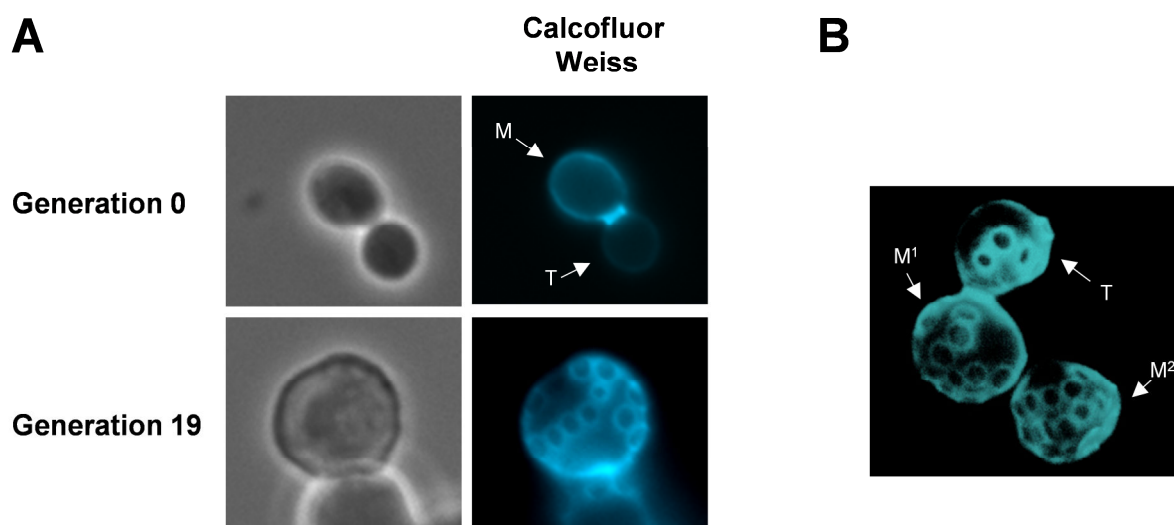


Abb. 14: Morphologische Veränderungen von *S. cerevisiae* Zellen während des replikativen Alterns. A) Phänotypisch lässt sich das Alter von Hefezellen anhand der Färbung von Knospungsnarben mittels Calcofluor Weiss bestimmen. Gezeigt ist eine 19 Generationen alte Mutterzelle (M), welche eine große Anzahl an Knospungsnarben gegenüber einer jungen Mutterzelle (Generation 0) aufweist (T=Tochterzelle). B) 3D-Rekonstruktion einer Spinning-Disc Aufnahme von zwei alten Calcofluor Weiss gefärbten Mutterzellen, bei der die Abschnürung der Tochterzelle von der alten Mutterzelle M¹ nicht erfolgt ist und die Tochterzelle schon selbst Knospungsnarben besitzt (Spinning Disc Aufnahme Dr. Boris Topolski, AG Fleig; 3D-Rekonstruktion Dipl. Biol. Sebastian Hänsch, AG Hegemann; Herstellung replikativ alter Zellen: diese Arbeit).

1.5.2 Chronologische Alterung

Im Gegensatz zur replikativen Lebensspanne beschreibt die chronologische Lebensspanne die Überlebenszeit einer sich nicht-teilenden Population von Zellen (stationäre Phase; Fabrizio and Longo 2003; Fabrizio and Longo 2007). Postmitotische Humanzellen sind metabolisch aktiv, wohingegen Hefezellen aufgrund des Nährstoffmangels postmitotisch werden und daher der Metabolismus reduziert wird (Laun *et al.* 2006; Piper 2006; Kaeberlein 2010). Mit dem Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase finden in Hefe Differenzierungsprozesse statt, um ein Überleben unter zukünftigen Stresseinflüssen (Summierung von zellulären Schäden über die Zeit) zu gewährleisten. Unter zelluläre Schäden fällt die Ansammlung von oxidativ geschädigten Proteinen, mitochondriale Schäden und toxische Konzentrationen von Essigsäure, wobei diese ursächlich für ein beschleunigtes chronologisches Altern von Hefe verantwortlich sind (Burtner, Murakami *et al.* 2009). Die vorhandene Essigsäure entsteht aus Ethanol, welches durch Fermentation aus Glukose entsteht. Ebenso nehmen verschiedene Signalwege in der Zelle einen Einfluss auf die Alterung (Longo *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2009; De Virgilio, 2011).

1.5.3 Genomische Instabilität mit steigendem Alter

Der Einfluss des Alterns auf die genomische Stabilität in Eukaryoten inklusive der Hefe ist nicht verstanden. In *S. cerevisiae* konnte in Tochterzellen von sehr alten Mutterzellen eine Zunahme des Verlustes von Heterozygotie (loss of heterozygosity = LOH) beobachtet werden, was durch Rekombination oder Chromosomenverlust geschehen kann. Hingegen zeigen replikativ alte Mutterzellen eine erhöhte Rate von mitotischer Rekombination, was in dem erhöhten Verlust von Heterozygotie resultierte (McMurray and Gottschling 2003; Lindstrom, Leverich *et al.* 2011). Zudem nimmt die Häufigkeit falscher mitotischer Chromosomenverteilung im Alter linear zu und verursacht Aneuploidien (Langen 2011). Ebenso zeigen alte humane T-Zellen und Lymphozyten eine erhöhte Mikrosatelliteninstabilität im Vergleich zu jungen Zellen (Dutkowski, Lesh *et al.* 1985; Ganguly 1993; Krichevsky, Pawelec *et al.* 2004). Dies spricht für eine veränderte Fehlpaarungsreparaturaktivität, da die beteiligten Proteine Replikationsfehler an Mikrosatelliten beheben. Inwieweit aber der Mechanismus der DNA-Fehlpaarungsreparatur betroffen ist, wurde bisher in nur wenigen Arbeiten untersucht. So zeigen Zellextrakte von alten humanen Fibroblasten eine reduzierte *in vitro* MMR-Aktivität. Dies wird auf eine im Alter verringerte Expression von hMSH2 und hMSH6 zurückgeführt. Hier konnte auch gezeigt werden, dass die Menge des Transkriptionsfaktor E2F1 im Alter ebenfalls verringert ist und es einen direkten Zusammenhang zwischen der E2F1- und hMSH2-Expression gibt (Chang, Jin *et al.* 2008). Da jedoch die Menge von E2F1 im Alter reduziert ist, hat dies zwar direkte Auswirkung auf die hMSH2-Expression, jedoch ist hMSH2 somit nur indirekt vom Altern

betroffen. Eine andere Studie mit *Arabidopsis thaliana* zeigt, dass sich die Mikrosatelliteninstabilität mit steigendem Alter erhöht. Ebenso ist die RNA-Menge des Fehlpaarungsreparaturproteins MSH2 einer 12 Tage alten Pflanze bereits um mehr als die Hälfte reduziert ist. Dass eine reduzierte Menge von MMR-Proteinen eine Rolle im Alter spielen könnte, zeigt weiterhin das Beispiel von 2 verschiedenen langlebigen Fledermausarten. In der kurzlebigen Art wurden in verschiedenen Geweben geringere Mengen von MSH2 und MLH1 im Vergleich zur langlebigen Art festgestellt (Conde-Perezprina, Luna-Lopez et al. 2012).

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, neuartige Hefe-Mensch-Msh2 Hybride als *in vivo* Testsystem zu entwickeln und zur funktionellen Charakterisierung unklassifizierter Varianten des humanen MSH2 Proteins einzusetzen. Die zu untersuchenden hMSH2-Varianten stammen von Patienten, die wegen des Verdachts auf Lynch-Syndrom im deutschen Verbundprojekt „Familiärer Darmkrebs“ der Deutschen Krebshilfe betreut werden. Um nicht-funktionelle hMSH2-Allele weiter zu charakterisieren, sollten diese in Koexpression mit dem Interaktionspartner hMSH6 auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, in *S. cerevisiae* einen dominant-negativen Mutatoreffekt auszulösen. Durch eine zusammenfassende Betrachtung der Funktion, Expression sowie Interaktion mit Komplexpartnern sollte eine Einstufung der hMSH2-Allele in funktionelle und nicht-funktionelle Varianten vorgenommen werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollte die grundsätzliche Frage untersucht werden, ob sich die Effizienz der Fehlpaarungsreparatur von *S. cerevisiae* mit steigendem replikativem sowie chronologischem Alter ändert.

2 Materialien

2.1 Gebrauchsartikel

Gebrauchsartikel	Hersteller
Deckgläschen	Roth
Elektroporationsküvette	Bio-Rad
Glaskolben (50 ml, 100 ml)	Schott
Glasperlen (\varnothing ~0,5 mm)	Braun
LS Columns	Miltenyi Biotec
Mikro-Küvette	Sarstedt
Mikro-Schraubröhre 2ml	Sarstedt
Objektträger, Glas	Diagonal
PCR-Reaktionsgefäße	Bio-Rad
Petrischalen	Sarstedt
Pierce Spin Columns	Thermo Scientific
Pipettenspitzen 200 μ l, 1000 μ l	Sarstedt
PVDF-Membran	Millipore
SafeLock Reaktionsgefäße 1.5 mL	Eppendorf
Sterilfilter	Nalgene
Filterpapier für Western-Blot	Whatman
Zentrifugationsröhrchen, 15 ml, steril mit Schraubverschluss	Sarstaedt
Zentrifugationsröhrchen, 50 ml, steril mit Schraubverschluss	Sarstaedt

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
BioPhotometer Plus	Eppendorf
Blotapparatur	Biometra
Colony Counter 50971	Bioblock Scientific
FACSAria	BD
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50	Zeiss
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Gene Pulser	Bio-Rad
MACS Multistand	Miltenyi Biotec
Multifuge 3SR+	Heraeus
Multitron Inkubationschüttler mit Befeuchtung	Infors HAT
Proteingelsystem SE260	Hofer
NanoDrop ND-2000C Spectrophotometer	PeqLab
PCR-Thermocycler: Gene Amp 9700	MJ Research
PCR-Thermocycler PTC-200	Bio-Rad
Pipetten Pipetman, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Gilson
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
preCellys24	bertin Technologies
quadroMACS	Miltenyi Biotec
Speed-Vac Vacuum-Concentrator	Savant
Schüttler Unitron	Infors HT
UV Tisch TFL 20M	Biometra
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zählkammer	Thoma

2.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamidlösung (30 %: 0.8% Bisacrylamid)	Roth
Agar	Difco
Agarose SeaKem® LE	Biozym
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Anti-Biotin Microbeads	Miltenyi Biotec
Bacto Trypton	Difco
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bradford Reagenz	Biorad
5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Fluka
Calcofluor White	Sigma-Aldrich
Carrier-DNA (Lachssperma-DNA)	Sigma-Aldrich
Casein Pepton	Difco
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva
Chloramphenicol	Roth
clonNAT	Werner Bio Agents
Desoxynukleosid-5'-Triphosphat (dNTPs)	Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol (96 %)	VWR
Ethidiumbromidlösung	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ficoll	Serva
G418	Merck Millipore
Galaktose	Roth
Glucose Monohydrat	Roth
Glycin	Roth
Glyzerin	Roth
Hefeextrakt	Difco
Hefe Stickstoffquelle (YNB)	Difco
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	AppliChem
L-Canavanin	Sigma-Aldrich
Lithiumacetat (LiAc)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ + 6 H ₂ O)	Roth
Methanol	Riedel-deHaën
Methylenblau	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	VWR
Natriumdeoxycholat	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid (PI)	Roth
Proteaseinhibitoren Cocktail „complete“	Roche
Protein-G-Agarose	Thermo Scientific

Chemikalien	Hersteller
Salzsäure (HCl)	Roth
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Scientific
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva
Triethanolamin	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypton Pepton	Difco
Tween 20	Merck
Vectashield	Linaris
Xylencyanol	Serva

2.4 Enzyme

2.4.1 Restriktionsenzyme

Alle genannten Enzyme wurden von der Firma Fermentas (Thermo Scientific) bezogen.

AhdI, Bsp1407I, Bsu36I, BglII, Bpu1102I, NheI, SpeI, XagI

2.4.2 Polymerasen

Enzym	Hersteller
taq DNA Polymerase	laborintern durch Irina Volfson

2.4.3 Sonstige Enzyme

Enzym	Hersteller
RNase A	Sigma-Aldrich

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

Reaktivität	Ursprung	für Western-Blot	Klon	Hersteller /Referenz
Hefe Msh2p	Hase	1:1000	N3C2	GeneTex
Hefe / Human GAPDH	Maus	1:5000	GT239	
Hefe-Cpf1p	Hase	1:1000	-	laborintern durch Ruth Lyck
Humanes MSH2	Maus	1:1000	3A2B8C	Santa Cruz
Humanes MSH6	Maus	1:1000	E-8	

2.5.2 Sekundärantikörper

Reaktivität	für Western-Blot	Hersteller
Maus (AP-konjugiert)	1:7500	Promega
Hase (AP-konjugiert)	1:7500	

2.6 Fluoreszenzfarbstoffe

Reaktivität	für Mikroskopie	Hersteller
APC-Streptavidin	1:20	BD Pharmingen
Calcofluor White	Endkonzentration 100µg/ml	Sigma-Aldrich

2.7 Größenstandards

2.7.1 DNA

Bezeichnung	kbp von hoch bis niedrig	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	10 – 8 – 6 – 5 – 4 – 3.5 – 2.5 – 1.5 – 1.2 – 1 – 0.9 bis 0.1	Fermentas (Thermo Scientific)

2.7.2 Protein

Bezeichnung	kDa von hoch bis niedrig	Hersteller
PageRuler™ Prestained	170 – 130 – 95 – 72 – 55 – 43 – 34 – 26 – 17 – 10	Fermentas (Thermo Scientific)

2.8 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QiaExII Gel Extraction Kit	

2.9 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden über die Firma Sigma-Aldrich und Biomers bezogen und liegen in einer Konzentration von 50 pMol / µl vor. Für die Sequenzierung und PCR-Reaktionen wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 18-23 Nukleotiden verwendet. Zum Klonieren in *S. cerevisiae* wurden 40 Nukleotide Homologie zum Ziel (in folgender Tabelle fett hinterlegt) und 20 Nukleotide zum Binden an die gewünschte Vorlage-DNA benutzt. Die angegebene Nummer zeigt die laborinterne Nummerierung an.

Nr.	Name	Sequenz 5' - 3'
361	Kan Start ver	attccaacatggatgctg
362	Kan stop ver	attcatatcaggattatc
363	KanMX forward primer	ggatgtatgggctaaatg
1553	MSH2ATPaseforward	taatgatgtcacattagagagtggaaggcgacttttaatactactggccccaatat
1604	MSH2ATPaserevneu	acaaagcgaacatccaatcttacttgcgatatgttcagctatagcccatgctaaccxaa
1649	T6821lfw	gtcgacaaattggggtgata
1650	T6821lrev	ctatcaccccaattgtcga
1651	L687Pfw	gtgatagtaccatggccca
1652	L687Pprev	tggccatgggtactatcac
1661	E749Kfw	atcatagataaattgggaag
1662	E749Krev	cttccaatttatctatgat
1756	veri_genomint_yhmsh2fw	atcatagatgaattgggaag
1783	hMSH2_ampli_fw	ttactggccccaatat
1784	hMSH2_ampli_rev	gcccatgctaaccxaa
1788	KanMXfw	tctagagatctgttagctg
1789	tetPfw	cattaggtcctttagcat
1791	KanMX_rev_genomInt_neu	atatgtactatttgtatctatatattatctatcgattctcaaaactatacaaatgacaagttc
1794	hMSH2666-766-seqfw	aggcatgctgtgtgaagt
1795	yhMSH2_fw_AS1-60-80-100	agtaagaattttgaaaattcaaggaatttcgagacaccatggcgggtgcagccgaagga
1796	yhMSH2_rev_AS1-100	tccaacccttatcgatatctcaactttatcccagatcaactctatactgacgaacc
1797	yhMSH2_rev_AS1-80	gagtggaagaactgttagcgaaacagtaacatatttagtaagcacaacactctgcaga
1798	yhMSH2_rev_AS1-60	ccgttacagggtccaattggcagttcttaaacagattgggtctgaacacctcccg
1800	Veri_yhMSH2_AS1-100rev	cgggcccggcagcagcgcgc
1801	pFH1-H_+38rechts_rev	tcatcgtcatgttttgttctttaaattttctcgatattgctgtgacatgtagattatt
1802	pFH1-H_+38links_fw	ctcctataccatacattagaccgaagttgcatcccatggatggacaaggaagaattatt
1803	Seq_yhMSH2628-766	atatgtgcaacaacatgcat
1804	hMSH2666-766-seqfw	aggcatgctgtgtgaagt
1805	gl_yhMSH2_rev_neu	tgacccggcgggacaaggcaagctaaacagatctctagattctcacttaagatgctgtgtaattataacaacaaggccttta
1814	SeqVeri_neu_yhMSH2_AS1-100	tgagcagttaagcgtattac
1839	Veri integration	cacaccctaactgacacac
1841	hMSH2_pAS2-1_rev1	taagcacaacactctgcaga
1842	hMSH2_pAS2-1_fw2	gaagtaatagcaaagaataat
1852	hMSH2_pAS2-1_veri_fw	Cacagatagattggctcag
1879-B	yhMSH-GFP_fw	ACGATAATTACCTGAAATATATAAAAGCCTTGTTGTTAACAAATACACACACTA AATTA
1908	hMSH2_seq_fw1	gaattctgatcacagaaaga
1909	hMSH2_seq_fw2	attacttctgtaacctgt
1910	hMSH2_seq_fw3	tctgtgatcaagtttggg

Nr.	Name	Sequenz 5' - 3'
1948	yhMSH-GFP_rev_(neu)	tgaccatgattacgccaagctctaatacagactcactatagttattgtacaattcatcat
1977	5' KanMX loxP rev	agtcttttcttacctatgg
1986	Veri 1-124 rev	accagaagaagatcttttac
2137	Veri_hMSH3_rev	cctcgcaggggctgagctg
2146	B-M	ggatgatgggctaaatg
2163	HAL9veri_rev	aacacttttagggattatgaat
2198	SeqVeri_fw	cacaaaatccatttggtagc
2217	DELpFH1_fw	aagtaagaatttttgaaaattcaaggaattcgagacacctgtctccactaggcca
2218	DELpFH1_rev	ttgggacaacaccagtgaaataattcttcaccttagacatggccttagtgaggacaa
2238	yMsh2 N-Vektor	tccgcaaccctgtatacttctt
2239	yMsh2 C-Vektor	acaagagctattgcgtgctata
2346	pSH62_TAFP_fw	tatgcgcatcagagcagattgtactgagagtgaccatataaggtctagagatctgttta
2347	pSH62_TAFP_rev	ccttacgcactgtgctggatttcacaccgcatagatccgattaagggttctcgagagct
2267	SPO21/KanMX Seq. + fw	aagaactgtgacgaagaaaatt
2268	SPO21/KanMX rev	cagaacaactctggcgcacg
2277	808-860_fw	ttgcacatatcgagaaaaatttaaagaacaaaaacatgacgaagagaccttaactatgct
2278	808-860_rev	cgaatattacctctgtaactctctgtaatgatagcttagctttttcaacgattctccaatatact
2279	808-860_veriSeq_fw	ttgtctgaaaaattgccccaa
2280	808-860_veri_rev	atatactgaaactcctcaag
2281	581-627_fw	aatcggctctggttagagaaattgtcaatattcttcagg
2282	581-627_rev	atgacgggagcttattaggtgagttcttcttccgaatcttctccaaaatggctggct
2283	Linker_581-627_fw	ggtcgtgatgaaattcatt
2284	Linker_581-627_rev	ttcttaaccagagccgatt
2285	581-627_veri_rev	caacagcatctagctgagct
2286	581-627_veriseq_fw	gaaatgggtgaaacaacggt
2309	yMSH2genseq_fw	gaggagggttacatgacct
2314	yMSH2_rev	ataagcatccaaatcaaccg
2315	yMSH2_fw	cgaagaaatggtgaaacaa
2368	628_gen_seqfw	cggctctggttagagaaattata
2377	yMsh2p_C_fw	gttgtcaattccagaaaa
2381	yMsh2fw	ttaacgaagtaatatctgt
2406	h329-363rev	cactaaatcaatctctct
2407	Linker_h329-363	ataagaacagaatagaggagagattgaatttagtgactatctaattgaccaaatt
2408	Veri329-363_rev	aattcaatctctctctatt
2437	Gnc_Msh2_fw	gaaaacgataattacctgaa
2438	Gnc_Msh2_rev	taatacagactcactatagggaaagctggtagcctgcattacattaaggggtgctgacctgcagcgtacgaagctcagctgtactattgtatctatatatta

Nr.	Name	Sequenz 5' - 3'
2439	Gnc_Msh2Veri_fw+seq	gaggagggtttacatgaccc
2440	Gnc_Msh2Veri_rev	taagggtgtcgcactgcag
2441	OL3msh2GNC	ttgtaaaaaataaaaattctttccaatgcatattatggtcatagggcactagtggtctg
2442	SPO21_fw	agttccgcactccatcaagt
2443	Linker_gnc_1-124_rev	ctctccaactgcagcgtctccttcggctgcaccgccatactttaatctgaggatttga
2444	SPO21_seq_fw	acaagtgtttattaattattaca
2445	1-124_rev	gaaaaggcgcactgtggtgt

2.10 Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden in dieser Arbeit konstruiert. Alle verwendeten Plasmide tragen das *bla*-Gen zur Selektion gegen Ampicillin in *E.coli*. Ist kein Hefe-Marker angegeben, handelt sich um keinen Hefe-Vektor. Die angegebene Nummer zeigt die laborinterne Nummerierung an.

Nr.	Name	Marker	Beschreibung, Konstruktion
1494	pFH1-HT682I	<i>URA3</i> , 2 μ	Mutation T682I kodiert in <i>yhMSH2_1</i> , PCR mit #1649 #1650 auf #1288, Fragment mit #1553 #1604 in #1285- <i>SpeI</i> integriert
1495	pFH1-HL687P	<i>URA3</i> , 2 μ	Mutation L687P kodiert in <i>yhMSH2_1</i> , PCR mit #1651 #1652 auf #1288, Fragment mit #1553 #1604 in #1285- <i>SpeI</i> integriert
1496	pFH1-E749K	<i>URA3</i> , 2 μ	Mutation E749K kodiert in <i>yhMSH2_1</i> , PCR mit #1661 #1662 auf #1288, Fragment mit #1553 #1604 in #1285- <i>SpeI</i> integriert
1633	pSBH9	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1799 #1798 auf #1288, Integration in #1285- <i>XagI</i> , um Hybrid 1-60 herzustellen (<i>yhMSH2_2</i>)
1634	pSBH10	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1799 #1797 auf #1288, Integration in #1285- <i>XagI</i> , um Hybrid 1-80 herzustellen (<i>yhMSH2_3</i>)
1635	pSBH11	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1799 #1796 auf #1288, Integration in #1285- <i>XagI</i> , um Hybrid 1-100 herzustellen (<i>yhMSH2_4</i>)
1636	pSBH12	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1799 #1796 auf #1288, Integration in #1286- <i>XagI</i> , um Hybrid 1-100 in #1286 zu integrieren (<i>yhMSH2_16</i>)
1637	pSBH13	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1802 #1604 auf #1288, Integration in #1285- <i>SpeI</i> , um Hybrid 628-766 zu integrieren (<i>yhMSH2_13</i>)
1638	pAC20.2-T682I	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1783 #1784 auf #1494, Integration in #1282- <i>Bsu36I</i> , um T682I in <i>hMSH2</i> zu integrieren
1639	pAC20.2-L687P	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1783 #1784 auf #1495, Integration in #1282- <i>Bsu36I</i> , um L687P in <i>hMSH2</i> zu integrieren
1640	pAC20.2-G692V	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1783 #1784 auf #1431, Integration in #1282- <i>Bsu36I</i> , um G692V in <i>hMSH2</i> zu integrieren
1641	pAC20.2-C697F	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1783 #1784 auf #1432, Integration in #1282- <i>Bsu36I</i> , um C697F in <i>hMSH2</i> zu integrieren
1642	pAC20.2-V702G	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1783 #1784 auf #1289, Integration in #1282- <i>Bsu36I</i> , um V702G in <i>hMSH2</i> zu integrieren
1643	pAC20.2-E749K	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1783 #1784 auf #1496, Integration in #1282- <i>Bsu36I</i> , um E749K in <i>hMSH2</i> zu integrieren
1684	pAC20.2-I708N	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1783 #1784 auf #1433, Integration in #1282- <i>Bsu36I</i> , um I708N in <i>hMSH2</i> zu integrieren
1770	pUG74		PCR mit #2168 #2169 auf #2051, Fragment mit <i>NcoI/SacI</i> verdaut und in pUG6 <i>NcoI/SacI</i> ligiert
1778	1285-GFP	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1879-B und #1948 auf pAH4, Integration in #1285- <i>PstI</i>
1779	1286-GFP	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1879-B und #1948 auf pAH4, Integration in #1286- <i>PstI</i>
1780	1432-GFP	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1879-B und #1948 auf pAH4, Integration in #1432- <i>PstI</i>
1781	1495-GFP	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1879-B und #1948 auf pAH4, Integration in #1495- <i>PstI</i>
1782	1431-GFP	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1879-B und #1948 auf pAH4, Integration in #1431- <i>PstI</i>
1783	1494-GFP	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1879-B und #1948 auf pAH4, Integration in #1494- <i>PstI</i>
1784	1289-GFP	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1879-B und #1948 auf pAH4, Integration in #1289- <i>PstI</i>

1849	pSBH16	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #2281 #2282 auf #1288, weitere PCR mit #2283 #2284 auf #1285, PCR-Fragmente vereint und finale PCR mit #2283 #2282, Integration in #1285- <i>Bgl</i> I um Hybrid 581-627 zu erhalten (<i>yhMSH2_12</i>)
1851	pSBH18	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #2194 #2195 auf #1288, PCR für Linker mit #2196 #2197 auf #1285, beide Fragmente in #1285- <i>Nhe</i> I integriert, um Hybrid 329-398 herzustellen (<i>yhMSH2_11</i>)
1853	pSBH20	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #1801 #1802 auf #1288, Integration in #1285- <i>Spe</i> I, um Hybrid 628-804 herzustellen (<i>yhMSH2_14</i>)
1854	pSBH21	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #2277 #2278 auf #1288, Integration in #1285- <i>Bpu</i> 1102I, um Hybrid 808-860 herzustellen (<i>yhMSH2_15</i>)
1855	pGAL1-GFP	<i>URA3</i> , 2 μ	<i>gfp</i> unter Kontrolle von <i>GAL</i> 1-Promotor, Oligodimer aus #2217 und #2218 in #1778- <i>Xag</i> I/ <i>Bpu</i> 1102I integriert
1984	pSH66	<i>natMX</i> 2 μ	<i>cre</i> -Plasmid, <i>TEF</i> - <i>P-natMX</i> - <i>TEF</i> - <i>T</i> Kasette mit #2346 #2347 von #1770 amplifiziert, Integration in pSH62- <i>Bgl</i> I
2184	pSBH24	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #2194 #2406 auf #1288, PCR für Linker mit #2407 #2197 auf #1285, beide Fragmente in #1285- <i>Nhe</i> I integriert, um Hybrid 329-363 herzustellen (<i>yhMSH2_10</i>)
2201	WT-gnc	<i>URA3</i> , 2 μ	Kolonie-PCR auf Stamm #1500 mit #2239 und #2163, um 60bp 3'-UTR von <i>yMSH2</i> zu erhalten. Fragment aus Gel eluiert, erneute PCR mit #2437 und #2438, Integration in #1285- <i>Acc</i> 65I
2202	14-103-gnc	<i>URA3</i> , 2 μ	Konstruktion wie #2201, nur Integration in #1830- <i>Acc</i> 65I
2210	628-804-gnc	<i>URA3</i> , 2 μ	Konstruktion wie #2201, nur Integration in #1853- <i>Acc</i> 65I
2212	pSBH26	<i>URA3</i> , 2 μ	PCR mit #2277 #2278 auf #1288, Integration in #1830- <i>Bpu</i> 1102I (<i>yhMSH2_18</i>)

Die folgenden Plasmide wurden in anderen Arbeiten hergestellt. Ist kein Marker angegeben, handelt sich um keinen Hefe-Vektor. Alle Plasmide, bis auf #1288 (*cat*-Gen, Resistenz gegenüber Chloramphenicol), tragen das *bla*-Gen für die Selektion in *E. coli* auf Ampicillin.

Nr.	Name	Marker	Beschreibung, Konstruktion
483	p425GAL1	<i>LEU2</i> , 2 μ	Klonierungsvektor (Martin Funk, laborintern)
457	pUG6		PCR-Vorlage Vektor zur Gendisruption, <i>kanMX</i> (Guldener, Heck et al. 1996)
892	pAH3		PCR-Vorlage Vektor, <i>kanMX</i> (Andrea Fischer-Heuschkel., laborintern)
911	pAH4	<i>URA3</i> , <i>CEN</i>	<i>yEGFP3</i> (Andrea Fischer-Heuschkel, laborintern)
952	pSH62	<i>HIS3</i> , <i>CEN</i>	<i>cre</i> -Rekombinase unter Kontrolle von <i>GAL</i> 1 (Guldener 2002)
1282	pAC20.2	<i>URA3</i> , 2 μ	<i>hMSH2</i> unter <i>GAL</i> 1-Promotor (Clark, 1999)
1284	pAC61.2	<i>LEU2</i> , 2 μ	<i>hMSH6</i> unter <i>GAL</i> 1-Promotor (Clark, 1999)
1285	pFH1	<i>URA3</i> , 2 μ	<i>yMSH2</i> unter <i>GAL</i> 1-Promotor (Clark, 1999)
1286	pFH1-H	<i>URA3</i> , 2 μ	Hybrid 666-766 (<i>yhMSH2_1</i>) in #1285 (Herbst 2006)
1287	pFH3	<i>URA3</i> , 2 μ	Kontrollvektor (Herbst 2006)
1288	pOTB7		<i>hMSH2</i> , RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
1289	pFH1-HV702G	<i>URA3</i> , 2 μ	Mutation V702G kodiert in <i>yhMSH2_1</i> (Herbst 2006)
1431	pFH1-HG692V	<i>URA3</i> , 2 μ	Mutation G692V kodiert in <i>yhMSH2_1</i> (Heick 2008)
1432	pFH1-HC697F	<i>URA3</i> , 2 μ	Mutation C697F kodiert in <i>yhMSH2_1</i> (Heick 2008)
1433	pFH1-HI708N	<i>URA3</i> , 2 μ	Mutation I708N kodiert in <i>yhMSH2</i> (Heick 2008)
1827	pBF1	<i>URA3</i> , 2 μ	Hybrid 1-124 (<i>yhMSH2_6</i>) (Funk 2010)
1828	pBF2	<i>URA3</i> , 2 μ	Hybrid 125-297 (<i>yhMSH2_7</i>) in #1285 (Funk 2010)
1829	pBF3	<i>URA3</i> , 2 μ	Hybrid 1-297 (<i>yhMSH2_9</i>) in #1285 (Funk 2010)
1830	pBF4	<i>URA3</i> , 2 μ	Hybrid 14-103 (<i>yhMSH2_5</i>) in #1285 (Funk 2010)
1831	pBF6	<i>URA3</i> , 2 μ	Hybrid 14-291 (<i>yhMSH2_8</i>) in #1285 (Funk 2010)

1836	pBF1 (A2T)	<i>URA3</i> , <i>2μ</i>	Mutation A2T kodiert in #1827 (Funk 2010)
1837	pBF1 (T33P)	<i>URA3</i> , <i>2μ</i>	Mutation T33P kodiert in #1827 (Funk 2010)
1838	pBF1 (L92V)	<i>URA3</i> , <i>2μ</i>	Mutation L92V kodiert in #1827 (Funk 2010)
1846	pAC20.2 (A2T)	<i>URA3</i> , <i>2μ</i>	Mutation A2T kodiert in #1282 (Funk 2010)
1847	pAC20.2 (T33P)	<i>URA3</i> , <i>2μ</i>	Mutation T33P kodiert in #1282 (Funk 2010)
1848	pAC20.2 (L92V)	<i>URA3</i> , <i>2μ</i>	Mutation L92V kodiert in #1282 (Funk 2010)
2051	pAG25		PCR-Vorlage Vektor, <i>nat1</i> (Goldstein 1999)
2213	pBF5	<i>URA3</i> , <i>2μ</i>	Hybrid 1-124/628-804 (<i>yhMSH2_17</i>) kodiert in #1285 (Funk 2010)

2.11 Zellen

2.11.1 *Escherichia coli*

Name	Genotyp	Referenz
XL ₁ -blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac-[F' proAB lac^P ZΔM15 Tn10(Tet^r)]</i>	Stratagene

2.11.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Nr.	Name	Genotyp
473	CENPK2-1C	<i>MAT_a leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i> (Entian, Schuster et al. 1999)
1499	Dag60	<i>MAT_α ade5-1 his7-2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 lys2::InsE-A₁₄ msh2::kanMX</i> (Clark, Cook et al. 1999)
1500	E134	<i>MAT_α ade5-1 his7-2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 lys2::InsE-A₁₄</i> (Clark, Cook et al. 1999)
1630	yB3	isogen zu #1500, eine <i>loxP</i> -Region 60bp 3' liegend nach STOP-Kodon von <i>yMSH2</i>
1634	yB7	isogen zu #1500, integrierte <i>kanMX</i> -Kassette von pAH3 ohne <i>loxP</i> , 30bp 3' liegend nach STOP-Kodon von <i>yMSH2</i>
1635	yB8	isogen zu #1634, Hybrid <i>yhMSH2_1</i> (humane AS 666-766) von #1286 integriert
1636	yB9	isogen zu #1634, Hybrid <i>yhMSH2_1</i> (humane AS 666-766) mit Mutation T682I von #1494 integriert
1637	yB10	isogen zu #1634, Hybrid <i>yhMSH2_1</i> (humane AS 666-766) mit Mutation L687P von #1495 integriert
1638	yB11	isogen zu #1634, Hybrid <i>yhMSH2_1</i> (humane AS 666-766) mit Mutation G692V von #1431 integriert
1639	yB12	isogen zu #1634, Hybrid <i>yhMSH2_1</i> (humane AS 666-766) mit Mutation C697F von #1432 integriert
1640	yB13	isogen zu #1634, Hybrid <i>yhMSH2_1</i> (humane AS 666-766) mit Mutation V702G von #1289 integriert
1641	yB14	isogen zu #1634, Hybrid <i>yhMSH2_1</i> (humane AS 666-766) mit Mutation I708N von #1637 integriert
1642	yB15	isogen zu #1634, Hybrid <i>yhMSH2_1</i> (humane AS 666-766) mit Mutation E749K von #1496 integriert
1644	yB17	isogen zu #1630, Hybrid <i>yhMSH2_8</i> (humane AS 14-103) von #2202 integriert
1645	yB18	isogen zu #1630, Hybrid <i>yhMSH2_14</i> (humane AS 628-804) von #2210 integriert

2.12 Medien

2.12.1 Medien für *E. coli*

Typ	Chemikalie	Menge in g	Anmerkung
LB	Bacto Trypton	10	in einem Liter deionisiertem Wasser lösen
	Hefeextrakt	5	
	NaCl	5	
	Agar*	13,5	

*nur bei Festmedien

Nach dem Autoklavieren ist die Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 50 mg/l) oder Chloramphenicol (Endkonzentration 20 µg/ml) möglich.

2.12.2 Medien für *S. cerevisiae*

Typ	Chemikalie (Konzentration)	Menge	Anmerkung
YPD	Glukose	20 g	in einem Liter deionisiertem Wasser lösen
	Hefeextrakt	10 g	
	Trypton Pepton	20 g	
	Agar*	13,5 g	
	Adenin-Stock (2 mg/ml)	2 ml	
	Tryptophan-Stock (5 mg/ml)	4 ml	
YPG	Galaktose sonst wie YPD	20 g	
SD+24	Glukose	20 g	in einem Liter deionisiertem Wasser lösen, bei Medium mit Agar vor dem Autoklavieren den pH mit 1M NaOH auf 6 einstellen
	Hefe Stickstoffquelle (YNB)	1.7 g	
	Ammoniumsulfat	5 g	
	Aminosäure-Mix	2 g	
	Agar*	20 g	
SG	Galaktose sonst wie SD+24	20 g	
SC-His-Arg +Canavanin	Agar	18 g	Agar autoklavieren und kühlen, anschließend restliche Lösungen in den Agar steril filtrieren
	GAB-Lösung	100 ml	
	Adenin (0.93 mg/ml)	20 ml	
	Uracil (1.85 mg/ml)	10 ml	
	Leucin (7.4 mg/ml)	5 ml	
	Lysin (7.4 mg/ml)	5 ml	
	Methionin (7.4 mg/ml)	5 ml	
	Tryptophan (7.4 mg/ml)	5 ml	
	Canavanin (10 mg / ml)	6 ml	

*nur bei Festmedien

Nach dem Autoklavieren von YPD ist die Zugabe von G418 (Endkonzentration 200 mg/l) oder clonNAT (Endkonzentration 100 µg/ml) möglich.

Aging Medium

Für chronologische Alterungsanalysen wurde das Aging-Medium wie folgt angesetzt (Angaben von Stefanie Kobus, laborintern, und (Murakami, Burtner et al. 2008)). SD+24-Medium wurde ohne Aminosäuren und ohne Glukose 10fach angesetzt und autoklaviert. Glukose wurde separat 20fach angesetzt und steril filtriert. Das autoklavierte 10fach SD-

Medium wurde anschließend einfach angesetzt und mit insgesamt 2% Glukose versetzt. Die folgenden Aminosäuren und Basen wurden in einem Aging-Aminosäuremix angesetzt und mussten in der angegebenen Endkonzentration im Medium vorliegen. Aminosäuren, für die der verwendete Stamm (hier E134, #1500) auxotroph ist, müssen in der 5fachen Menge vorliegen als die anderen Aminosäuren (in folgender Tabelle schon berücksichtigt).

Chemikalie	Endkonzentration g/l	Chemikalie	Endkonzentration g/l
Adenin	0,2	Phenylalanin	0,05
Arginin	0,02	Serin	0,375
Asparaginsäure	0,1	Threonin	0,2
Glutaminsäure	0,1	Tryptophan	0,04
Histidin	0,5	Tyrosin	0,03
Leucin	1,5	Valin	0,15
Lysin	0,15	Uracil	0,5
Methionin	0,02		

2.12.2.1 Aminosäure-Mix

Durch die Kombination aus den folgenden Aminosäuren, Basen und Chemikalien unter Weglassen des entsprechenden Stoffes für die Selektion erhält man den Aminosäure-Mix. Dieser wurde für mindestens 15 Minuten mit sterilen Mahlkugeln gemischt.

Stoff	Menge in g	Stoff	Menge in g
Adenin	0.5	Leucin	10
Alanin	2	Lysin	2
Arginin	2	Methionin	2
Asparagin	2	para-Aminobenzoesäure	2
Asparaginsäure	2	Phenylalanin	2
Cystein	2	Prolin	2
Glutamin	2	Serin	2
Glutaminsäure	2	Threonin	2
Glycin	2	Tryptophan	2
Histidin	2	Tyrosin	2
Inositol	2	Uracil	2
Isoleucin	2	Valin	2

3 Methoden

3.1 Methoden für *E. coli*

3.1.1 Anzucht

Zur Anzucht wurden *E. coli* - Zellen in aeroben Schüttelkulturen mit LB-Medium bei 37°C inkubiert. Um auf Plasmid-Transformanten zu selektionieren, wurde dem Medium, entsprechend dem selektionstragendem Plasmid, Ampicillin oder Chloramphenicol zugesetzt.

3.1.2 Transformation

3.1.2.1 Ein-Minuten-Transformation

Die verwendeten Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Hegemann gestellt. Entsprechend der Transformationseffizienz der Zellen wurden 10-20 µl DMSO-komponente – Zellen mit 1µl DNA (1 – 100ng) auf Eis gemischt.

- 1 min bei 42°C inkubieren.
- Zugabe von 100 µl LB – Medium.
- Ausplattieren des gesamten Ansatzes auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion und bei 37°C inkubieren.

3.1.2.2 Elektroporation

Für eine Transformation wurden jeweils 40 µl elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut. Elektroporationsküvetten wurden auf Eis vorgekühlt.

- kalte DNA (0,01 ng – 10 ng) aus Hefe-DNA-Präparation mit kalten Zellen mischen.
- Zellen zusammen mit der DNA in die eiskalten Küvetten pipettieren.
- Geräteparameter für die Elektroporation: Spannung: 2,1 kV, 200 Ohm, 25 µF.
- Küvette von außen gut trocknen und der Hochspannung aussetzen.
- Zugabe von 1 ml LB –Medium und den gesamten Ansatz in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführen und für 1 Stunde bei 37°C im Schüttler inkubieren.
- Suspension für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren.
Überstand abnehmen und Pellet in 100 µl LB resuspendieren, ausplattieren auf LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion. Inkubation über Nacht bei 37°C.

3.1.3 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*

Die Präparation beruht auf der alkalischen Lyse nach Maniatis (Sambrook 1989)

3.1.3.1 Mini-Präparation

Für die Präparation werden folgende Puffer verwendet.

Puffer	Chemikalie	Anmerkung
Puffer 1	Tris/HCl pH 8.0(50 mM) EDTA (10 mM) RNase A (100 µg/ml)	bei 4°C lagern
Puffer 2	NaOH (200 mM) SDS (1%)	
Puffer 3	Kaliumacetat pH 4.8 (2.55 M)	

- Anzucht von 2 ml LB Übernachtskulturen bei 37°C mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion.
- Kulturen in 1.5 ml Eppendorfgefäß überführen und 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- 300 µl Puffer 1 zugegeben, vortexen.
- Zugabe von 300 µl Puffer 2 invertieren, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zugabe von 300 µl Puffer 3, gut mischen.
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren.
- Überstand ohne feste Bestandteile in ein neues Reaktionsgefäß überführen (Plasmid-DNA befindet sich in Lösung).
- Zugabe von 0,5 fachem Volumen Isopropanol.
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- Pellet mit 500 µl 70%igem EtOH waschen, anschließend Überstand verwerfen.
- Pellet im Vakuum-Konzentrator trocknen.
- Aufnahme des Pellets in 100 µl ddH₂O.

3.1.3.2 Midi-Präparation

Zur Gewinnung größerer DNA – Mengen wurde das Plasmid Midi-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

3.2 Methoden für *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1 Anzucht

Die Anzucht aller verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 30°C in Voll- oder Minimalmedium.

3.2.2 Transformation

Es wurde ein abgewandeltes Protokoll verwendet, um Plasmide und Integrationskassetten in Hefe hocheffizient zu transformieren (Gietz, Schiestl et al. 1995). Folgende Lösungen wurden für die Transformation benötigt.

Lösung	Anmerkung
Carrier DNA (2mg/ml)	für 10min bei 100 °C denaturieren, anschließend auf Eis
Lithiumacetat (1M, 100mM)	pH 8.4 bis 8.9
PEG 3350 (50% w/v)	

- 5 ml Übernachtkultur des zu transformierenden Stamms in YPD oder YPG ansetzen.
- bestimmen der optischen Dichte, eine 50 ml Kultur mit einer OD von 0.1/ml ansetzen.
- Kultur bei einer OD von 1 für 5 min bei 3500 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, Zellen in 25 ml ddH₂O resuspendieren, erneut 5 min bei 3500 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, Pellet in 1 ml 100 mM Lithiumacetat (LiAc) resuspendieren und in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen.
- Zellen für 5 min bei 3500 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen und Zellpellet in 600 µl 100 mM LiAc resuspendieren.
- 50 µl Aliquots Zellen wurden für die Transformationen in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt.
- die Zellen wurden kurz sedimentiert, der Überstand verworfen.
- zu den kompetenten Zellen wurden folgende Chemikalien zur Transformation in genannter Reihenfolge gegeben: 240 µl PEG, 36 µl 1M LiAc, 50 µl Carrier DNA, 0.1 bis 1 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 34 µl ddH₂O.
- vortexen, Inkubation für 30 min bei 30 °C.
- Hitzeschock für 30 min bei 42 °C im Thermoblock.
- Transformationsansätze wurden bei 13000 rpm für 5 sek zentrifugiert und in 200 µl ddH₂O resuspendiert.

Die Ansätze wurden zu je 90% und 10% auf zwei selektive Platten ausgestrichen und bei 30 °C für 2 Tage (auf Selektivmedium mit Glukose: SD) bzw. 3 Tage (Selektivmedium mit Galaktose: SG, siehe 2.12.2) inkubiert.

Für Transformationen mit Plasmiden oder Kassetten, die dominante Marker wie *kanMX* oder *natMX* enthalten, wurde die Zellsuspension nach dem Hitzeschock zentrifugiert, das Pellet in 1 ml YPD resuspendiert und in ein 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden nochmals für eine Stunde bei 30° auf dem Rad inkubiert, damit diese die Resistenz gegenüber den Wirkstoffen G418 oder clonNAT aufbauen können. Die Zellsuspension wurde

anschließend kurz zentrifugiert und in 200 µl ddH₂O resuspendiert. Jeweils 100 µl wurden auf eine YPD-Platte mit entsprechendem Wirkstoff plattiert.

Zellen, die mit *kanMX*-Plasmiden oder -Kassetten transformiert wurden, wurden nach 24 Stunden replikaplattiert und nochmals für 2 bis 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

3.2.3 Gesamt-DNA-Isolation aus *S. cerevisiae*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurde eine Gesamt-DNA-Isolation durchgeführt. Die benötigten Puffer entsprechen den wie unter 3.1.3.1 beschriebenen.

- Ansetzen einer 5 ml Übernachtkultur in entsprechendem SD-Selektivmedium.
- 2 ml der Kultur wurden morgens in ein 2 ml Mikro-Schraubröhrchen überführt, kurz zentrifugiert und das Pellet in 1 ml ddH₂O gewaschen.
- Das Pellet wurde mit 750 µl Puffer P1 resuspendiert.
- Zugabe von 750 µl Puffer P2 und vorsichtig Mischen.
- Zugabe von einem halbem PCR-Reaktionsgefäß Glasperlen, Mikro-Schraubröhre fest verschließen.
- der Zellaufschluss erfolgte im preCellys24 bei 5000 Impulsen für 2x20 sek.
- die Suspension wurde für 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert.
- 1 ml Überstand wurde in ein neues 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.
- Zugabe von 500 µl Puffer P3, mischen.
- Inkubation auf Eis für 10 min.
- anschließend wurde die Suspension für 15 min. bei 13000 rpm abzentrifugiert.
- 600 µl Überstand wurde in ein neues 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol aufgefüllt. Durch Zentrifugation (30 min, 13000 rpm) wurde die DNA präzipitiert.
- Überstand verwerfen und das erhaltene DNA-Präzipitat mit 500 µl 70% Ethanol waschen, im Vakuum-Konzentrator trocknen und anschließend in 20 µl ddH₂O aufnehmen

3.2.4 Klonieren mit *S. cerevisiae*

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden diese per PCR hergestellt. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die 3' 20 Nukleotide Homologie zum zu amplifizierenden Gen tragen und 5' 40 Nukleotide Homologie zum Integrieren auf dem Zielplasmid (siehe Oligonukleotidtablelle unter 2.9, S. 42). Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem linearisierten Zielvektor in Hefe transformiert. Aufgrund der vorhandenen Homologie vom PCR-Produkt am 5'- und am 3'-Ende zu den Vektorenden erfolgt homologe Rekombination, die das Integrieren des PCR-Produkts in den Vektor ermöglichen.

3.2.4.1 Klonieren von Hefe-Mensch-*MSH2* Hybriden

Alle *yhMSH2* Hybride wurden in den Hochkopienvektor (2μ) pFH1 unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors kloniert. Am Beispiel des Hybrids *yhMSH2_14* wird eine Klonierung veranschaulicht. Der kodierende Abschnitt der hMSH2-Aminosäuren 628-804 wurde mit den Oligonukleotiden #1801 und #1802 vom hMSH2-Vektor pOTB7 amplifiziert (Abb. 15). Das erhaltene Fragment besitzt 5' und 3' Homologie zum 5' und 3' Bereich vom *yMSH2*-kodierenden Bereich AS 647-823. Das mit *SpeI*-linearisierte Plasmid pFH1 wurde mit dem humanen Fragment in Hefe transformiert. Aufgrund der zuvor beschriebenen Homologien wurde der kodierende Hefe-Abschnitt für AS 647-823 gegen den entsprechenden humanen Abschnitt durch homologe Rekombination eingebaut. Mittels Kolonie-PCR und den Oligonukleotiden #1607 und #1608 wurde die Integration des *hMSH2*-Fragments verifiziert. Aus positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und das humane Fragment sowie die Übergänge zum Hefegen sequenziert.

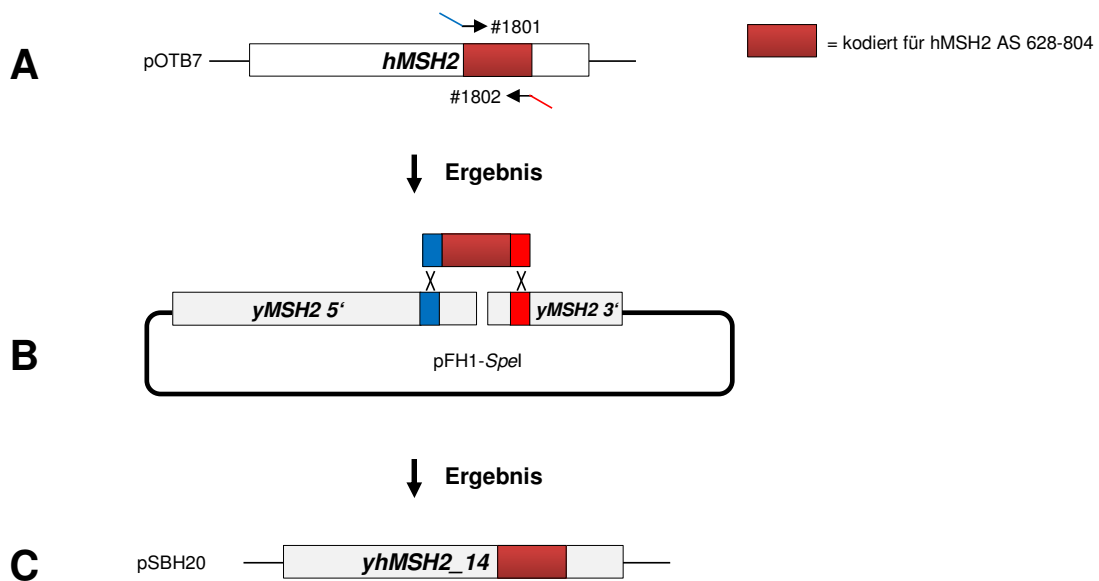


Abb. 15: Prinzip der Klonierung von *yhMSH2*-Hybriden. Beispielhaft ist die Konstruktion von *yhMSH2_14* dargestellt.

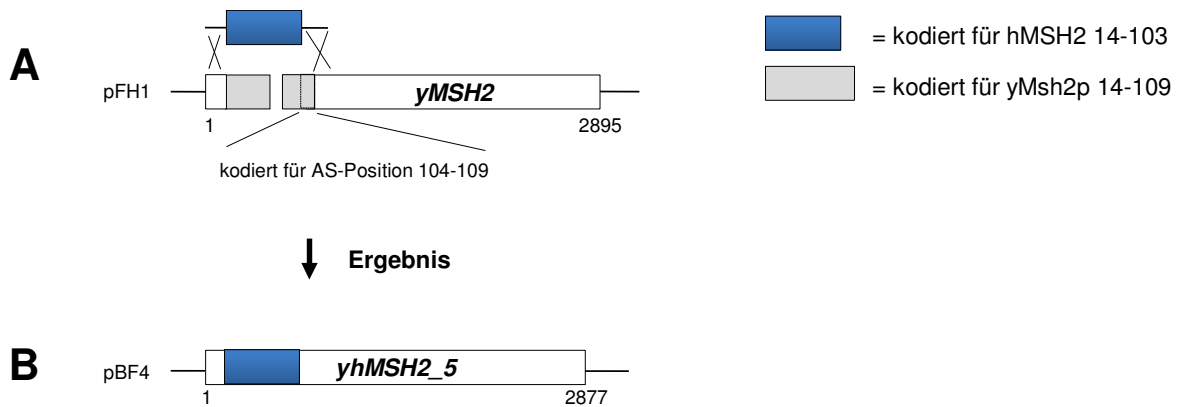


Abb. 16: Prinzip der Klonierung von *yhMSH2_5*. Der mit *XagI*-linearisierte Vektor pFH1 wurde mit dem hMSH2 Fragment (kodiert für AS 14-103) in Hefe transformiert, um das Plasmid pBF4 zu erhalten (Funk 2010).

Bei der Konstruktion von *yhMSH2_5* war das integrierte humane Fragment kleiner. Dies führte, aufgrund der gewählten Homologie, 5' liegend vom humanen Fragment, zu einem Verlust von 18 bp *yMSH2*. Dieses Hybrid ist somit um 6 Aminosäuren (Position 104-109) verkürzt (Abb. 16, Funk 2010).

3.2.5 Mutationsratenbestimmung mit dem *lys2_{A14}*-Reportersystem

Das Prinzip des *lys2_{A14}*-Reportersystems ist in Abb. 11 (S.32) dargestellt. Zur Mutationsratenbestimmung wurden die Stämme möglichst frisch aus dem -80°C Glycerin-Stock entnommen und auf YPD-Platten ausgestrichen.

3.2.5.1 Durchführung der Mutationsratenbestimmung von *yhMsh2*-Hybriden (bzw. Allelen)

Für die Mutationsratenbestimmung von Hefe-Mensch-*MSH2*-Hybrid-Genen und deren Allele wurden die Stämme Dag60 und E134 nach dem Auftauen aus dem -80°C Stock von YPD auf YPG-Platten umgesetzt, um den Stoffwechsel der Zellen auf Galaktose umzustellen (Herbst 2006), da alle Konstrukte unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors liegen. Beide Stämme wurden mit den zu testenden Hybriden oder Hybridallelen transformiert, um eine Komplementation der Hefe-*msh2*-Defizienz von Dag60 zu testen. Eine Kontrolle der Mutationsrate bei Expression von Allelen im Wildtypstamm ist notwendig, da gezeigt werden konnte, dass Allele von Hefe-*MSH2* einen dominant-negativen Mutatorphänotyp in einem Wildtypstamm auslösen können (Drotschmann, Clark et al. 1999). Dies lässt weitere Rückschlüsse auf die Funktionalität von Allelen zu.

Das Durchführungsschema wurde der Diplomarbeit von Frau Frauke Herbst entnommen und modifiziert (Herbst 2006). Von jedem transformierten Konstrukt wurden 16 Klone vereinzelt und für 2 Tage auf SG-Uracil-Platten (Minimalmedium mit Galaktose ohne Uracil) inkubiert.

Mit einer Pipettenspitze wurden die vereinzelt Klone in je 1 ml sterilen H₂O resuspendiert und die Zellzahl per Zählkammer bestimmt. 5 ml SG-Uracil Medium wurden mit 10³ Zellen/ml angeimpft und 3 Tage bei 30°C im Rad inkubiert. Von jedem angeimpften Klon wurden parallel 5 µl auf eine SG-Uracil-Lysin Platte gegeben, um Klone zu identifizieren, die schon vor oder während der Transformation mutiert sind. Dieser Schritt ist notwendig, da diese Klone, je nach Höhe der Mutationsrate, nicht mehr ausgewertet werden können. Klone, die nach 2 Tagen Wachstum auf SG-Uracil-Lysin Platten zeigten, wurden von der Mutationsratenbestimmung ausgeschlossen.

Nach 3 Tagen Wachstum im Flüssigmedium wurde jeder Klon auf Selektivmedium ausplattiert. Zur Bestimmung der Zellzahl/ml der 5 ml Flüssigkultur wurde eine 1:100.000-Verdünnung in 5 Verdünnungsschritten hergestellt. Hiervon wurden je 100 µl auf 5 SG-Uracil-Platten gegeben und ausplattiert. Zur Bestimmung der Revertanzahl wurden aus der gleichen 5 ml-Kultur je 100 µl auf 5 SG-Uracil-Lysin-Platten ausplattiert. Bei zu erwartenden niedrigen wildtypischen Mutationsraten wurde die unverdünnte Zellsuspension auf SG-Uracil-Lysin-Platten ausplattiert. Bei Hybriden oder Allelen, die nicht funktionell sind, wurde eine entsprechende Verdünnung gewählt, die zuvor in Voruntersuchungen mit nur 3 Klonen bestimmt wurde, um eine zählbare Anzahl Kolonien pro Platte zu bestimmen. Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.5.1.1 Statistische Analyse der Mutationsratenbestimmung nach Lea und Coulson mittels FALCOR

Zur Verdeutlichung der Auswertung wird anhand eines fiktiven Beispiels von 4 untersuchten Klonen eines Hybridkonstrukts die Mutationsratenbestimmung nach Lea und Coulson beispielhaft gezeigt (Lea und Coulson, 1948). Die Datenauswertung erfolgte mit Excel und dem internetbasierten Programm FALCOR (Fluctuation AnaLysis CalculatOR; <http://www.keshavsingh.org/protocols/FALCOR.html>; Hall, Ma et al. 2009).

Die Kolonien auf den Selektivplatten wurden nach 3 Tagen Inkubation gezählt. Kolonien, die auf SG-Uracil-Platten (Minimalmedium mit Galaktose ohne Uracil) gezählt wurden, gaben Aufschluss über die Anzahl der lebenden Zellen. Kolonien, die auf SG-Uracil-Lysin-Platten gewachsen sind, gaben Aufschluss über die Anzahl der Revertanten.

Klon	Platten									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	47	34	48	43	41	2	0	3	2	4
2	35	38	41	43	33	4	3	6	1	2
3	33	39	38	36	42	9	13	7	6	9
4	33	39	45	37	38	1	0	2	2	2
	Zellzahl 1:100.000					Revertanten, unverdünnt				

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Summe der gezählten Kolonien eines Klon durch 5 dividiert (Mittelwert) und mit 10^6 multipliziert, um die Zellzahl/ml zu erhalten.

$$\left(\frac{47 + 34 + 48 + 43 + 41}{5} \right) \cdot 10^6 = 4,3 \cdot 10^7$$

Es ergaben sich somit für die 4 verwendeten Klone folgende Zellzahlen.

Klon	Platten					Zellen/ml $\times 10^7$
	1	2	3	4	5	
1	47	34	48	43	41	4,3
2	35	38	41	43	33	3,8
3	33	39	38	36	42	3,8
4	33	39	45	37	38	3,8

Von der Kolonienzahl der SG-Uracil-Lysin Platten wurde der Mittelwert gebildet und mit 10 multipliziert, um die Anzahl der Revertanten/ml zu bestimmen.

$$\left(\frac{2 + 0 + 3 + 2 + 4}{5} \right) \cdot 10 = 22$$

Somit ergaben sich für die fiktiven 4 Klone folgende Anzahlen an Revertanten.

Klon	Platten					Revertanten/ml
	1	2	3	4	5	
1	2	0	3	2	4	22
2	4	3	6	1	2	32
3	9	13	7	6	9	88
4	1	0	2	2	2	14

Mittels des Programm FALCOR lässt sich nun die Mutationsrate bestimmen. Die Oberfläche bietet folgende relevanten Eingabefelder an (Abb. 17). Um die Mutationsratenanalyse nach Lea und Coulson durchzuführen, wurde diese entsprechend im Feld „Calculate Mutation Rate:“ ausgewählt. Anschließend wurden unter „values of ,r“ die Revertanten jedes einzelnen Klon untereinander eingeben. Unter „values of ,N“ wurde die Lebendzellzahl jedes einzelnen

Calculate Mutation Rate: **Lea-Coulson Method of the Median**

2 Column Entry: r | N

Values of 'r'	Values of 'N'
22	43000000
32	38000000
88	38000000
14	38000000

Group data by: 10 20 30 Group all data

Calculate 95% Confidence Interval
 Combine Rate Output

Rate: per 10⁷ mutations / generation

RUN
CLEAR

Mutations (m)	Mutation Rate (M)	Sorted Mutation Rates	Medians Only	95% CI Range	95% CI Difference
6.9279 9.2393 20.6256 4.9357	Mutation Rate (per 10 ⁷) 1.6111 2.4314 5.4278 1.2989	Sorted Rates 1.2989 1.6111 2.4314 5.4278	Medians (m) Mutation F 2.0213	Upper Bound Lower Bound 5.4278 1.2989	Upper Difference Lower Difference 3.4065 0.7224

Abb. 17: Benutzeroberfläche von FALCOR. Die für die Eingabe der Rohdaten und Auswertung-relevanten Felder sind rot markiert. Die Auswertung erfolgt durch Bestätigen von „RUN“. Eingabe Revertanten: values of ‚r‘; Eingabe Lebzellzahl: values of ‚N‘; Ausgabe der Mutationsrate: „Medians only“ (zweite Zahl); Ausgabe der unteren und oberen Grenze des Konfidenzintervalls: „95% CI Range“. Details siehe Text.

Klons ebenfalls untereinander eingegeben. Zusätzlich zur Mutationsrate lässt sich das Konfidenzintervall von 95% bestimmen („Calculate 95% Confidence Interval“). Das Konfidenzintervall schließt einen Bereich um den Wert der Mutationsrate ein, welche mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% in diesem Bereich liegt. Überschneiden sich Konfidenzintervalle verschiedener Konstrukte nicht, ist der Unterschied zwischen diesen Konstrukten signifikant. Damit das Programm alle eingegebenen Werte berücksichtigt, muss das Feld „Group all data“ ausgewählt sein. Die Mutationsrate kann in verschiedenen 10er Potenzen ausgegeben werden. Diese kann vom Benutzer manuell eingestellt werden („Rate: per 10^x mutations/generation“; „x“ = Höhe der 10er Potenz). Durch Bestätigen des Felds „RUN“ wird die Mutationsrate berechnet. Diese wird im Feld „Medians Only“ ausgegeben. Die zweite Zahl in diesem Feld, in Kombination mit der Größe der ausgewählten 10er Potenz, gibt dabei die Mutationsrate an. In diesem Beispiel entsprach diese 2.0213×10^{-7} . Im Feld „95% CI Range“ lässt sich die obere und untere Grenze des Konfidenzintervalls ablesen. Die obere Grenze lag bei 5.4278×10^{-7} , die untere Grenze bei 1.2989×10^{-7} . Bei zu erwartenden hohen Revertanten-Zahlen wird nicht die Zell- und Revertanten-Anzahl der Ausgangslösung bestimmt, sondern die der verwendeten Verdünnung, das heißt, es wird

die Zellzahl der Revertanten mit einer zuvor bestimmten Verdünnung bestimmt. Werden z.B. Revertanten bei einer 1:10.000 Verdünnung gezählt, wird die Zellzahl dementsprechend auch auf 1:10.000 angepasst. Die weitere Berechnung gleicht der Berechnung der hier gezeigten Daten.

3.2.5.2 Auslösung eines dominant-negativen Mutatorphänotyps durch Koexpression von hMSH2 und hMSH6

Das Prinzip des dominant-negativen Mutatorphänotyps ist in der Einleitung (siehe S. 33, Abb. 12) dargestellt.

Die Expression der Proteine erfolgte in dem wildtypischen Stamm E134, der das *lys2_{A14}*-Testsystem besitzt (wie in Abb. 11, S. 32 beschrieben), um so die Funktionalität von humanen *MSH2*-Allelen zu bestimmen. Der Stamm wurde mit dem *hMSH2*-Wildtyp (Plasmid #1282) und jeweils dessen Allelen (Plasmide #1638-#1643, #1684, #1846-#1848) mit dem Interaktionspartner *hMSH6* (Plasmid #1284) kotransformiert und auf SG-Uracil-Leucin (Minimalmedium mit Galaktose ohne Uracil und Leucin) Platten plattiert. Die Mutationsratenbestimmung erfolgte wie unter 3.2.5.1 beschrieben. Bei zu erwartender Funktionalität der *hMSH2*-Allele (Bestimmung durch Vortests) wurden von einer 1:1000 Verdünnung der inkubierten 5 ml Kultur 100 µl auf je 5x SG-Uracil-Leucin-Lysin zur Revertantenbestimmung ausplattiert. Bei zu erwartender Nicht-Funktionalität wurden 100 µl aus der Flüssigkultur unverdünnt auf SG-Uracil-Leucin-Lysin ausplattiert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine 1:100.000 Verdünnung hergestellt. Hieraus wurden je 100 µl auf 5 SG-Uracil-Leucin plattiert.

3.2.6 Alterungsexperimente

3.2.6.1 Isolierung von replikativ gealterten Hefezellen mittels

Biotinylierung und paramagnetischer Sortierung

Die hier verwendete Methode zur Biotinylierung, Kultivierung und Isolation alter Hefezellen wurde in modifizierter Form der Dissertation von Dr. Markus Langen entnommen und den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen angepasst (Langen 2011).

Zur Biotinylierung werden primäre Amine von Zelloberflächenproteinen mit membranimpermeablem Sulfo-NHS-LC-Biotin (die Sulfonatgruppe dient der Wasserlöslichkeit) über eine stabile Amidbrücke gekoppelt. Bei der anschließenden Kultivierung von biotinylierten Mutter-Zellen teilen sich diese und bringen Töchter hervor, dessen Zelloberfläche nicht biotinyliert ist, da sie ausschließlich aus neu synthetisierten Oberflächenproteinen besteht. Die gesamte Zellsuspension wird mit paramagnetischen Anti-Biotin Microbeads versetzt, welche nur an die biotinylierten Mutterzellen binden. Die

Zellsuspension wird auf eine LS-Säule gegeben, welche von einem starken magnetischen Feld umgeben ist (quadroMACS). Die paramagnetisch markierten Zellen werden an der Säule zurückgehalten, während deren Töchter hindurchfließen (Abb. 18). Die biotinylierten Zellen können im Anschluss von der Säule eluiert, plattiert und erneut inkubiert werden, so dass diese immer weiter altern. Für die Durchführung werden folgende Puffer werden benötigt.

Puffer	Zusammensetzung	Anmerkung
PBS	1xPBS pH 8,	nach Autoklavieren auf 4 °C kühlen
PBS-Glycin	1xPBS pH8 mit 100mM Glycin	
PBS-BSA	1xPBS pH 7.2 mit 2mM EDTA, 0.5% BSA w/v	steril filtrieren mit Vakuumpumpe, auf 4 °C kühlen

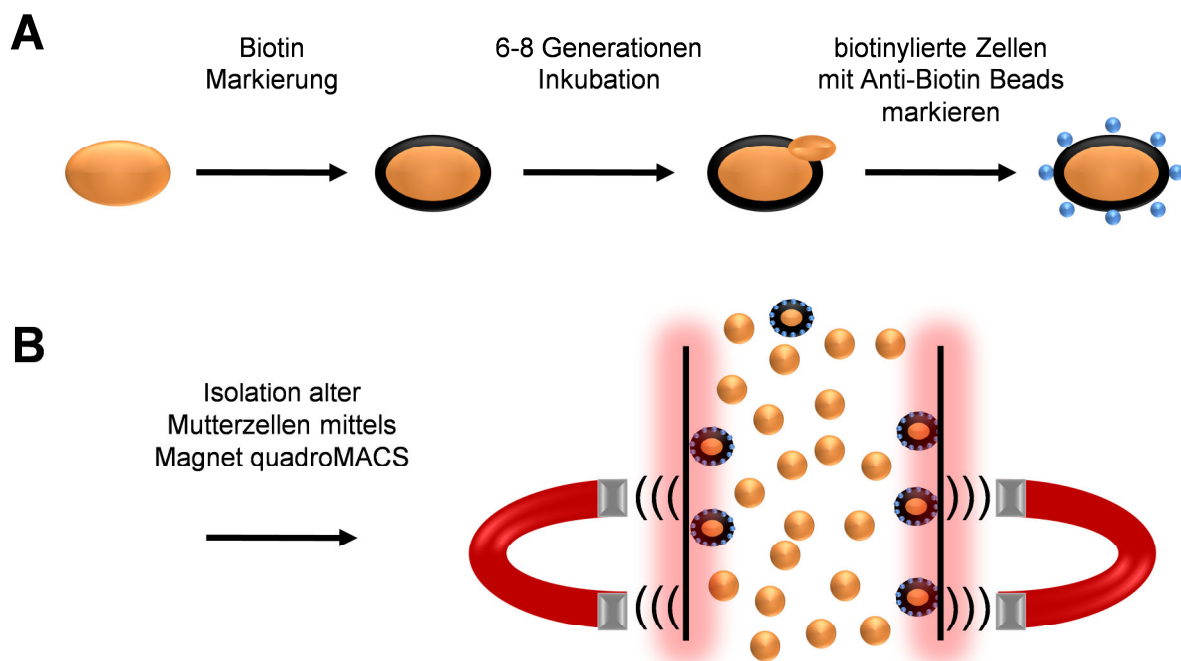


Abb. 18 Schematische Darstellung der Isolation alter Mutterzellen durch paramagnetische Sortierung. (A) Eine Hefe-Kultur wird biotinyliert (schwarze Umrandung) und für 6-8 Generation inkubiert. Töchter, die von biotinylierten Müttern stammen, verfügen über kein Biotin an der Zelloberfläche. Durch Zugabe von paramagnetischen Anti-Biotin Microbeads (blaue Kugeln) werden biotinylierte Mutterzellen markiert, die anschließend durch einen Magneten von nicht biotinylierten Zellen getrennt werden können (B). Magnetisch isolierte Zellen können dann erneut inkubiert werden. Entnommen und modifiziert aus Dissertation Dr. Markus Langen, 2012.

3.2.6.1.1 Kultivierung

- Hefestamm aus -80 °C Stock auf YPD-Platte auftauen, üN bei 30 °C inkubieren.
- Einzelkolonie-Ausstrich mit aufgetautem Stamm auf YPD, 2 Tage 30 °C.
- Picken einer Einzelkolonie und in 5 ml YPD resuspendieren, Kultur in zwei Schritten 1:25 verdünnen, üN bei 30 °C im Rad inkubieren.

- Bestimmung der optischen Dichte OD_{600} der 1:25 Verdünnung, Kultur sollte eine OD unter 6 haben.
- 20 ml YPD mit einer OD von 0.2/ml inokulieren.
- bei einer OD von 1 mit Biotinylierung beginnen.

3.2.6.1.2 Biotinylierung

- Zellzahl/ml mit Zählkammer bestimmen.
- Gesamte Kultur zentrifugieren und 3x mit 5 ml kaltem PBS waschen, anschließend in 5 ml kaltem PBS resuspendieren.
- Pro 10^8 Zellen wurde 1 mg Biotin zugesetzt. Biotin frisch abwiegen (z.B. 2 mg/ml) und in PBS resuspendieren, entsprechende Menge Biotin zu den Zellen geben und auf 5 ml PBS auffüllen.
- bei Raumtemperatur 45 min auf dem Rad langsam inkubieren.
- zentrifugieren bei 300 g (4°C) für 5 min und 2x mit 5 ml kaltem PBS-Glycin waschen (Quenching: Abstoppen der Biotinylierungsreaktion) und in 5 ml PBS-Glycin aufnehmen.
- Zellzahl erneut bestimmen.
- Zum Prüfen der Biotinylierungseffizienz wurden Zellen entnommen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert (siehe 3.5.1, S. 78).
- $5.5 - 6.5 \times 10^7$ biotinylierte Zellen wurden auf insgesamt 100 ml YPD gegeben und bei 25°C üN auf dem Schüttler inkubiert (Zellen bei 30°C haben am nächsten Tag eine zu hohe OD).

Im Anschluss erfolgte die Markierung und Sortierung mittels paramagnetischer Microbeads. Nach Sortierung wurden die replikativ gealterten biotinylierten Zellen ausplattiert und/oder in frischem YPD Medium weiter inkubiert, wobei diese immer maximal 8 Generationen durchlaufen sollten, damit die Kultur logarithmisch bleibt.

3.2.6.1.3 Paramagnetische Markierung und Sortierung

- nach ca. 15 Stunden Inkubation bei 25° wurde die Zellzahl der Kultur bestimmt (4-6mal zählen, Mittelwert bilden) und zentrifugiert (ca. 2×10^9 Zellen, davon sind $5.5 - 6.5 \times 10^7$ Zellen biotinyliert).
- 2x waschen mit 50 ml kaltem PBS-BSA.
- resuspendieren in 5 ml PBS-BSA, 25 μl anti-Biotin Microbeads pro 10^9 Zellen (gesamte Suspension) zugeben, gut mischen, 1 h bei 4°C auf Rad inkubieren.
- zum Entfernen ungebundener Microbeads wurde die Kultur 3x mit 5 ml kaltem PBS-BSA bei 2000 rpm für 5 min gewaschen.

- Pro 10^8 Zellen wurde 500 μ l PBS-BSA zugegeben.
- Sortierung erfolgte über LS-Säulen nach Herstellerangaben. Säule wurde 3 ml PBS-BSA äquilibriert, Zellsuspension wurde dann auf Säule gegeben. Nachladen der Säule erst nach Durchlaufen der Zellsuspension. 3x waschen der Säule mit 3ml PBS-BSA, eluieren der biotinylierten Zellen mit 5 ml PBS-BSA.
- erneute Sortierung der biotinylierten Zellen über eine zweite Säule wie oben, so wurde eine reinere biotinylierte Zellpopulation isoliert, eluierte Zellen zählen (4-6mal).
- Tochterzellen (Durchfluss) können verworfen werden, biotinylierte Mutterzellen wurden in 100 ml YPD resuspendiert und erneut bei 25°C üN inkubiert bzw. ausplattiert (siehe 3.2.6.1.4; Lagerung der sortierten Zellen für mehrere Stunden bei 4 °C möglich).

Sowohl nach dem ersten und zweiten Sortieren ist eine Entnahme von Zellen für die Durchflusszytometrie möglich, um die Sortierungseffizienz biotinylierter (und somit alter) und nicht biotinylierter junger Zellen zu bestimmen (siehe 3.5.1, S. 78).

3.2.6.1.4 Bestimmung der *LYS2*-Revertanzahl von biotinylierten Mutterzellen des Wildtyp-Stamms E134

Nach dem zweiten Sortieren wurden 5×10^6 biotinylierte Zellen entnommen und auf ein Volumen von 1 ml mit PBS-BSA eingestellt. In 3 Schritten wurde eine 1:1000 Verdünnung hergestellt, wovon je 100 μ l auf 3 Platten Minimalmedium (= SD+24, enthält alle relevanten Reagenzien des Aminosäuremixes wie unter 2.12.2.1, S. 49 beschrieben) plattiert wurden (500 Zellen, Lebendzellzahlbestimmung). Die restlichen 4.5×10^6 Zellen wurden für 5 min bei 300 g zentrifugiert und 700 μ l Überstand mit der Pipette abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde im verbleibenden Überstand (200 μ l) resuspendiert und auf einer Platte Minimalmedium ohne Lysin (SD-Lysin) ausplattiert, um die Revertanzahl zu bestimmen. Die Platten wurden für 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubiert. Für jeden gemessenen Zeitpunkt wurde bestimmt, um welchen Faktor die *LYS2*-Revertanzahl gegenüber Generation 0 erhöht war. Zudem musste der Faktor mit eingerechnet werden, um den die Lebendzellzahl gegenüber Generation 0 erniedrigt war (z.B. Lebendzellzahl Generation 0: 500 Kolonien, Generation 19: 100 Kolonien \rightarrow Faktor 5 mit Revertanzahl von Generation 19 multiplizieren).

3.2.6.1.5 Bestimmung der *LYS2*-Revertanzahl von biotinylierten Mutterzellen des *Amsh2*-Stamms Dag60

Nach dem zweiten Sortieren wurden 5×10^5 biotinylierte Zellen entnommen und auf ein Volumen von 1 ml mit PBS-BSA eingestellt. Für die Lebendzellzahlbestimmung wurde in 2

Schritten eine 1:100 Verdünnung hergestellt, wovon je 100 μl auf 3 SD+24 Platten plattiert wurden (500 Zellen). Je 3mal 5×10^3 Zellen wurden aus dem Reaktionsgefäß mit 5×10^4 Zellen entnommen (100 μl) und auf je einer SD-Lysin Platte ausplattiert (Revertantenbestimmung). Die Platten wurden für 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Bestimmung der Mutationsrate erfolgte wie unter 3.2.6.1.4 beschrieben.

3.2.6.1.6 Herstellen von Gesamtzellproteinextrakten

Um die Proteinmenge von Hefe-Msh2p während des Alterns zu bestimmen, wurden nach verschiedenen Generationen Proben generiert. Eine Einzelkolonie wurde wie unter 3.2.6.1.1 und 3.2.6.1.2 beschrieben angeimpft und biotinyliert (mit der Änderung, dass eine 50 ml Kultur biotinyliert wurde). Von der biotinylierten Startkultur wurde eine Probe von 2×10^7 Zellen entnommen und ein Zellextrakt hergestellt (Verfahren siehe 3.4.2, S. 74). Die restlichen Zellen wurden in 350 ml resuspendiert und je 100ml YPD mit je $6,5 \times 10^7$ Zellen wurden auf 3 Kolben verteilt (Abb. 19A). Alle 3 Kulturen wurden wie unter 3.2.6.1.3 beschrieben weiter verarbeitet. Nach dem Sortieren wurde eine komplette biotinylierte Kultur lysiert. Vor der Lyse wurde das Zellpellet 3mal 5 Minuten (300 g) mit PBS gewaschen, um BSA-Reste der vorherigen Puffer zu entfernen. BSA würde in diesem Fall eine korrekte Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lyse der Zellen verhindern. Die restlichen 2 biotinylierten Kulturen wurden weiter inkubiert. Bei der nächsten Sortierung wurde wieder so verfahren (Abb. 19B).

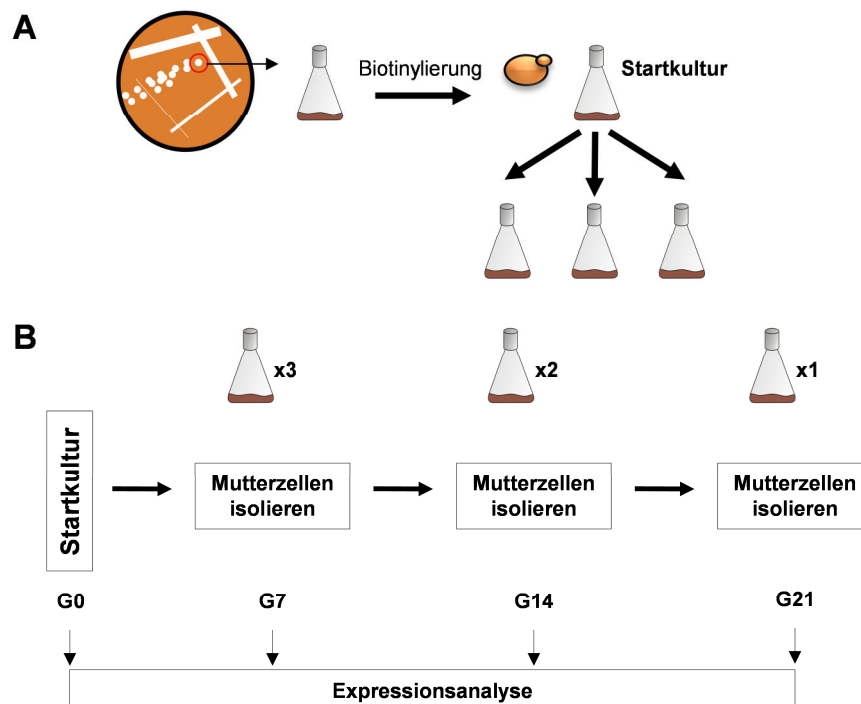


Abb. 19: Schema zur Gewinnung von Proteinextrakten nach verschiedenen Generationszeiten im replikativen Alter. Beispielhaft werden hier Generationszeiten von 0, 7, 14, und 21 angegeben. Eine Zellzahl von $6,5 \times 10^7$ wurde in je einen Kolben angeimpft (insgesamt 3x) und inkubiert. Nach 6-8

Generationen wurden die alten Mutterzellen aussortiert und für yMsh2p-Analysen im Western-Blot lysiert. Die restlichen 2 Kulturen wurden weiter inkubiert. Mit diesen wurde nach den weiteren Generationszeitpunkten ebenso verfahren. Biotinylierte Hefezelle = schwarz umrandet.

3.2.6.2 Bestimmung von *LYS2*-Revertanten während des chronologischen Alterns

Die Bestimmung von *LYS2*-Revertanten des Stamms E134 während des chronologischen Alterns erfolgte nach einem Protokoll aus der Dissertation von Dr. Markus Langen mit laborinternen Anpassungen (Langen 2011; Stefanie Kobus, laborintern) Alle verwendeten Kolben in Alterungsexperimenten mussten mit Silikonschwammstopfen verschlossen werden, um einen Gasaustausch zu ermöglichen und gleichzeitig die Verdunstung des Mediums zu verhindern.

- der Stamm wurde frisch von -80 °C auf YPD ausgestrichen, Inkubation bei 30 °C üN.
- nach einem Tag wurde dieser per Einzelkolonie-Ausstrich auf YPD vereinzelt und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.
- eine Kolonie wurde in 20 ml Aging-Medium (siehe 2.12.2, S. 48) resuspendiert und üN im INFORS Schüttler inkubiert (220 rpm, 30 °C, 75 % Luftfeuchtigkeit).
- die Vorkultur wurde ausgezählt und eine Hauptkultur wurde mit 2×10^6 Zellen / ml in 350 ml Aging-Medium angesetzt. Je 3x 100 ml wurden anschließend auf 3 neue Kolben verteilt und für 72 Stunden im Schüttler inkubiert. Die OD wurde alle 24 Stunden bestimmt.
- aus der stationären Hauptkultur (OD 7 bis 8 nach 3 Tagen) wurden 1.3×10^8 Zellen entnommen und wie folgt verdünnt (Abb. 20). Es wurde eine neue Zellsuspension hergestellt, welche eine Zellzahl von 1.0×10^5 Zellen/ml in einem Endvolumen von 10 ml aufwies. Hieraus wurde eine 1:40 Verdünnung in 2 ml Endvolumen hergestellt (2.5×10^3 Zellen/ml). Aus dieser Verdünnung wurden 200 µl (500 Zellen) entnommen und auf je 5 SD+24 Platten (siehe 2.12.2, S. 48) plattiert. Die verbliebenden $\sim 1.3 \times 10^8$ Zellen wurden für 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, in 200 µl ddH₂O resuspendiert und auf einer Platte Minimalmedium ohne Lysin (SD-Lysin) ausplattiert. Das Ausplattieren erfolgte auf großen Petrischalen (ø 140 mm).
- die Platten wurden für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert und alle gebildeten Kolonien mittels Colony Counter gezählt. Der Mittelwert der Lebendzellzahl der SD+24-Platten (Tag 0) wird als 100 % festgesetzt. Die prozentuale Standardabweichung vom Mittelwert wurde im Graphen zusätzlich dargestellt. Die Revertantenzahl wurde auf den SD-Lysin-Platten bestimmt.
- es wurden alle 3 Tage so lange weiter Aliquots der Hauptkulturen ausplattiert (Verdünnungen wurden so angepasst, das 300-500 Kolonien/Platte wachsen), bis 99.9 % der ausplattierten Zellen (auf SD+24) keine Kolonien mehr bilden können und die Kultur somit als tot definiert wurde.

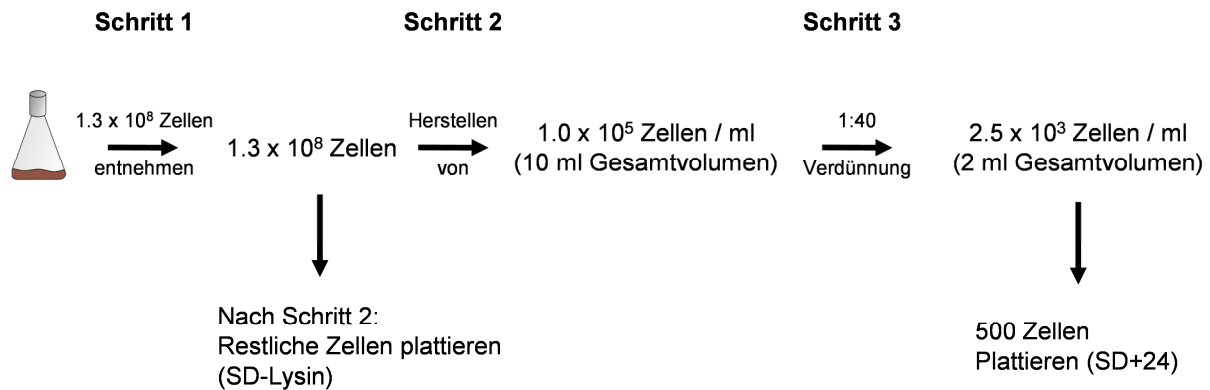


Abb. 20: Verdünnungsschema zum Plattieren von chronologisch gealterten *S. cerevisiae* Zellen. Details siehe Text.

3.2.7 Färben von lebenden und toten Zellen

Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde Propidiumiodid verwendet. Es ist für die Zellmembran undurchlässig, so dass lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen. Tote Zellen sind für Propidiumiodid empfänglich, so dass es zwischen die Basen von DNA interkaliert. Propidiumiodid wurde in einer Konzentration von 4 µg/ml zu Hefe geben und für 1 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 2x mit ddH₂O gewaschen und das Pellet in einem Volumen von 500 µl 1xPBS für die Durchflusszytometrie aufgenommen.

3.2.8 Färbung von Knospungsnarben mit Calcofluor White

Calcofluor White bindet an Strukturen, die Zellulose und Chitin enthalten. Nach der Teilung einer Hefe-Zelle bleibt eine Knospungsnarbe zurück, die verstärkt Chitin aufweist und durch Calcofluor White gut nachzuweisen ist. Die Färbung basiert auf einer Methode von Pringle *et al.* 1989.

Lösung	Konzentration	Herstellung	Anmerkung
Calcofluor White	5 mg/ml	50mg einwiegen, auf 7ml ddH ₂ O auffüllen, mit ein paar Tropfen 10M NaOH in Lösung bringen, dann auf Endvolumen von 10ml auffüllen	Aliquotieren, bei -20 °C dunkel lagern

- ein Aliquot von 5x10⁵ Zellen wurde mit Calcofluor White in einem Volumen von 200 µl ddH₂O versetzt (Endkonzentration 100 µg/ml).
- die Zellen wurden für 5 min dunkel bei Raumtemperatur inkubiert
- zur Entfernung von nicht gebundenem Calcofluor White wurden die Zellen 2x mit ddH₂O gewaschen
- gefärbte Zellen können mit einem DAPI kompatiblen Filter am Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Photometrische DNA-Mengenbestimmung

Zur Messung wurde 1 µl der DNA-Lösung unverdünnt im Nanodrop gemessen. Zum Abgleichen wurde 1 µl ddH₂O verwendet. Die Menge an DNA wird in µg / µl angegeben und ist das Absorptionsergebnis bei 260nm. Zur Bestimmung der Reinheit wird der Quotient zwischen der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Ein Wert zwischen 1.8 und 2.0 spiegelt eine reine DNA-Lösung wider.

3.3.2 DNA Restriktionsanalysen

Plasmide oder andere DNA-Fragmente wurden mit Restriktionsenzymen laut Herstellerangaben linearisiert. Die Restriktion erfolgt über Nacht.

3.3.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente mit einer Größe ab 1 kbp wurden über 0.7 %ige Agarosegele aufgetrennt. Fragmente, die kleiner als 1 kbp sind, wurden mit einem 1 bis 1.5%igen Gel aufgetrennt. Folgende Parameter wurden für die Gelelektrophorese verwendet: 120 V, 300 mA. Nach Beenden des Gellaufes werden die DNA-Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht, da zuvor bei der Herstellung des Agarosegels 100 µg Ethidiumbromid zugesetzt werden.

Puffer	Chemikalie	Anmerkung
1xTBE	Borsäure (89 mM) Tris (89 mM) EDTA (89 mM)	
Blaumarker	Bromphenolblau (0.1 %) Xylencyanol (0.1 %) Ficoll (15 %) Tris/HCl (10 mM) EDTA (10 mM)	gesamten Blaumarker steril filtrieren, hergestellt durch I. Volfson

3.3.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem QiaExII Gel Extraction Kit der Firma Qiagen

3.3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die taq-Polymerase verwendet.

3.3.5.1 Herstellen von DNA-Fragmenten zur Klonierung

Stammlösung	Menge in für PCR-Ansatz μ l
Primer 1 (50 pMol/ μ l)	1
Primer 2 (50 pMol/ μ l)	1
MgCl ₂ (25 mM)	5
dNTPs (4 mM)	2,5
Puffer (10x)	5
taq-Polymerase (1 U/ μ l)	1
template DNA (50 ng/ μ l)	1
ddH ₂ O	36,5

Schritt	Dauer	Temperatur
Initialisierung	5 min	95 °C
Denaturierung	1 min	95 °C
Annealing	1 min	¹
Elongation	²	72 °C
finale Elongation	8 min	72 °C

¹ Annealing-Temperatur ist von den Primeren abhängig

² abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments wird die Elongationszeit gewählt. Als Richtwert gilt 1 min = 1 kbp

Die PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt.

3.3.5.2 Herstellen von Marker-Kassetten zur genomischen Integration

Zur Integration von DNA-Fragmenten ins Genom von *S. cerevisiae* werden Marker-Kassetten benötigt. Es wurde der doppelte Ansatz wie unter 3.3.5.1 verwendet, wobei sich die PCR-Bedingungen unterscheiden. Als DNA-Vorlage wurden die Vektoren pUG6 und pUG74 verwendet (Hegemann and Heick 2011).

Schritt	Dauer	Temperatur
Initialisierung	5 min	95 °C
Denaturierung	40 sek	94 °C
Annealing	1 min	58 °C
Elongation	2 min	68 °C
finale Elongation	15 min	68 °C°

Die PCR wurde mit 25 Zyklen durchgeführt.

3.3.5.3 PCR auf Hefe-Zellen (Kolonie-PCR)

Hefezellen, von denen DNA-Abschnitte amplifiziert werden sollen, wurden mit einer Pipettenspitze im folgenden PCR-Ansatz resuspendiert. Die PCR erfolgte mit möglichst frischen Zellen. Diese können entweder bei einer Temperatur von 4 °C oder 30 °C entnommen werden. Die PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt.

Stammlösung	Menge in μl für PCR-Ansatz	
Primer 1 (50 pMol/ μl)	0,5	
Primer 2 (50 pMol/ μl)	0,5	
MgCl ₂ (25 mM)	1,25	
dNTPs (4 mM)	1,5	
Puffer (10x)	2,5	
taq-Polymerase (1 U/ μl)	0,5	
ddH ₂ O	18,25	

Schritt	Dauer	Temperatur
Initialisierung	10 min	94 °C
Denaturierung	1 min 30 s	94 °C
Annealing	2 min	
Elongation	²	72 °C
finale Elongation	7 min	72 °C°

¹ Annealing-Temperatur ist von den Primeren abhängig

² abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments wird die Elongationszeit gewählt. Als Richtwert gilt 1 min = 1 kbp

Die PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt.

3.3.5.4 Herstellen von Punktmutationen

Um gezielt Punktmutationen in ein DNA-Fragment einzubringen wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 20 Nukleotiden benutzt, die zentral die auszutauschende Base enthalten. In zwei unabhängigen PCRs wurden mit den mutagenen Vor- und Rückwärts-Oligonukleotiden Teilfragmente amplifiziert, die dann in einer weiteren PCR zu einem Fragment zusammengefügt wurden, welches dann die Punktmutation trägt. Dieses Fragment wurde dann über homologe Rekombination in das Zielgen auf einem linearisiertem Plasmid eingefügt. Die PCR-Bedingungen sind unter 3.3.5.1, S. 67 beschrieben. Um Allele von Hefe-Mensch-*MSH2* herzustellen, wurden über eine mutagenisierende PCR gezielt Punktmutationen in den humanen Abschnitt von *yhMSH2_1* integriert, bei der die Oligonukleotide bereits den Basenaustausch enthalten. Als *hMSH2*-Matrizen-DNA wurde das Plasmid pOTB7 (#1288) verwendet. Zum Einbringen der Punktmutationen wurden die Oligonukleotide #1649 bis #1662 verwendet (siehe 2.9, S. 42). Mit den Oligonukleotiden #1553 und #1604 wurde dann in einer zweiten PCR aus den entstandenen zwei Fragmenten ein 383bp großes komplettes Fragment amplifiziert. Die hergestellten DNA-Fragmente wurden über homologe Rekombination in den Zielvektor #1285 integriert (Abb. 21).

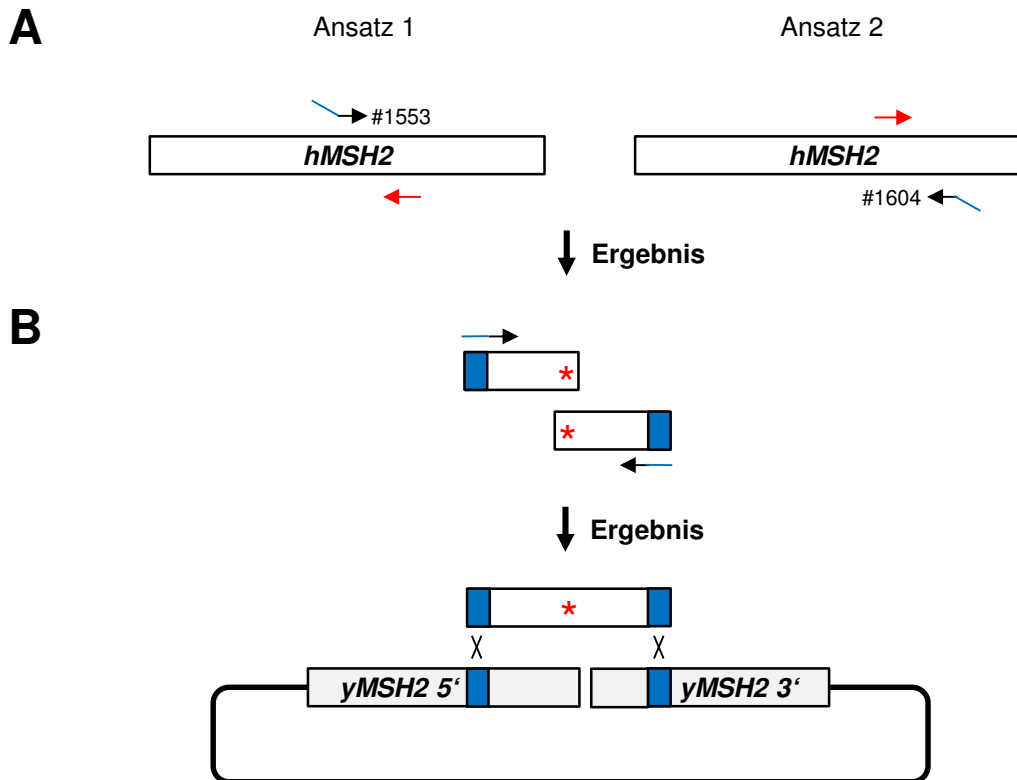


Abb. 21: Schematische Darstellung zum Integrieren einer Punktmutation in den humanen Teil des Hefe-Mensch-*MSH2*-Hybridgens. Rote Oligonukleotide tragen die auszutauschende Base. PCR-Produkte mit * enthalten die Mutation. Die Oligonukleotide #1553 und #1604 besitzen Homologie im 5'-Bereich (blau) zum Zielgen Hefe-*MSH2*.

3.3.5.5 Integration von humanen *MSH2*-Sequenzen in den Hefe-*MSH2*

Lokus

Zur Integration von humanen *MSH2*-Sequenzen (welche für den Proteinabschnitt AS 666-766 kodieren) in den Hefe-*MSH2* Lokus, wurde mit den Oligonukleotiden #1753 und #1805 ein PCR Produkt auf das Plasmid #1286 (pFH1-H) generiert, welches 5' Homologie zum Hefe-*MSH2* sowie 3' Homologie zu einer *kanMX*-Kassette trägt (Oligos #1788 und #1791, Vorlage pAH3, Abb. 22A). Das 3'-Oligonukleotid zur Amplifikation der Hybrid-Sequenz trägt zusätzlich 30 Nukleotide 3'UTR-Sequenz von Hefe-*MSH2*, so dass nach dem Stop-Kodon 30 Basenpaare genomische Region vorhanden sind, ehe die *kanMX*-Kassette beginnt (Abb. 22B). Beide Fragmente wurden in den Wildtypstamm E134 transformiert. Aufgrund der vorhandenen Homologien der Produkte untereinander und zum Hefe-*MSH2* Lokus findet ein Rekombinationsereignis statt, dass sowohl die Hybridsequenz als auch die *kanMX*-Kassette integriert (Abb. 22C). Der 5' Übergang von *yhMSH2_1* zur *kanMX*-Kassette wurde mit den Oligonukleotiden #1766 und #363 geprüft (Abb. 23B). Das entstandene Produkt wurde über ein 1 %iges Agarosegel eluiert und mit den genannten Oligonukleotiden sequenziert, um auf Fehler im humanen Abschnitt zu prüfen. Zur Überprüfung der Integration des humanen

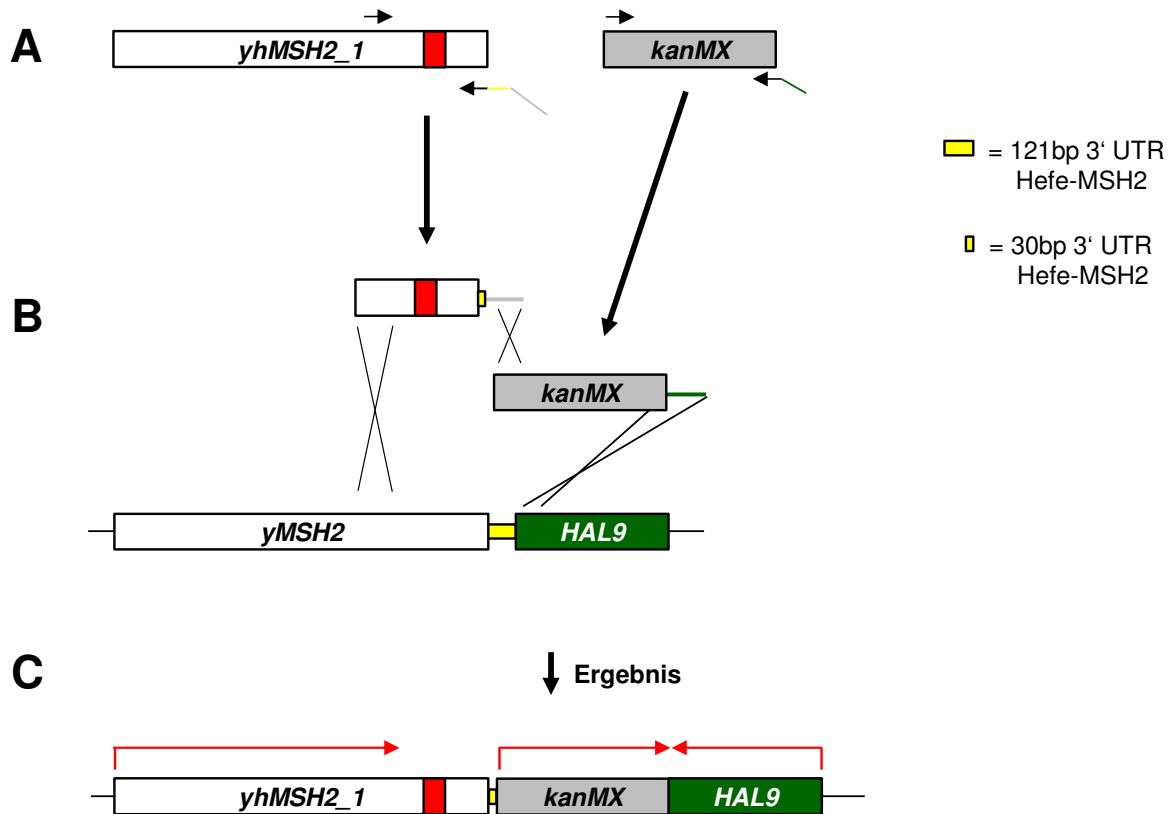


Abb. 22: Schematische Darstellung der Integration eines humanen *MSH2*-Fragments in den Hefe-*MSH2* Locus. Eine PCR auf das Hybrid *yhMSH2_1* erzeugt eine Hefe-Mensch-*MSH2*-Fragment, welches 30 Basenpaare 3'UTR vom genomischen *yMSH2*-Locus trägt. Eine weitere PCR auf eine *kanMX*-Kassette erzeugt somit zwei Fragmente, die aufgrund ihrer Homologien miteinander in den *yMSH2*-Locus integrieren. Promotor und Terminator der gezeigten Gene sind nicht dargestellt.

Abschnitts wurde mit dem Oligonukleotid #1756 (bindet im humanen Abschnitt) und mit #363 eine Verifizierungs-PCR durchgeführt (Abb. 23C). Der 3'-Bereich der *kanMX*-Kassette zu *HAL9* wurde mit den Oligonukleotiden #c-563 und #2163 geprüft (Abb. 23D).

Zur genomischen Integration von „Missense“-Mutationen in die humane Sequenz wurden jeweils andere Vorlage-Vektoren verwendet, die bereits die „Missense“-Mutation tragen. Die Stämme #1634 bis #1642 wurden so konstruiert (Stammliste S. 47).

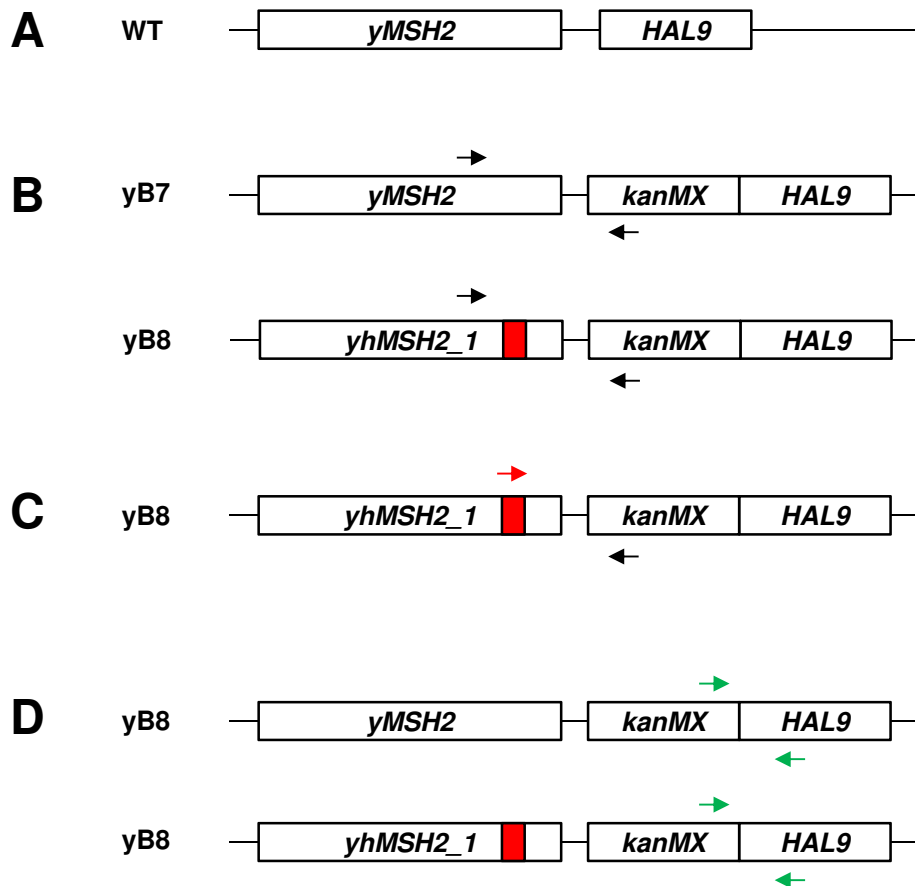


Abb. 23: Schema der Verifikation eines integrierten Hefe-Mensch-*MSH2* Hybrids in den Hefe-*MSH2* Lokus. A) Wildtypischer *yMSH2*-Lokus. Zwischen *yMSH2* und *HAL9* liegen 121bp UTR. B) Die Integration einer *kanMX*-Kassette zwischen *yMSH2* und *HAL9* verkürzt den 3'-UTR von *yMSH2* auf 30 bp. Die alleinige Integration der *kanMX*-Kassette als auch zusammen mit der Humansequenz von *yhMSH2_1* wurde über je eine PCR verifiziert. C) Verifikation der integrierten humanen Sequenz. D) Verifikation des 3'-Übergangs der *kanMX*-Kassette zu *HAL9*.

3.3.5.6 Integration von humanen *MSH2*-Sequenzen in den Hefe-*MSH2*

Lokus mittels Plasmid-Restriktion

Die Konstruktion der Stämme #1630, #1644 und #1645 wird am Beispiel des Hybrids *yhMSH2_14* demonstriert, bei der die humane Sequenz, welche für die AS 628-804 kodiert, in den Hefe-*MSH2* Lokus integriert wurde. Das Plasmid pSBH20 (#1853) wurde mit *Acc65I* 3' hinter dem Hefe-*MSH2* Gen geöffnet. Über homologe Rekombination wurde ein PCR-Fragment integriert, welches 60 bp 3'-UTR vom Hefe-*MSH2* Lokus und folgend 40 bp Homologie zu einer *kanMX*-Kassette trägt. Das so erhaltene Plasmid #2210 wurde mit den Enzymen *AhdI* und *Bsp1407I* geöffnet, so dass das Hefe-*MSH2* Gen vom Start-Kodon bis einschließlich der Homologie zur *kanMX*-Kassette ausgeschnitten wurde (Abb. 24A). Dieses Fragment wurde mit einer *kanMX*-Kassette, amplifiziert von pUG6 mit #2310 und #2441, über homologe Rekombination in den Hefe-*MSH2* Lokus integriert (Abb. 24B und C).

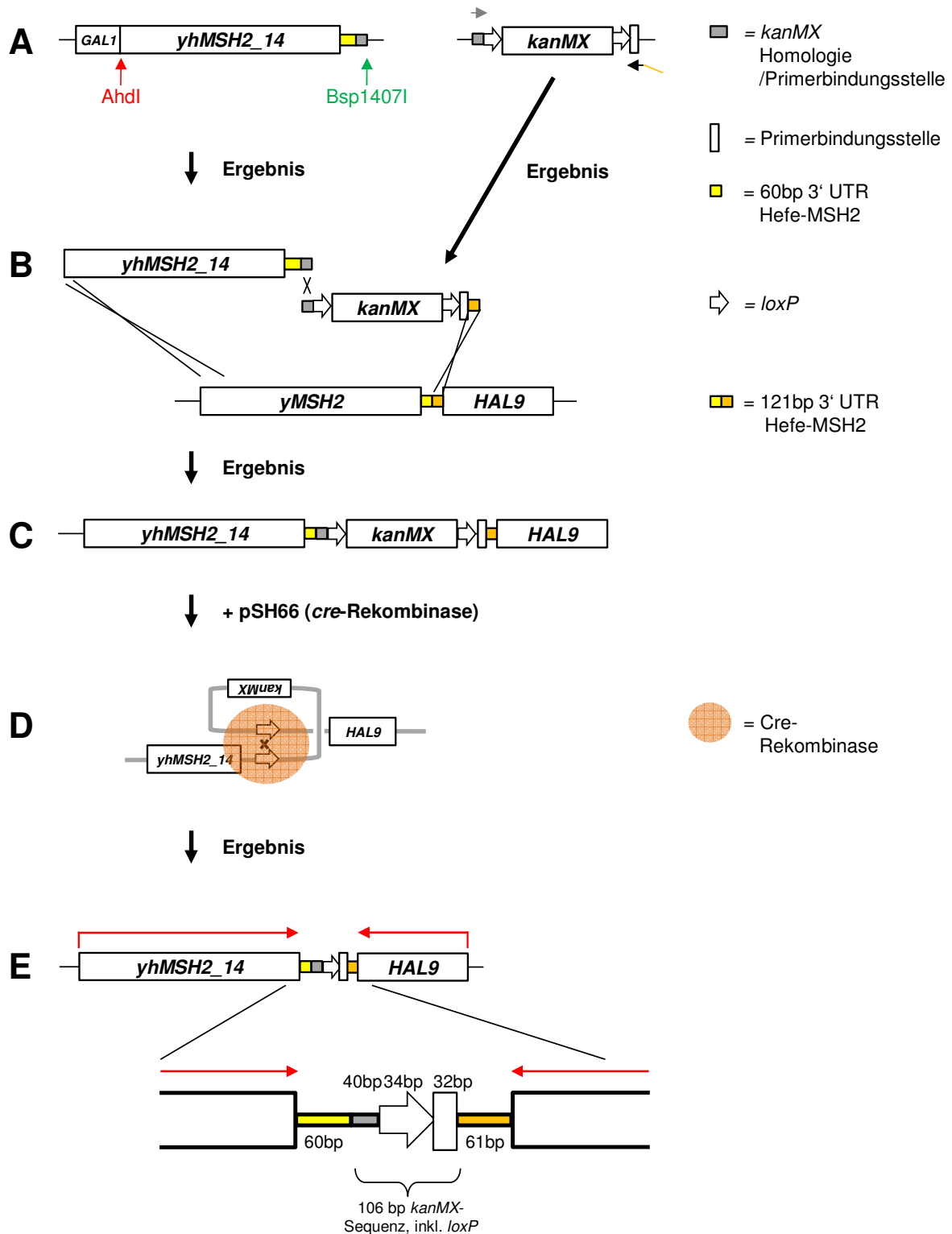


Abb. 24: Schematische Darstellung der Integration eines Hefe-Mensch-*MSH2* Hybridgens in den Hefe-*MSH2* Locus mittels Plasmid-Restriktion. A) Das Hybridgen *yhMSH2_14* wurde mit den Enzymen *AhdI* und *Bsp1407I* samt 60bp 3'-UTR als auch Homologie zur *kanMX*-Kassette aus dem Vektor entfernt. Die *kanMX*-Kassette wurde über 2 Oligonukleotide amplifiziert. B) Das erhaltene Produkt der Restriktion wurde mit einer *kanMX*-Kassette in den Wildtyp Stamm E134 transformiert. Durch homologe Rekombination rekombinieren beide Fragmente miteinander in den Hefe-*MSH2*-Locus (C). D) Durch Transformation mit pSH66 und anschließender Induktion der Cre-Rekombinase wurde *kanMX* über die *loxP*-Elemente aus dem Genom entfernt. E) Zurück blieb ein 106 bp Fragment von *kanMX* (inkl. einem *loxP*-Element), welches von jeweils einem 60 und 61 bp großen *yMSH2* 3'-UTR-Fragment flankiert wird. Promotor und Terminator der gezeigten Gene sind nicht eingezeichnet. Rote Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an. Grafik angelehnt an Hegemann and Heick 2011.

Die 5'-Verifikation, welche den Übergang von Hefe-*MSH2* zu *kanMX* prüft, erfolgte über die Oligonukleotide #2377 und #2358. Die 3'-Verifikation erfolgte mit #2359 und #2163, welche den Übergang zwischen *kanMX* und *HAL9* verifiziert. Für die Verifikation der integrierten humanen Sequenz, welche für die humanen Aminosäuren 628-804 kodiert, wurden die Oligonukleotide #1607 und #1608 benutzt. Die Verifikation der humanen kodierenden Sequenz der Aminosäuren 14-103 erfolgte mit #1986 und #2254.

Positive Stämme wurden mit dem Plasmid pSH66 transformiert, welches für die Cre-Rekombinase, unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors, kodiert. Die Cre-Rekombinase erkennt *loxP*-Seiten, die die *kanMX*-Kassette jeweils 5' und 3' flankieren (Abb. 24D). Durch Rekombination mit Cre wird die *kanMX*-Kassette aus dem Genom entfernt, so dass eine *loxP*-Seite zurückbleibt (Abb. 24E). Die Induktion von *cre* erfolgt üN durch Animpfen des transformierten Stamms in YPG Medium (siehe 2.12.2, S. 48). Am nächsten Morgen wurden 200 Zellen auf YPD plattiert und für 2 Tage bei 30° C inkubiert. Jeweils 8 Klone wurden von der Platte entnommen und auf YPD-Platten als auch auf YPD+G418-Platten plattiert. Auf letzteren wurde geprüft, ob die *kanMX*-Kassette durch die Cre-vermittelte Rekombination entfernt wurde. Die Verifizierung des Verlustes erfolgte zusätzlich über die Oligonukleotide #2163 und #2377. Insgesamt bleiben 106 bp der *kanMX*-Kassette (inkl. *loxP*-Seite) zurück (Abb. 24E).

Um das Plasmid pSH66 wieder aus dem transformierten Stamm zu entfernen, wurde der Stamm üN in 5 ml YPD angeimpft. Morgens wurden 200 µl auf 5 ml YPD angeimpft, abends wurden erneut 50 µl auf 5 ml YPD angeimpft. Morgens wurden 200 Zellen auf YPD plattiert und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Kolonien wurden anschließend auf YPD und YPD+clonNAT vereinzelt, um den Verlust von pSH66 zu prüfen.

3.3.5.7 DNA-Sequenzierung

PCR-Produkte und Plasmide wurden über die Firma GATC-Biotech sequenziert. Hierfür wurden 100 ng DNA in 30 µl Wasser verdünnt. Oligonukleotide wurden auf eine Konzentration von 10 pMol/µl eingestellt.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

790 µl Wasser wurden mit 10 µl Proteinrohextrakt und 200 µl Bradford-Reagenz vermischt, 10 min bei RT inkubiert und die Absorption anschließend bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinmenge im Rohextrakt wurde anschließend anhand einer BSA-Eichreihe mit definierten Proteinkonzentrationen (0 bis 10 µg BSA in 2 µg-Schritten) aus den Absorptionswerten berechnet.

3.4.2 Zellyse von *S. cerevisiae*

Es wurde ein verändertes Protokoll der Firma Miltenyi Biotec verwendet.

Puffer	Chemikalie	Endkonzentration	Anmerkung
Lyse	HEPES-KOH pH 7.5	50mM	
	NaCl	140mM	
	EDTA	1mM	
	Triton X-100	1%	Puffer frisch ansetzen, auf 4°C kühlen
	Natriumdeoxycholat	0,1%	
	PMSF	1mM	
	Complete Inhibitor 25x	1x	

- 5 ml Kultur in Selektivmedium ansetzen
- morgens auf OD 0.2 / ml in 5 ml umimpfen
- Zellen bei OD 1 ernten
- 1x Waschen mit 5 ml H₂O
- Überführen mit 1 ml H₂O in 2 ml Tube
- Zellen kurz zentrifugieren, Überstand komplett abnehmen
- Zellpellet mit 100 µl kaltem Lysepuffer versetzen
- ein Viertel PCR-Reaktionsgefäß Glas beads zugeben und für 2x20sek bei 5500 Impulsen im preCellys24 lysieren
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- möglichst viel Überstand abnehmen, erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Tube überführen
- Proteinkonzentration per Bradford bestimmen
- Proteinextrakt mit ¼ BM und 1/10 DTT versetzen und bei 100°C 10 min erhitzen

3.4.3 Co-Immunopräzipitation von hMSH2 und seinen Interaktionspartnern

Zum Nachweis der Interaktion von humanen MSH2 mit dem Interaktionspartner hMSH6 wurde *hMSH2* (Plasmid #1282) mit *hMSH6* (Plasmid #1284) im Hefestamm E134 (#1500) kotransformiert. Die Klone, mit denen die Mutatorexperimente durchgeführt wurden (siehe 3.2.5.2), wurden ebenfalls für die Co-Immunopräzipitation benutzt.

- eine 50ml Kultur wurde in SG-Uracil-Leucin Selektivmedium bis einer OD von 1 wachsen lassen und wie unter beschrieben 3.4.2 lysiert (Zellpellet in 500 µl Lyse-Puffer und einem halben PCR-Reaktionsgefäß Glas beads versetzt)
- in der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der Säule
- 50 µl Protein-G-Agarose wurden auf die Säule gegeben, 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und je 2x mit 700 µl sterilem 1xPBS (kalt) gewaschen
- Säule für 1 min bei 13.000 rpm trocken zentrifugiert

- 500 µg Hefe-Proteinextrakt wurden mit sterilen 1x PBS (kalt) auf 500 µl Endvolumen eingestellt (in Säule)
- Zugabe von 1 µg α -hMSH6 oder α -hMSH3 Antikörper, Inkubation üN bei 4° auf Rad
- morgens 3x waschen mit sterilem 1xPBS (kalt), 750µl, je 1 min zentrifugieren 13.000 rpm, Säule anschließend trocken zentrifugieren
- Saure Elution mit 100 µl 100 mM Glycin, pH 2.5 10 min auf Eis, Deckel nicht schließen
- 1 min zentrifugieren bei 13.000 rpm
- Eluat mit 12 µl 1M Tris abpuffern (pH 9.5)
- 1 h 30 min einengen in Speedvac
- Zugabe von ¼ BM und 1/10 DTT, bei 100°C für 10 min erhitzt
- Kompletter Ansatz wurde über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt. Detektion von hMSH2 erfolgte nach Transfer auf eine Nylonmembran mit dem entsprechenden Antikörper (siehe 2.5.1, S. 41).

3.4.4 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinen wurden 10 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Die zu verwendenden Glasplatten und Abstandhalter werden mit 70 %igen Ethanol und destilliertem Wasser gereinigt und anschließend getrocknet. Es wurden kleine Proteingele mit den Maßen 7 cm x 9 cm benutzt.

3.4.4.1 Herstellung des Trenngels

Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Proteine werden diese im Trenngel separiert. Acrylamid (30:0.8), Wasser und Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8.8; 0.4 % SDS) wurden zusammenpipettiert und gut gemischt. TEMED und Ammoniumpersulfat (10 %ige Stocklösung) wurden zum Schluss hinzugegeben. Der Ansatz wurde zügig ohne Blasenbildung zwischen die Glas- und Aluminiumplatte bis 2 cm unter den oberen Rand gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde Isopropanol abgenommen und das Gel vorsichtig mehrfach mit destilliertem Wasser gespült.

Chemikalien für Trenngel	Menge in ml
Acrylamid	13.3
4xTrenngelpuffer	10
Ammoniumpersulfat	0.2
TEMED	0.05
ddH ₂ O	16.5

3.4.4.2 Herstellung des Sammelgels

Um die zu separierenden Proteine im Gel zu fokussieren, wurde ein Sammelgel über das Trenngel gegossen. Es dient einer sauberen und besseren Bandenbildung der Proteine. 1,5 ml Acrylamidlösung (30:0.8) wurde mit 2.5 ml 4 x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCL pH 6.8; 0.4 % SDS) und 6 ml destilliertem Wasser gemischt. 200 µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung und 20 µl TEMED wurden noch hinzugegeben. Das Sammelgel wurde luftblasenfrei auf das Trenngel gegossen. Der Kamm wurde in das Sammelgel gesteckt, so dass sich Ladetaschen bilden konnten. Nach dem Auspolymerisieren konnte das Gel für die Elektrophorese verwendet werden. Der Kamm wurde gezogen und die Ladetaschen mehrfach mit Laufpuffer gespült.

3.4.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Das fertige Gel wurde in die Apparatur eingespannt und beide Kammern mit Laufpuffer (0.05 M Tris / HCL pH 8.3; 0.2 M Glycin; 0.2 % SDS) soweit gefüllt, dass das Gel Kontakt zum Laufpuffer hatte. Die Proben (maximal 20 µl / Ladetasche) wurden aufgetragen unter folgenden Bedingungen gestartet: max. 100 V bei etwa 20 mA für 1.5 h.

Das Gel kann anschließend mittels Coomassie-Blau gefärbt werden oder für eine spezifische Proteindetektion auf eine Nylonmembran übertragen werden.

3.4.4.3.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Nach dem Lauf des SDS-Gels wurde dieses in eine Wanne mit ddH₂O gelegt und für 30 sek bei 600 Watt in der Mikrowelle erwärmt. Anschließend wurde es 3x für je 10 min unter leichtem Schwenken gewaschen, wobei das Wasser alle 10 min ausgetauscht wurde. Nach Entfernen des Wassers im letzten Waschschrift erfolgte die Färbung des Gels für mind. 15 min bis 1 Stunde mit Coomassie-Lösung (leichtes Schwenken). Mehrfaches Waschen mit ddH₂O führt zum Entfernen von unspezifisch gebundenem Coomassie aus dem Gel.

3.4.4.4 Western-Blot-Analyse

Das Verfahren beruht auf dem Transfer von Proteinen aus einem Acrylamidgel auf eine Membran, wodurch diese immobilisiert werden. Auf dieser Membran können dann Proteine mittels Antikörper nachgewiesen werden.

3.4.4.4.1 Aufbau der Blotapparatur

Für je ein Acrylamidgel wurden 6 Filterpapiere mit den Maßen 7 cm x 9 cm zurechtgeschnitten. Diese wurden anschließend in Transferpuffer (48 mM Tris/HCL, 39 mM Glycin, 0,037 % (v/v) SDS, 20 % Methanol) inkubiert. Ebenso wurde ein Stück

Nylonmembran mit den Maßen 7 cm x 9 cm geschnitten, in Methanol inkubiert und dann mit destilliertem Wasser gespült. Drei Filterpapiere wurden sorgfältig gestapelt auf die Graphitplatte der Blotapparatur gelegt und alle Luftblasen mittels Rollen einer Glaspipette entfernt. Die Membran wurde aufgelegt und sichergestellt, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Filterpapier befinden.

Die Gelapparatur wurde auseinandgebaut, das Gel von der Glasplatte gelöst und luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Der Stapel aus Filterpapier und Membran wurde mit den restlichen drei Filterpapieren bedeckt. Luftblasen wurden durch vorsichtiges Auswalzen mittels einer sterilen Glaspipette entfernt. Die zweite Graphitplatte wurde auf den Stapel gelegt und die Kontakte an das Stromgerät angeschlossen. Ein Gewicht von etwa 1 kg wurde auf die Apparatur gestellt, um den Transfer zu begünstigen. Bei 300 mA findet für 60min der Transfer der Proteine auf die Membran statt.

3.4.4.4.2 Abbau der Blotapparatur

Der Strom wurde abgeschaltet und die Apparatur wieder abgebaut. Die Membran wurde mittels einer sterilen Pinzette in ein sauberes Gefäß transferiert und für 1 h in Blockierungslösung (3 % Milchpulver, 0.05% Tween 20 in 1 x PBS) inkubiert.

3.4.4.4.3 Antikörperreaktion auf der Nylonmembran

Um auf der Nylonmembran spezifische Proteine zu detektieren, wurden verschiedene Antikörper eingesetzt. Zuerst wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper, welcher das spezifische Protein erkennt, inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte in Milchpulverlösung (3% Milchpulver, 0.05% Tween 20 in 1 x PBS). Die Nylonmembran wurde 1h bei 4°C unter leichtem Schwenken in der Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Membran dreimal mit 1xPBS für jeweils 10 min gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundär-Antikörper (Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus), welcher mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Der Sekundär-Antikörper wurde 1:7500 in Blockierungspuffer verdünnt. Nach fertiger Inkubation wurde die Membran dreimal 10 min mit 1xPBS gewaschen.

3.4.4.4.4 Farb-Entwicklung von Western-Blots mittels alkalischer Phosphatase

Für die Farbentwicklung wurde die Membran für 5 min in Detektionspuffer (0.1 M Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 20 ml Farbsubstrat-Lösung (Detektionspuffer + 33 µl BCIP-Lösung (0.5 g BCIP in 10 ml DMF) +

66µl NBT-Lösung (0.5 g NBT in 10 ml 70 %igem DMF) für mindestens 5 min bis zu 45 min inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch mehrfaches Waschen mit Wasser abgestoppt.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Quantifizierung von biotinylierten Zellen

Zum Prüfen der Biotinylierungseffizienz wurden 10 µl Zellsuspension (ca. 1.5×10^5 Zellen) aus einer biotinylierten Kultur entnommen und auf 38 µl Volumen mit 1xPBS aufgefüllt. Anschließend wurde Streptavidin-APC (1:20) hinzugegeben und für 5 min im Dunkeln inkubiert (alternativ: üN bei 4°C auf Rad). Die Probe wurde anschließend 3x mit 1xPBS gewaschen und in 500 µl 1xPBS resuspendiert. In der Durchflusszytometrie wird Streptavidin-APC mit einer Wellenlänge zwischen 595 bis 647 nm angeregt. Die Emission liegt zwischen 640 und 680 nm. Erhaltene Streptavidin-APC-Signale wurden gegen die Größe (forward-scatter) in einem Dotplot dargestellt. Die Messung erfolgte durch Dipl. Biol. Klaus Meyer (AG Hegemann).

3.5.2 Sortieren von lebenden und toten Zellen

Zellen wurden wie unter 3.2.7 (S. 65) beschrieben gefärbt. In der Durchflusszytometrie werden durch Propidiumiodid zwei Populationen identifiziert, die sich nach lebenden und toten Zellen sortieren lassen. In Kombination mit einer Streptavidin-APC Färbung lassen sich zudem Zellen aussortieren, die leben und biotinyliert sind.

3.6 Bioinformatische Analysen

3.6.1 Sequenzvergleiche

Zum Bestimmen von Identitäten und Homologien der Proteinsequenzen von humanen MSH2 und Hefe-Msh2p wurden Sequenzvergleiche mit NCBI BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool) unter Standardeinstellungen durchgeführt (Altschul, Madden et al. 1997). „Identity“ gibt an, zu wieviel Prozent die verglichenen Sequenzen untereinander identisch sind. „Positive“ gibt an, zu wieviel Prozent die Sequenzen homolog zu einander sind. „Gaps“ beschreibt die Anzahl von Lücken zwischen den Sequenzen.

3.6.2 Quantifizierung von Western-Blots

Für die Quantifizierung von Banden auf einem Western-Blot wurde das Programm ImageJ verwendet. Es vergleicht die Bandenintensitäten aufgrund ihrer Signalintensität und Signalbreite untereinander. Um die Signalintensitäten verschiedener Proteine miteinander vergleichen zu können, wurden die GAPDH- bzw. Cpf1p- Ladekontrollen der zu untersuchenden Proteine mit der des zu untersuchenden Wildtyps verglichen (erhöht/niedrig

oder gleich). Bei Coomassie-Gelen wurden einzelne Banden quantifiziert, die mit der Software gut zu detektieren waren. Der daraus resultierende Faktor wurde mit der Signalintensität des zu untersuchenden Proteins verrechnet, um die Proteinmenge in % zu bestimmen. Das wildtypische Protein wurde dabei immer auf 100 % gesetzt.

3.6.2.1 Quantifizierung von yMsh2-Hybriden

Zum Vergleich von endogenem yMsh2p des Wildtyps E134 mit den Hybriden wurde keine Probe mit auf die Gele geladen, da eine Quantifizierung nicht möglich gewesen wäre, da die Signale der Hybride auf dem Blot nach kurzer Exposition im Entwicklungspuffer schon vorhanden waren. Die Detektion von endogenem yMsh2p dauerte wesentlich länger.

3.6.3 *In silico* Analyse von hMSH2-Allelen mit SIFT, PolyPhen2 und MAPP-MMR

Die webbasierten Programme SIFT (**S**orting **I**ntolerant **F**rom **T**olerant, Ng and Henikoff 2001), PolyPhen2 (**P**olymorphism **P**henotyping, Adzhubei, Schmidt et al. 2010) und MAPP-MMR (Chao, Velasquez et al. 2008) treffen die Vorhersage, ob ein Aminosäureaustausch in einem Protein einen Einfluss auf die Proteinfunktion hat. Die Vorhersage basiert auf dem Grad der Konservierung einer Aminosäure zwischen verschiedenen Spezies sowie ihrer chemischer Eigenschaften.

4 Ergebnis

4.1 Funktionelle Analyse von hMSH2 Allelen

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollten neue humanisierte Versionen von Hefe-Msh2p konstruiert werden. Funktionelle yhMsh2-Hybride sollten dann genutzt werden, um die Auswirkung einer humanen MSH2 Mutation auf die Fehlpaarungsreparatur *in vivo* in Hefe zu untersuchen. Weitere funktionelle Analysen der Mutationen im humanen MSH2-Protein sollten anschließend eine Einstufung in funktionelle und nicht-funktionelle Proteinvarianten möglich machen.

4.1.1 Sequenzvergleiche von hMSH2 und Hefe-Msh2p und Konstruktion von yhMsh2-Hybriden

Für das Design neuer Hybride wurde ein Sequenzvergleich von Hefe-Msh2p und hMSH2 mit dem webbasierten Programm NCBI BLAST durchgeführt (Durchführung siehe 3.6.1, S. 78). Die Strategie zur Klonierung von neuen Hybriden verfolgte den Ansatz, sowohl Proteinbereiche mit hoher und mittlerer Konserviertheit als auch teilweise ganze Domänen des humanen MSH2 gegen entsprechende Abschnitte im Hefe-Msh2p Aminosäure-genau auszutauschen. Für die Konstruktion eines Hybrids wurde festgelegt, dass beim Sequenzvergleich die Identität bei mind. 40 % und die Homologie bei mind. 60 % liegen sollte. Die im Folgenden beschriebenen Sequenzvergleiche beider Proteine beginnen am N-Terminus und sind im Anhang unter 6.1, S.158 zu finden.

Zur Konstruktion von yhMsh2-Hybriden wurden die humanen Fragmente mittels homologer Rekombination in *S. cerevisiae* in das 2 μ Hochkopienplasmid pFH1 (trägt das vollständige *yMSH2*-Gen) unter Kontrolle des starken *GAL1*-Promotors kloniert (Details Klonierung siehe 3.2.4.1, S.54)

4.1.1.1 Sequenzvergleich von Aminosäure 1 bis 124

Der Sequenzvergleich von hMSH2 und Hefe-Msh2p ergab, dass der Hefe-N-Terminus von Aminosäure (AS) 14 bis 109 (103 in hMSH2) eine Identität von 38 % sowie Homologie von 55 % zeigte. Aufgrund der festgelegten Grenze für Identität und Homologie (siehe oben) und der nur knapp unterhalb liegenden Werte wurden die Hefe-Aminosäuren 14 bis 109 gegen die humanen Aminosäuren 14 bis 103 ersetzt (Abb. 25, Hybrid yhMsh2_5; Funk 2010). Es zeigte sich zudem, dass 6 Aminosäuren im N-Terminus von Hefe-Msh2p auftreten, die in der hMSH2-Sequenz nicht vorhanden sind (siehe Anhang 6.1). Hierbei handelt es sich um die AS-Positionen 66 und 67 (Aminosäuren NC) und AS-Positionen 80-83 (Aminosäuren PTKY).

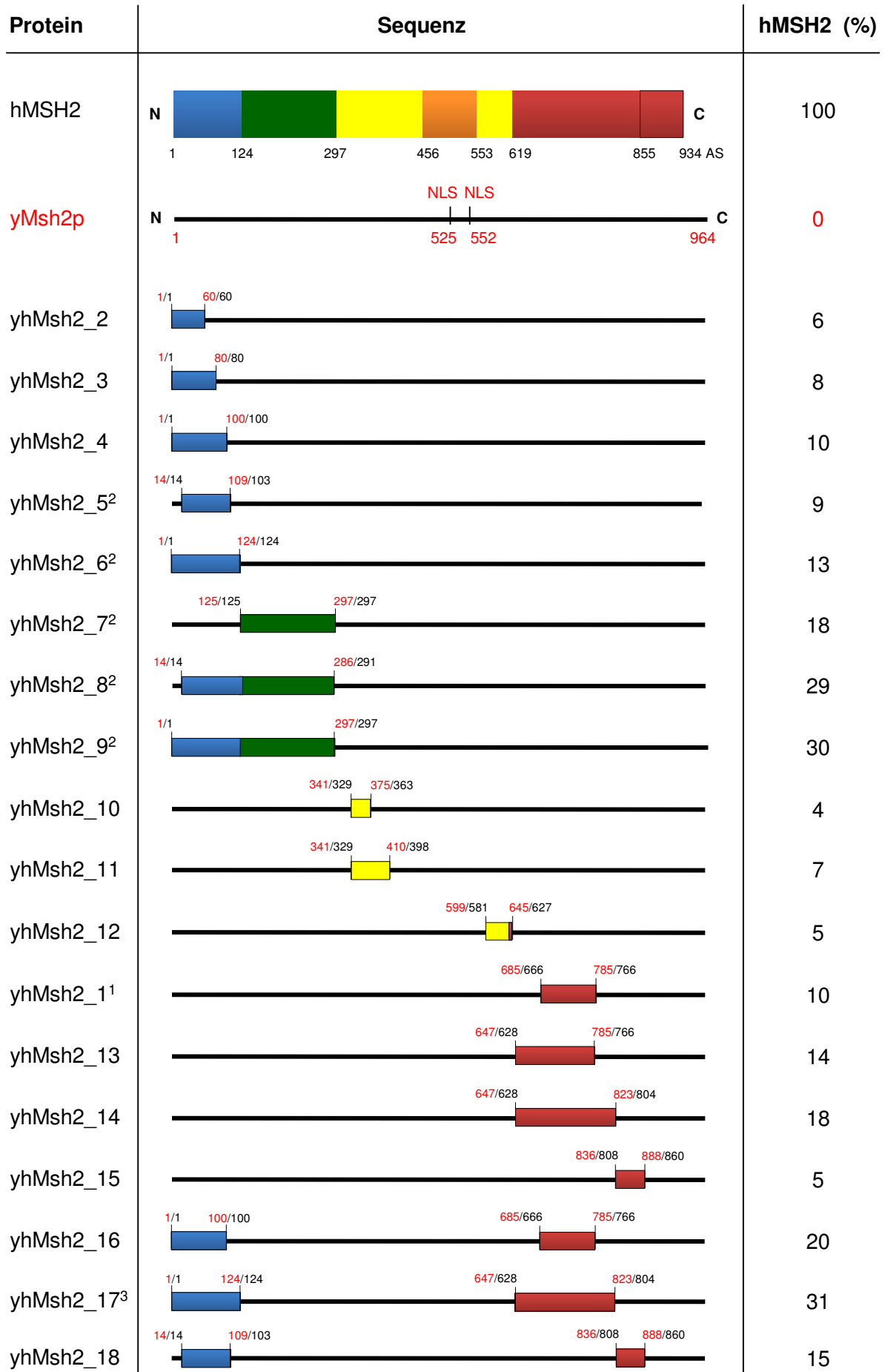


Abb. 25: Übersicht von Hefe-Mensch-Msh2p Hybriden. Die Konstrukte sind nach dem Humanisierungsgrad vom N- bis zum C-Terminus sortiert. Die AS-Zahlen zeigen, welcher Hefe-Abschnitt (Zahl 1, rot) durch den entsprechenden humanen Proteinabschnitt ersetzt wurde (Zahl 2, schwarz). Die Lage der Domänen im humanen MSH2 ist durch entsprechende AS-Zahlen unter der Proteinsequenz angegeben (Details hMSH2 siehe Einleitung, 1.2.3, S. 24). Die genauen Domänenabschnitte von Hefe-Msh2p (yMsh2p) sind nicht bekannt. Die Angabe „hMSH2 (%)“ gibt an, zu wieviel Prozent humane MSH2 AS-Sequenz in den jeweiligen Hybrid-Proteinen vorhanden ist. Die einzelnen Hybride sind genauer im Text beschrieben. NLS = nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal).¹konstruiert in Herbst 2006; ²konstruiert in Funk 2010, ³konstruiert von Benedikt Funk, nicht publiziert. Die Positionen der NLS-Sequenzen sind bei den Hybriden aufgrund der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Aminosäuren eine funktionelle Rolle spielen. Bei der Klonierung des Hybrid yhMsh2_5 wurden diese AS-Positionen aber ignoriert. Zudem ist das klonierte Hybrid 6 Aminosäuren kürzer, was auf die Konstruktion zurückzuführen ist (Details Klonierung für dieses Hybrid siehe 3.2.4.1, Abb. 16, S. 55). Aufgrund fehlender Homologien erscheinen die ersten 13 Aminosäuren nicht im Sequenzvergleich. Um diese ebenfalls für eine *in vivo* Analyse zugänglich zu machen, wurde eine andere Vorgehensweise benutzt. Statt die ersten 13 Hefe-Aminosäuren gegen humane Sequenz zu ersetzen, wurden größere Hefe-Abschnitte 1:1 gegen humane Sequenzen im N-Terminus ausgetauscht. Bei Funktionalität eines dieser Hybride ist eine zu untersuchende Aminosäure somit von einem größeren humanen Kontext als nur 13 Aminosäuren umgeben. So wurden beim Hybrid yhMsh2_2 die ersten 60 Hefe-Msh2p Aminosäuren gegen die entsprechenden ersten 60 Aminosäuren von hMSH2 ersetzt. Dieser Austausch wurde um jeweils 20 (AS 1-80, yhMsh2_3) und 40 Aminosäuren (AS 1-100, yhMsh2_4, Abb. 25) vergrößert. Um eine maximale humane Abdeckung der „Mismatch binding“ Domäne zu erzielen, wurde die komplette humane Domäne (AS 1-124) gegen die Hefe-Msh2p Aminosäuren 1-124 ersetzt (Hybrid yhMsh2_6, Abb. 25, Funk 2010).

4.1.1.2 Sequenzvergleich von Aminosäure 125 bis 297

Um den N-Terminus noch weiter zu humanisieren, wurden sowohl die „Mismatch binding“ als auch die „Connector“ Domäne von hMSH2 (AS 1-297) mit den entsprechenden Hefe-Aminosäurenpositionen verglichen. Hier zeigte sich, dass die AS 14-286 von Hefe-Msh2p im Vergleich zu den humanen Aminosäuren 14-291 eine Identität von 33 % und Homologie von 56% zeigten. Trotz der gesetzten Vorgaben (mind. 40 % Identität, 60 % Homologie) wurden die entsprechenden Aminosäuren ersetzt (Hybrid yhMsh2_8), um die Funktionalität der beiden humanen Domänen in Hefe zu testen (Funk 2010, Abb. 25). Auch hier erscheinen die ersten 13 Aminosäuren aufgrund fehlender Homologien nicht im Sequenzvergleich. Um diese trotzdem zugänglich zu machen, wurde die gesamte humane „Mismatch binding“- und „Connector“- Domäne von AS 1-297 gegen die gleichen Aminosäurepositionen in Hefe-Msh2p ausgetauscht (yhMsh2p_9, Funk 2010). Für den isolierten Austausch der

„Connector“- Domäne wurden die humanen AS 125-297 gegen den Hefe-Abschnitt AS 125-297 ausgetauscht, um das Hybrid yhMsh2_7 zu erstellen (Funk 2010).

4.1.1.3 Sequenzvergleich von Aminosäure 298 bis 600

Größere Abschnitte von hMSH2 und Hefe-Msh2p zeigten in diesem Bereich keine hohe Identität/Homologie, so dass nur kleinere Fragmente von der humanen „lever“ Domäne in Hefe-Msh2p integriert werden konnten. Dies umfasste den Austausch der AS 341 bis 375 des Hefe-Msh2p durch die humanen Aminosäuren 329 bis 363, da hier eine höhere Ähnlichkeit festgestellt wurde (Identität 54 %, Homologie 74 %: yhMsh2_10). Eine verlängerte Variante dieses Hybrids ist das Konstrukt yhMsh2_11, bei dem die Hefe-Msh2p Aminosäuren 341 bis 410 gegen die humanen Aminosäuren 329 bis 398 ersetzt wurden. Diese beiden Proteinabschnitte zeigten allerdings eine niedrigere Ähnlichkeit (Identität: 44 %, Homologie: 64 %).

Der Bereich AS 500 bis 600 in Hefe-Msh2p wurde nicht bearbeitet, da sich hier Kernlokalisierungssignale (nuclear localization signal = NLS) an den Positionen AS 525-531 und AS 552-556 befinden (genaue AS-Sequenz der NLS-Sequenzen siehe 6.2, S. 161). Während humanes MSH2 keine bekannte NLS aufweist, haben die NLS-Sequenzen in Hefe-Msh2p einen erheblichen Einfluss auf den Kernimport und sollten daher in den yhMsh2-Hybriden erhalten bleiben (Hayes, Sevi et al. 2009).

Weitere Sequenzvergleiche im C-Terminus zeigten, dass die AS 599 bis 645 von Hefe-Msh2p mit den humanen AS 581 bis 627 eine Identität 48 % und Homologie 68 % aufwiesen. Aufgrund der hohen Homologie und Identität wurde der Hefe-Abschnitt durch den entsprechenden humanen Abschnitt ersetzt (Hybrid yhMsh_12).

4.1.1.4 Sequenzvergleich der Aminosäuren 600 bis 964 (bzw. 934 bei hMSH2)

Wie in der Einleitung beschrieben, findet sich die höchste Identität (86 %) und Homologie (94 %) zwischen den humanen AS 666-766 und Hefe AS 685-785. Diese Abschnitte wurden ausgetauscht, um das Hybrid yhMsh2_1 zu konstruieren (Herbst 2006). Aufgrund der hohen Konservierung des C-Terminus war zu erwarten, dass auch der Austausch von größeren Hefe-Abschnitten durch humane Sequenzen erfolgreich sein könnte. Ausgehend von yhMsh2_1 wurde daher der humane Abschnitt N-terminal verlängert (humane AS 628-766 gegen Hefe AS 647-785 – Identität 76 %, Homologie 86%, Hybrid yhMsh2_13). Ausgehend von yhMsh2_13 wurde dann der humane Abschnitt C-terminal erweitert (humane AS 628-804 gegen Hefe AS 647-823 – Identität: 73 %, Homologie 85, Hybrid yhMsh2_14). Ein

weiterer gut konservierter Bereich fand sich zwischen den humanen AS 808-860 und Hefe AS 836-888 (Identität 47 %, Homologie 75 %: Hybrid yhMsh2_15).

In hMSH2 ist im Bereich von AS 856 bis 934 ein Helix-turn-Helix Motiv lokalisiert, welches für die Interaktion mit hMSH3 und hMSH6 benötigt wird (Guerrette, Wilson et al. 1998, Warren, Pohlhaus et al. 2007). Es kann angenommen werden, dass sich in Hefe-Msh2p ein ähnliches Motiv befindet, was für die Interaktion mit den Komplexpartnern Hefe-Msh3p/Msh6p eine Rolle spielt. Deshalb wurde auf eine Humanisierung gegen Ende des C-Terminus verzichtet. Um eine größere Humanisierung von Hefe-Msh2p zu erreichen, wurden später verschiedene funktionelle Hybride kombiniert. So sollte geprüft werden, ob die Integration von mehreren humanen Sequenzen an verschiedenen Positionen in Hefe-Msh2p ein funktionelles Hybrid erzeugt. Dies führte zu den Hybriden yhMsh2_16, _17 und _18 (siehe Abb. 25).

Insgesamt wurden 18 Hybride konstruiert. Hiervon decken 8 Hybride die N-terminale „Humanisierung“ von Hefe-Msh2p ab. Jeweils 3 Konstrukte sind mittig, 4 hingegen im C-terminalen Bereich humanisiert. Ebenso decken 3 Konstrukte verschiedene Kombinationen von N- und C-terminalen Hybriden ab. Insgesamt wird die humane MSH2 Sequenz durch die Hybride zu 68 % abgedeckt, was bei Funktionsfähigkeit aller Hybride eine Analyse von theoretisch 635 humanen AS-Positionen ermöglicht.

4.1.1.5 Funktioneller Test der Fehlpaarungsreparaturaktivität der konstruierten Hefe-Mensch-Msh2 Hybriden

Nach der Plasmid-basierten Konstruktion der verschiedenen Hybride sollten diese in einer ersten Analyse qualitativ auf Funktionalität getestet werden. Alle Hybride lagen bei dieser Analyse Plasmid-bedingt in hoher Expression vor. Vorteil der Analyse vom Plasmid ist zum einen die schnelle Konstruktion als auch Transformation eines Hybrids in Hefe für die Funktionsanalyse. Für letzteres wurden die Konstrukte in den $\Delta msh2$ Stamm Dag60 transformiert, welcher das genomisch integrierte *lys2_{A14}*-Reportersystem trägt. Durch eine 14 A=T Basenpaar-tragende Insertion im *lys2*-Gen ist Dag60 auxotroph für die Aminosäure Lysin, da sich das Gen nicht im Leserahmen befindet (siehe Abb. 11, S. 32). Aufgrund der *yMSH2* Deletion ist der Stamm nicht in der Lage, auftretende Replikationsfehler an diesem AT-Homooligomer zu beheben, was in dem Verlust von einem AT-Basenpaar und somit zu einer Reversion zu Lysin-Prototrophie resultieren kann (Durchführung siehe 3.2.5, S 55).

Bevor eine statistisch signifikante Bestimmung der Funktionalität der verschiedenen Konstrukte vorgenommen wurde, wurden von jedem Hybrid vier Klone qualitativ auf ihre Funktionalität hin untersucht. Hybride, die nicht in der Lage waren, die $\Delta msh2$ Defizienz des Stamms zu komplementieren, zeigten eine ähnliche starke Revertanzahl wie die

Konstrukt (in $\Delta msh2$ Stamm)	Plasmid	funktionell?	Konstrukt (in $\Delta msh2$ Stamm)	Plasmid	funktionell?
Kontrolle (pFH3)	#1287	Nein	yhMsh2_10	#2184	Nein
WT-yMsh2p (pFH1)	#1285	Ja	yhMsh2_11	#1851	Nein
yhMsh2_2	#1633	Ja	yhMsh2_12	#1849	Nein
yhMsh2_3	#1634	Ja	yhMsh2_1	#1286	Ja
yhMsh2_4	#1635	Ja	yhMsh2_13	#1637	Ja
yhMsh2_5	#1830	Ja	yhMsh2_14	#1853	Ja
yhMsh2_6	#1827	Ja	yhMsh2_15	#1854	Ja
yhMsh2_7	#1828	Nein	yhMsh2_16	#1636	Ja
yhMsh2_8	#1831	Nein	yhMsh2_17	#2213	Ja
yhMsh2_9	#1829	Nein	yhMsh2_18	#2212	Nein

Tab. 2: Ergebnis der qualitativen Analyse der konstruierten Hefe-Mensch-Msh2 Hybride. 11 von 18 Hybriden zeigten Funktionalität in einem $\Delta msh2$ Stamm. Die Klassifizierung der Funktionalität erlaubt noch keine Aussage über deren Grad.

Leervektorkontrolle pFH3. Bei funktionellen Konstrukten entsprach die Anzahl der Revertanten typischerweise der des wildtypischen Hefe-Msh2p (Vektor pFH1).

Der $\Delta msh2$ Stamm mit pFH3 zeigte erwartungsgemäß keine Funktionalität, was sich in einer hohen Revertanzahl reflektierte. Durch Transformation mit pFH1 ging die Anzahl der Revertanten dagegen stark zurück. Für die Hybride des N-Terminus yhMsh2_2 bis yhMsh2_6 zeigte sich Funktionalität (Tab. 2). Das Hybrid yhMsh2_1 zeigte erwartungsgemäß ebenfalls eine Komplementation der $\Delta msh2$ Deletion, was frühere Daten bestätigt (Herbst 2006). Ebenso konnte Funktionalität bei den Hybriden yhMsh2_13 bis yhMsh2_17 beobachtet werden, wohingegen bei den Konstrukten yhMsh2_7 bis yhMsh2_12 sowie yhMsh2_18 keine Funktionalität festgestellt wurde. Somit zeigten von 18 konstruierten Hybriden 11 qualitativ eine Komplementation des $\Delta msh2$ Stamms. Bei den 7 nicht-funktionellen Konstrukten ist es möglich, dass entweder wichtige funktionelle Motive durch die „Humanisierung“ von Hefe-Msh2p verloren gegangen sind oder dass die Struktur/Allosterie eines Hybridproteins oder sogar die Expression verändert ist.

4.1.1.6 Proteinmengenbestimmung der untersuchten Hybriden

Im nächsten Schritt wurden die Proteinmengen der verschiedenen Konstrukte untersucht. So sollte getestet werden, ob die Nichtfunktionalität eines Hybridproteins auf eine veränderte Proteinmenge zurückzuführen ist.

Da alle Konstrukte von einem 2 μ Hochkopienplasmid mit starkem *GAL1*-Promotor exprimiert wurden (Plasmid pFH1: alle Hybride basieren auf diesem Plasmid), wurde vorab geprüft, wie hoch die Proteinexpression ist. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe von Proteinextrakten des $\Delta msh2$ - und Wildtyp-Stamms durchgeführt, die beide vom Plasmid pFH1 das

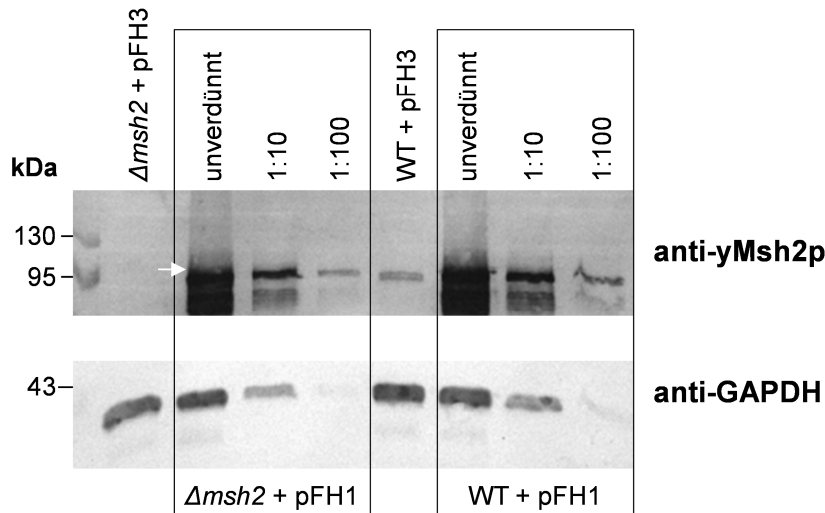


Abb. 26: Kinetik zur Bestimmung der Überexpressionsmenge von Plasmid-basiertem Hefe-Msh2p (yMsh2p). Der $\Delta msh2$ Stamm sowie der isogene Wildtyp (WT) wurden sowohl mit der Leervektorkontrolle pFH3 als auch dem Plasmid pFH1 (*yMSH2*) transformiert. Für die Analyse wurden unverdünnte Proben (10 μ g) einer lysierten Kultur von OD 1 als auch 2 Verdünnungen (1:10 und 1:100) auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Details siehe Text. kDa = Kilodalton. Weißer Pfeil = yMsh2p Bande (theor. Gewicht 109 kDa). GAPDH = Ladekontrolle (36 kDa). Die Membran wurde unterhalb von 95 kDa geteilt und jeweils mit anti-yMsh2p (sek. Anti-Hase) und anti-GAPDH (sek. Anti-Maus) inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte wie unter 3.6.2 (S. 78) beschrieben.

wildtypische Hefe-Msh2p exprimieren (Abb. 26). Als Kontrolle diente der Wildtypstamm, welcher mit dem Leervektor pFH3 transformiert wurde.

Die Detektion von WT-Hefe-Msh2p vom Plasmid pFH1 zeigte eine Hauptbande, die bei ca. 100 kDa zu detektieren war, gefolgt von einem Schmier unterhalb von 95 kDa, vermutlich Abbaubanden von Hefe-Msh2p. Die Quantifizierung der Hauptbande ergab, dass die Proteinmenge bei Plasmid-basierter Expression im $\Delta msh2$ Stamm um den Faktor 76 höher lag als die endogene Wildtypsituation. Im Gegensatz dazu war die Menge von Hefe-Msh2p bei Plasmid-basierter Expression im Wildtyp-Stamm 130fach höher. Dies entspricht einer Erniedrigung im Deletionsstamm gegenüber dem Wildtypstamm um den Faktor 1.3. Also sollten Plasmid-basierte Hybride, die eine ähnliche Proteinmenge wie WT-Hefe-Msh2p im $\Delta msh2$ Stamm aufweisen, ca. 76mal höher exprimiert werden als endogenes Hefe-Msh2p.

Die anschließende Proteinmengenbestimmung aller Hybride erfolgte erneut mit dem Anti-Hefe-Msh2p Antikörper, dessen Antigen das Volllängenprotein war. Das Hybrid yhMsh2_2 wies nur 7 % der wildtypischen Hefe-Msh2p-Hauptbande auf (Abb. 27). Die Hybride yhMsh2_3 und yhMsh2_4 zeigten eine noch niedrigere Menge von jeweils 1%. Im Gegensatz dazu zeigte yhMsh2_5 eine Menge von jeweils 62 %, wohingegen yhMsh2_6 mit 9 % gegenüber dem Wildtyp bestimmt wurde. Im Gegensatz zu den Hybriden yhMsh2_2 bis _4 sowie yhMsh2_6 sind bei yhMsh2_5 die ersten 13 Aminosäuren von Hefe-Msh2p erhalten geblieben. Dies resultiert in einer höheren Proteinmenge von 62 %. Bei allen Hybriden von yhMsh2_2 bis _6 wurde der N-Terminus „humanisiert“ und im Western-Blot tritt bei genau diesen Hybriden eine zusätzliche Bande auf, die etwas unter der eigentlichen yhMsh2 Bande

zu detektieren war. Für yhMsh_3 und yhMsh2_4 ist die Bandenintensität dieser neuen Bande ca. 10mal höher als die eigentliche yhMsh2 Bande. Hingegen ist sie bei yhMsh2_2, yhMsh2_5 und yhMsh2_6 gleich intensiv wie die höher laufende Hybridbande. Vermutlich handelt es sich hier um eine Abbaubande, die spezifisch für diese Konstrukte auftritt. Für die Quantifizierung wurde nur die eigentliche yhMsh2-Hauptbande herangezogen.

Das Hybrid yhMsh2_7 zeigte eine Proteinmenge von 32 %. Durch die N-terminale Erweiterung bei yhMsh2_8 reduziert sich die Menge auf 7 %. Hingegen konnte bei yhMsh2_9, welches die komplette humane „Mismatch binding“ und „Connector“ Domäne umfasst, eine nur wenig verringerte Expression von 61% gegenüber Hefe-Msh2p gemessen werden.

Die Hybride yhMsh2_10 bis yhMsh2_12, die im mittleren Teil von Hefe-Msh2p nur geringfügig humanisiert wurden, zeigten im Vergleich zu N-terminal humanisierten Bereichen ein ganz anderes Bild. Die Proteinmenge dieser Konstrukte lag hier deutlich höher mit 54 % (yhMsh2_11) und 73 % (yhMsh2_10 und yhMsh2_12).

Die in der ATPase-Domäne humanisierten Bereiche von yhMsh2_1, yMsh2_13 und yhMsh14 zeigten eine Reduktion der Proteinmenge auf 34% (yhMsh2_1 und 13) und 45% (yhMsh2_14). Interessanterweise wies das Hybrid yhMsh2_15 als einziges im Vergleich zu Hefe-Msh2p und allen anderen Hybriden eine Erhöhung um 263% auf.

Die Kombination von N-terminal und C-terminal humanisierten Bereichen in den Hybriden yhMsh2_16 und yhMsh17 lagen hingegen wieder bei jeweils 23% und 10%. Das Hybrid yhMsh2_18 zeigte schließlich eine wildtypische Proteinmenge. Hier trat wieder, bedingt durch die N-terminale „Humanisierung“, eine zweite Bande unterhalb der eigentlichen Hybridbande auf.

Zusammenfassend zeigte sich, dass von 18 untersuchten Hybriden nur ein Hybrid eine höhere Proteinmenge als wildtypisches Hefe-Msh2p vom Plasmid pFH1 aufwies (Tab. 3). Ein weiteres Hybrid zeigte wildtypische Proteinmengen. Bei 4 Konstrukten wurde eine Menge von 50 % - 100 % detektiert, wohingegen 7 Hybride weniger als 50 % des Wildtyps aufwiesen. Weniger als 10 % Proteinmenge konnte dagegen bei 5 Konstrukten gemessen. Der größte Einfluss der „Humanisierung“ auf die Proteinmenge konnte bei Hybriden mit N-terminalen humanen MSH2-Sequenzen festgestellt werden, da hier die Expression/Stabilität erheblich verändert ist, während andere Hybride weniger stark davon betroffen sind.

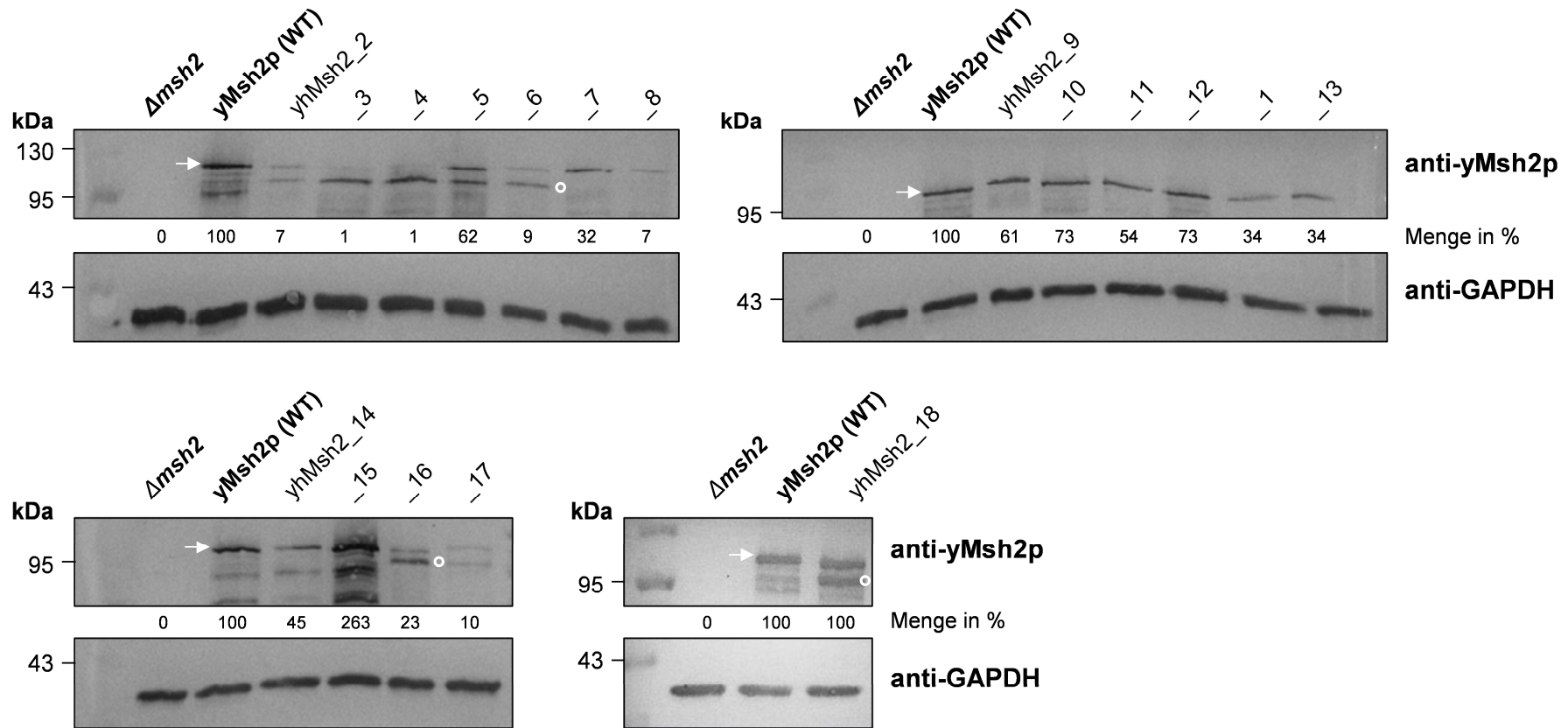


Abb. 27: Proteinmengenbestimmung der Hefe-Mensch-Msh2 Hybride. Die Proteinmengen der Hybride unterscheiden sich teilweise erheblich von wildtypischem Hefe-Msh2p (yMsh2p). Wildtypisches Hefe-Msh2p wurde als Referenzwert auf 100 % gesetzt. Es wurden 10 µg Zellextrakt einer Kultur von OD 1 auf ein 10 %iges SDS-Gel geladen. kDa = Kilodalton, GAPDH (36 kDa) = Ladekontrolle, weißer Pfeil = yMshp2 (theor. Gewicht 109 kDa) bzw. yhMsh2 Bande, weißer Kreis = markiert die zusätzlich auftretende Bande bei N-terminal humanisierten Hefe-Msh2p (yhMsh2_2 bis _6, yhMsh2_16 und _18). Die Membranen wurde mit den in Abb. 26 beschriebenen Antikörpern inkubiert. „Menge in %“ bezieht sich auf yhMsh2p (WT). Die Quantifizierung der Banden erfolgte wie unter 3.6.2 beschrieben.

A)	B)	C)	D)	E)
Hybrid	Menge in %	Intervall	Faktor ggü. yMsh2p-WT (Plasmid)	Faktor erhöht ggü. yMsh2p-WT (endogen)
yhMsh2_15	263	> 100	2,6 ↑	198
yMsh2p-WT	100	= 100	1 =	76
yMsh2_18	100		1 =	76
yhMsh2_10	73	< 100	1,3 ↓	58
yhMsh2_12	73		1,3 ↓	58
yhMsh2_5	62		1,6 ↓	47
yhMsh2_9	61		1,6 ↓	47
yhMsh2_11	54		1,8 ↓	42
yhMsh2_14	45	< 50	2,2 ↓	34
yhMsh2_1	34		2,9 ↓	26
yhMsh2_13	34		2,9 ↓	26
yhMsh2_7	32		3,1 ↓	24
yhMsh2_16	23		4,3 ↓	17
yhMsh2_17	10		10 ↓	7,6
yhMsh2_6	9	< 10	11,1 ↓	6,8
yhMsh2_2	7		14,2 ↓	5,3
yhMsh2_8	7		14,2 ↓	5,3
yhMsh2_3	1		100 ↓	0,76
yhMsh2_4	1		100 ↓	0,76
Kontrolle	0	= 0	0	0

Tab. 3: Übersicht der Proteinmengen von yMsh2 Hybriden. Diese wurden nach der gemessenen Proteinmenge sortiert (angegeben in Spalte B). A) untersuchtes Hybrid. B) Proteinmenge im Vergleich zu Hefe-Msh2p-WT (graue Spalte). C) Basierend auf der Quantifizierung des Msh2-Signals aus Abb. 27 wurden die Messwerte der Proteinmenge nach folgenden Kriterien sortiert: mehr als 100 % (> 100), Wildtypniveau (= 100), weniger als 100 % (< 100), weniger als 50 % (< 50), weniger als 10 % (< 10), 0 % (= 0). D) Faktor erhöht (↑), erniedrigt (↓) oder unverändert (=) gegenüber Hefe-Msh2p-WT (Plasmid-basiert). E) Der Faktor gegenüber Hefe-Msh2p-WT (Plasmid-basiert) wurde mit dem Faktor 76 verrechnet (siehe Abb. 26), um den Faktor gegenüber endogenen Hefe-Msh2p zu bestimmen, um den die Hybride erhöht sind. ggü. = gegenüber

4.1.1.7 Quantitative Analyse der funktionellen Hefe-Mensch-Msh2

Hybride

Als nächstes wurde in einem quantitativen Ansatz die Funktionalität der zuvor als qualitativ funktionell eingestuft Konstrukte im $\Delta msh2$ Stamm bestimmt. Hierfür wurden jeweils 12 bis 16 Klone pro Hybrid untersucht, um eine anschließende Auswertung nach Lea & Coulson vorzunehmen (Durchführung siehe 3.2.5.1.1, S. 56). Als Kontrolle wurde der $\Delta msh2$ Stamm jeweils sowohl mit der Leervektorkontrolle pFH3 als auch mit dem WT-yMsh2 kodierendem Plasmid pFH1 transformiert. Alle untersuchten Konstrukte wurden vom 2μ Hochkopienplasmid unter Kontrolle des GAL1-Promotors exprimiert.

Die Mutationsrate des $\Delta msh2$ -Stamms wurde mit 4.7×10^{-3} bestimmt. Wird in diesem Stamm wildtypisches yMsh2p vom Plasmid pFH1 exprimiert, sinkt die Mutationsrate auf $1,8 \times 10^{-7}$. Dies entspricht einer Erniedrigung der Mutationsrate um den Faktor 26.000 (Tab. 4). Die

Konstrukt (in $\Delta msh2$ Stamm)	Plasmid	Mutations- rate	95% Konfidenzintervall		Faktor erhöht ggü. yMsh2p
			obere Grenze	untere Grenze	
Kontrolle (pFH3)	#1287	$4,7 \times 10^{-3}$	$6,1 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$	26.000
yMsh2p (pFH1)	#1285	$1,8 \times 10^{-7}$	$2,6 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-7}$	1
yhMsh2_2	#1633	$1,6 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-6}$	9
yhMsh2_3	#1634	$2,0 \times 10^{-6}$	$2,3 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-6}$	11
yhMsh2_4	#1635	$2,5 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-6}$	14
yhMsh2_5 ^{1,2}	#1830	$2,0 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-6}$	11
yhMsh2_6 ¹	#1827	$8,7 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-6}$	$6,7 \times 10^{-7}$	5
yhMsh2_1 ³	#1286	$1,2 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-7}$	1
yhMsh2_13	#1637	$2,1 \times 10^{-7}$	$3,8 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-7}$	1
yhMsh2_14	#1853	$1,3 \times 10^{-7}$	$5,7 \times 10^{-7}$	4×10^{-8}	1
yhMsh2_15	#1845	$2,5 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$	138
yhMsh2_16	#1636	$2,8 \times 10^{-6}$	$4,6 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	16
yhMsh2_17	#2213	$4,4 \times 10^{-6}$	$5,5 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-6}$	24

Tab. 4: Ergebnis der quantitativen Analyse von Hefe-Mensch-Msh2 Hybriden. Angegeben sind die Mutationsrate, das 95% Konfidenzintervall sowie der Faktor, um die die Mutationsrate eines Konstruktes gegenüber WT-yMsh2p erhöht ist (ausgehend von der Mutationsrate). Mutationsraten und Konfidenzintervalle wurden mit FALCOR bestimmt, siehe 3.2.5.1.1 (S. 56). ¹konstruiert in Diplomarbeit B. Funk, 2010. ²Messung dieses Hybrids wurde in dieser Arbeit durchgeführt. ³konstruiert und gemessen in Diplomarbeit F. Herbst, 2006 sowie in dieser Arbeit. ggü. = gegenüber

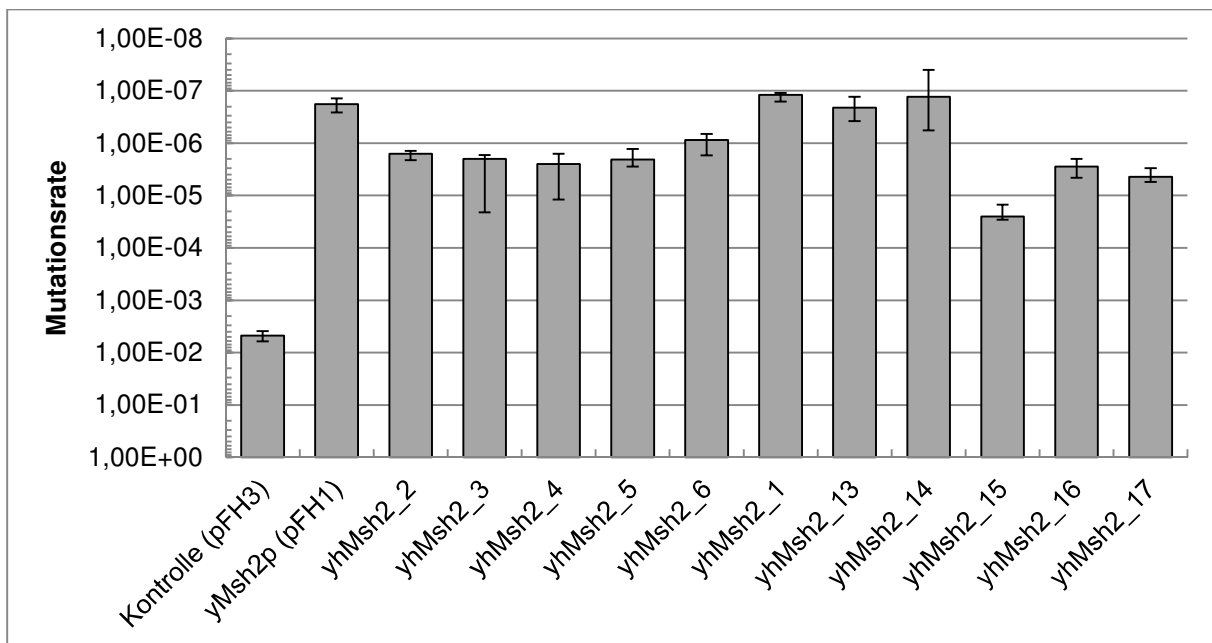


Abb. 28: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse von Hefe-Mensch-MSH2 Hybriden. Dargestellt sind die Mutationsrate sowie das Konfidenzintervall (95%) für jedes Konstrukt. Die Konfidenzintervalle der Mutationsraten von yhMsh2_2 bis _6, sowie yhMsh2_15 bis _17 überschneiden sich nicht zum WT-yMsh2p, so dass der Unterschied signifikant ist (bestimmt mit FALCOR, siehe 3.2.5.1.1, S. 56).

starke Überexpression von Hefe-Msh2p hat keinen negativen Einfluss auf die Fehlpaarungsreparatureffizienz. Dies zeigt die Expression in einem Wildtyp-Hefestamm ($1,1 \times 10^{-7}$ im Vergleich zu WT mit Leervektor: $3,0 \times 10^{-7}$, Herbst 2006). Die Hybride yhMsh2_2 und yhMsh2_3 zeigten eine Mutationsrate von $1,6 \times 10^{-6}$ und $2,0 \times 10^{-6}$, was einer Erhöhung um den Faktor 9 und 11 entspricht. Ein ähnliches Bild zeigte sich für yhMsh2_4 und yhMsh2_5 mit einer Mutationsrate von $2,5 \times 10^{-6}$ sowie $2,0 \times 10^{-6}$, was einer Erhöhung um den Faktor 14 bzw. 11 entspricht. Hingegen konnte beim Hybrid yhMsh2_6, welches die größte humane Abdeckung im N-Terminus besitzt, eine Mutationsrate von $8,7 \times 10^{-7}$ gemessen werden, welche also lediglich um den Faktor 5 im Vergleich zu WT-Hefe-Msh2p erhöht war.

Die Hybride des C-Terminus yhMsh2_1, yhMsh2_13 und yhMsh2_14 zeigten eine wildtypische Mutationsrate (entspricht Faktor 1). Im Gegensatz dazu zeigte sich beim Hybrid yhMsh2_15 eine erhöhte Mutationsrate von $2,5 \times 10^{-5}$, was einer Erhöhung um den Faktor 138 entspricht. Eine ebenfalls erhöhte Mutationsrate zeigten die Hybride yhMsh2_16 und yhMsh2_17 von jeweils $2,8 \times 10^{-6}$ und $4,4 \times 10^{-6}$, was einer Erhöhung um den Faktor 16 und 24 entspricht.

Von insgesamt 11 funktionellen Hybriden zeigten die 3 in der ATPase-Domäne humanisierten Konstrukte eine wildtypische Mutationsrate. Die hier ausgetauschten Proteinabschnitte zeigten beim Sequenzvergleich auch die höchste Identität und Homologie, was die Funktionsfähigkeit erklären mag. Alle 5 N-terminalen Hybride zeigten eine leichte Erhöhung der Mutationsrate um den Faktor 5 bis 14. Auch zwei kombinierte Hybride des N-Terminus und der ATPase-Domäne waren leicht um den Faktor 16-24 erhöht (verglichen zu Faktor 26.000 von $\Delta msh2$ mit Leervektorkontrolle), so dass die N-terminalen humanen Anteile einen leichten Einfluss auf die Funktion haben könnten. Ein Hybrid mit einem weiter C-terminal liegenden humanisierten Bereich der ATPase-Domäne war trotz einer hohen Identität und Homologie um den Faktor 138 erhöht. Alle Hybride können somit genutzt werden, um unklassifizierte hMSH2-Allele funktionell zu charakterisieren. Selbst Hybride, bei denen die Mutationsrate im Schnitt um den Faktor 10 oder 100 erhöht ist, bieten immer noch ein Analysefenster um den Faktor 100 bis 1000 für eine Funktionsanalyse.

4.1.1.8 Analyse von yMsh2p_1 unter endogenen Bedingungen

Die Funktionalität der Hybride wurde bisher bei starker Proteinexpression untersucht, was möglicherweise einen Einfluss auf die *in vivo* Aktivität eines Hybrids haben könnte. Um dies zu untersuchen, sollten ausgewählte Hybridgene ins Genom integriert und deren Funktionalität unter endogenen Bedingungen getestet werden. Im Gegensatz zu Plasmid-basierter Expression mit *GAL1*-Promotor ist der Vorteil der endogenen Expression, dass ein Hybridgen in den regulären chromosomalen *yMSH2*-Lokus integriert wird und somit unter Kontrolle des eigenen *yMSH2*-Promotors steht. Zudem liegt das chromosomal integrierte

Hybridgen im Vergleich zu einem Hochkopienplasmid nur noch in einer Kopie vor. Hybridproteine werden also unter gleichen Bedingungen wie wildtypisches endogenes yMsh2p exprimiert, was dann die Aussagekraft der folgenden Funktionsanalyse signifikant erhöht. Als erstes wurde das funktionelle Hybrid *yhMSH2_1* genomisch integriert, da aufgrund der höchsten Identität und Homologie angenommen werden konnte, dass das Hybrid auch unter endogenen Bedingungen funktionell ist.

Bei der genomischen Integration des Hybridgens mussten viele Aspekte beachtet werden, um den enormen Arbeitsaufwand effizient aber auch ebenso durchdacht durchzuführen. Genomisches *yMSH2* trennt ein 121bp langes 3'UTR von dem benachbarten Gen *HAL9* (HALotolerance), welches bei Deletion zu einer erniedrigten Toleranz gegen Salze führt (Abb. 29A, Mendizabal, Rios et al. 1998). Bei der Integration des *yhMSH2_1* Gens sollten 30 bp dieses 3'-UTR Bereiches vom chromosomalen *yMSH2* erhalten bleiben, um den Locus nicht zu sehr zu verändern. So sollte weiterhin eine effiziente Expression von Hefe-Msh2p ermöglicht werden.

Die Integration der humanen Sequenz erfolgte durch homologe Rekombination mit einer *kanMX*-Selektionsmarker-Kassette in den *yMSH2*-Locus des Stamms E134. Die Selektionskassette wurde dabei, wie oben beschrieben, so integriert, dass 30 bp vom 3' UTR des *yMSH2* erhalten bleiben (Stamm yB8, Abb. 29D; Schema der Konstruktion siehe 3.3.5.5, S. 69). Das 3'-Ende der *kanMX*-Kassette wurde dabei genau 5' vor *HAL9* integriert. Der theoretisch mögliche Einfluss der Konstruktion auf *HAL9* wurde vernachlässigt, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Teil der Sequenz von *HAL9* Einfluss auf die Termination von *yMSH2* nimmt. Als Kontrollstamm wurde die *kanMX*-Kassette alleine 3' liegend von *yMSH2* in E134 integriert (yB7, Abb. 29C). So sollte der alleinige Einfluss der *kanMX*-Kassette auf die Expression und somit Funktionalität von *yMSH2* untersucht werden. Die fertigen Stämme wurden nach der Sequenzierung des Integrationsortes, ebenso wie die Kontrollstämme Dag60 ($\Delta msh2$) und E134 (Wildtyp), anschließend mit dem Leervektor pFH3 transformiert und mit Hilfe des *lys2_{A14}*-Reportersystems auf Funktionalität quantifiziert. Der humanisierte Stamm sollte somit unter den gleichen Bedingungen wie die Plasmid-basierte Version von *yhMSH2_1* untersucht werden.

Die Mutationsrate des Kontrollstamms yB7 lag bei $6,1 \times 10^{-7}$, was einer Erhöhung um den Faktor 2 gegenüber dem Wildtyp E134 entspricht (Tab. 5, Abb. 30). Der Stamm yB8 zeigte eine Mutationsrate von $6,4 \times 10^{-7}$ und ist somit gegenüber dem Kontrollstamm yB7 nicht erhöht. Das unter endogenen Bedingungen getestete Hybrid *yhMsh2_1* ist somit voll funktionell.

Die Proteinmenge von Hefe-Msh2p in yB7 lag bei 83 % im Vergleich zu E134 (Abb. 31). Ein leichter Einfluss der *kanMX*-Kassette auf die yMsh2p Expression ist somit möglicherweise vorhanden. Das Hybrid *yhMsh2p_1* in yB8 zeigte eine Proteinmenge von 39 % gegenüber

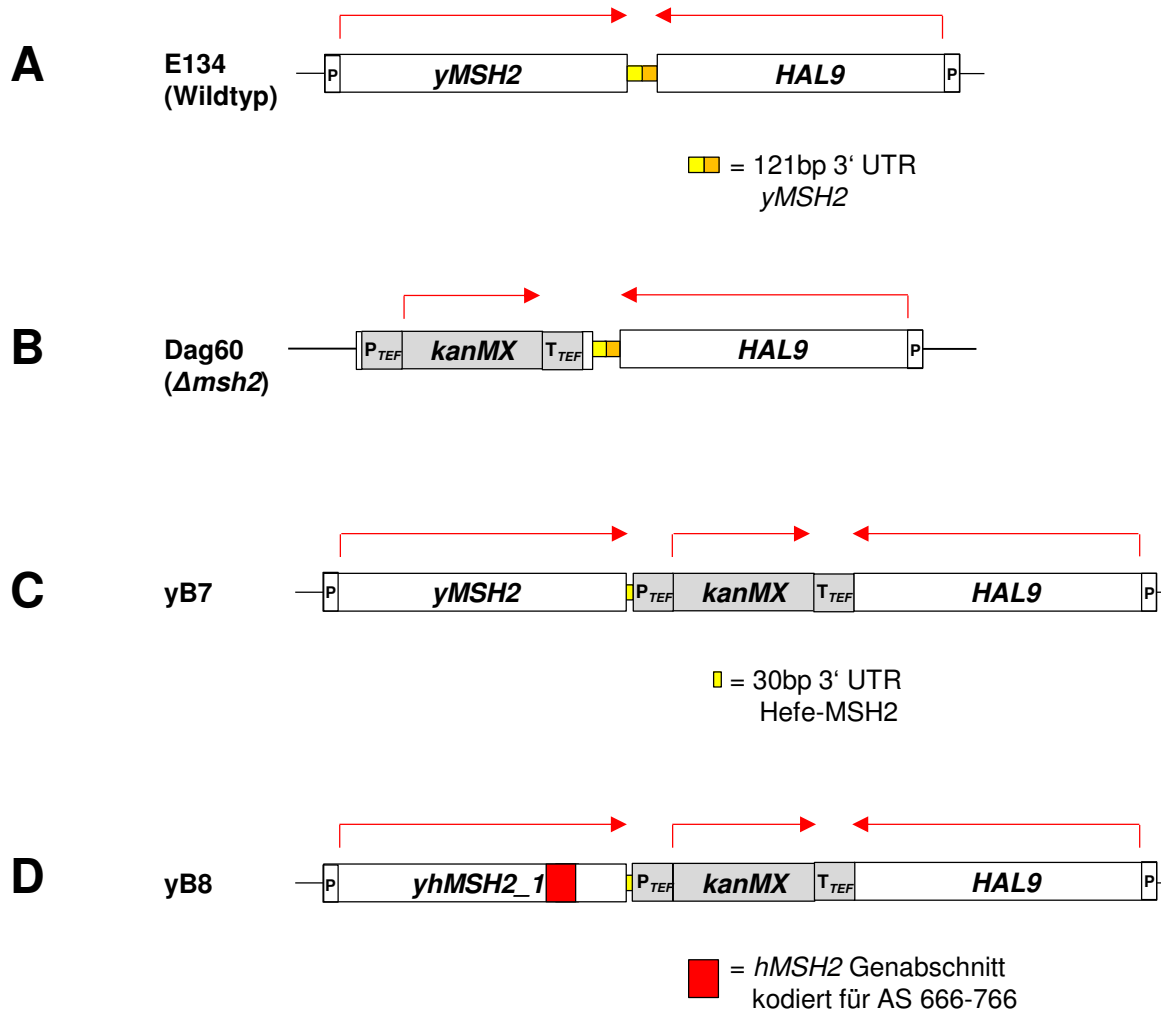


Abb. 29: Überblick über die genomischen *yMSH2* Loci von E134, Dag60, yB7 und yB8. A) Wildtypstamm E134. Zwischen *yMSH2* und *HAL9* liegt ein 121 bp untranslatierter Bereich (UTR). B) Deletionsstamm Dag60. Die Deletion von *yMSH2* durch eine *kanMX*-Kassette lässt 41 bp 5' und 96 bp 3' von *yMSH2* zurück (Clark, Cook et al. 1999). C) Kontrollstamm yB7 für yB8. Die Integration einer *kanMX*-Kassette in E134 3' von *yMSH2* verkürzt die 3' UTR auf 30 bp. D) Hybridstamm yB8. Dieser Stamm trägt die humanisierte Version *yhMSH2_1*, bei der die *yMsh2p* AS 685-785 gegen die *hMSH2* AS 666-766 in E134 ausgetauscht wurden. Die roten Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. Um sicherzustellen, dass die Integration korrekt vorgenommen wurde, wurden die 5'-3' Übergänge zwischen dem Hybridgen, *kanMX*-Kassette sowie *HAL9* per PCR überprüft. Zusätzlich wurde das integrierte humane Fragment sequenziert, um Fehler in der Sequenz auszuschließen. Nur die grau unterlegte *kanMX*-Kassette ist heterolog. P = Gen-eigener Promotor. P_{TEF} = *TEF2* Promotor aus *Ashbya gossypii*, T_{TEF} = Terminator aus *A. gossypii*.

yB7, was einer Reduzierung um den Faktor 2,5 entspricht. Somit kann trotz einer geringen Erhöhung der Mutationsrate und einer erniedrigten Proteinmenge das Hybrid *yhMsh2_1* als funktionell eingestuft werden. Es kann somit auch unter endogenen Bedingungen genutzt werden, um „Missense“-Mutationen des entsprechenden Bereiches des humanen *MSH2* Gens zu analysieren.

Stamm	Mutationsrate	95% Konfidenzintervall		Faktor erhöht gegenüber E134
		obere Grenze	untere Grenze	
Dag60	$4,7 \times 10^{-3}$	$6,1 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$	15000
E134	$3,1 \times 10^{-7}$	$3,7 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-7}$	1
yB7	$6,1 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-7}$	2
Faktor erhöht gegenüber yB7				
yB8	$6,4 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-7}$	1

Tab. 5: Ergebnis der quantitativen Analyse des Hybridstamms yB8.

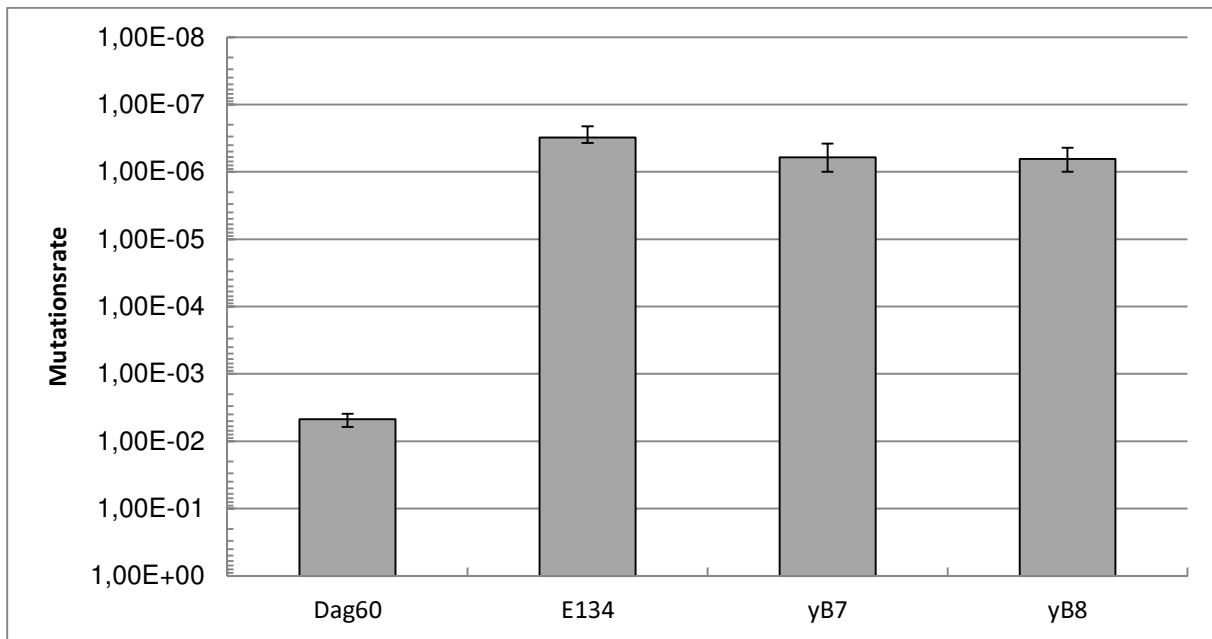


Abb. 30: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Mutationsraten der Stämme aus Abb. 29. Der Unterschied von yB7 und yB8 zu E134 ist signifikant (bestimmt mit FALCOR, siehe 3.2.5.1.1, S. 56).

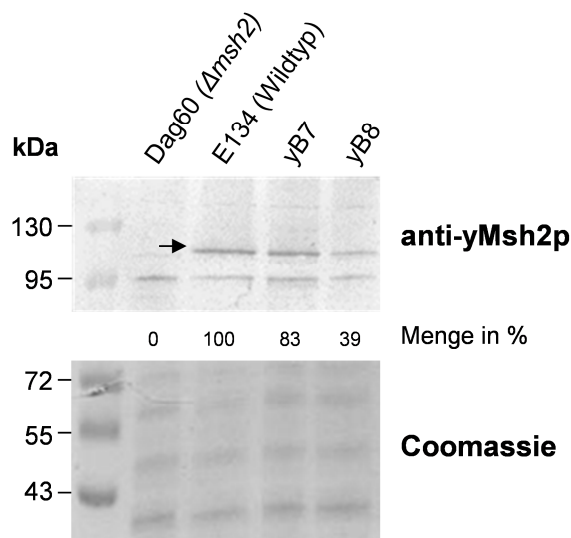


Abb. 31: Proteinnachweis des Hybrids yMsh2_1 im Stamm yB8. 10 μ g Zellextrakt wurden auf ein 10 %iges SDS-Gel geladen. Als Ladekontrolle wurde ein Coomassie-Gel verwendet. Für die

Quantifizierung wurde die Coomassie-Bande unterhalb von 43 kDa verwendet. kDa = Kilodalton. Coomassie = Ladekontrolle. Schwarzer Pfeil= yMshp2 bzw. yhMsh2 Bande. „Menge in %“ bezieht sich auf den Wildtypstamm E134. Die Membran für die Hefe-Msh2p Detektion wurde mit den in Abb. 26 beschriebenen Antikörpern inkubiert.

4.1.1.9 Analyse von yhMsh2_5 und yhMsh2_14 unter endogenen Bedingungen

Um auszuschließen, dass die *kanMX*-Kassette möglicherweise zu nah 3' an *yMSH2* liegt und hierdurch zu einer Verminderung der Proteinexpression bei yB7 (und yB8) führte, wurde die Konstruktion weiterer endogener Hybridgene abgeändert. Zum einen wurde die 3'UTR von *yMSH2* auf insgesamt 60 bp vergrößert. Zum andern wurde die *kanMX*-Kassette mittels Cre-vermittelter Rekombination über *loxP*-Seiten entfernt, welche die *kanMX*-Kassette flankieren (Durchführung und Schema siehe 3.3.5.6, S. 71) Als Kontrollstamm wurde yB3 konstruiert, welcher nach Entfernen der *kanMX*-Kassette nur noch ein 106 bp großes Fragment der *kanMX*-Integration (inklusive einer *loxP*-Seite) trägt (Abb. 32 B). Neben *yhMSH2_1* sollten die Hybridgene *yhMSH2_5* sowie *yhMSH2_14* integriert werden. Das Hybrid yhMsh2_14 zeigte unter Plasmid-Bedingungen zwar eine reduzierte Proteinmenge um den Faktor 2,2, war aber trotzdem voll funktionell. Zudem besitzt es das größte humane Fragment im C-Terminus, was zudem noch eine hohe Identität aufweist. Das Hybrid yhMsh2_5 war zwar um den Faktor 10 schlechter als WT-Hefe-Msh2p, die Proteinmenge war aber im Vergleich zu anderen N-terminalen Hybriden höher. Für eine maximale Abdeckung des N-Terminus wurde ebenfalls eine Integration von *yhMSH2_6* vorgenommen. Diese war aber nicht erfolgreich.

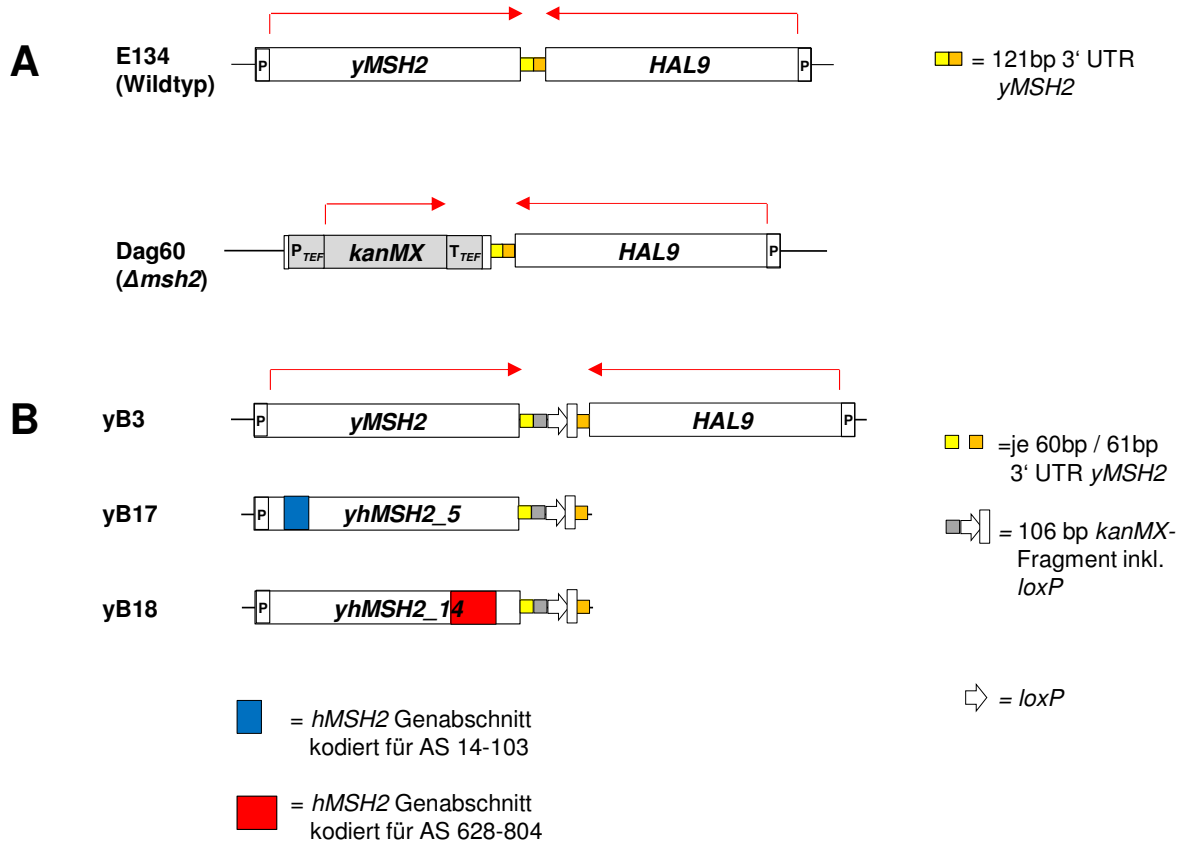


Abb. 32: Überblick über die genomischen *yMSH2* Loci von Dag60, E134, yB3, yB17 und yB18. A) Wildtypstamm E134 und $\Delta msh2$ Stamm Dag60 (Clark, Cook et al. 1999). B) Kontrollstamm yB3 für yB17 (*yhMSH2_5*) und yB18 (*yhMSH2_14*). Die roten Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. P = Gen-eigener Promotor, P_{TEF} = *TEF2* Promotor aus *Ashbya gossypii*, T_{TEF} = Terminator aus *A. gossypii*. Details der Konstruktion siehe 3.3.5.6, S. 71.

Die quantitative Analyse des Kontrollstamms yB3 ergab eine Mutationsrate von $3,4 \times 10^{-7}$ im Vergleich zum Wildtyp E134 mit $4,0 \times 10^{-7}$. Demnach war keine Erhöhung der Mutationsrate festzustellen (Tab. 6, Abb. 33). Die Proteinmenge von Hefe-Msh2p war im Vergleich zu E134 auf 115 % erhöht (Abb. 34). Somit hat die Sequenzveränderung 3' von *yMSH2* einen leichten Einfluss auf die Proteinexpression, welche sich aber nicht in einer erhöhten Mutationsrate widerspiegelt.

Die qualitative Analyse (je 3 Klone) der Hybride yMsh2_5 und yMsh2_14 in den Stämmen yB17 und yB18 ergab eine ungefähre Mutationsrate von $8,8 \times 10^{-6}$ und $1,6 \times 10^{-6}$. Dies entspricht einer Erhöhung gegenüber yB3 um den Faktor 42 für yB17 sowie 8 für yB18 (Tab. 7).

Die Proteinmenge von yhMsh2_5 in yB17 zeigte eine Erhöhung auf 144 % gegenüber dem Kontrollstamm yB3. Zudem wurde dieses Hybridprotein bei einer niedrigeren Laufhöhe detektiert, so dass sich das apparente Laufverhalten bei ca. 95 kDa nachweisen lässt. Dieses Hybrid ist nur um 6 Aminosäuren kürzer als WT-Hefe-Msh2p, besitzt aber durch die humanen Anteile im N-Terminus eine andere Aminosäureabfolge, die einen Einfluss auf das

Laufverhalten nehmen könnte. Für yhMsh2_14 konnte eine reduzierte Menge von 52 % im Stamm yB18 gemessen werden. Hier zeigte sich kein verändertes Laufverhalten (Abb. 35). Zusammenfassend konnten so 3 Hybride unter endogenen Bedingungen analysiert werden. Dabei zeigte yhMsh2p_1 eine 5fach schlechtere Fehlpaarungsreparatureffizienz im Vergleich zu Plasmid-basierter Expression. Das Hybrid yhMsh2_5 war 4fach schlechter, während yhMsh2_14 eine 12fach schlechtere Effizienz zeigte, wobei zu beachten ist, dass die letzten beiden Hybride mit nur wenigen Klonen untersucht wurden. Auch unter endogenen Bedingungen und einer leicht veränderten Proteinmenge waren diese Hybride immer noch in der Lage, fast wildtypische Fehlpaarungsreparatur zu betreiben. Somit ermöglichen diese Hybride unter endogenen Bedingungen, humane MSH2-Mutationen funktionell zu untersuchen.

Konstrukt	Mutationsrate	95% Konfidenzintervall		Faktor erhöht gegenüber E134
		obere Grenze	untere Grenze	
Dag60	$4,3 \times 10^{-3}$	$5,7 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	10.750
E134	$4,0 \times 10^{-7}$	$4,4 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-7}$	1
yB3	$3,4 \times 10^{-7}$	$8,7 \times 10^{-7}$	$2,8 \times 10^{-7}$	1

Tab. 6: Ergebnis der quantitativen Analyse des Kontrollstamms yB3.

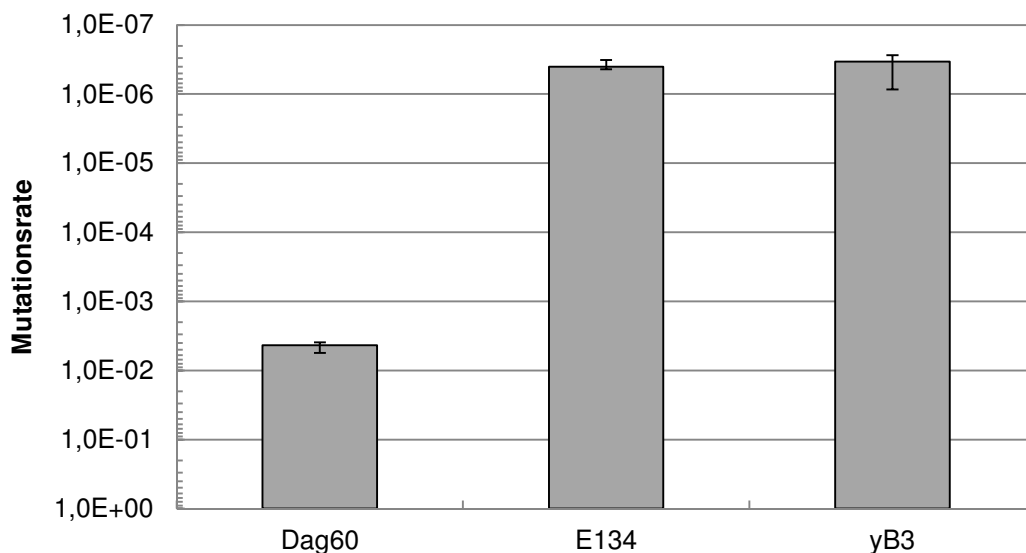


Abb. 33: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse des Kontrollstamms yB3. Dargestellt sind die Mutationsrate sowie das Konfidenzintervall (95%) für jeden Stamm.

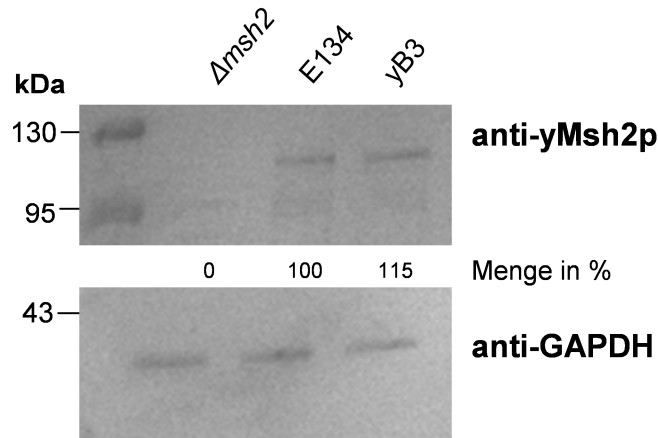


Abb. 34: Proteinnachweis des Kontrollstamms yB3. 10 µg Zellextrakt wurden über ein 10 %iges SDS-Gel aufgetrennt. kDa = Kilodalton. GAPDH = Ladekontrolle. „Menge in %“ bezieht sich auf E134. Die Membranen wurde mit den in Abb. 26 beschriebenen Antikörpern inkubiert.

Konstrukt	Ungefähre Mutationsrate	Faktor erhöht gegenüber yB3
Dag60	$4,3 \times 10^{-3}$	20.000
yB3	$2,1 \times 10^{-7}$	1
yB17	$8,8 \times 10^{-6}$	42
yB18	$1,6 \times 10^{-6}$	8

Tab. 7: Ergebnis der qualitativen Analyse der Hybridstämme yB17 und yB18. Aufgrund der niedrigen Anzahl getesteter Klone wird hier nur die „ungefähre Mutationsrate“ angegeben.

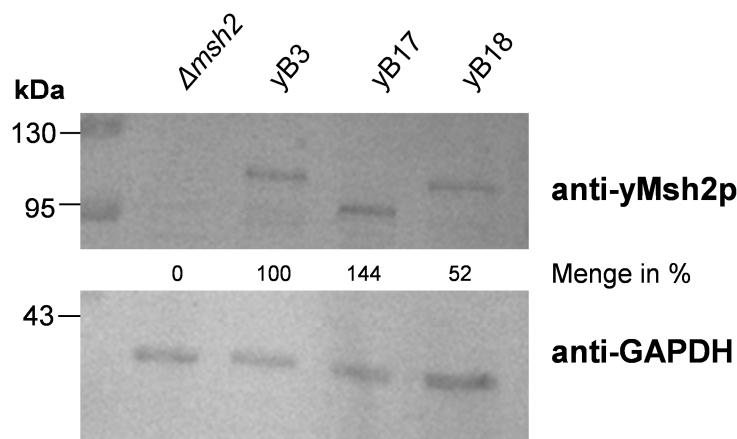


Abb. 35: Proteinnachweis von Hefe-Msh2p der Hybridstämme yB17 und yB18. 10 µg Zellextrakt wurden über ein 10 %iges SDS-Gel aufgetrennt. „Menge in %“ bezieht sich auf yB3. kDa = Kilodalton, yMsh2p = theor. 109 kDa, GAPDH (36 kDa) = Ladekontrolle. Die Membranen wurde mit den in Abb. 26 beschriebenen Antikörpern inkubiert.

4.1.2 *In vivo* Analyse von 10 hMSH2-Allelen in yhMsh2 Hybriden

Nachdem erfolgreich eine große Anzahl funktioneller yhMsh2-Proteine generiert werden konnte, stand nun ein einzigartiges Werkzeug zur Verfügung, um hMSH2 Allele *in vivo* in der Fehlpaarungsreparatur zu charakterisieren. Zudem ist es erstmalig durch die endogene

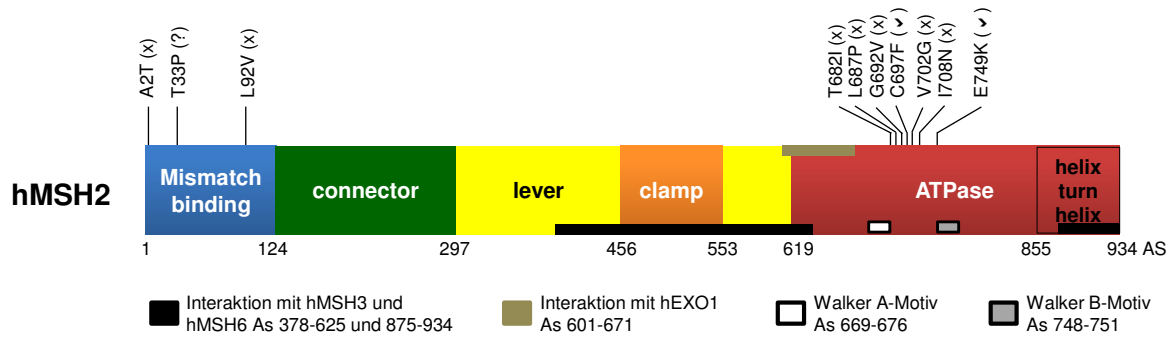


Abb. 36: Das humane MSH2 Protein mit den in dieser Arbeit untersuchten Allelen. AS = Aminosäure, (x) = unklassifizierte Variante, (?) = Funktionalität unklar, (✓) = funktionell charakterisiert. Details des hMSH2-Aufbaus siehe Einleitung 1.2.3, S. 24.

Expression ausgewählter Hybridproteine möglich, hMSH2-Allele unter endogenen Bedingungen der Fehlpaarungsreparatur zu untersuchen.

In einem nächsten Schritt sollten in Patienten identifizierte hMSH2 Allele in *yhMSH2* Hybride integriert und *in vivo* in Hefe analysiert werden. Hierfür wurde die Datenbank des Verbundprojekts „Familiärer Darmkrebs“ sowie die Online-Datenbank www.mmruv.info nach solchen Allelen durchsucht, die in den Humanbereichen der yhMsh2-Proteine lokalisiert sind. Insgesamt wurden zehn hMSH2 Allele ausgesucht, von denen 7 Allele unklassifizierte Varianten sind und 2 Allele als nicht-funktionell eingestuft wurden. Die Funktionalität eines Allels bleibt auch nach diversen experimentellen Ansätzen widersprüchlich (Abb. 36). Jeweils 7 Allele wurden im Humanteil des Hybrids yhMsh2_1 und 3 Allele in yhMsh2_6 integriert.

4.1.2.1 Funktionelle Analyse von Allelen im hMSH2 N-Terminus mit einem yhMsh2 Hybridprotein

Die Allele A2T, T33P und L92V wurden einzeln in das Hybrid yhMsh2_6 integriert (Abb. 37) und die Analyse der Allele erfolgte in einem quantitativen Ansatz vom Plasmid im $\Delta msh2$ Stamm Dag60. Als Kontrolle wurde der Leervektor pFH3 und das Wildtyp Hybrid *yhMSH2_6* transformiert.

Die Allele A2T und L92V zeigten keine Erhöhung der Mutationsrate im Vergleich zum Wildtyp. Eine nicht-signifikante Erhöhung um den Faktor 2 konnte beim Allel T33P gemessen werden (Funk 2010, Tab. 8, Abb. 38).

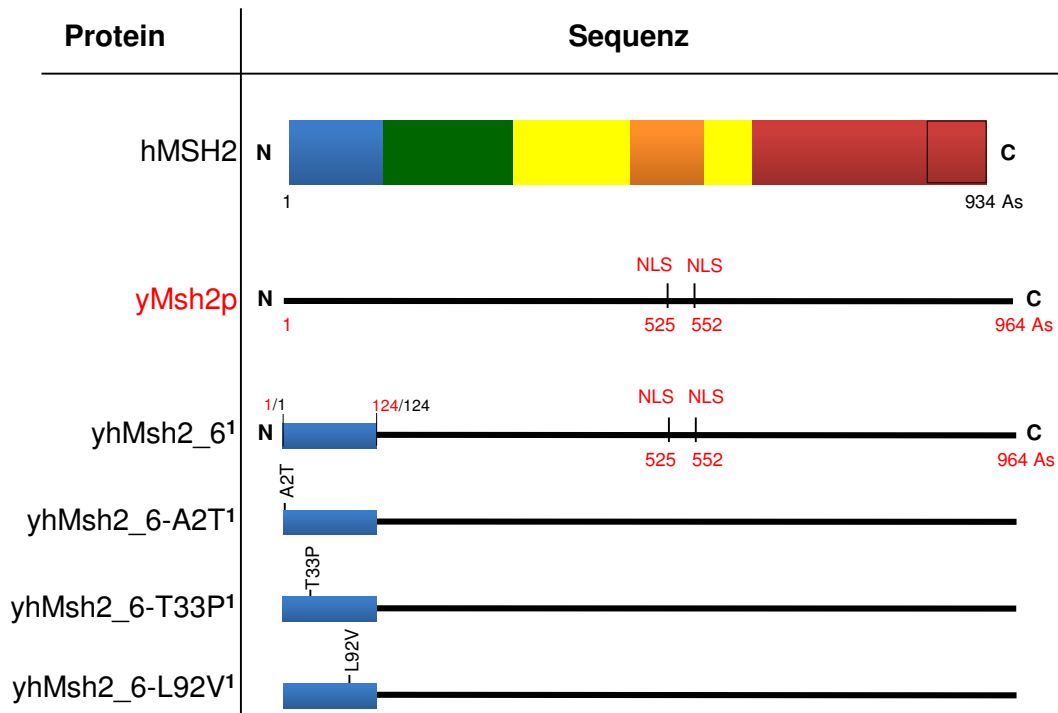


Abb. 37: Das Hybrid yhMsh2_6 mit den 3 zu untersuchenden Allelen. Jedes Allel wurde einzeln in das Hybrid integriert ¹Funk 2010. NLS = nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal). AS = Aminosäure. Die Positionen der NLS-Sequenzen sind bei den Allelen von yhMsh2_6 aufgrund der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

Die Proteinmengen der Allele zeigten ein anderes Bild. Während A2T keine Veränderung in der Proteinmenge zeigte (100 %), waren L92V auf 61% und T33P sogar auf 33 % verringert (Abb. 39). Trotz der veränderten Proteinmengen der Allele zeigten sich wildtypische Mutationsraten, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Überexpression vom Plasmid die Mutationen T33P und L92V stabilisieren.

Konstrukt (in $\Delta msh2$ Stamm)	Plasmid	Mutations -rate	95% Konfidenzintervall		Faktor erhöht ggü. yhMsh2_6
			obere Grenze	untere Grenze	
Kontrolle (pFH3)	#1287	$4,7 \times 10^{-3}$	$6,1 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$	8100
yhMsh2_6	#1827	$5,8 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$4,8 \times 10^{-7}$	1
-A2T	#1836	$7,3 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-7}$	1,2
-T33P	#1837	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-6}$	7×10^{-7}	2
-L92V	#1838	$8,0 \times 10^{-7}$	$8,6 \times 10^{-7}$	$6,9 \times 10^{-7}$	1,3

Tab. 8: Ergebnis der quantitativen Analyse der Allele des yhMsh2_6 Hybrids. Rohdaten generiert in Diplomarbeit B. Funk, 2010. Mutationsraten in dieser Arbeit neu mit FALCOR bestimmt, um Konfidenzintervall zu berechnen. ggü. = gegenüber

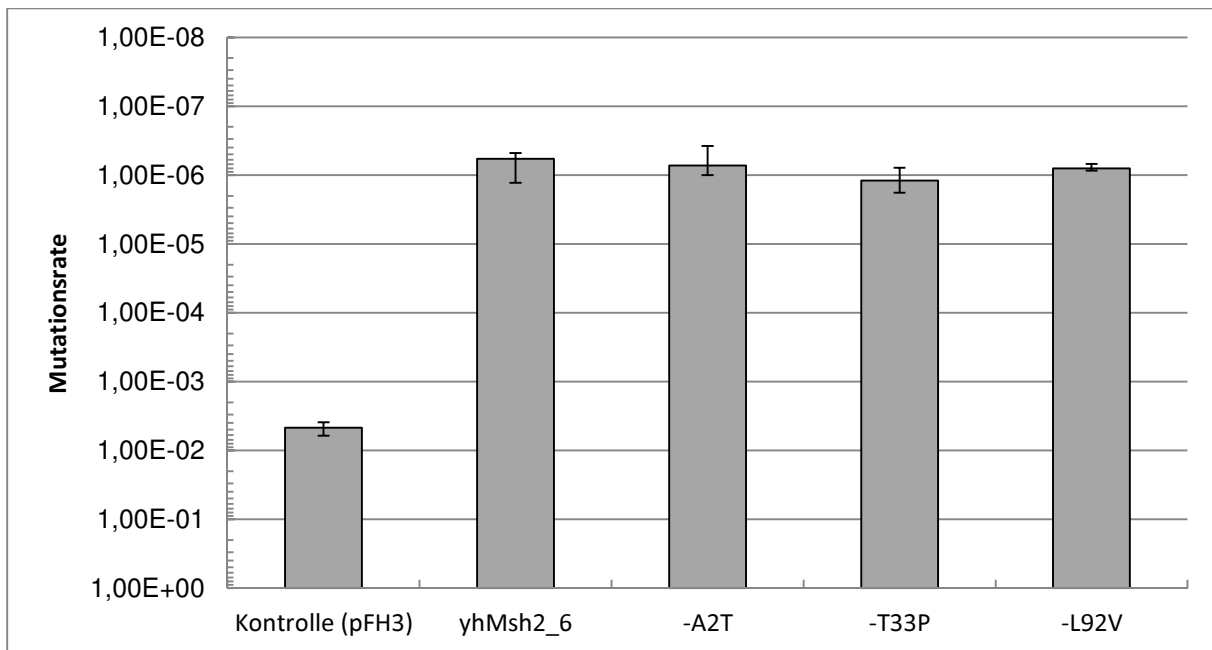


Abb. 38: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Allele des yhMsh2_6 Hybrids. Die Unterschiede der Mutationsraten der Allele zu yhMsh2_6 sind nicht signifikant.

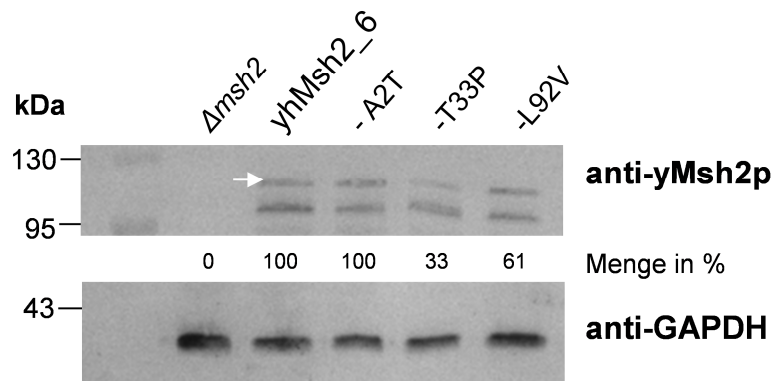


Abb. 39: Proteinmengen der Allele des yhMsh2_6 Hybrids. Es wurden 10 μ g Proteinextrakt einer Kultur von OD 1 auf ein 10%iges SDS-Gel geladen. Die für yhMsh2_6 typische zweite Bande bei ca. 95 kDa tritt bei allen Allelen auf. kDa = Kilodalton, GAPDH (36 kDa) = Ladekontrolle, weißer Pfeil = yMsh2 Bande (theor. 109 kDa). „Menge in %“ bezieht sich auf yhMsh2_6. Die Membranen wurde mit den in Abb. 26 beschriebenen Antikörpern inkubiert.

4.1.2.2 Funktionelle Analyse von Allelen des hMSH2 C-Terminus mit einem yhMsh2 Hybridprotein

Aus der C-terminalen ATPase Domäne von hMSH2 wurden die Allele T682I, L687P, G692V, C697F, V702G, I708N und E749 jeweils einzeln im Hybrid yhMsh2_1 unter Plasmid-Bedingungen untersucht (Abb. 40). Als Kontrolle diente das wildtypische yhMsh2_1 Hybrid sowie die Leervektorkontrolle pFH3 im Δ msh2 Stamm, wobei die Analyse in einem quantitativen Ansatz erfolgte.

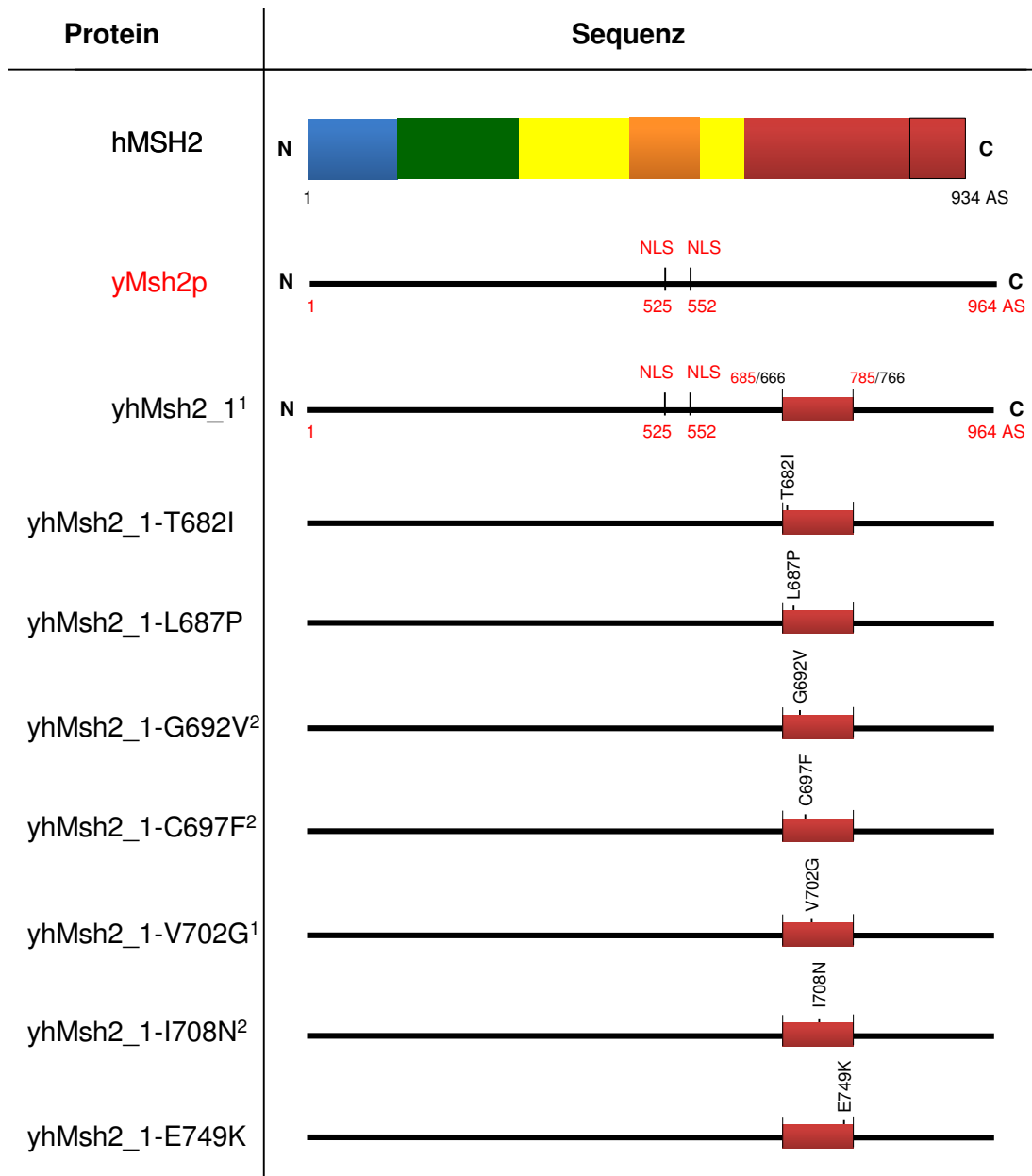


Abb. 40: Das Hybrid yhMsh2_1 mit den 7 integrierten Allelen. Jedes Allel wurde einzeln in das Hybrid integriert. ¹Kloniert in Diplomarbeit F. Herbst, 2006. ²Kloniert in Diplomarbeit S. Heick, 2008. NLS = nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal), AS = Aminosäure. Die NLS-Sequenzen wurden bei den einzelnen Allelen nicht mit dargestellt.

Das Allel V702G zeigte keine erhöhte Mutationsrate (Tab. 9, Abb. 41). Hingegen war T682I signifikant um den Faktor 3 erhöht. Eine um den Faktor 150 erhöhte Mutationsrate konnte beim Allel I708N gemessen werden. Eine noch höhere Mutationsrate war bei C697F zu beobachten, welche um den Faktor 2.300 erhöht war. Ähnliche Mutationsraten wie die Leervektorkontrolle pFH3 und somit keine Funktionalität zeigten G692V, L687P und E749K, welche um den Faktor 14.000 und 19.000 erhöht waren.

Konstrukt (in <i>Δmsh2</i> Stamm)	Plasmid	Mutations- rate	95% Konfidenzintervall		Faktor erhöht ggü. yhMsh2_1
			obere Grenze	untere Grenze	
Kontrolle (pFH3)	#1287	$4,7 \times 10^{-3}$	$6,1 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$	24000
yhMsh2_1	#1286	$1,9 \times 10^{-7}$	$2,6 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-7}$	1
-T682I	#1494	$5,0 \times 10^{-7}$	$9,9 \times 10^{-7}$	$3,3 \times 10^{-7}$	3
-L687P	#1495	$2,9 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	15000
-G692V ^{1,3}	#1431	$2,6 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$	14000
-C697F ^{1,3}	#1432	$4,5 \times 10^{-4}$	$6,8 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-4}$	2300
-V702G ^{2,3}	#1289	$2,2 \times 10^{-7}$	$4,1 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-7}$	1
-I708N ^{1,3}	#1433	$2,9 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-5}$	150
-E749K	#1496	$3,6 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$	19000

Tab. 9: Ergebnis der quantitativen Analyse der Allele des yhMsh2_1 Hybrids. ¹konstruiert und gemessen in Diplomarbeit S. Heick, 2008. ²konstruiert und gemessen in Diplomarbeit F. Herbst, 2006. ³in dieser Arbeit neu berechnet mit FALCOR, um Konfidenzintervall zu bestimmen. ggü. = gegenüber

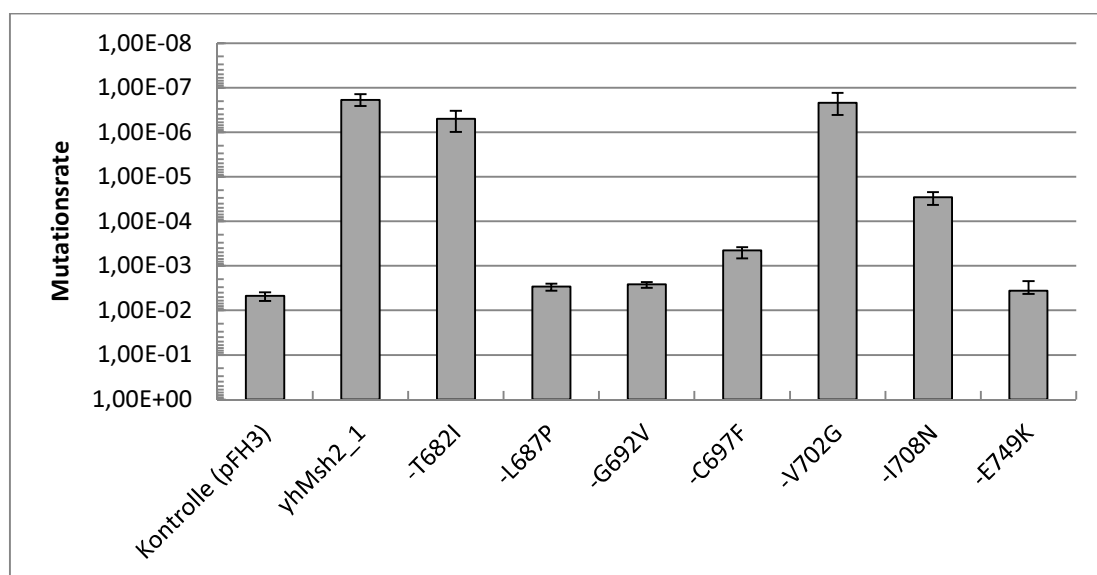


Abb. 41: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Allele im yhMsh2_1 Hybrid. Bis auf V702G sind die Unterschiede der Mutationsraten von allen Allelen zu yhMsh2_1 signifikant.

Die Proteinmengen der Allele L687P und C697F waren wildtypisch (96 % und 100 %, Abb. 42, Tab. 10), während die Mengen von G692V und T682I jeweils auf 117 % bzw. 127 % erhöht waren. Ebenso war eine weitere Erhöhung auf 136 % bei V702G und I708N zu beobachten. Als einziges Allel zeigte E749K eine stark erhöhte Proteinmenge auf 232%. Insgesamt zeigten somit nur zwei Allele wildtypische Proteinmengen, wohingegen 5 yhMsh2-Allele leichte bis stark erhöhte yhMsh2-Mengen zeigten.

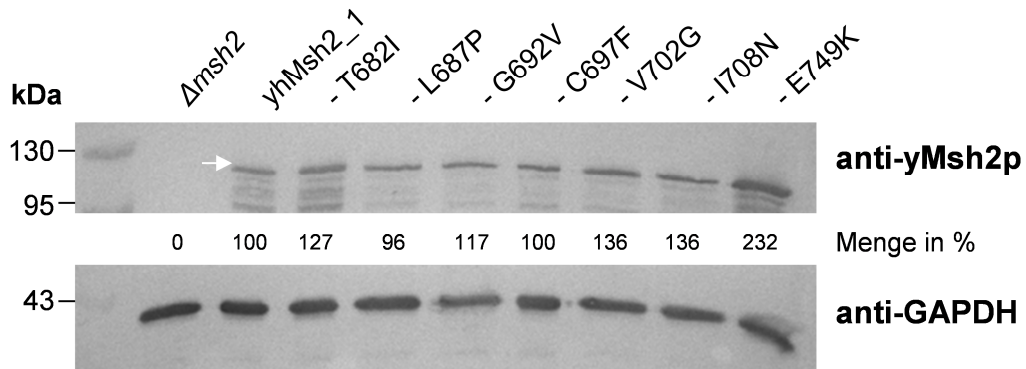


Abb. 42: Proteinmengenbestimmung der Allele des yhMsh2 Hybrids im Δ msh2 Stamm. 10 μ g Proteinextrakt einer Kultur von OD 1 wurden auf ein 10%iges SDS-Gel geladen. „Menge in %“ bezieht sich auf yhMsh2_1. kDa = Kilodalton, GAPDH = Ladekontrolle, weißer Pfeil = yhMsh2 Bande. Die Membranen wurde mit den in Abb. 26 beschriebenen Antikörpern inkubiert.

Allel	Menge in %	Intervall	Faktor erhöht ggü. yhMsh2_1
E749K	232	> 200	2.3
V702G	136	> 100	1.4
I708N	136		1.4
T682I	127		1.3
G692V	117		1.2
yhMsh2_1	100	= 100	1
C697F	100		1
L687P	96		0.96
Kontrolle	0	= 0	0

Tab. 10: Übersicht der Proteinmengen von Allelen des yhMsh2_1 Hybrids. Basierend auf der Quantifizierung des yhMsh2_1-Signals aus Abb. 42 wurden die Allele nach steigender Proteinmenge sortiert: mehr als 200 % (> 200), mehr als 100 % (> 100), Wildtypniveau (= 100, L687P wurde hier mit 96 % noch mit eingeschlossen), 0 % (= 0). ggü. = gegenüber

Zusammenfassend zeigten von insgesamt 10 untersuchten hMSH2-Allelen des N- und C-Terminus fünf eine wildtypische Funktionalität, wovon 3 im N-Terminus lokalisierten. Ein Allel war in seiner Funktion reduziert, wohingegen 4 Allele keine Funktion zeigten. Ein Allel des N-Terminus zeigte wildtypische Proteinmengen, bei 2 hingegen war diese reduziert. Bei einem untersuchten Allel des C-Terminus zeigte sich eine stark erhöhte Proteinmenge, wohingegen 4 Allele nur leicht erhöhte yhMsh2-Mengen zeigten. Nur zwei Allele zeigten wildtypische Proteinmengen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Proteinmenge und der Funktionalität eines Allels konnte nicht festgestellt werden, so dass diese Allele wahrscheinlich Funktionsprobleme haben.

4.1.2.3 *In vivo* Funktionsanalyse von yhMsh2-Allelen durch Auslösen eines dominant-negativen Mutatorphänotyps

Um mögliche andere Faktoren zu untersuchen, die Einfluss auf die Funktionalität eines Allels nehmen, wurde eine weitere unabhängige *in vivo* Analyseverfahren verwendet. Das Prinzip

besteht darin, Allele von Hybridproteinen in einem wildtypischen Hefestamm stark zu exprimieren. Ist das Allel funktionsunfähig, so wird es unter Umständen mit dem endogenen Fehlpaarungsreparatursystem interferieren und dabei einen sogenannten dominant-negativen Mutatorphänotyp auslösen. Dies resultiert in einer erhöhten Mutationsrate des wildtypischen Hefe-Stamms.

Für die Analyse von Allelen des C-Terminus wurden als Kontrolle die Leervektorkontrolle pFH3, das Wildtyp Hybrid yhMsh2_1 sowie funktionelle Allele aus der Analyse von 4.1.2.2 verwendet. Diese sollten erwartungsgemäß kein dominant-negatives Verhalten zeigen. Alle Konstrukte wurden vom Plasmid exprimiert. Die Analyse von Allelen des N-Terminus wurde in einer anderen Arbeit durchgeführt und zeigte kein dominant-negatives Verhalten (Funk 2010).

Die Mutationsrate des Wildtypstamms E134 mit dem Leervektor pFH3 lag bei $3,1 \times 10^{-7}$ (Tab. 11, Abb. 43). Die Expression des wildtypischen Hybrids yhMsh2_1 zeigte keinen Einfluss auf die Mutationsrate ($3,6 \times 10^{-7}$, Faktor 1,2). Somit bestätigt sich hier erneut die Funktionalität dieses Hybrids. Die Allele T682I bis I708N zeigten ebenfalls keine signifikante Erhöhung. Lediglich das Allel E749K zeigte dominant-negatives Verhalten, was in einer Erhöhung der Mutationsrate um den Faktor 11935 zu messen war. Die Mutation E749K liegt im Walker-B Motiv der ATPase Domäne, welches zusammen mit dem Walker-A Motiv die Bindung/Spaltung von ATP koordiniert. Eine veränderte Interaktion mit ATP/ADP kann hier der Grund für dominant-negatives Verhalten sein, was zu einer Störung bzw. Inaktivierung der Fehlpaarungsreparatur führt.

Konstrukt (in Wildtyp)	Mutationsrate	95% Konfidenzintervall		Faktor erhöht gegenüber Kontrolle
		obere Grenze	untere Grenze	
Kontrolle (pFH3)	$3,1 \times 10^{-7}$	$3,7 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-7}$	1
yhMsh2_1	$3,6 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-7}$	1,2
-T682I	$6,9 \times 10^{-7}$	$8,8 \times 10^{-7}$	$5,1 \times 10^{-7}$	2,2
-L687P	$3,2 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-7}$	1
-G692V ^{1,3}	$2,2 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-7}$	0,7
-C697F ^{1,3}	$2,2 \times 10^{-7}$	$4,2 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-7}$	0,7
-V702G ^{2,3}	$1,4 \times 10^{-7}$	$3,3 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$	0,5
-I708N ¹	$1,5 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-7}$	0,5
-E749K	$3,7 \times 10^{-3}$	$4,6 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-3}$	11935

Tab. 11: Ergebnis der quantitativen Analyse der Allele des yhMsh2_Hybrids. Alle Allele wurden in den Wildtyp Stamm E134 transformiert, um zu prüfen, ob ein dominant negativer Mutatoreffekt ausgelöst wird. Die Plasmid-Nummern der Konstrukte entsprechen denen in Tab. 9. ¹konstruiert und gemessen in Diplomarbeit S. Heick, 2008. ²konstruiert und gemessen in Diplomarbeit F. Herbst, 2006. ³in dieser Arbeit neu berechnet mit FALCOR, um Konfidenzintervall zu bestimmen.

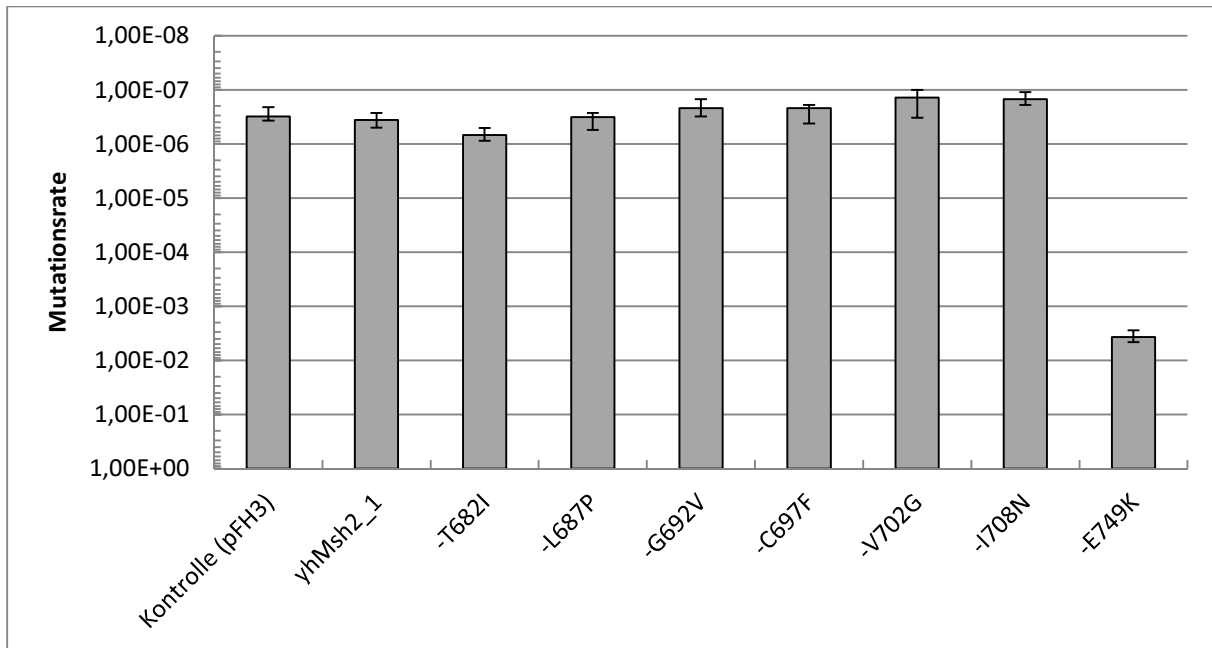


Abb. 43: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Allele des yhMsh2_1 Hybrids im Wildtypstamm E134. Bis auf E749K sind die Unterschiede zu yhMsh2_1 nicht signifikant.

4.1.2.4 Analyse der Funktionalität von yhMsh2-Allelen unter endogenen Bedingungen

Alle bisherigen Analysen der Allele des C-Terminus wurden unter Bedingungen durchgeführt, bei denen die Gene unter Kontrolle des starken *GAL1*-Promotors sowie alle Konstrukte von einem 2μ Hochkopienplasmid exprimiert wurden. Da gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von nicht-funktionellen yMsh2-Allelen wieder zur Funktionalität führen kann (Gammie, Erdeniz et al. 2007), sollten im Folgenden die sieben hMSH2 Allele T682 bis E749K von yhMsh2_1 in den genomischen yMSH2 Locus des Wildtypstamms E134 integriert und analysiert werden. Diese Analyse war möglich, weil wie bereits unter 4.1.1.8 beschrieben, yhMsh2_1 unter endogenen Bedingungen funktionell war. Durch eine PCR auf das humane Fragment eines yhMSH2-Allels wurde dieses mit einer *kanMX*-Kassette als Selektionsmarker mittels homologer Rekombination zusammen in den endogenen yMSH2-Locus integriert, so dass die Allele unter Kontrolle des endogenen yMSH2-Promotors standen (Details der Klonierung siehe 3.3.5.5, S. 69).

Als Kontrollstämme dienten der $\Delta msh2$ Deletionsstamm Dag60 und der Stamm yB8, welcher das wildtypische yhMSH2_1 Gen trägt. Alle untersuchten Stämme wurden mit dem Leervektor pFH3 transformiert, um gleiche Bedingungen wie bei der Analyse vom Plasmid zu haben.

Die Mutationsrate des $\Delta msh2$ Stammes lag bei $4,7 \times 10^{-3}$ (Tab. 12, Abb. 44) Im Vergleich zu yB8, welcher eine Mutationsrate von $6,4 \times 10^{-7}$ zeigte, entspricht dies einer Erhöhung um den Faktor 7344. Das Allel T682I zeigte eine nicht-signifikante Erniedrigung der Mutationsrate um

Stamm	Nr.	Mutationsrate	95% Konfidenzintervall		Faktor erhöht ggü. yB8
			obere Grenze	untere Grenze	
Dag60 (<i>Δmsh2</i>)	#1499	$4,7 \times 10^{-3}$	$6,1 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$	7344
yB8 (<i>yhMsh2_1</i>)	#1635	$6,4 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-8}$	$4,4 \times 10^{-7}$	1
yB9 (-T682I)	#1636	$2,0 \times 10^{-7}$	$4,9 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-7}$	0,4
yB10 (-L687P)	#1637	$3,5 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-3}$	5468
yB11 (-G692V)	#1638	$5,7 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-3}$	8906
yB12 (-C697F)	#1639	$5,4 \times 10^{-3}$	$7,4 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-3}$	8437
yB13 (-V702G)	#1640	$2,2 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	3437
yB14 (-I708N)	#1641	$4,7 \times 10^{-3}$	$6,6 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$	7343
yB15 (-E749K)	#1642	$5,7 \times 10^{-3}$	$6,6 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$	8906

Tab. 12: Ergebnis der quantitativen Analyse der Allele des *yhMsh2_1* Hybrids unter endogenen Bedingungen. Die Stämme yB9 bis yB15 tragen jeweils eine Punktmutation im *yhMSH2_1* Locus, die zu dem in der Klammer notierten AS-Austausch führt. Angegeben sind die Mutationsrate, das 95% Konfidenzintervall sowie der Faktor, um den ein Allel gegenüber der Kontrolle yB8 erhöht ist (ausgehend von der Mutationsrate). ggü. = gegenüber

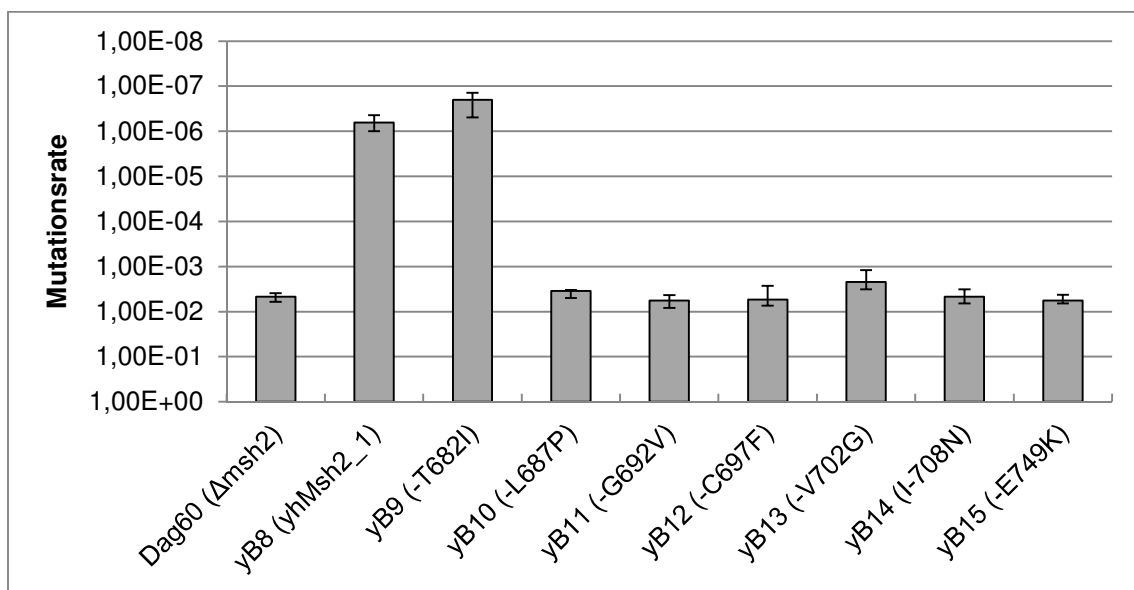


Abb. 44: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Allele des *yhMsh2_1* Hybrids unter endogenen Bedingungen. Die niedrigere Mutationsrate von yB9 ist im Vergleich zu yB8 nicht signifikant.

den Faktor 0,4. Hingegen zeigten die Allele L687P bis E749K keine Funktionalität. Die erhöhten Mutationsraten lagen zwischen Faktor 3437 und 8906. Diese waren im Vergleich zum *Δmsh2* Stamm nicht signifikant verändert.

Anschließend wurden die Proteinmengen der verschiedenen Allele unter endogenen Bedingungen analysiert. Das Allel T682I zeigte leicht eine verringerte Proteinmenge von

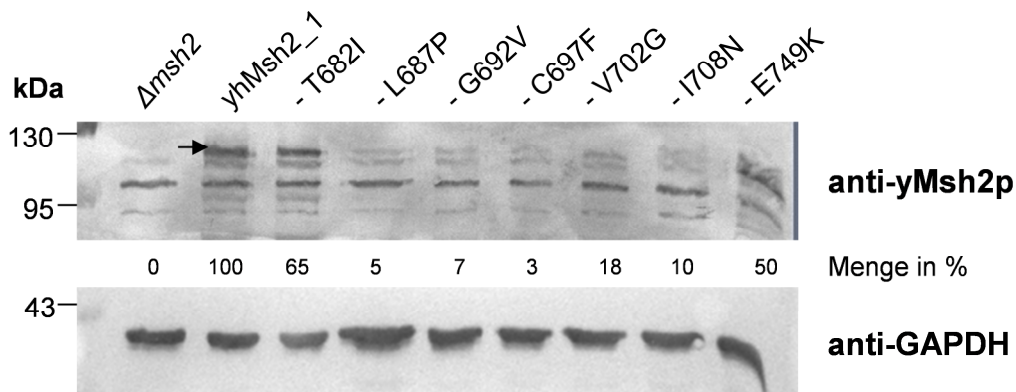


Abb. 45: Proteinmengen der Allele des yhMsh2_1 Hybrids unter endogenen Bedingungen. „Menge in %“ bezieht sich auf yhMsh2_1. Die Membranen wurde mit den in Abb. 26 beschriebenen Antikörpern inkubiert. kDa = Kilodalton, yMsh2p = theor. 109 kDa, GAPDH (36 kDa) = Ladekontrolle, schwarzer Pfeil = yhMsh2.

65% (Abb. 45). In einem ähnlichen Bereich lag das Allel E749K mit 50%. Eine drastische Reduzierung zeigten die restlichen Allele. Bei den Allelen V702G und I708N lag die Proteinmenge bei 18% und 10% Noch niedrigere Mengen waren bei L687P, G692V und C697F mit jeweils 5%, 7% und 3% zu messen.

Insgesamt zeigten 2 Allele verringerte Proteinmengen von 50 – 65 %. Bei 2 Allelen konnte weniger als 20 % nachgewiesen werden, wohingegen bei 3 Allelen weniger als 10% Protein vorhanden war (Tab. 13). Die stark reduzierte Proteinmenge der Allele L687P bis I708N könnte somit in einem direkten Zusammenhang mit ihrer fehlenden Funktionalität in der Fehlpaarungsreparatur bei genomischer Integration stehen.

Allel	Menge in %	Intervall	Faktor erniedrigt ggü. WT
yhMsh2_1 WT	100	= 100	1
T682I	65	< 70	1,5
E749K	50		2
V702G	18	< 20	5,5
I708N	10		10
G692V	7	< 10	14
L687P	5		20
C697F	3		33
Kontrolle	0	= 0	0

Tab. 13: Proteinmengen der Allele des yhMsh2_1 Hybrids unter endogenen Bedingungen. Basierend auf der Quantifizierung des yhMsh2_1 Signals aus Abb. 45 wurden die Messwerte der Proteinmenge nach folgenden Kriterien sortiert: Wildtypniveau (= 100), weniger als % (< 70), weniger als 20 % (20), weniger als 10 % (< 10), 0 % (= 0). ggü. = gegenüber

4.1.2.5 Lokalisation von Allelen des C-Terminus

Damit Fehlpaarungsreparatur stattfinden kann, müssen die beteiligten Proteine im Zellkern lokalisiert sein. Um dies zu untersuchen, wurden yMsh2p, yhMsh2_1 sowie dessen Allele C-terminal mit GFP fusioniert. Als Kontrolle diente das Plasmid pUG35, welches nur für GFP kodiert. Um die Kernlokalisierung zu prüfen, wurden die Zellen mit DAPI gefärbt und 100 Zellen per Mikroskop überprüft, wobei die Analyse im $\Delta msh2$ Stamm erfolgte.

Zellen, die mit pUG35 transformiert wurden, zeigten eine durchgehende Grünfluoreszenz der gesamten Zelle (Abb. 46A). Hingegen zeigte die yMsh2p-GFP Fusion eine vollständige Kolokalisation mit dem DAPI-Signal, was die Kernlokalisierung des yMsh2p-GFP Proteins belegt (Abb. 46B). Auch in teilenden Zellen blieb die Kernlokalisierung erhalten (Abb. 46 C). Das gleiche Bild zeigte sich für das Wildtyp-Hybrid yhMsh2_1. Für die untersuchten Allele konnten zwei Lokalisierungsmuster beobachtet werden. Die Allele T682I und E749K zeigten eine wildtypische Lokalisierung im Nukleus. Hingegen zeigten die Allele L687P, G692V, C697F und V702G (I708N nicht untersucht) eine veränderte Lokalisation in der Zelle. Die mit GFP fusionierten Proteine akkumulierten wahrscheinlich auf einer Seite des Nukleus (Abb. 46E und F). Hier konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob die Allele tatsächlich im Nukleus akkumulieren oder ob diese erst gar nicht in den Nukleus gelangen. Eine teilweise Kernlokalisierung könnte vorhanden sein, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass das DAPI-Signal in den GFP-Kanal überstrahlt (Jez, Bas et al. 2013). In teilenden Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Während die DNA in die Tochterzelle segregiert wird, akkumulieren die genannten Allele weiterhin in der Mutterzelle, wobei nicht eindeutig ist, ob sich das Signal im Kern befindet (Abb. 46D). Alle untersuchten Zellen zeigten jeweils einen einheitlichen 100%igen nukleären oder veränderten Phänotyp (Tab. 14). Interessanterweise korrelierte die Fehlpaarungsreparatur-Aktivität eines Allels nicht mit der subzellulären Lokalisierung.

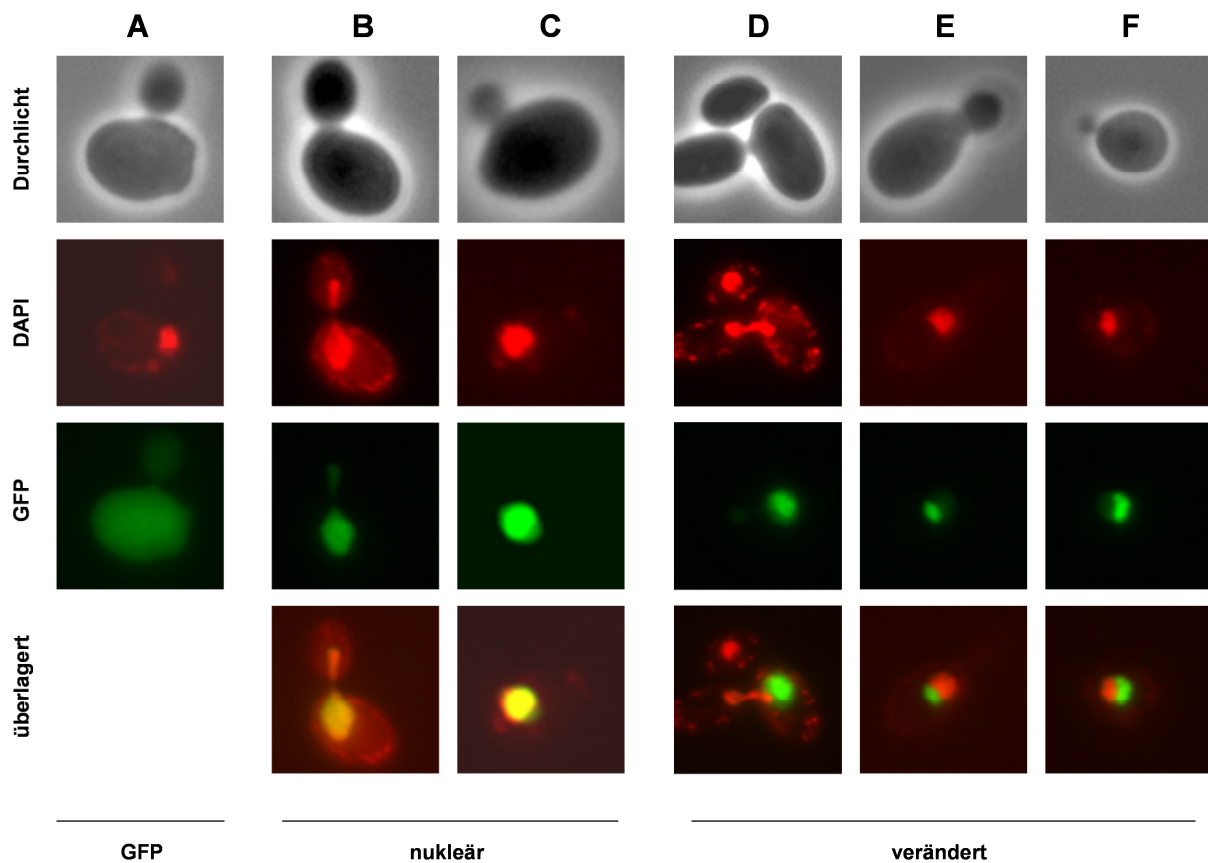


Abb. 46: Mikroskopische Analyse von GFP-fusioniertem yMsh2p, yhMsh2_1 sowie dessen Allele. Die Untersuchung der Konstrukte zeigte zwei unterschiedliche Lokalisationsmuster. Es wurden entweder eine nukleäre (B und C) oder eine veränderte Lokalisation festgestellt (D bis F). Zuordnung und Häufigkeit der Phänotypen siehe Tab. 14.

Konstrukt	Lokalisierung	Phänotyp in%
GFP	Cytoplasma/nukleär	100
yMsh2p	nukleär	100
yhMsh2_1	nukleär	100
-T682I	nukleär	100
-L687P	verändert	100
-G692V	verändert	100
-C697F	verändert	100
-V702G	verändert	100
-I708N	nicht untersucht	
-E749K	nukleär	100

Tab. 14: Quantitative Analyse der beobachteten Phänotypen von GFP-fusionierten yhMsh2_1-Allelen. Alle GFP-positiven Zellen zeigten zu 100% das entsprechende Lokalisierungsmuster.

4.1.3 *In vivo* Funktionsanalyse von hMSH2-Allelen durch Auslösen eines dominant-negativen Mutatorphänotyps

Neben der *in vivo* Analyse von hMSH2 Allelen mittels yhMsh2 Hybridproteinen gibt es in *S. cerevisiae* noch eine weitere indirekte Möglichkeit, hMSH2 Allele auf ihre Funktionalität hin *in vivo* zu prüfen. Bei gleichzeitiger starker Expression von humanem MSH2 mit seinem humanen Interaktionspartner hMSH6 interagieren beide Partner miteinander und bilden den hMutS α -Komplex. Dieser Komplex erkennt nun auftauchende Fehlpaarungen und bindet daran. Allerdings kann dieser nicht mit Proteinen der Hefe-Fehlpaarungsreparatur interagieren und schirmt die Fehlpaarung der Hefe somit ab – der Fehler wird nicht repariert. Der wildtypische hMutS α -Komplex löst somit einen dominant-negativen Mutatorphänotyp aus, was in einer erhöhten Mutationsrate resultiert (Clark 1999; Prinzip siehe Einleitung Abb. 12, S. 33). Humane MSH2 Allele, die sich wildtypisch verhalten, zeigen dementsprechend zusammen mit wildtypischem hMSH6 eine ähnliche Mutationsrate wie der wildtypische hMutS α -Komplex. Bleibt die Expression eines hMSH2 Allels, die Interaktion mit hMSH6 oder die Erkennung einer Fehlpaarung in Kombination mit hMSH6 aus, ist die wildtypische Hefe-Fehlpaarungsreparatur in der Lage, einen Replikationsfehler zu erkennen und zu beheben, da dieser nicht mehr vom hMutS α -Komplex blockiert wird.

Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm E134 mit der Leervektorkontrolle pFH3/hMSH6 (Plasmid #1287/#1284) sowie mit hMSH2/hMSH6 (Plasmid #1282/1284) transformiert. Humanes hMSH2 und hMSH6 werden dabei von einem 2 μ Hochkopienplasmid unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors exprimiert.

Wird nur hMSH6 in E134 exprimiert, zeigte sich eine Mutationsrate von $1,0 \times 10^{-7}$ (Tab. 15, Abb. 47). Durch die Koexpression von wildtypischem hMSH2/hMSH6 wird ein dominant-negativer Mutatoreffekt ausgelöst, was sich in einer Mutationsrate von $5,8 \times 10^{-4}$ widerspiegelt, einer Erhöhung um den Faktor 5800. Die Allele A2T (Faktor 4900), T33P (5400) und L92V (3700) zeigten ebenso wie das C-terminal gelegene T682I (9300) eine ähnlich erhöhte Mutationsrate wie der Wildtyp. Einen schwachen dominant-negativen Effekt zeigte C697F mit einer Erhöhung von 61 sowie G692V mit dem Faktor 6 gegenüber der Kontrolle. Lediglich für die Allele L687P, V702G, I708N und E749K konnte keine signifikante Erhöhung der Mutationsrate gegenüber der Kontrolle gemessen werden.

Zusammenfassend lösten alle 3 Allele des N-Terminus wie auch das WT-hMSH2 einen dominant-negativen Mutatorphänotyp aus. Dies trifft ebenso für ein Allel des C-Terminus zu. Die gebildeten hMutS α -Komplexe sind somit wahrscheinlich in der Lage, an Fehlpaarungen zu binden. Zwei weitere Allele des C-Terminus zeigten nur eine leichte Erhöhung der Mutationsrate, wohingegen 4 Allele keine Erhöhung zeigten, was für Funktionslosigkeit spricht. Der Grund hierfür kann aus diesem Experiment aber nicht abgeleitet werden.

Konstrukt (+hMSH6)	Plasmid	Mutations -rate	95% Konfidenzlimits		Faktor erhöht ggü. Kontrolle
			obere Grenze	untere Grenze	
Kontrolle (pFH3)	#1287	$1,0 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-7}$	$6,0 \times 10^{-8}$	1
hMSH2-WT	#1282	$5,8 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-7}$	$4,4 \times 10^{-7}$	5800
-A2T	#1846	$4,9 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-4}$	4900
-T33P	#1847	$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-4}$	5400
-L92V	#1848	$3,7 \times 10^{-4}$	$5,3 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	3700
-T682I	#1638	$9,3 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-4}$	9300
-L687P	#1639	$1,5 \times 10^{-7}$	$5,4 \times 10^{-7}$	$9,0 \times 10^{-8}$	2
-G692V	#1640	$6,2 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$5,4 \times 10^{-7}$	6
-C697F	#1641	$6,1 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-6}$	61
-V702G	#1642	$1,5 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-7}$	1,5
-I708N	#1684	$3,0 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-7}$	3
-E749K	#1643	$3,3 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$	3

Tab. 15: Ergebnis des dominant-negativen Mutatorphänotyps durch Koexpression von hMSH2 mit hMSH6. Alle dargestellten Konstrukte wurden mit *hMSH6* kotransformiert. Angegeben sind die Mutationsrate, das 95% Konfidenzintervall sowie der Faktor, um den ein Allel gegenüber der Kontrolle erhöht ist (ausgehend von der Mutationsrate). Plasmidnr. hMSH6: #1284. ggü = gegenüber

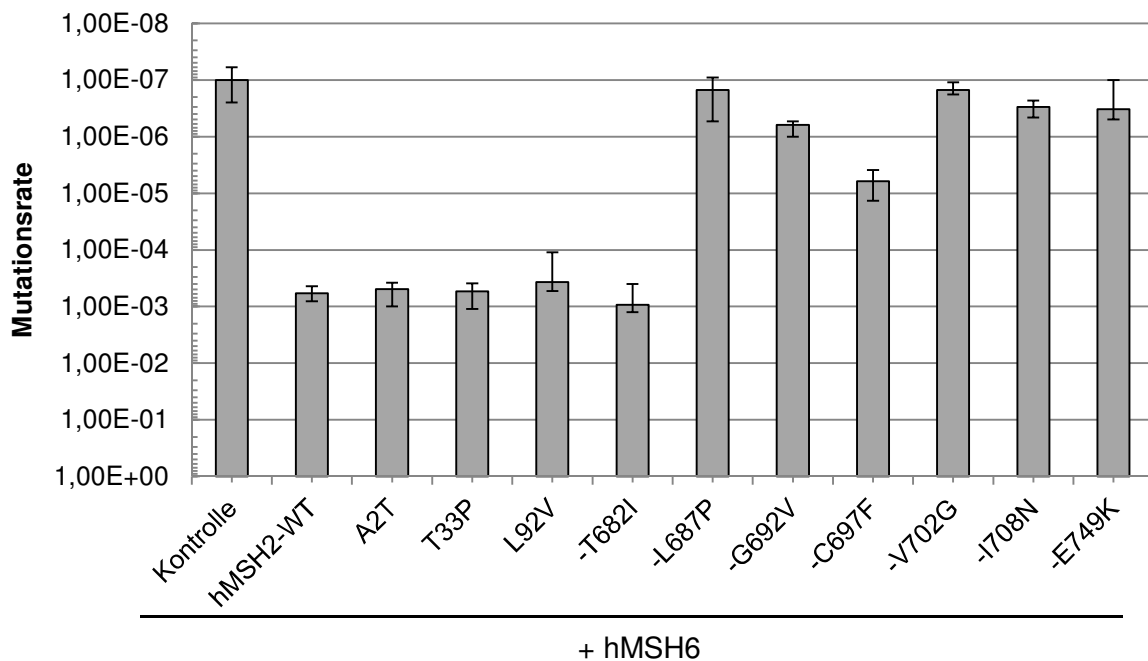


Abb. 47: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der hMSH2-Allele im dominant-negativen Mutatorphänotyp. Die Mutationsraten von A2T bis L92V, T682I, G692V und C697F sind gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht.

4.1.4 Interaktionsnachweis der hMSH2-Allele mittels Co-Immunopräzipitation

Um zu prüfen, ob ein ausbleibender Mutatorphänotyp wie unter 4.1.3 beobachtet auf die fehlende Interaktion zwischen hMSH2 mit hMSH6 oder der Expression eines hMSH2-Allels zurückzuführen ist, wurde diese mittels Co-Immunopräzipitation (CoIP) untersucht (Durchführung siehe 3.4.3, S. 74). Zwar liegen die Allele in keinem Bereich, der für die Interaktion mit hMSH6 verantwortlich ist, ein Einfluss auf die Interaktion kann aber nicht ausgeschlossen werden. Für die Analyse wurde der Wildtyp E134 mit hMSH6 und hMSH2 oder dessen Allelen exprimierenden Plasmiden transformiert, welche auch schon beim dominant-negativen Mutatorphänotyp verwendet wurden. Nach einer Zellyse eines transformierten Klons wurde anschließend hMSH6 mit einem anti-hMSH6 Antikörper präzipitiert. Wurde ein hMSH2-Allel mit hMSH6 kopräzipitiert, konnte es mittels anti-hMSH2 Antikörper nachgewiesen werden, was somit für Interaktion mit hMSH6 spricht.

Als Negativkontrolle des Systems wurde der wildtypische Hefestamm E134 mit dem Leervektor pFH3 und dem Plasmid pAC61.2 (#1284, hMSH6) kotransformiert. Für die Negativkontrolle war erwartungsgemäß weder im INPUT noch nach der CoIP humanes MSH2 nachweisbar. Als Positivkontrolle diente E134 mit den transformierten Plasmiden #1282 (hMSH2) und #1284 (hMSH6). Sowohl im INPUT als auch in der CoIP war hMSH2 nachweisbar (Abb. 48 A und B).

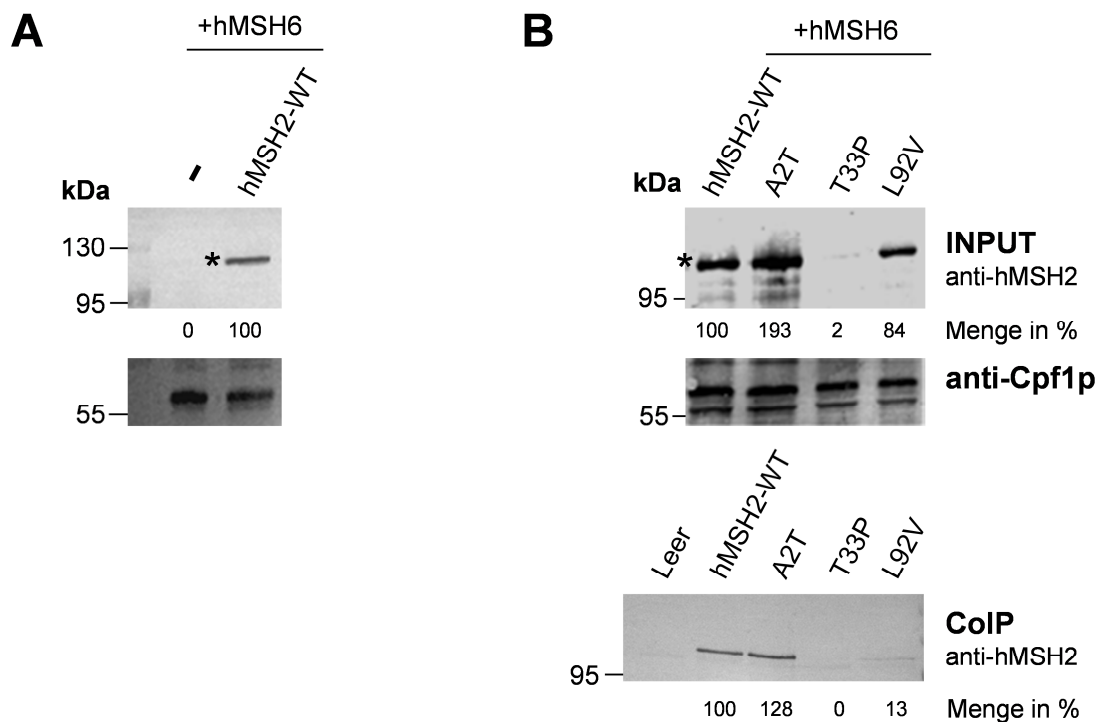


Abb. 48: Co-Immunopräzipitation von Allelen des N-Terminus von hMSH2 durch hMSH6. Humanes MSH6 wurde präzipitiert, um anschließend die hMSH2-Allele nachzuweisen. A) Positivkontrolle für die Funktionalität des hMSH2 (theor. 105 kDa) Antikörpers. B) INPUT und CoIP von hMSH2-WT und den Allelen A2T, T33P und L92V. Für den INPUT wurden jeweils 10 µg

Rohextrakt geladen (T33P war fast nicht nachweisbar). Für die CoIP wurden 500 µg Proteinrohextrakt einer Kultur von OD 1 mit 1 µg α-hMSH6 Antikörper versetzt. Alle Proben wurden über ein 10 %iges SDS-Gel aufgetrennt. kDa = Kilodalton, - = Negativkontrolle (Leervektor pFH3). Cpf1p (36 kDa) = Ladekontrolle. Das Protein Cpf1p ist ein Zentromer-bindendes Protein. Die Quantifizierung des Cpf1p-Signals erfolgte mit der ersten Bande von oben. Die Quantifizierung aller Banden erfolgte mit dem Programm ImageJ (siehe Methoden 3.6.2, S. 78).

Mit der INPUT-Analyse wurde direkt mitgeprüft, wie hoch die Proteinmengen der verschiedenen Allele waren. Für die Allele des N-Terminus zeigte sich, dass die Proteinmenge von A2T fast doppelt so hoch wie der Wildtyp war (193 %). Schwächer exprimiert wurde das Allel L92V (84 %), wohingegen T33P mit 2 % der wildtypischen Proteinmenge fast nicht nachweisbar war. In der CoIP zeigte sich, dass A2T mit 128% im Vergleich zu wildtypischen hMSH2 nachzuweisen war. Hingegen war das Allel L92V nur mit einer Proteinmenge von 13% detektierbar und für T33P konnte nach der CoIP kein hMSH2-Protein nachgewiesen werden (Abb. 48B)

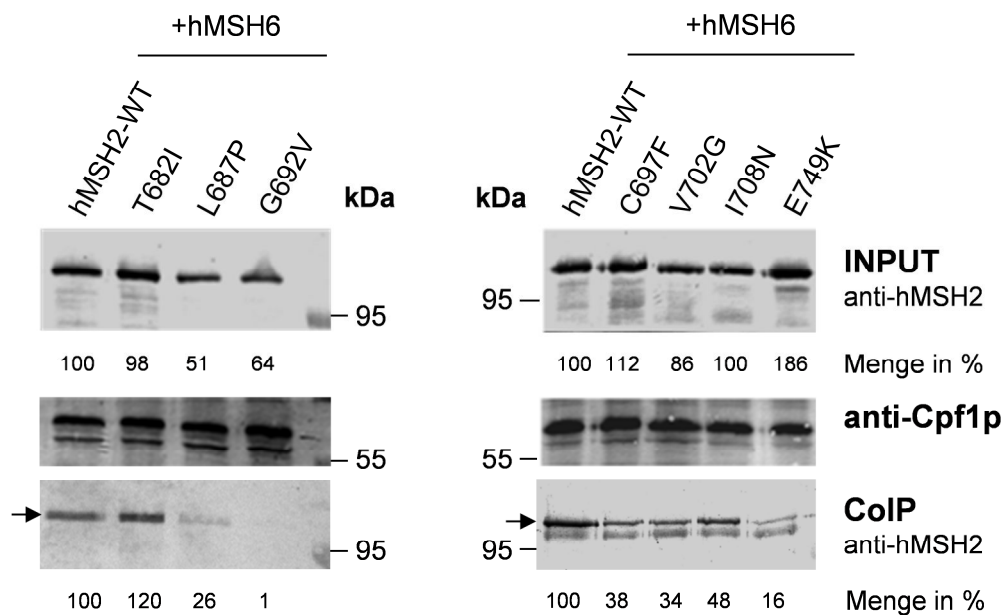


Abb. 49: Co-Immunopräzipitation von Allelen des C-Terminus von hMSH2 durch hMSH6. Abgebildet sind Western-Blots, welche mit einem anti-hMSH2 Antikörper inkubiert wurden. Für den INPUT wurden jeweils 10 µg Zellextrakt auf ein 10 %iges SDS geladen. Der schwarze Pfeil markiert die hMSH2-Bande nach der CoIP, wobei die untere Bande unspezifisch ist. Cpf1p = Ladekontrolle

Für die Allele des C-Terminus konnten im INPUT wildtypähnliche hMSH2-Mengen für I708N (100 %) und T682I (98 %) gemessen werden (Abb. 49). Die CoIP dieser Allele zeigte ein differenziertes Bild. T682I konnte mit einer Erhöhung auf 120 % nachgewiesen werden, während für I708N nur 48 % detektiert wurden

Die Allele V702G, G692V und L687P zeigten bereits im INPUT eine Erniedrigung der Proteinmengen auf 86, 64 bzw. 51 %. Für V702G konnten nach der CoIP noch 34 %, für L687P noch 26 % sowie für G692V nur noch 1 % Protein nachgewiesen werden.

A)	B)	C)	D)	E)
Konstrukt	Menge in %	Faktor ggü. hMSH2-WT	Menge nach CoIP in %	Faktor ggü. hMSH2-WT nach CoIP
A2T	193	1,9 ↑	128	1,3 ↑
E749K	186	1,8 ↑	16	6,3 ↓
C697F	112	1,1 ↑	38	2,6 ↓
hMSH2-WT	100	1 =	100	1
I708N	100	1 =	48	2 ↓
T682I	98	1 =	120	1,2 ↑
V702G	86	1,1 ↓	34	3 ↓
L92V	84	1,2 ↓	13	7,7 ↓
G692V	64	1,5 ↓	1	100 =
L687P	51	2 ↓	64	1,5 ↓
T33P	2	50 ↓	0	0
Kontrolle	0	0	0	0

Tab. 16: Übersicht der Proteinmengen vor und nach der CoIP von hMSH2-Allelen. Basierend auf der Quantifizierung des hMSH2-Signals aus Abb. 48 und Abb. 49 wurden die Ergebnisse hier zusammengefasst und nach INPUT-Proteinmengen gereiht. A) untersuchtes Konstrukt. B) Proteinmenge im Vergleich zu hMSH2-WT (graue Spalte). C) Faktor erhöht (↑), erniedrigt (↓) oder unverändert (=) gegenüber hMSH2-WT. D) hMSH2-Menge nach der CoIP im Vergleich zu hMSH2-WT. E) siehe C. ggü. = gegenüber

Eine erhöhte Proteinmenge im INPUT zeigten E749K (186 %) und C697F (112 %). Die hohen Proteinmengen konnten nach der CoIP jedoch nicht bestätigt werden: für C697F waren lediglich noch 38 %, für E749K 16 % nachweisbar.

Insgesamt zeigten von den 10 untersuchten Allelen (Abb. 48 und Abb. 49) im INPUT 3 Allele eine erhöhte Proteinmenge. Wiederum 2 Allele konnten als wildtypisch eingestuft werden. 4 Allele zeigten eine Reduktion, wohingegen ein Allel fast nicht zu detektieren war. Nach der CoIP wurden 2 Allele mit erhöhter Proteinmenge nachgewiesen, 8 hingegen zeigten eine Reduzierung, wobei für ein Allel nur ein sehr schwaches Proteinsignal detektiert wurde und für ein weiteres Allel kein hMSH2 nach der CoIP nachgewiesen werden konnte (Tab. 16). Die reduzierte Proteinmenge der hMSH2-Allele kann als Grund für einen ausbleibenden dominant-negativen Mutatorphänotyp ausgeschlossen werden. Zwar sind einige ko-präzipitierte hMSH2-Allele 3mal weniger vorhanden als WT-hMSH2, trotzdem sollte die Interaktion aufgrund der hohen Expression vom Plasmid ausreichen, um immer noch einen Mutatorphänotyp auszulösen. Trotzdem scheinen diese Allele eine veränderte Biologie bzgl. der Interaktion mit hMSH6 zu haben.

4.1.5 *In silico* Analyse von humanen MSH2 Allelen

Neben *in vitro* und *in vivo* Analysen zur Funktionsfähigkeit von hMSH2-Allelen wurden zusätzlich *in silico* Analysen durchgeführt. Aufgrund verschiedenster Algorithmen berechnen Programme den Einfluss eines Aminosäureaustausches auf die Funktion. Diese Analysen werden ergänzend zu experimentellen Ansätzen verwendet (Details siehe 3.6.3, S. 79). Mittels der Programme SIFT, PolyPhen2 und MAPP-MMR wurden die Allele des humanen MSH2 analysiert. Dabei basiert die Vorhersage der Funktionalität eines Aminosäureaustausches auf dem Grad der Konservierung einer Aminosäure sowie ihrer chemischer Eigenschaften.

Beim SIFT-Programm gibt ein Wert von weniger also 0,05 an, dass ein Aminosäureaustausch wahrscheinlich Einfluss auf die Proteinfunktion hat. So zeigte sich, dass nur die Allele T682 (Wert 1), L92V (0,37) und A2T (0,32) als funktionell eingestuft wurden. Alle anderen Allele wurden als nicht-funktionell vorhergesagt (0,00; Tab. 17).

Bei der Analyse mit PolyPhen2 werden Allele als funktionell eingestuft, wenn der errechnete Wert unter 0,05 liegt. Dies traf nur für T682I zu, wohingegen bei alle anderen Allelen ein Wert von über 0,05 errechnet wurde.

Die Analyse mit MAPP-MMR zeigt funktionelle Allele bei einem Wert von unter 4,55 an. Werte, die um diesen Wert streuen, werden als Grenzfall eingestuft. In der Analyse zeigte sich, dass erneut das Allel T682I als funktionell eingestuft wurde (1,9). Für L92V lag das Ergebnis in einem Grenzbereich, so dass eine Aussage über die Funktionalität unklar ist. Für das Allel A2T konnte keine Klassifizierung vorgenommen werden. Alle anderen untersuchten Allele wurden als nicht-funktionell eingestuft (Werte zwischen 11,52 und 29,36).

Zusammenfassend wurde das Allel T682I in 3 verschiedenen *in silico* Ansätzen als funktionell eingestuft. Dies deckt sich mit den bisher durchgeführten *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen. Die Analyse der Allele A2T und L92V liefert unklare Ergebnisse. Alle anderen Allele wurden über die 3 Verfahren als defekt eingestuft, was sich ebenfalls mit den bisherigen Untersuchungen deckt.

Allel	SIFT	PolyPhen2	MAPP-MMR	Ergebnis
A2T	0,32	1	-	unklar
T33P	0.00	1	6,73	3x defekt
L92V	0.37	0.95	4,1	unklar
T682I	1	0.003	1,9	3x funktionell
L687P	0.00	1	23,44	3x defekt
G692V	0.00	1	29,36	3x defekt
C697F	0.00	1	11,52	3x defekt
V702G	0.00	0.96	17,4	3x defekt
I708N	0.00	1	14,63	3x defekt
E749K	0.00	0.998	19,98	3x defekt

Tab. 17: *In silico* Analyse der humanen MSH2 Allele.

Die Programme stufen die Allele nach folgenden Kriterien als funktionell / nicht-funktionell ein: SIFT = defekt wenn weniger als 0,05; PolyPhen2 = defekt wenn mehr als 0,05; MAPP-MMR = defekt wenn mehr als 4,55. - = Programm konnte Berechnung nicht durchführen. Grün =

funktionell, orange = grenzwertiges Ergebnis, keine Aussage möglich, rot = nicht funktionell

4.2 Der Einfluss des replikativen Alterns auf die Fehlpaarungsreparatur

Mit Hilfe des Modellorganismus *S. cerevisiae* sollte geprüft werden, ob replikative Alterung einen Einfluss auf die Fehlpaarungsreparatur-Aktivität hat.

Um replikativ gealterte Zellen zu erhalten, wurden Hefezellen einer logarithmischen Flüssigkultur auf der Zelloberfläche mit Biotin markiert. Die biotinylierten Hefen wurden weiter inkubiert und nach ca. 6 Generationen sortiert (Abb. 50). Dies wurde mit magnetischen Anti-Biotin Microbeads erreicht, welche biotinylierte Mutterzellen von nicht-biotinylierten Tochterzellen mittels eines Magneten trennen (genauer experimenteller Ablauf auf S. 59, 3.2.6.1). Die angereicherten biotinylierten Mutterzellen wurden anschließend wieder in Kultur genommen und erneut für weitere Generationen inkubiert. Durch Wiederholung dieser Schritte stieg das replikative Alter der biotinylierten Mutterzellen an. Für die Prüfung eines Alterungseffekts auf die Fehlpaarungsreparatur wurde für dieses Experiment der bereits beschriebene Wildtypstamm E134 verwendet, der das *lys2_{A14}* Reportersystem im Genom trägt. Mit steigendem replikativem Alter wurden alte Mutterzellen auf Minimalmedium (SD) ohne Lysin plattiert, um einen Effekt auf die Anzahl von Lysin-Revertanten (und somit eventuell auf die Fehlpaarungsreparatur) zu untersuchen.

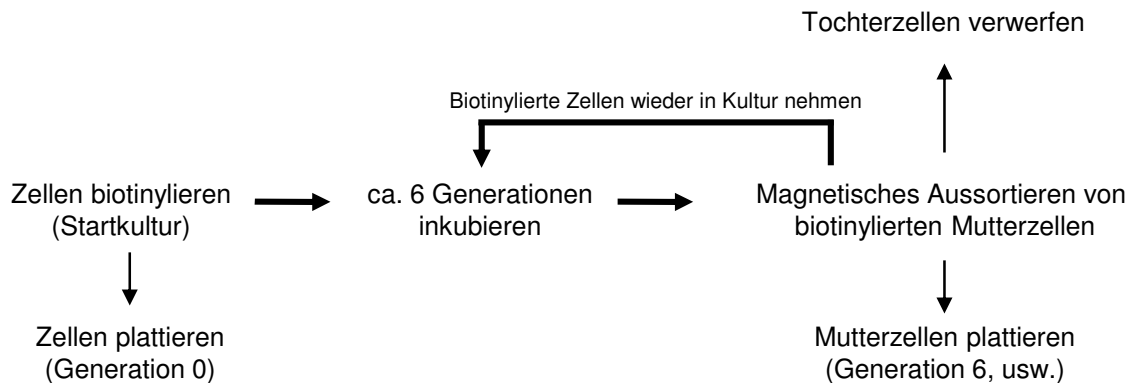


Abb. 50: Fließschema zur Gewinnung und Untersuchung von replikativ gealterten Zellen. Das Experiment wurde mit $6,5 \times 10^7$ biotinylierten Zellen begonnen. Biotinylierte alte Mutterzellen wurden dann nach verschiedenen Generationen auf SD+24-Medium für die Lebendzellzahl sowie auf SD+24-Lysin-Medium für die Anzahl an Lysin-Revertanten plattiert.

4.2.1 Überprüfung des experimentellen Systems zur Gewinnung von alten Mutterzellen

Da die Analyse der Fehlpaarungsreparatur mit biotinylierten Zellen unterschiedlichen replikativem Alters erfolgen sollte, wurde nach verschiedenen Arbeitsschritten mittels Durchflusszytometrie untersucht, wieviele biotinylierte Zellen tatsächlich noch vorhanden waren bzw. plattiert wurden.

Zu Beginn des Experiments wurde die Biotinylierungseffizienz der Startkultur (Generation 0) geprüft. Ein Aliquot von Zellen wurde nach der Biotinylierung entnommen und mit Streptavidin-Allophycocyanin (Strep-APC) versetzt. Streptavidin bindet nicht-kovalent an Biotin, so dass an Streptavidin gekoppeltes APC mittels Laser angeregt werden kann und die Menge an fluoreszenten Signalen angibt, wieviele Zellen biotinyliert sind. Als Kontrolle dienten Zellen vor dem Biotinylierungsschritt, die sowohl mit als auch ohne Strep-APC in der Durchflusszytometrie quantifiziert wurden.

Sowohl unbiotinylierte als auch biotinylierte Zellen zeigten ohne Strep-APC eine relative Fluoreszenz im Bereich von 10^1 - 10^2 (Abb. 51A). Die Zugabe von Strep-APC zu unbiotinylierten Zellen zeigte eine leichte Verschiebung der Population entlang der X-Achse (relative Fluoreszenz) nach rechts auf 10^3 . Strep-APC scheint unspezifisch an Hefezellen zu binden, was die leicht erhöhte Fluoreszenz erklären würde. Biotinylierte Zellen nach Strep-APC-Behandlung zeigten eine signifikante Verschiebung der Population zu höherer Fluoreszenz (10^4). Die Quantifizierung zeigte, dass 99,5% der biotinylierten und mit Strep-APC versetzten Zellen APC-positiv sind, was für eine 100%ige Biotinylierungseffizienz spricht (Abb. 51B). Eine anschließende Prüfung der Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop zeigte, dass alle diese Zellen tatsächlich APC-positiv sind. Bei allen anderen in der Durchflusszytometrie untersuchten Proben konnte im Mikroskop keine sichtbare Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 51B).

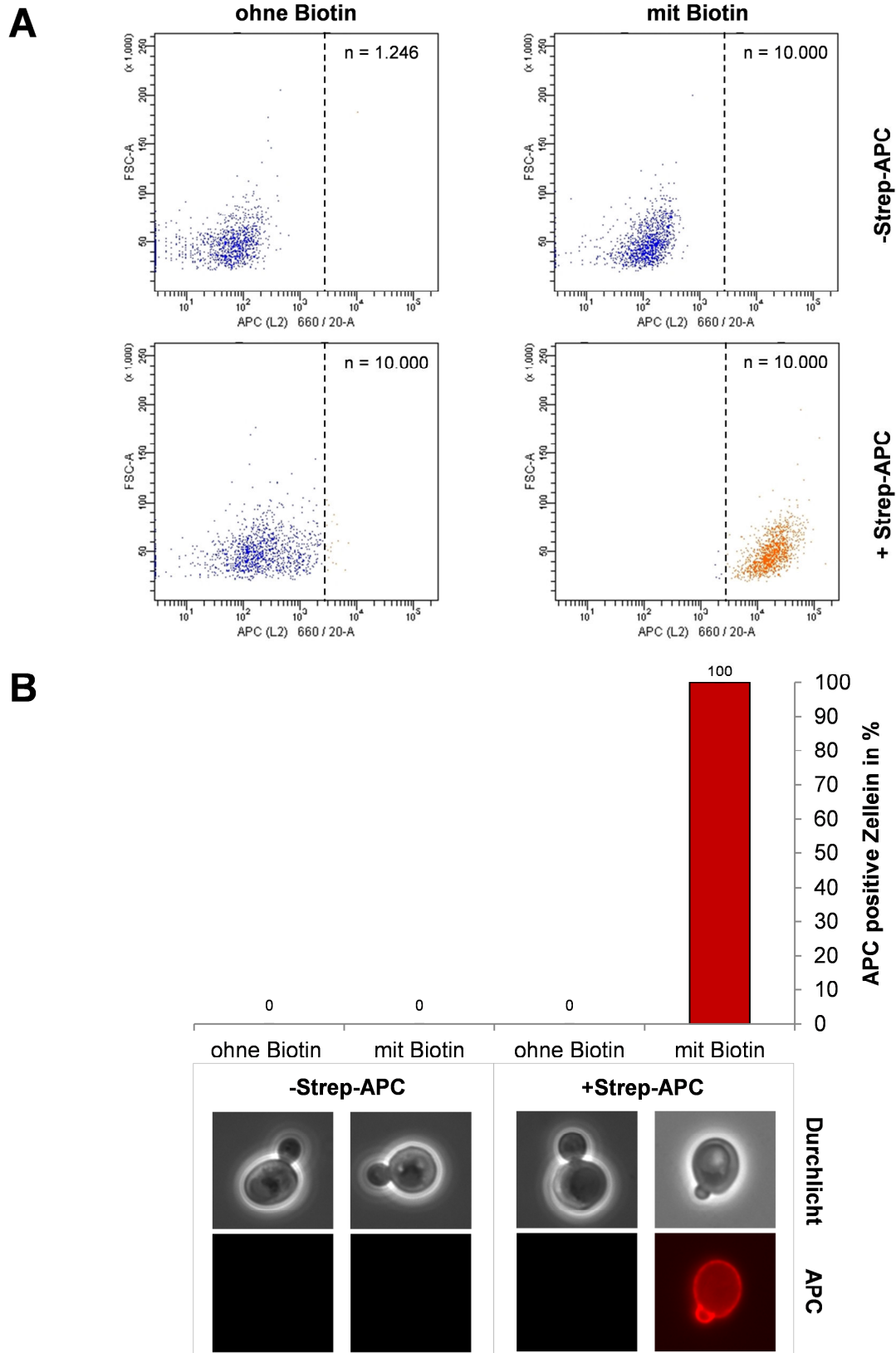


Abb. 51: Nachweis von biotinylierten Zellen. Bei jeder Messung ist oben rechts die Anzahl (n) der gemessenen Hefezellen angegeben. A) Messung von Hefe-Zellen in der Durchflusszytometrie zum Nachweis ihrer Biotinylierung mittels Strep-APC zum Zeitpunkt 0 (n=3). Die Fluoreszenz wird auf der X-Achse, die Größe der Zellen auf der Y-Achse dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine Hefe-Zelle. Nicht-fluoreszente Zellen sind blau dargestellt, wohingegen fluoreszente Zellen als orange angezeigt werden. Die Grenze zwischen einer unspezifischen und spezifischen Fluoreszenz wurde bei ca. 2×10^3

gesetzt (vgl. hierzu Abb. 61 auf S.162 im Anhang 6.4). B) Quantifizierung der gemessenen biotinylierten Zellen aus (A). C) Fluoreszenzmikroskopie von der in (A) untersuchten Proben. APC (L2) 660/20-A = relative Fluoreszenz, FSC-A = forward scatter, entspricht Größe der Zellen, Strep-APC = Streptavidin-Allophycocyanin.

Nachdem überprüft worden war, dass die verwendete Startkultur zu 100% biotinylierte Zellen enthält, wurde diese für ca. 6 Generationen inkubiert und anschließend nach Zugabe der magnetischen Microbeads magnetisch sortiert.

Nach der Trennung von biotinylierten alten Mutterzellen von nicht-biotinylierten jungen Tochterzellen wurde die Sortierungseffizienz der biotinylierten Zellen erneut per Durchflusszytometrie quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Menge an biotinylierten Zellen mit steigender Generationszahl nach jedem Aussortieren konstant zwischen 90 bis 92% lag (jeweils $n = 10.000$, Abb. 52A). Neben dem Nachweis der Biotinylierung in der Mikroskopie konnte man auch durch einfache Betrachtung die Zellpellets von sortierten jungen Tochterzellen von denen alter biotinylierter Mutterzellen unterscheiden. Biotinylierte Zellen zeigten eine Braunfärbung, welche auf die gebundenen magnetischen Microbeads zurückzuführen war. Dies war bei aussortierten jungen Tochterzellen nicht der Fall (Abb. 53). Mit steigendem replikativem Alter zeigte sich zudem eine Veränderung der Zellphysiologie bei alten Mutterzellen. Diese wurden zum einen leicht größer, andererseits verlief die Abknospung von Tochterzellen nicht mehr so effizient, da diese sich teilweise nicht mehr von den Mutterzellen abschnürten (Abb. 52A, Generation 13 und 19). Dieser Phänotyp konnte in der Durchflusszytometrie ebenfalls gemessen werden. Mit steigendem replikativem Alter verschob sich die biotinylierte Population entlang der Y-Achse (aufgrund größerer Vorwärtsstreulicht-Parameter = forward-scatter) nach oben, was auf alte Mutterzellen mit nicht-abgeschnürten Tochterzellen zurückzuführen war. Diese Zellhaufen wurden in Generation 0 kaum, hingegen in Generation 19 sehr häufig detektiert (Abb. 52B). Eine Quantifizierung erfolgte aber nicht.

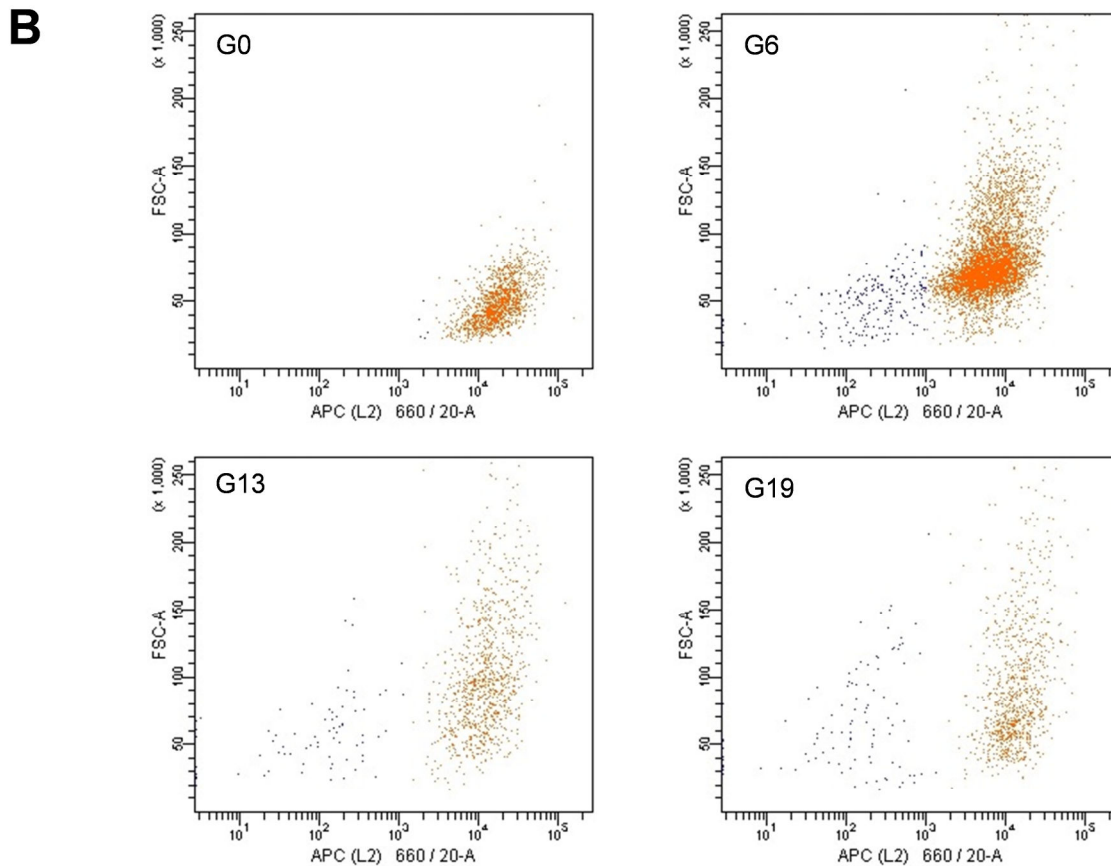
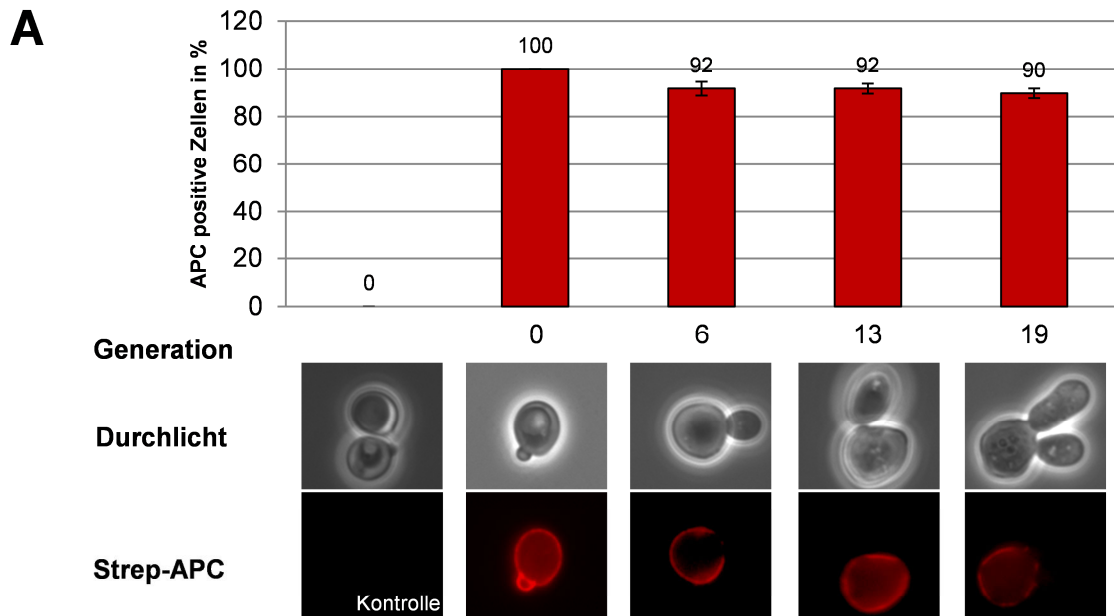


Abb. 52: Quantifizierung der Sortierungseffizienz von alten biotinylierten Zellen. (A) Nach ca. 6 Generationen wurden die biotinylierten Zellen von den unbiotinylierten Tochterzellen per magnetischer Sortierung getrennt (n=3). Es zeigte sich in der Durchflusszytometrie, dass die Anzahl von biotinylierten Zellen (orange) nach jedem Sortierschritt konstant bei ~90% lag (unbiotinylierte Tochterzellen sind blau dargestellt). Dies konnte per Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Hier zeigte sich auch, dass der Zell-Phänotyp sich über die Generationen hinweg verändert. (B) Dies

äußerte sich in der Durchflusszytometrie im Verschieben der Zell-Population nach oben entlang der Y-Achse (forward-scatter) über die Generationen hinweg (Quantifizierung erfolgte nicht). Die Grenze zur Detektion von fluoreszenten Zellen lag bei G0 wie in Abb. 51 bei ca. 2×10^3 , für G6 bis G19 wurde die Grenze auf ca. $0,5 \times 10^3$ herabgesetzt, da die Fluoreszenzintensität von Allophycocyanin hier etwas schwächer im Vergleich zu G0 war.

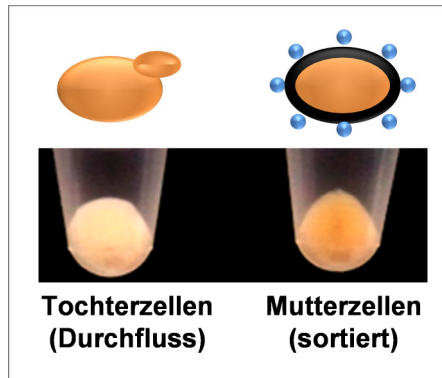


Abb. 53: Visueller Nachweis für das Binden von paramagnetischen Anti-Biotin Microbeads an biotinylierte Mutterzellen. Die Braunfärbung von Mutterzellen wird durch die Microbeads verursacht. Nicht-biotinylierte Zellen binden keine Microbeads (Tochterzellen). Für diese Aufnahmen wurden ca. 6×10^7 Zellen zentrifugiert.

Zusammenfassend ist das verwendete Microbeads-System in der Lage, biotinylierte Mutterzellen von jungen Tochterzellen nach verschiedenen Generationszeiten effizient zu trennen. Durch das Aussortieren von alten Zellen nach 6, 13 und 19 Generationen konnten ca. 90 % biotinylierte alte Zellen gewonnen werden, die für Analysezwecke verwendet werden konnten. Der auftretende Phänotyp von nicht-abgeschnürten Tochterzellen an alten Mutterzellen nahm Einfluss auf die zu plattierende Zellzahl für das folgende Experiment. Ein Zellhaufen von einer alten Mutterzelle mit nicht-abgeschnürten Tochterzellen wurde als eine Zelle gezählt, da nicht davon auszugehen war, dass sich die Tochterzellen während des Plattierens von der Mutterzelle lösen und eine eigene Kolonie ausbilden. Zusätzlich diente dieser Phänotyp als Indikator, um aussortierte Zellen als „alt“ zu identifizieren.

4.2.2 Mit steigendem replikativem Alter nehmen *LYS2*-Revertanten zu

Nachdem die Isolierung von Hefezellen unterschiedlichen replikativen Alters etabliert worden war, wurde als nächstes geprüft, ob sich im Verlauf des replikativen Alterns eine Veränderung der Fehlpaarungsreparatur-Aktivität feststellen lässt bzw. ob sich die Anzahl an *LYS2*-Revertanten ändert. Für die Analyse wurde sowohl der Wildtypstamm E134 als auch der isogene $\Delta msh2$ Stamm Dag60 verwendet, die wie unter Abb. 11, S. 32 beschrieben das *lys2_{A14}*-Reportersystem besitzen. Biotinylierte Mutterzellen wurden nach durchschnittlich 0, 6, 12 und 19 Generationen auf Minimalmedium ohne Lysin auf die Anzahl von *LYS2*-Revertanten hin untersucht. Im Durchschnitt wurden von den beiden Stämmen ca. 90 % biotinylierte Zellen pro untersuchtem Generationszeitpunkt aussortiert (Abb. 54A).

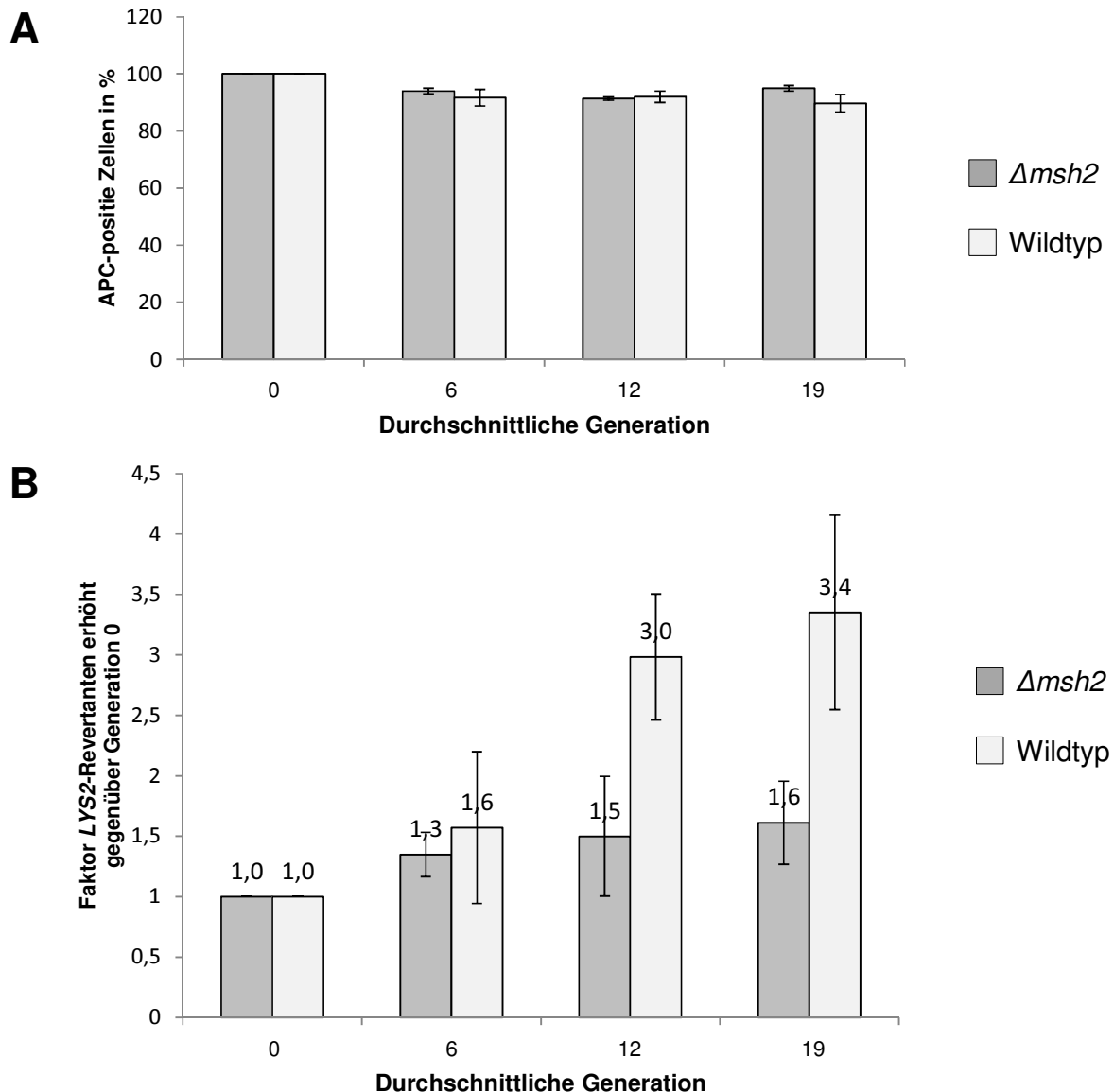


Abb. 54: Einfluss des replikativen Alters auf die *LYS2*-Revertanzahl. (A) Per Durchflusszytometrie wurde zur Kontrolle geprüft, wieviele Zellen vor dem Plattieren biotinyliert und somit alt waren. (B) Analyse der *LYS2*-Revertanzahl eines Wildtyp- und $\Delta msh2$ -Stamms bei steigendem replikativen Alter. Es wurden von jedem Hefestamm jeweils 3 unabhängige Klone untersucht. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt wurden für die Revertantenbestimmung für den $\Delta msh2$ -Stamm 5×10^4 Zellen, für den Wildtyp $4,5 \times 10^6$ Zellen plattiert (Details Durchführung siehe 3.2.6.1.4 und 3.2.6.1.5, S. 62). Um den Faktor der *LYS2*-Revertanzahl zu bestimmen, wurde die Revertanzahl jedes untersuchten Zeitpunkts gegenüber Generation 0 verglichen. Es ist zu beachten, dass die Mutationsrate von $\Delta msh2$ bei 10^{-3} , wiederum die vom Wildtyp bei 10^{-7} liegt.

Für den Wildtypstamm zeigte sich, dass schon nach 6 Generationen die Anzahl an *LYS2*-Revertanten um den Faktor 1.6 gegenüber Generation 0 erhöht war. Nach 12 Generationen stieg der Faktor an Revertanten um 3 an, nach 19. Generationen war ein Faktor von 3.4 zu messen (Abb. 54B). Die erhöhte Anzahl an Revertanten nach 19 Generationen könnte entweder auf einer erhöhten Fehlerrate der DNA-Polymerase und/oder einer schlechteren Fehlpaarungsreparatur beruhen. Sollte die Fehlpaarungsreparatur einen Einfluss haben,

sollte die Revertanzahl im $\Delta msh2$ Stamm niedriger ausfallen. So zeigte sich bei der Analyse des Fehlpaarungsreparatur-defizienten $\Delta msh2$ Stamms, dass wie im Wildtyp die Mutationsrate schon nach ca. 6 Generationen anstieg (Faktor 1,3), um dann um den Faktor 1.6 nach Generation 12 und 19 anzusteigen (Abb. 54B).

Zusammenfassend zeigte sich eine Erhöhung der *LYS2*-Revertanten mit steigendem replikativem Alter in einem Wildtyp- sowie $\Delta msh2$ -Stamm. Der Faktor gegenüber Generation 0 war bei Generation 19 im Wildtyp doppelt so hoch als im *msh2* Deletionsstamm. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Fehlpaarungsreparatur im Wildtyp mit steigendem replikativen Alter an Effizienz verliert und somit weniger Fehler erkennt und behebt.

4.2.3 Wie verändert sich die Proteinmenge von Hefe-Msh2p über das Alter hinweg?

Eine Möglichkeit der Abnahme der Fehlpaarungsreparatureffizienz mit steigendem replikativen Alter könnte mit der Abnahme von beteiligten MMR-Proteinen korrelieren, wie z.B. Msh2p. Diese Möglichkeit war naheliegend, da entsprechende Beobachtungen in alten Zellen von *Arabidopsis thaliana* und humanen Fibroblasten gemacht wurden (Chang, Jin et al. 2008; Golubov, Yao et al. 2010).

Um diese Annahme für *S. cerevisiae* zu prüfen, wurde die Proteinmenge von Hefe-Msh2p aus einem Gesamtzelllysat eines E134-Klons (Wildtyp) zu verschiedenen Generationszeitpunkten replikativ alter Zellen untersucht (experimentelle Durchführung 3.2.6.1.6, S. 63). Leider konnte eine zusätzliche Analyse der Revertanzahl nicht erfolgen, da alle Zellen für die Proteinanalyse verwendet werden mussten.

Die Proteinmenge von Hefe-Msh2p lag nach 7 Generationen bei 91 % im Vergleich zu Generation 0 (Abb. 55). Nach 14 Generationen zeigte sich eine Menge von 105 %, wohingegen nach 21 Generationen eine Gesamtmenge von 100 % zu detektieren war.

Die Proteinmenge von Hefe-Msh2p war somit über das replikative Alter hinweg konstant, so dass aufgrund dieser Daten die beobachtete höhere Mutationsrate alter Hefezellen nicht auf Änderungen in der Msh2p-Proteinmenge zurückzuführen ist. Es muss aber in Betracht gezogen werden, dass das Msh2p-Signal in alten Mutterzellen durch nicht-abgetrennte Tochterzellen beeinflusst sein könnte (vgl. Abb. 14 S. 36 und Abb. 52, S. 121). Die Anzahl von nicht-abgetrennten Zellen variierte zwischen 2 und 5 Zellen (siehe weiterhin Anhang Abb. 63, S. 163). Diese Zellen werden ebenfalls beim Herstellen des Zellextrakts mitlysiert und könnten das hier gezeigte Ergebnis beeinflussen.

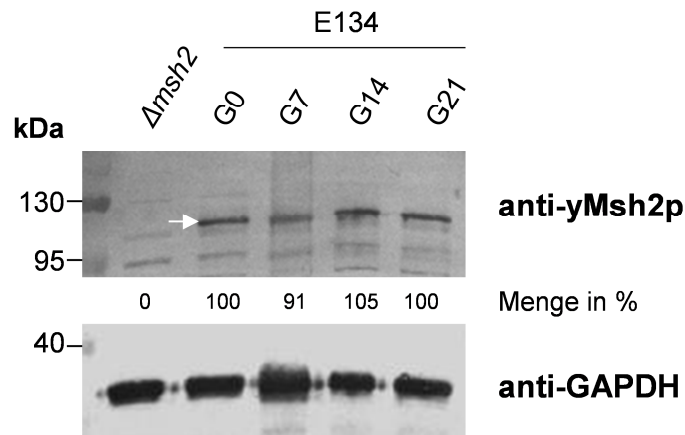


Abb. 55: Analyse der Hefe-Msh2p Proteinmengen im Wildtyp E134 nach verschiedenen Generationen. Das Experiment wurde wie in Abb. 19 dargestellt durchgeführt (S. 63). Zum Nachweis wurden 10 µg Gesamtzelleextrakt auf ein 10 %iges SDS geladen. Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und mit Generation 0 verglichen. „Menge in %“ bezieht sich auf Hefe-Msh2p (weißer Pfeil, theor. Gewicht 109 kDa) zum Zeitpunkt 0. G = Generation, kDa = Kilodalton, GAPDH = Ladekontrolle (36 kDa).

4.2.4 Beeinflussen tote Mutterzellen die Proteinmenge von Hefe-Msh2p?

Beim Bestimmen der *LYS2*-Revertantenanzahl unter 4.2.2 war aufgefallen, dass mit steigendem replikativen Alter die Lebensfähigkeit alter Mutterzellen abnimmt (siehe Anhang 6.5, S. 163). Um auszuschließen, dass nach ca. 19 Generationen eine Mischkultur von toten und lebenden alten Mutterzellen ein falsch-positives Signal von Hefe-Msh2p im Western-Blot liefert, wurde in einem weiteren Experiment eine Lebend-Tot-Sortierung mittels Propidiumiodid (PI) vorgenommen. Ist eine Zelle tot, ist diese nicht mehr in der Lage, PI auszuschleusen, so dass diese per Durchflusszytometrie detektiert werden kann. So sollten lebende alte Mutterzellen gewonnen werden, welche anschließend auf die Hefe-Msh2p Menge untersucht werden sollten.

4.2.4.1 Lebend/Tot-Situation von replikativ gealterten Zellen

Wie die vorherigen Experimente wurde auch dieses mit ca. $6,5 \times 10^7$ biotinylierten Zellen begonnen. Die Ausbeute von aussortierten alten Mutterzellen lag in den vorherigen Experimenten teilweise nur bei 60 % im Vergleich zur Zellzahl der biotinylierten Zellen bei Beginn der Inkubation (z.B. Generation 0: biotinylierte $6,5 \times 10^7$ Zellen üN inkubiert, nach dem Aussortieren nach 6 Generationen ca. 4×10^7 biotinylierte Zellen gewonnen). Da bei der Lebend/Tot-Sortierung in der Durchflusszytometrie ebenfalls noch mit dem Verlust von Zellen zu rechnen war und am Ende dieses Experiments noch genügend Zellen für ein Proteinextrakt vorhanden sein sollten, wurde ein Klon des Stamms E134 nach der

Biotinylierung auf 2 Kolben verteilt und am Ende des Experiments wieder zusammengeführt, um diese Zellen dann mit PI anzufärben und per FACS zu analysieren.

Nach 6, 12 und 18 Generationen wurde je ein Aliquot der üN-Kultur als Kontrolle (enthält unbiotinylierte Tochterzellen und biotinylierte Mutterzellen, Mischkultur) sowie ein Aliquot der über Microbeads-sortierten Mutterzellen entnommen und auf Biotinylierung per Streptavidin-APC getestet. Gleichzeitig wurde mit PI geprüft, wie viele Zellen leben bzw. tot sind. Die Messung erfolgte nach 4 Kriterien, mit denen sich die Kulturen in 4 Subpopulationen einteilen ließen (Abb. 56A):

- PI-positiv/APC negativ (Q1) → tote Tochterzellen, nicht biotinyliert
- PI-positiv/APC positiv (Q2), → tote Mutterzellen, biotinyliert
- PI-negativ/APC-negativ (Q3) → lebende Tochterzellen, nicht biotinyliert
- und PI-negativ/APC-positiv (Q4) → lebende Mutterzellen, biotinyliert

Nach der Biotinylierung der Startkultur waren 95% der Zellen lebend und biotinyliert (Q4, Abb. 56A, Tab. 18). Lediglich 5% der untersuchten Population waren tot (Q2). Bei den Mutterzellen nach 6 Generationen blieb die Anzahl an Zellen der Population Q2 konstant (4 %). Hingegen nahm die Anzahl der lebenden Mutterzellen (Q4) von 95% auf 87% ab. Interessanterweise zeigte die Analyse der Mutterzellen nach 12 Generationen einen starken Anstieg der toten Mutterzellen auf 42 %, was einer Steigerung um den Faktor 10 entspricht. Dementsprechend nahm die Anzahl der lebenden Mutterzellen ab, so dass diese bei 56% lag (Q4). Nach 18 Generationen waren 86% aller Mutterzellen tot, was einen Anstieg um den Faktor 2 gegenüber Generation 12 entspricht. Nur noch 12% der biotinylierten Mutterzellen waren lebend. Dies entspricht nochmals einer Reduzierung um den Faktor 4.6 gegenüber Mutterzellen der Generation 12.

Tochterzellen, die von 6 Generationen alten Müttern abstammten, waren zu 97% lebend (Q3) und zu 0,4 % tot (Q1). Ein leichter Anstieg von toten Tochterzellen konnte nach 12 Generationen beobachtet werden (1,3 %), wobei die Anzahl an lebenden Zellen auf 96,6 % abnahm. Lebende Tochterzellen von Mutterzellen der 18. Generation zeigten weiterhin eine Reduzierung auf 95.6 %, während die Anzahl an toten Zellen auch hier zunahm (1,8 %).

Insgesamt nahm die Anzahl an lebenden biotinylierten alten Mutterzellen mit steigendem replikativem Alter signifikant ab. Nach 18 Generationen war die Anzahl um den Faktor 8 reduziert. Ebenfalls konnte durch Plattierung im Experiment unter 4.2.2 eine Reduzierung der Lebendzellzahl um den Faktor ~4 festgestellt (siehe Anhang 6.5, S. 163). Die steigende Anzahl von toten Tochterzellen aus alten Mutterzellen (Faktor 4,5 nach 18 Generationen) ist für dieses Experiment nicht weiter relevant.

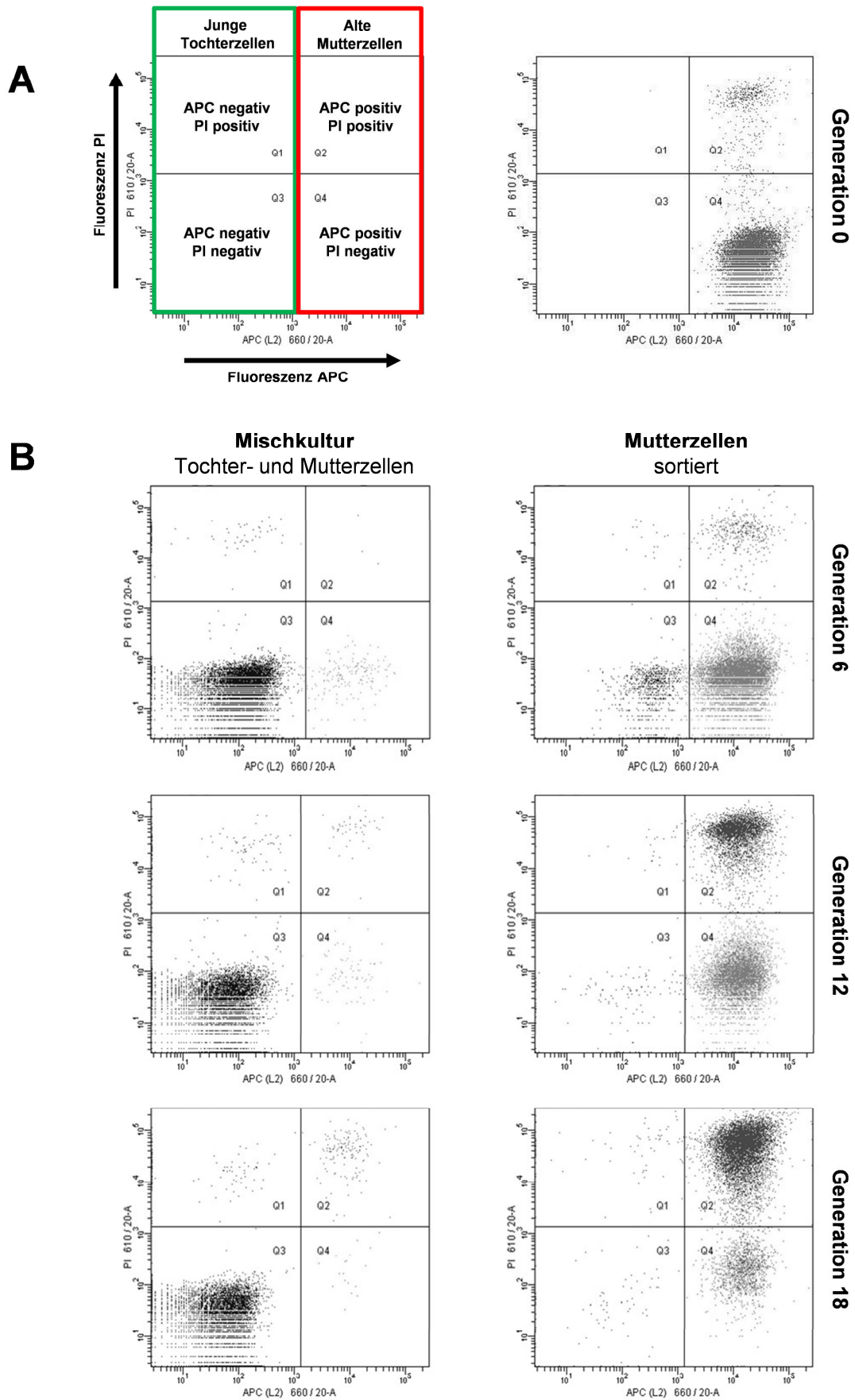
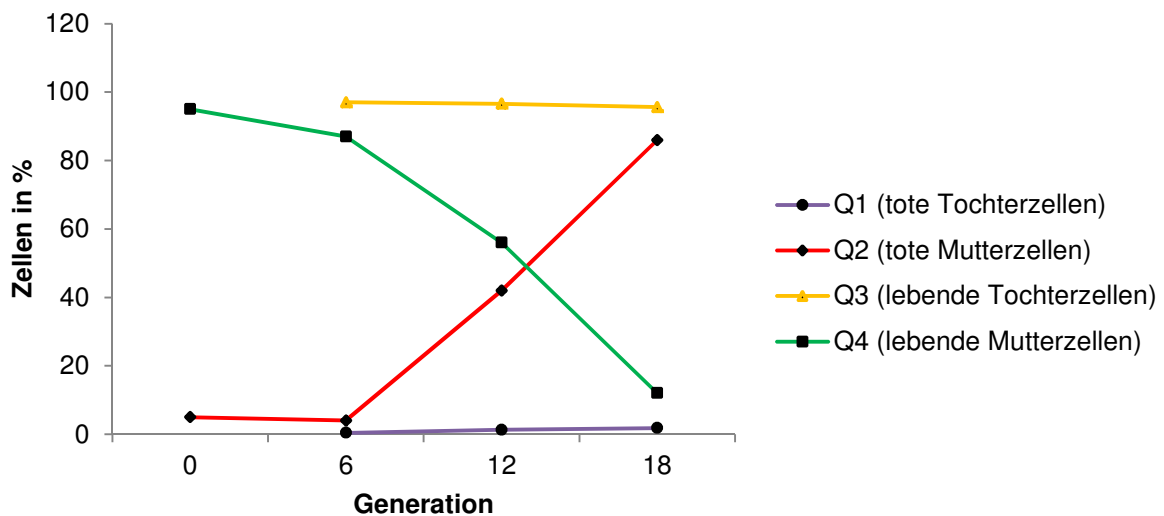


Abb. 56: Quantifizierung von PI-positiven und PI-negativen Hefezellen nach verschiedenen Generationen. Der Stamm E134 wurde nach den Generationen 0, 6, 12 und 18 nach den unter (A) aufgeführten Parametern analysiert. Als Kontrolle wurde nach 6, 12 und 18 Generationen die

unsortierte Kultur von E134 (Mischkultur) vor der Sortierung ebenfalls nach den genannten Parametern untersucht (B). Für Generation 0 gibt es keine Mischkultur, da alle Zellen hier biotinyliert waren. Die Grenze zur Detektion von fluoreszenten Zellen lag bei $0,5 \times 10^3$

	Biotinylierte Mutterzellen (APC positiv)			Nicht-biotinylierte Tochterzellen (APC negativ)		
	Tot (PI positiv) Q2	Lebend (PI negativ) Q4	Σ	Tot (PI positiv) Q1	Lebend (PI negativ) Q3	Σ
Generation 0	5	95	100	-	-	0
Generation 6	4	87	91	0,4	97	97,4
Generation 12	42	56	98	1,3	96,6	97,9
Generation 18	86	12	98	1,8	95,6	97,4



Tab. 18: Ergebnis der Quantifizierung von lebenden und toten Hefezellen nach verschiedenen Generationen. Angegeben ist die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellen nach den Parametern Q1 bis Q4 nach verschiedenen Generationen. - = Tochterzellen waren zu Generation 0 noch nicht vorhanden.

Die nach der Biotinylierung auf zwei Kolben verteilten Kulturen zeigten ähnliche Ergebnisse bzgl. der Lebend/Tot-Sortierung und wurden nach 18 Generationen wieder vereint.

4.2.4.2 Aussortieren von lebenden alten Mutterzellen mit anschließender Hefe-Msh2p Mengenanalyse

Aus insgesamt $\sim 3 \times 10^7$ alten Mutterzellen wurden $2,39 \times 10^7$ tote (Q2) und $1,8 \times 10^6$ lebende Zellen (Q4) aussortiert. Die restlichen Zellen (15 %) gingen bei der Sortierung durch das FACS verloren. Die gewonnenen Populationen Q2 und Q4 wurden lysiert und das erhaltene Proteinextrakt auf die Hefe-Msh2p Proteinmenge hin untersucht. Aufgrund der geringen Zellzahl der Population Q4, die nach dem Sortieren erhalten wurde, konnten nur 5 µg Proteinextrakt für die Analyse verwendet werden.

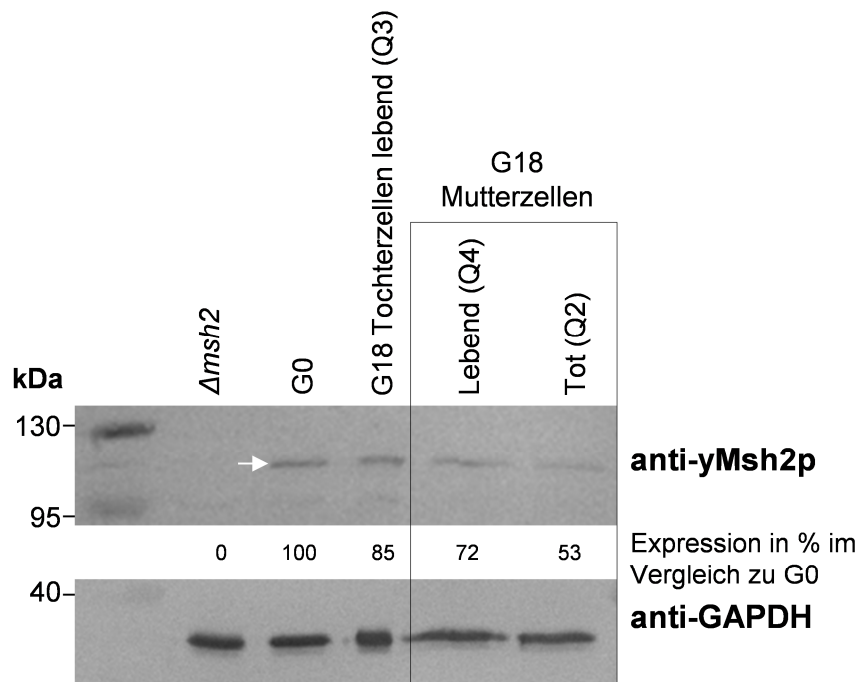


Abb. 57: Nachweis von Hefe-Msh2p bei lebenden und toten replikativ gealterten Zellen. Zum Nachweis wurden 5 µg Proteinextrakt jeder Kultur auf ein 10 %iges SDS geladen. Zur Quantifizierung wurden die Signalintensitäten von Hefe-Msh2p und GAPDH gemessen wobei die yMsh2p-Menge von Hefezellen der Generation 0 (G0) auf 100 % gesetzt wurde. Die Intensitäten der anderen Banden wurden im Vergleich zu G0 bestimmt.

Zur Analyse der Hefe-Msh2p Proteinmenge wurde ein Lysat der Generation 0 (biotinylierte Startkultur) sowie ein Lysat der Tochterzellen, welche aus 12-18 Generationen alten Mutterzellen produziert worden waren, aufgetragen (Population Q3). Zum Vergleich wurden sowohl die Lysate der Population Q4 (lebende Mutterzellen) und Q2 (tote Mutterzellen) nach 18 Generationen analysiert.

Die Proteinmenge von Hefe-Msh2p in Tochterzellen der 18. Generation lag im Vergleich zu Generation 0 bei 85 % (Faktor 1,2). Vergleicht man die Proteinmenge von lebenden (Q4) mit toten Mutterzellen (Q2) der 18. Generation mit Generation 0, so zeigte sich eine Proteinmenge von jeweils 72 % (Q4) und 53 % (Q2; Abb. 57). Dies entspricht jeweils einer Reduzierung um den Faktor 1,4 sowie 1,8.

Zusammenfassend zeigte sich, dass sich nach 18 Generationen die Hefe-Msh2p Menge von lebenden und toten alten Mutterzellen unterscheidet. Die Proteinmenge von lebenden alten Mutterzellen war gegenüber Generation 0 um 30 % reduziert, so dass eine reduzierte Proteinmenge mit einer erhöhten Mutationsrate im Zusammenhang stehen könnte.

Aufgrund des enormen experimentellen Aufwands wurde dieses Experiment nur 1mal durchgeführt, so dass die Ergebnisse als vorläufig einzustufen sind.

4.3 Der Einfluss des chronologischen Alters auf die Fehlpaarungsreparatur

Da ein Einfluss des replikativen Alters auf die Fehlpaarungsreparatur gezeigt werden konnte, sollte folgend untersucht werden, ob auch das chronologische Alter einen Einfluss auf die Mutationsrate hat. Für chronologische Alterungsanalysen werden Hefezellen solange in Flüssigkultur gehalten, bis sie die stationäre Phase erreicht haben. Von diesem Zeitpunkt an wird in regelmäßigen zeitlichen Abständen (z.B. alle 3 Tage) ein Aliquot aus der stationären Kultur entnommen und plattiert, um die gewünschte biologische Fragestellung mit steigendem chronologischen Alter der Kultur zu untersuchen.

Für die Analyse der Fehlpaarungsreparatur wurde ebenfalls der Wildtypstamm E134 verwendet. Drei unabhängige Klone einer stationären Kultur (100 ml) wurden über einen Zeitraum von 42 Tagen untersucht, wobei jeden dritten Tag ca. $1,3 \times 10^8$ Zellen auf Mangelmedium ohne Lysin ausplattiert wurden (Durchführung unter 3.2.6.2, S. 64). So sollte geprüft werden, ob mit steigendem chronologischem Alter eine Veränderung der *LYS2*-Revertantenanzahl auftritt, welche möglicherweise mit einer veränderten Fehlpaarungsreparaturaktivität korreliert. Zur Kontrolle wurde die Anzahl an Koloniebildenden Einheiten (CFUs) auf Vollmedium-Platten (SD+24) über den genannten Zeitraum bestimmt. Das Experiment wurde in 2 unabhängigen Ansätzen mit je 3 Klonen durchgeführt. Betrachtet man die CFUs der 6 untersuchten Klone, so fiel die Anzahl in 3 Stufen. Bis Tag 3 lagen die CFUs bei ca. 100 %. Von Tag 6 bis Tag 9 sanken diese auf ca. 70 – 90 %, wobei ein weiterer Verlust bis Tag 21 auf ca. 40 – 50 % zu beobachten war. Ab Tag 24 sanken die CFUs konstant weiter auf ca. 1 bis 5 %.

Bei der Betrachtung der Revertantenzahl über den genannten Zeitraum zeigten die Klone unterschiedliches Verhalten. Im ersten Ansatz zeigte sich bei Tag 0 (Start des Experiments) eine Revertantenzahl von knapp 1000 bei allen 3 Klonen (Abb. 58). Diese Anzahl ließ sich konstant mit leichten Schwankungen bei allen Klonen bis Tag 21 messen. Ab Tag 24 entwickelten diese unterschiedliche Trends bzgl. der Revertantenzahl. Klon 1 zeigte eine Erhöhung der Revertanten um den Faktor 26,7, Klon 3 um 23,5 (Tab. 19). Hingegen zeigte Klon 2 keine Veränderung. An Tag 27 erhöhte sich die Revertantenzahl von Klon 1 weiter auf den Faktor 1960, die Anzahl von Revertanten bei Klon 3 zeigten hingegen nur noch eine Erhöhung von 2,2 (ebenso Klon 2). Ab Tag 30 nahm der Faktor bei Klon 1 und 2 wieder ab (258 und 1,8), Klon 3 zeigte hingegen wieder eine Erhöhung auf 14,8. Ab Tag 33 ist bei allen 3 Klonen hingegen wieder ein Abwärtstrend mit leichten Schwankungen der *LYS2*-Revertanten zu beobachten. Das Experiment musste aufgrund von Kontaminationen der 3 Kulturen nach 42 Tagen gestoppt werden, da sich diese nach dem Plattieren schwer von Hefe-Kolonien unterscheiden ließen und die Auswertung der folgenden Tage erschwerte/verfälschte.

Im zweiten Ansatz zeigte sich zu Beginn ein Unterschied in der Revertantenzahl im Vergleich zu Ansatz 1. Statt 1000 Revertanten wurden hier mit leichten Schwankungen bis Tag 21 ca. 100 Revertanten gemessen (Abb. 58). Lediglich Klon 2 zeigte vereinzelt an den Tagen 15 bis 24 eine Reduzierung der Revertanten von 0,5 bis 0,2 (Tab. 19). An Tag 24 zeigte sich ähnlich wie in Ansatz 1 eine erste rapide Veränderung. Hier waren die Revertanten bei Klon 3 um den Faktor 10,5 erhöht, Klon 1 und 2 zeigten keine großen Veränderungen. Dies änderte sich bis Tag 36 nicht. Lediglich Klon 1 zeigte an Tag 33 eine Reduzierung der Revertanten um den Faktor 10. Die Revertantenzahl von Klon 3 zeigte an Tag 27 nochmals eine Erhöhung auf 11,9, nahm dann aber bis Tag 33 wieder auf 1 ab. An Tag 36 zeigte sich aber erneut eine Erhöhung um den Faktor 10,6. Auch dieser Ansatz musste aufgrund von Kontamination nach 39 Tagen beendet werden.

Zusammenfassend zeigte sich bei 6 Klonen bis Tag 21 eine konstante Revertantenzahl mit leichten Schwankungen. Ab Tag 24 konnte bei 3 Klonen sowohl eine Erhöhung der Revertantenzahl beobachtet werden, zum anderen sank bei allen 6 Klonen konstant die Anzahl der CFUs. Ab Tag 27 zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Revertantenzahl, die sich aber von Klon zu Klon unterschiedlich hoch zeigte. Die hier 3 untersuchten Klone / Ansatz entsprechen ungefähr der qualitativen Mutationsratenanalyse der Hefe-Mensch-Msh2-Hybriden (vgl. 4.1.1.5, S. 84). Daher müssen für eine quantitative Aussage der hier gezeigten Entwicklung der Revertantenzahl mehr Klone untersucht werden. Die Anzahl der hier untersuchten Klone ist aber ausreichend, um einen Trend bzgl. der Entwicklung der Revertantenzahl mit steigendem chronologischem Alter zu beobachten.

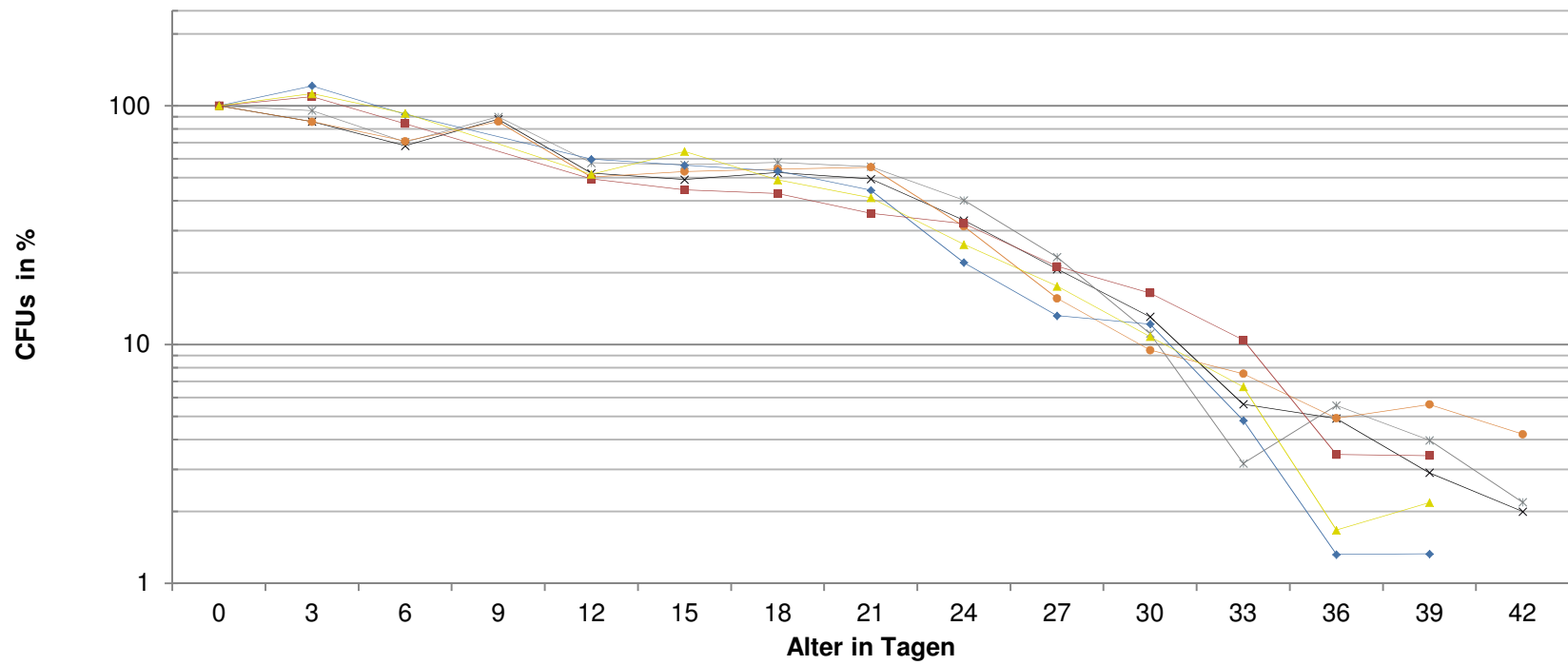
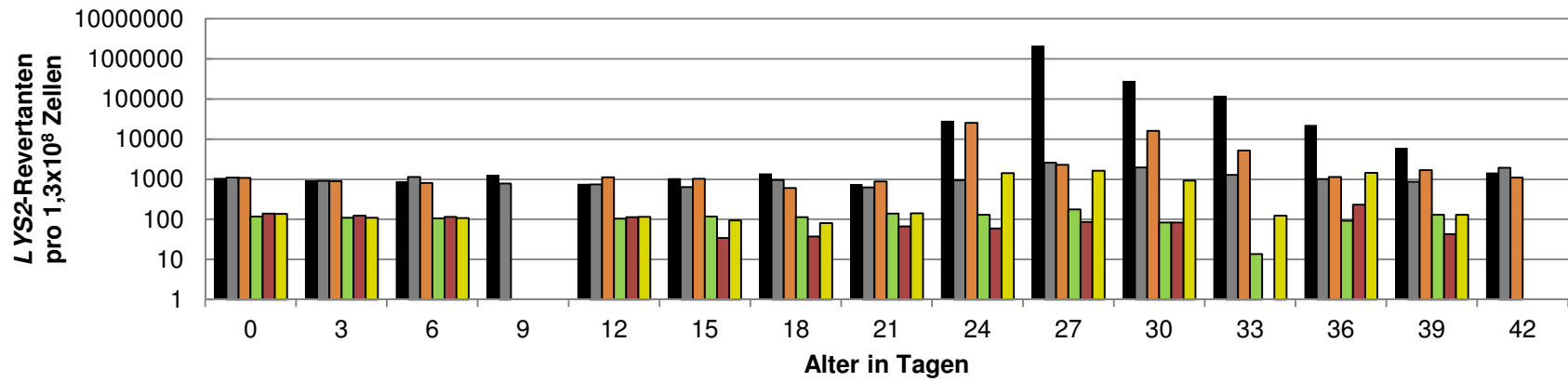


Abb. 58: Der Einfluss des chronologischen Alters auf die Fehlpaarungsreparatur. Oben dargestellt ist die Anzahl von *LYS2*-Revertanten/ $1,3 \times 10^8$ Zellen, unten dargestellt ist die Anzahl an Kolonien-bildenden Einheiten zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Datenpunkte an Tag 9 der Klone des zweiten Ansatzes wurden nicht bestimmt. Weitere fehlende Datenpunkte konnten aufgrund von Kontaminationen nach dem Plattieren nicht bestimmt werden. CFUs = Colony Forming Units (Kolonien-bildende Einheiten), X-Achse = chronologisches Alter in Tagen, Y-Achse = CFUs in % (logarithmisch).

Tag	CFUs in %	Faktor <i>LYS2</i> -Rev. gegenüber Tag 0			Tag	CFUs in %	Faktor <i>LYS2</i> -Rev. gegenüber Tag 0		
		1	2	3			1	2	3
0	100±0	1,0	1,0	1,0	0	100±0	1	1	1
3	89±6	0,9	0,8	0,8	3	114±6	0,9	0,9	0,8
6	70±2	0,8	1,0	0,7	6	90±5	0,9	0,8	0,8
9	88±2	1,2	0,7	-	9	nicht bestimmt			
12	53±4	0,7	0,7	1,0	12	53±5	0,8	0,8	0,9
15	53±4	1,0	0,6	1,0	15	55±10	1,0	0,2	0,7
18	55±3	1,3	0,9	0,6	18	48±5	1,0	0,3	0,6
21	53±4	0,7	0,6	0,8	21	40±5	1,2	0,5	1,0
24	35±5	26,7	0,9	23,5	24	27±5	1,1	0,4	10,5
27	20±4	1960,0	2,4	2,1	27	17±4	1,5	0,6	11,9
30	11±2	258,0	1,8	14,8	30	13±3	0,7	0,6	6,9
33	6±2	108,0	1,2	4,8	33	7±3	0,1	-	0,9
36	5±0	21,0	0,9	1,1	36	2±1	0,8	1,7	10,6
39	4±1	5,6	0,8	1,5	39	2±1	1,1	0,3	1,0
42	3±1	1,4	1,8	1,0	42	-	-	-	-

Tab. 19: Vergleichende Übersicht der chronologischen Alterung. Die erste auffällige Veränderung der *LYS2*-Revertantenanzahl tritt in beiden Ansätzen nach 24 Tagen auf. Orange-markiert sind auffällige Veränderungen gegenüber Tag 0. Die CFUs sind als Mittelwert mit Standardabweichung (±) dargestellt. - = aufgrund von Kontaminationen nicht bestimmt.

5 Diskussion

5.1 Funktionelle Analyse von unklassifizierten hMSH2

Varianten

Pro Jahr erkranken weltweit ca. 1.000.000 Menschen an Dickdarmkrebs. Etwa 3 % dieser Fälle sind auf eine vererbare Form, dem Lynch-Syndrom, zurückzuführen (Lynch, Lynch et al. 2009). Neben kolorektalen Karzinomen können Tumore in weiteren Organen, wie z.B. Gehirn oder Haut auftreten. Grund für das Lynch-Syndrom ist eine reduzierte oder sogar ausgefallene Fehlpaarungsreparatur, was auf Keimbahnmutationen in den beteiligten Genen *hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1* und *hPMS2* zurückzuführen ist. Während z.B. Leserasterverschiebungen offensichtlich ein Gen inaktivieren können, ist der Einfluss einer „Missense“-Mutation unklar. Zwar gibt es Testsysteme, die die Funktionalität einer Mutation *in vitro* bestimmen, aber die Auswirkung auf die Fehlpaarungsreparatur unter *in vivo* Bedingungen auf humanes MSH2 konnte bisher nicht untersucht werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde daher erstmals ein Hefe-Mensch-Msh2 Hybrid entwickelt, was eine Analyse direkt in der Fehlpaarungsreparatur *in vivo* ermöglicht. Allerdings blieb die Analyse von Mutationen nur auf eine kleine Region des C-Terminus von hMSH2 beschränkt (Herbst 2006).

Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* neuartige Hefe-Mensch-Msh2 Hybride konstruiert, um anschließend Mutationen des wichtigen humanen Fehlpaarungsreparaturproteins hMSH2 zu untersuchen. Funktionelle Konstrukte wurden dann für eine Funktions- und Expressionsanalyse von 10 hMSH2 Missense-Mutationen verwendet, welche überwiegend im Rahmen des Verbundprojekts „Familiärer Darmkrebs“ bei Patienten isoliert worden waren. Zusätzlich wurde mittels GFP-Fusion geprüft, wo Hybride mit humanen hMSH2-Mutationen in Hefe lokalisieren.

Neben dem funktionellen Hybridsystem wurde durch Ko-Expression des humanen MSH2 Proteins mit dem Interaktionspartner hMSH6 untersucht, ob hMSH2-Allele einen dominant-negativen Mutatorphänotyp in Hefe auslösen. Hier wurde zudem untersucht, wie hoch die Proteinmengen der hMSH2-Allele waren und ob eine Interaktion mit hMSH6 mittels CoIP nachweisbar war. Abschließend wurde in einer *in silico* Analyse überprüft, welche hMSH2-Mutationen einen Einfluss auf die Funktionalität nehmen könnten. Der vergleichende Überblick der einzelnen Analysen sollte schließlich Aufschluss geben, ob es sich bei einem untersuchten Allel um eine wildtypische Variante handelt oder ob die Funktionalität beeinträchtigt oder sogar nicht mehr vorhanden ist.

5.1.1 Hefe-Mensch-Msh2 Hybriden als *in vivo* Testsystem

Für die funktionelle *in vivo* Analyse von hMSH2-Varianten wurden 18 Hefe-Mensch-Msh2-Hybride konstruiert. Im Folgenden wird die Funktionalität aller konstruierten Hybride diskutiert und in Abb. 59 sind die Ergebnisse der Analysen zusammengefasst.

5.1.1.1 Hybride mit humanen N-terminalen Sequenzen sind funktionell

Die Humanisierung des N-Terminus von Hefe-Msh2p brachte 5 Konstrukte hervor, welche unter Überexpressionsbedingungen (2 μ Hochkopienplasmid, *GAL1*-Promotor) funktionell waren. Die Konstrukte yhMsh2_2 bis _4 sowie yhMsh2_6 waren trotz einer gegenüber WT-Hefe-Msh2p verringerten Proteinmenge von 1% bis 9% immer noch funktionell und bei der Mutationsrate nur um den Faktor 5 bis 14 schlechter als wildtypisches Hefe-Msh2p. Dies ist nur eine geringfügig erhöhte Mutationsrate, wenn man den Funktionsverlust im Δ *msh2* Stamm betrachtet (ca. Faktor 10.000) Interessanterweise zeigte das Hybrid yhMsh2_5 zwar auch eine 9fach erhöhte Mutationsrate, die Proteinmenge lag aber mit 62 % weit über den anderen Hybriden des N-Terminus. Bei diesem Konstrukt sind die ersten 13 Aminosäuren des Hefe-Msh2p erhalten geblieben, was im Vergleich zu den anderen N-terminalen Hybriden entscheidend zur Erhöhung der Proteinmenge dieses Hybrids beitragen könnte. Hier ist zudem noch zu beachten, dass yhMsh2_5 konstruktionsbedingt um 6 Hefe-Msh2p Aminosäuren verkürzt ist, so dass dies auch einen Einfluss haben könnte. Somit ist die humane Sequenz dafür verantwortlich, dass dieses und die anderen N-terminalen Hybride instabiler sind und/oder schlechter exprimiert wurden.

Protein	Sequenz	Faktor erhöht	Protein-Menge %
hMSH2		nicht funktionell	-
yMsh2p		1	100
yhMsh2_2		9	7
yhMsh2_3		11	1
yhMsh2_4		14	1
yhMsh2_5		11	62
yhMsh2_6		5	9
yhMsh2_7		nicht funktionell	32
yhMsh2_8		nicht funktionell	7
yhMsh2_9		nicht funktionell	61
yhMsh2_10		nicht funktionell	73
yhMsh2_11		nicht funktionell	54
yhMsh2_12		nicht funktionell	73
yhMsh2_1		1	34
yhMsh2_13		1	34
yhMsh2_14		1	45
yhMsh2_15		138	263
yhMsh2_16		16	23
yhMsh2_17		24	10
yhMsh2_18		nicht funktionell	100

Abb. 59: Zusammenfassung der konstruierten Hefe-Mensch-Msh2 Hybriden in Bezug auf Funktionalität und Proteinmenge unter Überexpressionsbedingungen. „Faktor erhöht“ gibt an, um welchen Faktor die Mutationsrate im Vergleich zum wildtypischen yMsh2p erhöht ist. „Proteinmenge in %“ spiegelt die Höhe der Proteinmenge eines einzelnen Hybridkonstrukts im Vergleich zu WT-yMsh2p wider. Überexpressionsbedingungen = 2µ Hochkopienplasmid, GAL1-Promotor.

Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass die Deletion der Aminosäuren 2 bis 133 von Hefe-Msh2p keine Auswirkung auf die Proteinmenge hat. Jedoch ist diese Domäne in *S. cerevisiae* essentiell für die Interaktion mit dem Partner Msh3p (Goldfarb and Alani 2005). Zusammen mit yMsh3p wird der yMutS β -Komplex bildet, welcher, im Gegensatz zum MutS α -Komplex (yMsh2p/yMsh6p), für die Erkennung von großen Insertions- und Deletionsschleifen verantwortlich ist. Im hier verwendeten *lys2_{A14}* Testsystem bildet sich bei einem Fehler der DNA Replikation eine Insertions- oder Deletionsschleife von einem Basenpaar (Clark, Cook et al. 1999). Somit ist dieser Fehler das bevorzugte Substrat des MutS α -Komplexes. Die Deletion der Aminosäuren 2 bis 133 führt zu einem Verlust der Reparatur von großen Insertionsschleifen, wohingegen die Reparatur von kleinen Insertionen nahezu wildtypisch bleibt, da diese durch den yMutS α -Komplex behoben werden (Lee, Surtees et al. 2007). Die beobachteten Defekte decken sich mit dem Auftreten von Tumoren bei Lynch-Syndrom-Patienten, die eine Deletion von Exon 1 in hMSH2 tragen (Wang, Friedl et al. 2003).

Da die hier verwendeten N-terminalen Hybride yhMsh2_2 bis _6 im Durchschnitt nur eine Erhöhung der Mutationsrate um den Faktor 10 zeigten bleibt zu klären, ob bei größeren Insertions-Deletionsschleifen der yMutS β -Komplex ebenso effizient arbeitet, da eine Veränderung des N-Terminus durch die Humanisierung vorgenommen wurde. Sollte ein negativer Einfluss festgestellt werden, müssen die Ergebnisse der Analyse eines humanen Allels mit Vorsicht betrachtet werden. Wenn eine wildtypische Aktivität in einem Reportersystem gemessen wird, bei dem der yMutS α -Komplex eine Rolle spielt, muss dieses wildtypische Ergebnis nicht automatisch für die Funktionalität des yMutS β -Komplexes zutreffen. Eine *in vitro* Studie zeigte, dass die Deletion der Domäne I (siehe Struktur hMSH2 Abb. 7, S.25; Domäne I in Hefe wahrscheinlich AS 1-121; Kumar, Piacente et al. 2011) von Hefe-Msh2p zu einer reduzierten Affinität für Fehlpaarungen führt. Ebenso erhöht die Deletion von Domäne I nicht-spezifische DNA-Kontakte. Hingegen wurden *in vivo* keine funktionellen Defekte festgestellt, so das vermutet wird, dass das Fehlpaarungsreparatursystem in der Lage ist, durch die Interaktion mit weiteren beteiligten Proteinen (wie z.B. PCNA) Defekte in der MSH2-Proteinstruktur zu kompensieren (Kumar, Piacente et al. 2011).

Die in dieser Arbeit entwickelten Hybride yhMsh2_2 bis yhMsh2_4 sowie die von B. Funk konstruierten Hybride yhMsh2_5 und yhMsh_6 sind für die Analyse von humanen MSH2 Mutationen des N-Terminus geeignet. Vorzugsweise sollte aber das Hybrid yhMsh2_5 genutzt werden, da es bezüglich der Proteinmenge dem WT-Hefe-Msh2p am ähnlichsten ist. Da die anderen Hybride stark verringerte Proteinmengen zeigten, sind diese möglicherweise für zu analysierenden Mutationen sensitiviert. Die Integration einer Mutation kann dazu führen, dass die Proteinmenge, im schlechtesten Fall, noch weiter reduziert wird, so dass ein falsches Ergebnis bzgl. der Funktionalität bestimmt wird. Zudem ist zurzeit noch unklar, ob,

bis auf die Ausnahme von yhMsh2_5, eine endogene Expression der Hybride zu einer funktionellen Fehlpaarungsreparatur führt.

Die Analyse von yhMsh2_5 zeigte unter endogenen Bedingungen fast wildtypische Aktivität, wobei die yhMsh2-Proteinmenge auf 144 % und die Mutationsrate um den Faktor 42 erhöht war. Um einen signifikanten Unterschied bzgl. der Funktionalität zwischen dem Hybrid und WT-yMsh2p (Stamm yB3) als Kontrolle festzustellen, sollten noch weitere Hybridklone geprüft werden. Warum das Protein unter endogenen Bedingungen aufgrund von 6 fehlenden Aminosäuren im Western-Blot unter der erwarteten Größe läuft ist unklar. Ob dies auch unter Überexpressionsbedingungen zutrifft sollte erneut geprüft werden.

5.1.1.2 Hybride mit humaner „connector“-Domäne sind nicht funktionell

Die Hybride yhMsh2_7 bis yhMsh2_9, welche sowohl die gesamte hMSH2 „connector“-Domäne als auch zusätzlich die hMSH2 „mismatch binding“ Domäne tragen, zeigten keine Funktionalität unter Plasmid-Bedingungen (Funk 2010). Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der Aminosäuren an Position 237 und 241 in Hefe-Msh2p einen Interaktionsverlust mit dem yMutL α -Komplex bewirkt. Ein Motiv für die Interaktion mit dem yMutL α -Komplex könnte also um diese Aminosäuren herum lokalisiert sein. Zudem ist bisher unklar, ob dieser Bereich mit dem Hefe-MutL α Komplex durch Interaktion mit Hefe-Mlh1p oder -Pms1p interagiert (Mendillo, Hargreaves et al. 2009). Somit können die Hybride yhMsh2_7 bis _9 wahrscheinlich an Fehlpaarungen binden, aber die Interaktion mit dem nachfolgenden Hefe-MutL α -Komplex ist wahrscheinlich durch die eingeführte humane Interaktionsdomäne gestört. Zwar verfügt das humane MSH2 Protein über 3 Schleifenstrukturen in der „connector“-Domäne, welche wahrscheinlich Protein-Protein-Interaktion vermitteln (Warren, Pohlhaus et al. 2007). Jedoch scheinen diese Strukturen sowie die gesamte hMSH2 „connector“-Domäne spezifisch für die Interaktion mit humanem MutL α zu sein und können deshalb nicht mit dem yMutL α -Komplex interagieren. Aufgrund der Nicht-Funktionalität sind diese Hybride für die Analyse von Mutationen nicht geeignet.

5.1.1.3 Hybride im mittleren Teil des Proteins

Auch für die Hybridkonstrukte yhMsh2_10 bis yhMsh2_12 konnte in den *in vivo* Analysen keine Funktionalität unter Plasmid-Bedingungen festgestellt werden. Hier bleibt vorerst unklar, warum diese Konstrukte nicht funktionell sind. Bisher konnten in Hefe-Msh2p keine Motive in diesem Bereich identifiziert werden, die eine Interaktion mit den Komplexpartnern vermitteln. Es wird vermutet, dass die „lever“-Domäne im humanen MSH2 zur Signalweiterleitung zwischen der ATPase Domäne und dem restlichen Protein dient (Warren, Pohlhaus et al. 2007). Da die Sequenzkonservierung dieser Domäne mit dem entsprechenden Hefeproteinabschnitt nicht sehr hoch ist, könnte theoretisch die Allosterie

des Proteins durch die „Humanisierung“ gestört sein. Ebenso ist eine damit verbundene fehlende Interaktion mit dem Komplexpartner Hefe-Msh6p möglich. Diese Konstrukte können somit nicht für die funktionelle Analyse von hMSH2-Mutationen verwendet werden.

5.1.1.4 Hybride in der ATPase Domäne

Die Hybride yhMsh2_1 und yhMsh2_13 bis yhMsh2_15 umfassen „humanisierte“ Bereiche der ATPase Domäne. Bis auf das Konstrukt yhMsh2_15 zeigten alle Hybride keine Erhöhung der Mutationsrate. Lediglich die Proteinmenge war um den Faktor 2 bis 3 reduziert. Die ATPase-Domäne des MSH2 Proteins zeigt die höchste Konservierung zwischen den Spezies (48 % Identität; Warren, Pohlhaus et al. 2007). Diese hohe Konservierung mag die Funktionalität dieser Hybride erklären. Die Hybride yhMsh2_1, yhMsh2_13 und 14 umfassen die für die Bindung und Hydrolyse von ATP wichtigen Walker A und B Motive. Das Walker A Motiv koordiniert die Phosphatgruppen von ATP. Dieses Motiv ist in vielen Proteinen vorhanden, die ATP binden und hydrolysieren (Walker, Saraste et al. 1982; Gorbalenya and Koonin 1990; Lowth, Kirstein-Miles et al. 2012; Sharma, Say et al. 2013). Das Walker A Motiv ist durch das typische Motiv GxxxxGKS/T gekennzeichnet und für die Hydrolyse von ATP in Verbindung mit einem zweiwertigen Kation verantwortlich. Dieses wird durch das Walker B Motiv (DExx) gebunden (z.B. Mg²⁺). Die Hybride enthalten also die wichtigen humanen Motive, die für die Verarbeitung von ATP während der Fehlpaarungsreparaturinitiation und den weiteren Verlauf benötigt werden.

Erstaunlicherweise war die Proteinmenge des Hybrids yhMsh2_15 um den Faktor 2,6 höher als die des wildtypischen Hefe-Msh2p. Zudem war die Mutationsrate um den Faktor 138 erhöht. Grund hierfür könnte theoretisch eine verstärkte Interaktion mit den Komplexpartnern Hefe-Msh6p und/oder Hefe-Msh3p sein. Es konnte nämlich in Hefe gezeigt werden, dass durch die fehlende Interaktion von yMsh2p mit dem Partner yMsh6p die Proteinmenge von yMsh2p bis zu 50% reduziert sein kann (Hayes, Sevi et al. 2009). Zudem führt in Humanzellen die fehlende Expression von hMSH2 auch zum Verlust von hMSH6, was sowohl für die Stabilisierung der Interaktionspartner als auch deren abhängige Expression spricht (Brieger, Trojan et al. 2002). So könnte man spekulieren, dass eine erhöhte Interaktion von hMSH2 mit den Komplexpartnern zu einer Stabilisierung dieses Komplexes führen, welche die Ubiquitinierung und somit den Abbau durch das Proteasom verzögert. Das Hybrid yhMsh2_15 bietet trotzdem immer noch einen Analyserahmen um den Faktor 100, um Mutationen zu analysieren.

Von den Hybriden der ATPase-Domäne konnte erfolgreich *yhMSH2_1* und *yhMSH2_14* ins Genom integriert werden. Die Analyse von yhMsh2_1 zeigte, dass die Funktionalität voll erhalten bleibt. Lediglich die Proteinmenge war um den Faktor 2,5 verringert, während der Kontrollstamm (yB7) eine verringerte Proteinmenge um den Faktor 1.2 zeigte. Dies zeigt,

dass sowohl die Integration der *kanMX*-Kassette 3' von *yMSH2* als auch die humane Proteinsequenz, trotz der hohen Konservierung, einen Einfluss auf die Proteinmenge nehmen. Die endogene Analyse des Hybrids yhMsh2_14 zeigte eine erhöhte Mutationsrate um den Faktor 8 sowie eine erniedrigte Proteinmenge um den Faktor 2. Trotzdem sind diese beiden Konstrukte für die Analyse von Mutationen unter endogenen Bedingungen geeignet.

5.1.1.5 Kombinierte Hybridvarianten sind teilweise funktionell

Die Hybride yhMsh2_16 und yhMsh2_17 sind für eine Analyse von Mutationen geeignet, während yhMsh2_18 keine Funktionalität zeigte. Die kombinierten Hybride können genutzt werden, um zu prüfen, ob sich eine Mutation anders verhält wenn eine zusätzliche humane Domäne vorhanden ist. Dies kann Aufschluss geben, ob z.B. die Mutation im untersuchten Bereich Einfluss auf die Interaktion/Allosterie mit einem anderen Bereich nimmt. Ebenso ist es aber auch möglich, dass die Mutation zu einer Strukturveränderung führt, welche durch eine zusätzliche humane Domäne begünstigt wird und das Protein inaktiviert. Zudem besteht bei den hier genannten funktionellen Konstrukten ebenfalls das Problem der verringerten Proteinmenge, was das Protein sensitiver für destabilisierende Mutationen macht.

5.1.1.6 Weiterentwicklungen der Humanisierung der Hefe-MMR

In dieser Arbeit wurden unter der Berücksichtigung von bestimmten Grenzwerten zur Identität und Homologie von Bereichen des humanen und Hefe-Msh2p Hybride konstruiert. Möglichkeiten für die weitere Humanisierung von Hefe-Msh2p sind immer noch vorhanden. So könnte man kleinere Bereiche von z.B. der „connector“-Domäne gegen entsprechende humane Bereiche austauschen. Ebenso kann das Hybrid yhMsh2_5 mit yhMsh2_14 kombiniert werden, da die Einzelanalyse unter endogenen Bedingungen gute Ergebnisse zeigten. Obwohl veränderte Proteinmengen auftraten, kann sich eine Kombination beider Hybride natürlich wieder vollkommen anders auf die Proteinmenge auswirken.

Der C-Terminus von Hefe-Msh2p von AS-Position 861 bis 964 wurde in dieser Arbeit nicht humanisiert, da hier, aufgrund der Ähnlichkeit zu hMSH2, Motive für die Interaktion mit Komplexpartnern liegen könnten. Eine schrittweise Deletion des C-Terminus von Hefe-Msh2p in kleinen Blöcken mit anschließender Funktionalitätsanalyse und Interaktionsnachweis mit einem Hefe-2-Hybrid-System könnte zeigen, ob sich solche Domänen hier tatsächlich befinden. Anschließend kann nach Eingrenzung entsprechender Bereiche (wenn vorhanden) ebenfalls eine Humanisierung des C-Terminus erfolgen.

Um die Aussagekraft der Hybridanalysen weiter zu erhöhen, sollten weitere Proteine der Hefe-Fehlpaarungsreparatur „humanisiert“ werden. Potentielle Kandidaten sind alle an der Fehlpaarungsreparatur beteiligten Proteine, besonders hMSH3, hMSH6 oder hEXO1. Eine andere Möglichkeit besteht im kompletten Austausch eines Hefe-Gens gegen das

entsprechende humane Homolog. Dass humane Proteine in Hefe funktionell sein können, konnte u.a. für die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Fz1 und Fz2 bewiesen werden (Sherman, Stone et al. 1999, Dirnberger and Seuwen 2007). Bei Nicht-Funktionalität von humanen Proteinen wurde ebenfalls auf Hybridkonstrukte zurückgegriffen, um diese funktionell zu charakterisieren (Eltschinger, Greganova et al. 2012). In Bezug auf die Fehlpaarungsreparatur konnte gezeigt werden, dass die Konstruktion von Hefe-Mensch-Mlh1p Hybriden bereits erfolgreich war (Ellison, Lofing et al. 2001). Nachfolgende Arbeiten konnten sogar zeigen, dass der funktionelle Austausch des Hefe-MutL α Komplexes, welcher durch die beiden Proteine yMlh1p und yPms1p in Hefe gebildet wird, durch die humanen Homologe hMLH1 und hPMS2 möglich ist. Der humane Komplex behebt Fehler im Kontext der Hefe-Fehlpaarungsreparatur genauso effizient wie ein wildtypischer Hefestamm und wird für die Analyse von humanen MLH1 Mutationen genutzt (Vogelsang, Comino et al. 2009; Vogelsang and Komel 2011). Mit den in dieser Arbeit konstruierten Hybriden und dem humanisierten hMLH1/hPMS2 Hefestamm sind somit zwei Systeme verfügbar, die die Analyse von Mutationen der humanen Fehlpaarungsreparatur-Gene hMLH1 und hMSH2 in einem humanen Kontext möglich machen.

Um die Signifikanz der *in vivo* Analyse von hMSH2 Mutationen weiter zu erhöhen, wäre eine Kombination beider Systeme möglich. Die Integration der Hybridgene in den hMutL α „humanisierten“ Stamm wäre ein weiterer Schritt für die Humanisierung der Hefe-Fehlpaarungsreparatur. Der weitere komplette Austausch von Hefeproteinen gegen humane Proteine würde die Aussagekraft sogar noch weiter erhöhen. Der Austausch von Hefe-MutL α durch hMutL α zeigt bereits, dass der Komplex in der Lage ist, mit allen in der Fehlpaarungsreparatur beteiligten Hefe-Proteinen zu interagieren, u.a. Hefe-Exo1p. Es konnte schon in anderen Ansätzen gezeigt werden, dass Hefe-Exo1p mit hMLH1 interagiert, wobei dies durch eine C-terminale Region in Hefe-Exo1p vermittelt wird. Die MIP-Box (MLH1 interacting protein box) in Hefe-Exo1p ist in der Lage, mit dem C-Terminus von humanem MLH1 zu interagieren. (Tran, Simon et al. 2001; Dherin, Gueneau et al. 2009). Dieses Beispiel zeigt, dass Motive, die Interaktion vermitteln, im Hefeprotein so konserviert sein können, dass sie auch die Interaktion mit den humanen Fehlpaarungsreparaturproteinen vermitteln können. Interessant hierbei ist auch, dass Hefe-Exo1p mit humanem MSH2 *in vivo* als auch *in vitro* interagiert (Tishkoff, Boerger et al. 1997). Ebenso ist humanes EXO1 in der Lage, bei Rekombinationsereignissen die volle Funktion in Hefe zu übernehmen (Qiu, Qian et al. 1999). Ob humanes EXO1 auch in der Fehlpaarungsreparatur das Hefeprotein funktionell ersetzen kann bleibt aber noch zu klären, da Hefe-Exo1p wahrscheinlich nicht die einzige Exonuklease ist, die in der Fehlpaarungsreparatur involviert ist (Amin, Nguyen et al. 2001). Der Austausch des Hefe-Gens gegen das humane *EXO1*-Gen ist aufgrund der bereits publizierten Daten aber ein erfolgsversprechender Schritt. Ein Austausch von Hefe-Proteinen

gegen die humanen Homologe macht aber nicht immer Sinn. Dies wird am Beispiel des Proteins PCNA deutlich. Dies erhöht die Prozessivität der DNA-Replikation und ist an der Fehlpaarungsreparatur beteiligt. In Humanzellen interagiert PCNA neben hMLH1 mit mindestens 30 weiteren Proteinen (Maga and Hubscher 2003). So kann angenommen werden, dass Hefe-PCNA auch eine ebenso zentrale Rolle in der Zelle spielt, die eventuell von hPCNA nicht komplett übernommen werden kann.

Ein weiterer Schritt zur „Humanisierung“ der Fehlpaarungsreparatur wäre, Hefemotive, die Interaktion zwischen Hefe-Proteinen vermitteln, in humane Fehlpaarungsreparaturproteine zu integrieren. Schon in anderen Systemen wurde bewiesen, dass die Integration solcher Hefe-Sequenzen in das entsprechende humane Protein Funktionalität vermitteln kann. Die Integration eines nukleären Hefe-Kernexportsignals in humanes GLE1, einem RNA-Export Protein, komplementiert einen temperatursensitiven Hefe Gle1p Stamm (Watkins, Murphy et al. 1998). Andere Beispiele zeigen, dass ca. 66% C-terminale humane Sequenz im Hefeprotein Prp17p Zellzyklus und Splicing-Defekte eines Prp17p mutanten Stammes beheben (Ben Yehuda, Dix et al. 1998).

Ob die Funktionalität weiterer humaner Proteine in Hefe erfolgreich ist, hängt zu dem davon ab, ob diese in der richtigen Menge exprimiert werden, um eine funktionelle Fehlpaarungsreparatur zu ermöglichen. In Hefe konnte für Chromosom 3 gezeigt werden, dass die Expression in verschiedenen Regionen des Chromosoms unterschiedlich hoch ist (Yamane, Yamaoka et al. 1998). Dies spielt sicherlich an den relevanten Loci der MMR-Gene ebenfalls eine Rolle, so dass dies ein weiterer Faktor ist, der bei der „Humanisierung“ der Hefe-Fehlpaarungsreparatur eine mögliche Rolle spielen wird.

Insgesamt sind die Möglichkeiten der „Humanisierung“ der Fehlpaarungsreparatur in Hefe bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Die Kombination der genannten Möglichkeiten sollte die „Humanisierung“ der Fehlpaarungsreparatur weiter vorantreiben. Solange weiterhin kein *in vivo* System zur funktionellen Charakterisierung von Mutationen der Fehlpaarungsreparatur in Humanzellen zur Verfügung steht, wird deren Analyse in einer „humanisierten“ Hefe ein exzellentes Werkzeug bleiben.

5.1.2 Zusammenfassung der hMSH2-Allel-Analysen

Ausgesuchte funktionelle yhMsh2-Hybride wurden verwendet, um unklassifizierte hMSH2-Varianten zu analysieren. Ein zusammenfassender Überblick aller Analysen der humanen MSH2 Mutationen ist in Tab. 20 dargestellt. Im Folgenden werden die Analysen der einzelnen Mutationen genauer besprochen.

5.1.2.1 Analysen von Mutationen des N-Terminus

Für die Mutation A2T konnte unter hohen Expressionsbedingungen eine wildtypische Mutationsrate und Lokalisierung im Zellkern detektiert werden (Funk 2010), wobei die Proteinmenge ebenfalls wildtypisch war. Da das Hybrid *yhMSH2_5* nicht erfolgreich in den *yMSH2*-Wildtyp-Lokus integriert werden konnte, wurde keine Analyse dieser Mutation unter endogenen Bedingungen vorgenommen. Die Ko-Expression von hMSH2-A2T mit hMSH6 löste in Hefe einen wildtypischen Mutatorphänotyp aus; allerdings zeigte das Allel hier eine erhöhte hMSH2-Proteinmenge gegenüber dem WT (Faktor 1,9). Ebenso konnte eine erhöhte Interaktion in der CoIP gemessen werden (Faktor 1,9). Die *in silico* Analyse konnte nur bei 2 von 3 Verfahren durchgeführt werden. Die Aussagen beider Programme divergieren zudem noch voneinander. Mit den experimentellen Daten wird diese Mutation zusammenfassend als funktionell eingestuft.

Die Mutation L92V zeigte ebenfalls Funktionalität im MSH2-Hybridsystem, wobei die Proteinmenge unter Überexpression auf 61 % verringert war. Die Analyse unter endogenen Bedingungen konnte wie bei A2T nicht vorgenommen werden. Es zeigte sich im Mutatorphänotyp ein wildtypähnliches Verhalten, wobei die Interaktion mit dem Komplexpartner hMSH6 nur bei 13 % in der CoIP lag. Die *in silico* Analysen lieferten kein klares Ergebnis. Obwohl das MSH2-Hybridsystem ein positives Ergebnis zeigte, wird aufgrund der geringeren Interaktion in der CoIP, der ungenauen Angaben der *in silico* Analyse sowie der fehlenden Funktionsanalyse unter endogenen Bedingungen im Hybridsystem diese Mutation als „unklar“ eingestuft.

Auch für die Mutation T33P liegt eine wildtypische Situation für die MMR-Aktivität im Hybrid vor, wobei die Proteinmenge auf 33 % reduziert war. In Ko-Expression mit humanem MSH6 konnte hMSH2-T33P einen Mutatorphänotyp auslösen, obwohl die Proteinmenge dieser Mutation mit fast 3% nicht mehr zu detektieren war. Zudem konnte in der CoIP keine Interaktion mit hMSH6 mehr nachgewiesen werden. Ob hier wirklich keine Interaktion mit hMSH6 mehr vorliegt, konnte wahrscheinlich aufgrund der Nachweisgrenze von hMSH2-T33P im Western-Blots nicht geprüft werden. Trotzdem scheint die Proteinmenge noch auszureichen, um die Hefe-Fehlpaarungsreparatur zu stören. Angenommen, die Menge von humanem MSH2 befindet sich bei dieser Mutation auf Niveau des endogenen Hefe-Msh2p, könnte dies sogar zeigen, dass der humane MutS α -Komplex eine höhere Affinität zu Fehlern besitzt. Betrachtet man zudem die *in silico* Analysen, sagen alle eine Funktionsstörung voraus. Publierte Daten zeigen, dass die Proteinmenge von hMSH2-T33P in der transfizierten humanen LoVo-Zelllinie (homozygote *MSH2*-Deletion) als wildtypisch eingestuft wurde. Wiederum zeigte ein *in vitro* MMR-Assay dieses Allels reduzierte Aktivität gegenüber dem Wildtyp, wobei die Interaktion mit dem Partner hMSH6 aber bestätigt werden konnte (Ollila, 2006; Ollila, 2008). Neuere Studien zeigen, dass der konservierte Austausch

von T33P in Hefe-Msh2p zu einer Erhöhung der Mutationsrate um den Faktor 10 führt, wobei das Konstrukt von einem *CEN*-Plasmid (Niedrigkopienplasmid) unter Kontrolle des Hefe-*MSH2* eigenen Promotors exprimiert wurde. Wird zudem yMsh2p-T33P in einem $\Delta msh6$ -Stamm exprimiert, führt dies zu einer Inaktivierung des Hefe-MutS β -Komplexes (Martinez and Kolodner 2010). Somit sollte ebenfalls eine Analyse der humanen Mutation mit dem Komplexpartner hMSH3 erfolgen. Mit den bislang publizierten Ergebnissen ist die Datenlage für diese Mutation unklar.

5.1.2.2 Analysen von Mutationen des C-Terminus

Das Allel T682I zeigte als einziges der 10 untersuchten Mutationen in allen experimentellen Ansätzen wildtypische Aktivität. Sowohl im MSH2-Hybridsystem war es unter hohen wie auch unter niedrigen Expressionsbedingungen funktionell. Die Proteinmenge bei Plasmid-basierter Expression lag bei 127%, wohingegen unter endogenen Bedingungen sich nur 65% detektieren ließen. Dies spricht für eine gewisse Stabilisierung durch die Überexpression. Die zeigt, dass die Menge an yMsh2p-Protein unter endogenen Bedingungen ausreichend ist, um wildtypische Fehlpaarungsreparatur zu betreiben. Was die minimale Menge an yMsh2p für eine wildtypische Fehlpaarungsreparatur ist, ist nicht bekannt. Für die Mutation von Hefe-Msh2p-D524Y konnte gezeigt werden, dass ca. 30 % dieser Msh2p Variante ausreichen, um wildtypische Fehlpaarungsreparatur zu betreiben (Arlow, Scott et al. 2012). Somit kann angenommen werden, dass dies auch für wildtypisches Hefe-Msh2p zutreffen könnte. Die Lokalisierung des Hybridallels mit einem C-terminal fusionierten GFP war nukleär. Ebenso löste die Mutation im humanen MSH2 in Ko-Expression mit dem Komplexpartner hMSH6 einen Mutatorphänotyp aus. Dies bedeutet, dass der Komplex in Hefe Fehler erkennt. Ebenso war die Expression des hMSH2-T682I nahezu wildtypisch. Die CoIP mit hMSH6 zeigte eine 1,2fach höhere Proteinmenge als WT-hMSH2, was auf eine leicht erhöhte Interaktion schließen lässt. Für dieses Allel liegen noch keine funktionellen Analysen in der Literatur vor. Zwar existiert eine andere dokumentierte Mutation an dieser Aminosäureposition (T682A), wobei für diesen Austausch nur *in silico* Analysen vorgenommen wurden (Chao, Velasquez et al. 2008). Zusammen mit den hier vorgenommenen *in silico* Analysen und den experimentellen Ansätzen lässt sich dieses Allel als wildtypisch und somit funktionell einstufen.

Das Allel V702G zeigte unter hohen Expressionsbedingungen im Hybridsystem wildtypische Reparaturaktivität, wobei die Proteinmenge um den Faktor 1,3 höher lag. Jedoch ging die Funktionalität sowie die wildtypähnliche Proteinmenge unter endogenen Bedingungen verloren. Die Fehlpaarungsreparatur war hier nicht aktiv und die Proteinmenge auf 18% verringert. Ebenso war die nukleäre Lokalisierung verändert. Dass die Mutation unter endogenen Bedingungen keine Funktionalität zeigte, wird auf die erniedrigte Proteinmenge

zurückzuführen sein. Mit knapp 18 % vom Wildtyp ist keine Funktionalität mehr nachweisbar. In einer Analyse von 54 Missense-Mutationen in Hefe-Msh2p wurde gezeigt, dass ca. 50 % aller untersuchten Mutationen durch Überexpression die Funktionalität wieder auf wildtypischem Niveau hergestellt werden kann (Gammie, Erdeniz et al. 2007). Mutationen, die unter endogenen Bedingungen ihre vorherige wildtypische Expressionshöhe und Funktionalität verlieren, besitzen möglicherweise eine höhere „turn-over“ Rate, da sie mit der Ubiquitin-Ligase San1p interagieren. Diese interagiert mit falsch gefalteten nukleären Proteinen, um deren Abbau durch das Proteasom zu bewirken (Rosenbaum, Fredrickson et al. 2011). Für Mutationen des Hefe-Msh2p konnte gezeigt werden, dass Allele, die durch Überexpression stabilisiert werden, mit San1p interagieren und auch ubiquitiniert werden, wobei wildtypisches Hefe-Msh2p nicht mit dieser Ubiquitin-Ligase interagiert (Arlow, Scott et al. 2012). Durch die hohe Überexpression vom Plasmid in Kombination mit dem *GAL1* Promotor ist die Proteinmenge ca. 100fach höher als das wildtypische endogene Hefe-Msh2p. Einer entsprechend hohen Proteinmenge steht San1p gegenüber, so dass das Enzym die im Überschuss vorhandenen Msh2p-V702G Proteine nicht vollständig ubiquitiniert, was zu einer Stabilisierung der Mutation führt. Ob San1p tatsächlich hierfür verantwortlich ist, muss in einem $\Delta san1$ Deletionsstamm überprüft werden. Die Analyse des humanen Proteins zeigte, dass die Koexpression von hMSH2-V702G mit hMSH6 keinen Mutatorphänotyp auslöst, obwohl die Proteinmenge bei fast 86 % im Vergleich zu Wildtyp-hMSH2 lag. Die Interaktion in der CoIP mit hMSH6 lag bei 34 %. Warum der dominant-negative Mutatorphänotyp ausbleibt, ist unklar. Eine reduzierte Interaktion um den Faktor 3 mit hMSH6 ist ausgeschlossen, da das Allel T33P (siehe oben) mit einer detektierten Proteinmenge von 3% immer noch einen Mutator auslöst. Eine nicht-stattfindende Lokalisierung in den Zellkern müsste untersucht werden, da sich der humane Import-Mechanismus von humanen und Hefe-Msh2p unterscheidet. Trifft diese Annahme nicht zu, liegt ein funktioneller Defekt vor. Die hier gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass der humane Komplex nicht in der Lage ist, an DNA / Fehlpaarungen zu binden. Aufgrund der vorliegenden Daten und der *in silico* Analysen wird dieses Allel als nicht funktionell eingestuft.

Die Mutation I708N zeigte im Hybridsystem bei Überexpression eine Erhöhung der Mutationsrate um den Faktor 150 sowie eine erhöhte Proteinmenge von 136 %. Die leicht erhöhte Mutationsrate sowie die hohe Proteinmenge gingen ähnlich wie bei V702G unter endogenen Expressionsbedingungen verloren. Ob dies durch Interaktion mit San1p aufgrund einer falschen Faltung zurückzuführen ist, bleibt zu klären. Zudem war die Lokalisierung des Hybridallels verändert. Ein Mutatorphänotyp von hMSH2 mit hMSH6 konnte nicht gemessen werden, obwohl die Proteinmenge von hMSH2-I708N wildtypisch war. Jedoch war die Interaktion mit hMSH6 um 50% reduziert. Die *in silico* Analysen sagten keine Funktion

voraus und in der Literatur ist diese Mutation noch nicht funktionell beschrieben. Die Ergebnisse der Hybridanalyse decken sich hier mit der Analyse des humanen Proteins im Mutatorphänotyp, so dass im Vergleich dieses Allel als nicht funktionell eingestuft wird.

Für die Mutation C697F zeigte sich im MSH2-Hybridsystem unter hohen Expressionsbedingungen eine Erhöhung der Mutationsrate um den Faktor 2300, so dass nur eine leichte Funktionalität vom Faktor 10 gegenüber der Leervektorkontrolle im $\Delta msh2$ -Stamm zu messen war (Faktor 26000). Die Proteinmenge war wildtypisch, wobei die Lokalisation dieser Mutationen verändert war. Unter endogenen Expressionsbedingungen ging auch die geringe Rest-Funktionalität verloren, wobei interessanterweise die Proteinmenge auf 3 % gegenüber dem Wildtyp reduziert war. Betrachtet man die Ergebnisse der humanen hMSH2-C697F Analyse, zeigt sich dass in Koexpression mit hMSH6 nur ein ganz schwacher Mutatorphänotyp ausgelöst werden konnte (Faktor 61), obwohl die Proteinmenge dieses Allels wildtypisch war. Jedoch konnte in der CoIP eine Reduzierung um den Faktor 3 gemessen werden, was für eine verringerte Interaktion spricht. Bereits publizierte Ergebnisse zu diesem Allel liefern widersprüchliche Daten bezüglich der Analyse im humanen Protein oder dem homologem Austausch in Hefe. Die Analyse des homologen Austauschs an der AS-Position 716 in Hefe-Msh2p zeigte eine verringerte Proteinmenge von 5 %. Zudem zeigte sich ein Verlust mit den Interaktionspartnern yMsh3p, yMsh6p und yExo1p (Gammie, Erdeniz et al. 2007). Die in Gammie et al. publizierte Höhe der Proteinmenge von yMsh2p-C697F deckt sich mit den Daten dieser Arbeit. Die Expression dieses Allels fand bei Gammie et al. von einem *CEN*-Plasmid mit eigenem *yMSH2*-Promotor statt, in dieser Arbeit sogar im Genom unter Kontrolle des eigenen *yMSH2*-Promotors. Hingegen zeigen publizierte Analysen des humanen Proteins hMSH2-C697F divergierende Ergebnisse. Hier konnte eine verringerte Interaktion mit den Partnern hMSH6 und hEXO1 im Hefe-2-Hybrid System gemessen werden, jedoch in der Analyse mittels eines GST-Pulldowns waren die Interaktionen wildtypisch. Andererseits ist der mutierte hMutS α -Komplex nicht in der Lage, an ein künstliches DNA-Molekül mit einer Fehlpaarung zu binden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Reparatur einer Fehlpaarung *in vitro* ausbleibt (Ollila, Sarantaus et al. 2006; Lutzen, de Wind et al. 2008; Ollila, Dermadi Bebek et al. 2008). Das der humane Komplex keine Fehlpaarungen erkennt, deckt sich mit dem Ergebnis dieser Arbeit, da fast kein Mutatorphänotyp ausgelöst wurde, wobei die Erhöhung um den Faktor 60 für die Sensibilität des *in vivo* Systems spricht, welche das *in vitro*-MMR System wahrscheinlich nicht leisten kann. Betrachtet man die Proteinmenge von hMSH2-C697F variiert diese zwischen verschiedenen Zelllinien. So wurde in murinen NIH-3T3 Zellen sowie der humanen LoVo Zelllinie eine wildtypische Menge detektiert (Ollila, Sarantaus et al. 2006; Lutzen, de Wind et al. 2008). Hingegen zeigte sich in der Insektenzelllinie Sf9 eine reduzierte Proteinmenge von hMSH2-C697F (Ollila, Dermadi Bebek et al. 2008). Basierend auf der

Datenlage dieser Arbeit ist diese Mutation nicht in der Lage, trotz Interaktion mit seinem Komplexpartner hMSH6 und einer stark verringerten Proteinmenge Fehlpaarungen zu binden, so dass diese Mutation als nicht-funktionell eingestuft wird.

Die Mutation L687P wurde ebenfalls noch nicht funktionell charakterisiert. Die Analyse im Hybridsystem zeigte unter hohen Expressionsbedingungen keine Fehlpaarungsreparaturaktivität. Die bei Überexpression erhöhte Proteinmenge ging bei genomischer Expression komplett verloren. Zudem konnte für das humane hMSH2-L687P in Koexpression mit hMSH6 kein Mutatorphänotyp nachgewiesen werden. Hier zeigte sich auch, dass die Proteinmenge von diesem Allel sowie die Interaktion mit dem Partner hMSH6 verringert war. Da eine Interaktion mit dem Partner in der CoIP vorhanden war, wird diese Mutation nicht in der Lage sein, an DNA zu binden oder Fehlpaarungen zu erkennen. Mit abschließender Betrachtung der *in silico* Analyse, welche keine Funktionalität voraussagt, wird diese Mutation als nicht funktionell eingestuft.

Sowohl im Hybridsystem als auch im Mutatorphänotyp zeigte hMSH2-G692V keine Funktionalität. Die unter Überexpression gemessene wildtypische Proteinmenge im Hybridsystem ging unter endogenen Bedingungen verloren, so dass hier wieder eine Interaktion mit San1p im Raum steht. Auch die Proteinmenge des humanen hMSH2-G692V war verringert und zudem konnte bei der Co-Immunopräzipitation keine Interaktion mit humanem MSH6 nachgewiesen werden. In der Literatur ist dieses Allel noch nicht funktionell beschrieben, so dass die hier gezeigten Daten vermuten lassen, dass die fehlende Interaktion mit dem Komplexpartner hMSH6 zu einer Inaktivierung des hMutSa-Komplexes führt, obwohl diese Mutation nicht in dem Bereich liegt, welcher für die Interaktion mit hMSH6 verantwortlich ist (siehe Einleitung Abb. 7, S. 25).

Die Mutation hMSH2-E749K zeigte im Hybridsystem keine Funktionalität im *msh2*-Deletionsstamm. Interessanterweise führte die Expression in einem wildtypischen Hefestamm zum Auslösen eines dominant-negativen Mutatorphänotyps. Verantwortlich hierfür ist die Inaktivierung des Walker B Motivs (DExx, x = jede beliebige Aminosäure), welches für die Bindung von zweiwertigen Kationen und in Verbindung mit dem Walker A Motiv zur ATP Hydrolyse führen. Obwohl die Rolle von ATP und ADP im MutSa-Komplex beim Menschen und Hefe (sowie MutS bei *E. coli*) noch kontrovers bei der Initiation ist, weiß man, dass durch Bindung von ATP der Komplex sich von einer Fehlpaarung löst. Mit der Mutation hMSH2-E749K kann der Komplex die Fehlpaarung nicht verlassen und führt zu einer kompletten Inaktivierung der Fehlpaarungsreparatur. Somit erklärt dies den Mutatorphänotyp des Hybridallels im Wildtypstamm. Durch die hohe Expression vom Plasmid wird das wildtypische endogene Msh2p vom Hybridallel yhMsh2_1-E749K verdrängt, was zu einer Inaktivierung führt. Dies deckt sich mit Beobachtungen, dass das hochkonservierte Walker B Motiv und auch andere Aminosäurepositionen in der

hochkonservierten ATPase-Domäne bei Mutation sowohl in Bakterien als auch in Hefe zur Inaktivierung der Fehlpaarungsreparatur führt (Studamire, Price et al. 1999; Lamers, Winterwerp et al. 2003). Ebenfalls haben *in vitro* Fehlpaarungsreparatur-Versuche mit hMSH2-E749K gezeigt, dass diese Mutation keine Aktivität zeigt (Ollila, Sarantaus et al. 2006). Warum ein dominant-negativer Mutatorphänotyp in Hefe ausbleibt ist unklar, da gezeigt werden konnte, dass der hMutS α -Komplex mit hMSH2-E749K an Fehlpaarungen binden kann, nicht aber auf ATP zur Freisetzung der Fehlpaarung reagiert (Ollila, Dermadi Bebek et al. 2008). Warum die Proteinmenge des Hybridallels als auch des humanen Proteins mit dieser Mutation fast doppelt so hoch wie wildtypisches MSH2 bleibt unklar.

hMSH2 Missense Mutation	Allel	Funktionalität in Hefe-Mensch Msh2 Hybrid					hMutSa DNM		CoIP hMSH2 durch hMSH6	SIFT	Poly Phen2	MAPP MMR	Klassifizierung
		Überexpression (2 μ , GAL1)		Lokalisation	genomisch exprimiert		Faktor erhöht	Protein %	Protein %	Klassifizierung			
		Faktor erhöht	Protein %		Faktor erhöht	Protein %							
c.4G>A	A2T	1	100	nukleär ¹	-	-	4900	193	128	funktionell	defekt	-	funktionell
c.97A>C	T33P	2	33	nukleär ¹	-	-	5400	2	0	defekt	defekt	defekt	unklar
c.274C>G	L92V	1	61	nukleär ¹	-	-	3700	84	13	funktionell	funktionell	unklar	unklar
c.2045C>T	T682I	3	127	nukleär	0,4	65	9300	98	120	funktionell	funktionell	funktionell	funktionell
c.2060T>C	L687P	15000	96	verändert	5468	5	2	51	26	defekt	defekt	defekt	nicht funktionell
c.2075G>T	G692V	14000	117	verändert	8906	7	6	64	1	defekt	defekt	defekt	nicht funktionell
c.2090G>T	C697F	2300	100	verändert	8437	3	61	112	38	defekt	defekt	defekt	nicht funktionell
c.2105T>G	V702G	1	136	verändert	3437	18	1,5	86	34	defekt	defekt	defekt	nicht funktionell
c.2123T>A	I708N	150	136	verändert	7343	10	3	100	48	defekt	defekt	defekt	nicht funktionell
c.2245G>A	E749K	19000	232	nukleär	8906	50	3	186	16	defekt	defekt	defekt	nicht funktionell

Tab. 20: Übersicht der experimentellen und *in silico* ermittelten Funktionsdaten von humanen MSH2 Mutationen. In der ersten Spalte sind die Missense-Mutationen der kodierenden (c.) hMSH2-Sequenz angegeben. Die Zahl gibt dabei die Nukleotidposition an, an der ein Austausch (>) erfolgt ist, welcher zum entsprechenden Aminosäureaustausch im humanen hMSH2 Protein führt (Spalte 2). Die Analyse einer Mutation im Hefe-Mensch-Msh2 Hybrid System erfolgte nach Überexpression vom Plasmid (Spalten 3 und 4) und nach genomischer Expression (Spalten 6 und 7). „Faktor erhöht“ (Spalten 3 und 6) gibt dabei an, um welchen Faktor die Mutationen gegenüber dem wildtypischen Hefe-Mensch-Msh2 Hybrid erhöht sind. „Protein %“ spiegelt die Expression der Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Hybrid wider (Spalten 4 und 7). Proteinmengen, die weniger als 80 % betragen, wurden als bedenklich (orange), bei weniger als 50 % und mehr als 140 % als kritisch eingestuft (rot). Die Analyse der Mutationen im humanen hMSH2 Protein ist in der rechten Hälfte der Tabelle dargestellt. Die Analyse des Proteins im dominant-negativen Mutatorphänotyp (DNM) gibt durch „Faktor erhöht“ an, um welchen Faktor die Mutationsrate gegenüber dem wildtypischen hMutSa-Komplex erhöht ist (Spalte 8). „Protein %“ gibt an, wieviel hMSH2 im Vergleich zum Wildtyp vorhanden ist (Spalte 9). Allele, die weniger als 80 % betragen, wurden als bedenklich (orange), bei weniger als 50 % und mehr als 140 % als kritisch eingestuft (rot). „Protein %“ der CoIP gibt an, wieviel Prozent humanes MSH2 durch die CoIP mit hMSH6 detektiert werden konnte (Spalte 10). Allele, die zu weniger als 50 % nachgewiesen werden konnten, wurden als kritisch eingestuft (rot). *In silico* Analysen wurden mit SIFT, PolyPhen2 und MAPP-MMR vorgenommen (Spalten 11-13). Grün-markierte Ergebnisse werden als wildtypisch / funktionell eingestuft. - = nicht untersucht. ¹Funk 2010.

5.1.2.3 Nachteile der Analyse von Mutationen in *S. cerevisiae*

Der konservierte Mechanismus der Fehlpaarungsreparatur in eukaryotischen Zellen ermöglicht es, humane Mutationen in Hefe zu untersuchen. Trotzdem gibt es einige Unterschiede, die bei der Interpretation von Daten berücksichtigt werden müssen.

Ein wichtiger Aspekt ist die Translokation des Mut α -Komplexes in den Nukleus. Der Mechanismus in Hefe unterscheidet sich dabei grundlegend von dem in Humanzellen. Hefe-Msh2p verfügt über zwei Kernlokalisierungssignale, die an Position 525 und 552 liegen. Somit ist das Protein in der Lage, auch unabhängig von Hefe-Msh6 in den Nukleus zu gelangen, jedoch ist die Proteinstabilität in Abwesenheit von Hefe-Msh6p stark verringert. Hefe-Msh6p kann nicht selbstständig in den Nukleus gelangen, da dies von der Dimerisierung mit Hefe-Msh2p abhängt, wobei dies für Hefe-Msh3p nicht der Fall ist (Hayes, Sevi et al. 2009). Humane Mutationen, die im Hefe-Human-Hybridsystem einen Einfluss auf die Struktur nehmen und dadurch eventuell sogar die Signale für die Kernlokalisierung unzugänglich machen, würden ein falsch-negatives Ergebnis liefern. Dies würde das Ergebnis der in dieser Arbeit verwendeten C-terminale GFP-Fusion an Hybridallele für die Lokalisierungsstudie beeinflussen. Zudem wurde dieses Konstrukt (WT-Hefe-Msh2p) nicht funktionell getestet. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die GFP-Fusion einen Einfluss auf die Struktur/Funktion eines Allels nimmt, was somit in einer veränderten Lokalisierung resultieren kann, da diese bereits durch die Mutation verändert sind. Es zeigte sich aber, dass, bis auf E749K, dass als wildtypisch eingestufte Allel yhMsh2_1-T682I ebenso wie WT-Hefe-Msh2p im Nukleus lokalisierte, wohingegen die anderen als nicht-funktionell eingestuften Allele eine veränderte Lokalisierung zeigten. Dies spricht für die Funktionsfähigkeit dieses Experimentes.

Für die Translokation von hMSH2 in Humanzellen wurde angenommen, dass dies ebenfalls von der Interaktion mit den Komplexpartnern abhängt (Christmann and Kaina 2000). Jedoch wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass humanes MSH2 in der Abwesenheit der Komplexpartner hMSH3 und hMSH6 in den Zellkern gelangt (Gassman, Clodfelter et al. 2011). Dies legt nahe, dass ein anderer Mechanismus für die Translokation verantwortlich ist, der für eventuelle funktionelle Analysen von humanen Mutationen ebenfalls untersucht werden sollte. Zwar interagiert hMSH2 trotz fehlender Kernlokalisierungssignale mit dem Importin $\alpha 3$ *in vitro*, jedoch konnte diese Interaktion ebenfalls für die im Cytoplasma lokalisierende Mutation C697F nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Kernlokalisierungsmechanismen für die Fehlpaarungsreparaturproteine in Human- und Hefezellen möglicherweise unterschiedlich sind (Knudsen, Nielsen et al. 2007; Lutzen, de Wind et al. 2008).

Das in dieser und anderen Arbeiten verwendete *lys2*_{A14}-Reportersystem dient zur Detektion von kleinen Insertions- und Deletionsschleifen (IDLs) im Gen. Somit wird für die funktionelle

Analyse von MMR-Protein-Mutationen spezifisch der hMut α -Komplex über das Reportersystem angesprochen. Es bleibt somit zu klären, wie sich MSH2-Mutationen in Interaktion mit dem humanen MSH3 bzw. dem Hefe-Msh3p Protein verhalten, welcher größere IDLs detektiert. Dies zeigt das Beispiel der Mutation yhMsh2-T682I. Es konnte in der *in vivo* MMR-Funktionsanalyse wildtypisches Verhalten festgestellt werden, so dass hier auf eine stattfindende Interaktion mit yMsh6p geschlossen werden kann. Ob dabei auch eine Interaktion mit yMsh3p ebenfalls noch stattfindet bleibt aber zu klären.

Die Analyse der humanen MSH2 Mutationen geschah in dieser und auch in bereits publizierten Arbeiten immer im Kontext der DNA-Fehlpaarungsreparatur. Es ist aber bekannt, dass humanes MSH2 auch in der Apoptose-Induktion eine Rolle spielt (Lin, Wang et al. 2004; Drotschmann, Topping et al. 2004). So bleibt zu klären, ob eine in der Fehlpaarungsreparatur wildtypische Mutation sich anders bei der Induktion der Apoptose verhält („separation of function“-Phänotyp), da auch hier mit weiteren Proteinen eine Interaktion stattfinden muss. Eine Möglichkeit zur Analyse besteht in der Überexpression von hMSH2 Mutationen in humanen Zelllinien. Wildtypisches hMSH2 löst unter diesen Umständen Apoptose aus. Bleibt dies bei der zu untersuchenden Mutation aus, zeigt sich, dass der Apoptose-Signalweg nicht durch die hMSH2-Mutation angesprochen wird und somit defekt ist (Zhang, Richards et al. 1999).

Ebenfalls sollte in einer weiterführenden Analyse beachtet werden, dass stille Mutationen zu Exon-Skipping führen können, so dass ein nicht-funktionelles Protein gebildet wird (Liu, Cartegni et al. 2001). Die in dieser Arbeit als wildtypisch eingestuft Mutationen können zu dem in Kombination mit einer Mutation in einem anderen Fehlpaarungsreparatur-Protein zu einem starken Defekt führen. Dies wird möglich durch Mutation eines zweiten Fehlpaarungsreparatur-Gens. Beide Mutationen für sich zeigen keinen oder einen sehr leichten Defekt, aber in Kombination könnten sie die Fehlpaarungsreparatur inaktivieren. Dies konnte schon exemplarisch in Hefe mit schwachen Mutationen von Hefe-Msh2p und Hefe-Msh6p bewiesen werden (Martinez and Kolodner 2010). Auch zeigte sich in Lynch-Syndrom Patienten jeweils eine Mutation in hMSH2 und hMSH6, wovon beide einzeln zwar als funktionell charakterisiert wurden, aber die Analyse der Doppelmutante aussteht (Kariola, Otway et al. 2003).

5.2 Einfluss der Alterung auf die Fehlpaarungsreparatur

Alterung ist ein komplexer Prozess, der durch intrinsische und extrinsische Faktoren zur Seneszenz einer Zelle beiträgt. Wichtige zelluläre Prozesse wie die DNA-Replikation und die Verteilung von Chromosomen sind somit vom Altern betroffen. Wie sich diese Prozesse mit zunehmendem Alter einer Zelle verändern, ist größtenteils noch ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass die Fehlverteilung von Chromosomen mit zunehmendem Alter ansteigt, so dass

Aneuploidien auf komplexe Art und Weise an der Entwicklung von Tumoren beteiligt sind (Langen, 2012; Pfau and Amon 2012). Wie sich die DNA-Replikation, und hierbei insbesondere der postreplikative Mechanismus der DNA-Fehlpaarungsreparatur, im Laufe des Alters ändern, ist bisher aber nicht verstanden. Mit Hilfe von *Saccharomyces cerevisiae* wurde in dieser Arbeit versucht, einen Einfluss der Alterung auf die DNA-Fehlpaarungsreparatur, insbesondere auf Hefe-Msh2p, zu studieren.

5.2.1 Steigendes replikatives Alter ist mit einer erhöhten Mutationszahl verbunden

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Sortierung von biotinylierten Zellen mittels magnetischer Anti-Biotin Microbeads zur Bestimmung von Mutationszahlen mit steigendem replikativem Alter wurde erfolgreich etabliert. Aufgrund der gezeigten Daten handelt es sich um ein robustes System, was alte von jungen Zellen trennen kann.

Zur Bestimmung der Mutationszahl mit steigendem replikativem Alter wurde der bereits beschriebene Wildtypstamm E134 verwendet. Die Messung zeigte, dass die Mutationsanzahl nach 19 Generationen im Vergleich zu Generation 0 um den Faktor 3,4 erhöht war. Die Msh2p-Proteinmenge bei lebenden alten Mutterzellen lag bei 72 % was einer Reduzierung um den Faktor 1,3 gegenüber Generation 0 entspricht. Dabei kann die erhöhte Mutationszahl prinzipiell auf 3 Möglichkeiten zurückgeführt werden (Abb. 60):

1. Durch eine erhöhte Fehlerrate der DNA-Polymerase treten mehr Fehler während der DNA-Replikation auf. Die Fehlpaarungsreparatur ist jedoch nicht in der Lage, die vermehrt auftretenden Fehler zu beheben.
2. Ebenso ist es möglich, dass die Replikationsgenauigkeit konstant bleibt und die Fehlpaarungsreparaturaktivität schlechter wird, so dass die entstandenen Fehler nicht mehr so effizient repariert werden wie in einer jungen Zelle.
3. Zudem ist eine Kombination aus beiden Ursachen möglich.

Um Hinweise für eine dieser 3 Möglichkeiten zu finden, wurde die Mutationsrate im $\Delta msh2$ Stamm in der replikativen Alterung überprüft, da hier keine funktionelle Fehlpaarungsreparatur vorhanden ist. Es zeigte sich, dass auch hier die Mutationsrate steigt, jedoch nach 19 Generationen mit einem Faktor von 1,5 um die Hälfte niedriger ist als in einem wildtypischen Hefestamm, der über eine funktionelle Fehlpaarungsreparatur verfügt. Die Erhöhung der Mutationsrate während des replikativen Alterns im $\Delta msh2$ Stamm stützt die These, dass die DNA-Polymerase in alternden Zellen mehr Fehler macht. Betrachtet man im Vergleich dazu den Wildtyp mit funktioneller Reparatur, so ist die Mutationsrate nochmals um den Faktor 1,5 erhöht (Faktor 3 insgesamt). Dies deutet wiederum darauf hin, dass sowohl die Effizienz der DNA-Replikation als auch die Fehlpaarungsreparatur im Wildtyp

A	Replikationsgenauigkeit schlechter im Alter MMR-Effizienz konstant	Zelle	
		jung	alt
	Replikationsfehler	100	1000
	durch MMR reduziert auf	1	10

B	MMR schlechter im Alter Replikationsgenauigkeit konstant	Zelle	
		jung	alt
	Replikationsfehler	100	100
	durch MMR reduziert auf	1	10

C	beides schlechter im Alter	Zelle	
		jung	alt
	Replikationsfehler	100	1000
	durch MMR reduziert auf	1	100

Abb. 60: Modelle zur erhöhten Revertanzahl im replikativen Alter. Beispielhaft sind die Fehlerzahl durch die DNA-Polymerase und nicht behobene Fehler durch MMR dargestellt. A) Durch schlechter werdende Replikationsgenauigkeit im Alter treten deutlich mehr Mutationen auf. Die MMR-Effizienz bleibt konstant, jedoch kann das MMR-System die vermehrt auftretenden Fehler nicht kompensieren. B) Ein zweites Modell geht von einer schlechter werdenden MMR aus, die auftretende Fehler bei der DNA-Replikation alter Zellen weniger effizient behebt. C) Kombination der Modelle aus A und B. MMR = Mismatch Reparatur.

während des replikativen Alterns schlechter werden. Ob die reduzierte Proteinmenge von Hefe-Msh2p (72 %) dazu beiträgt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden, da nicht bekannt ist, bis zu welcher minimalen Menge an Hefe-Msh2p eine wildtypische Reparatur betrieben werden kann und wie sich eine verringerte Hefe-Msh2p Menge im Alter auf die Reparatur auswirkt. Jedoch zeigen Daten dieser Arbeit, dass eine reduzierte Menge Hefe-Mensch-Msh2p zwischen 39 % - 65 % wildtypische Fehlpaarungsreparatur betreiben kann (vgl. Abb. 31 S. 94, Abb. 35 S. 98, Abb. 45 S. 108). So könnte es sein, dass ebenfalls eine in diesem Bereich reduzierte Menge von WT-Hefe-Msh2p für eine wildtypische Fehlpaarungsreparatur ausreicht. Um trotzdem den Einfluss der Hefe-Msh2p Proteinmenge im Alter zu prüfen wäre ein Austausch des endogenen *MSH2*-Promotors gegen einen regulierbaren möglich. Hier bietet sich der Fusionspromotor *tetO7-CYC1* Promotor an, der über die Doxyzyklin-Konzentration reguliert werden kann. Hiermit ließe sich die Expression von Hefe-Msh2p regulieren und in verschiedenen Mengen im replikativen Alter untersuchen. Allerdings zeigen neuere Arbeiten, dass der *MSH2*-Promotor Elemente für die Zellzyklus-

abhängige Regulation enthält (Tennen, Haye et al. 2012). Somit könnte ein Austausch des endogenen *MSH2*-Promotors gegen einen regulierbaren Promotor demnach zu grundlegenden Veränderungen der Msh2p-Expression führen, was die Analyse in einem replikativen Alterungsexperiment stark beeinflussen würde

Um einen Einfluss des Zell-Alters auf die Fehlpaarungsreparatur in Hefe genauer zu prüfen, könnte eine Mutation in Msh2p oder einem anderen Fehlpaarungsreparaturprotein eingebracht werden, welche das Protein sensibilisieren. Msh2p-Mutationen, die um den Faktor 10 bis 100 funktionell schlechter sind, könnten Aufschluss geben, ob die Anzahl an Revertanten nach ca. 19 Generationen genauso hoch ist wie beim wildtypischen Hefe-Msh2p oder einem anderen Reparaturprotein. Zusätzlich ließe sich der Ansatz um eine Genomsequenzierung von Einzelzellen ergänzen, bei der man das Genom von jungen und alten Zellen vergleicht, um so einen Einblick zu erhalten, wieviele und welche Art von Mutationen über die Zeit aufgetreten sind (Fan, Wang et al. 2011; Zong, Lu et al. 2012, Lang et al 2013).

Die Wirkung des Alterns auf die DNA-Fehlpaarungsreparatur wurde bisher in einer überschaubaren Anzahl von Experimenten untersucht (Gorbunova, Seluanov et al. 2007). Dabei konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob die DNA-Replikation, die DNA-Fehlpaarungsreparatur oder beide Systeme mit dem Alter an Genauigkeit verlieren. In einer Arbeit zur Fehlpaarungsreparaturaktivität in alten humanen Fibroblasten zeigte sich, dass die *in vitro* Fehlpaarungsreparaturaktivität von ca. 55 Tage alten Zellen um den Faktor 3 bis 4 gegenüber jungen Zellen verringert ist. Dies wird auf eine reduzierte Proteinmenge von hMSH2 und hMSH6 zurückgeführt, welche sich in den untersuchten Zellen nur noch auf ca. 20% vom Wildtyp belaufen. Diese reduzierte Menge wird wiederum auf die verringerte Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F zurückgeführt, welcher den humanen *MSH2*-Promotor als Ziel hat (Chang, Jin et al. 2008). Ein direkter Einfluss des Alterns auf hMSH2 wäre hierdurch aber nicht bewiesen. Lediglich eine weitere Arbeit in *Arabidopsis thaliana* zeigt durch Real-time PCR Analysen, dass die RNA-Menge des Fehlpaarungsreparaturproteins MSH2 einer 12 Tage alten Pflanze bereits um mehr als die Hälfte reduziert ist. Zudem nimmt im Alter die Polymerase-Aktivität ab, überraschenderweise die Replikationsgenauigkeit aber zu. Hieraus wurde geschlossen, dass die verringerte Menge an MSH2, nicht aber die verringerte Menge der DNA-Polymerasen α und δ , zur Erhöhung der Mutationsrate beiträgt (Golubov, Yao et al. 2010). Die in dieser Arbeit festgestellte Beobachtung der Erhöhung der Mutationszahl und den genannten publizierten Daten deckt sich mit der Entdeckung, dass in verschiedenen Zelltypen von alten Patienten die Mikrosatelliteninstabilität gegenüber jungen Patienten erhöht ist. Hieraus wurde geschlossen, dass die Fehlpaarungsreparaturaktivität abnimmt (Ben Yehuda, Globerson et al. 2000, Krichevsky, Pawelec et al. 2004). Ob tatsächlich eine reduzierte Menge von

Fehlpaarungsreparaturproteinen einen Einfluss auf dessen Funktion nimmt, wurde in Fledermäusen untersucht. Die Proteinmengen von MSH2 und MLH1 sind in verschiedenen Geweben von kurzlebigen Arten im Vergleich zu langlebigen Arten verringert. Ebenso ist in der kurzlebigen Art die Mikrosatelliteninstabilität erhöht, was für einen direkten Zusammenhang zwischen der Relevanz der Proteinmenge und dem Alter sprechen würde (Conde-Perezprina, Luna-Lopez et al. 2012). Zudem zeigen alte Mäuse eine Hypermethylierung des *MSH2*-Promotors mit zunehmendem Alter. Hypermethylierung an CpG Inseln kann zur Reduktion oder Inaktivierung der Promotoraktivität führen. Jedoch führt die Methylierung des *MSH2*-Promotors zu keiner verringerten Expression, so dass hier zu klären bleibt, welchen Effekt die Methylierung mit steigendem Alter auslöst (Conde-Perezprina, Luna-Lopez et al. 2008).

Arbeiten in Bezug auf die DNA-Replikation in der Alterung wurden u.a. mit der DNA-Polymerase α vorgenommen, welche die Replikation initiiert. In verschiedenen murinen Zelllinien verliert mit steigendem Alter die Polymerase an Replikationsgenauigkeit (Taguchi, 1997). Andere Experimente hingegen zeigten, dass die Replikationsgenauigkeit der Polymerase α von Mausleberzellen erhalten bleibt (Silber, 1985). Wieder andere Arbeiten zeigen, dass die Replikationsgenauigkeit von humanen Fibroblasten-Extrakten mit zunehmendem Alter abnehmen, so dass die Datenlage hier unklar ist (Linn, 1976; Fukuda, 1999).

Im hier benutzten Hefe-System der replikativen Alterung verlieren alte Mutterzellen zunehmend an replikativem Potential, während dessen junge Tochterzellen wieder in der Lage sind, eine normale Anzahl an Zellteilungen zu durchlaufen. Dies bedeutet, dass Faktoren, die Alterung verursachen, in der alten Mutterzelle zurückgehalten werden und schließlich dort akkumulieren (Egilmez and Jazwinski 1989, Kennedy, Austriaco et al. 1994). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass oxidativ geschädigte Proteine und reaktive Sauerstoff Spezies (reactive oxygen species = ROS) in der Mutterzelle zurückgehalten werden und nur in einem geringen Maße in der jungen Tochterzelle nachzuweisen sind. Die steigende Menge von ROS in einer alten Mutterzelle kann zur Oxidation der Seitenketten von Aminosäuren führen (Amici, Levine et al. 1989). Zudem können Oxidationen zu einer Verknüpfung von Protein-Protein Interaktionen führen, so dass ein Komplex inaktiviert wird. Das Hefe-Msh2p-Protein sowie die DNA-Polymerasen werden auch von oxidativen Schäden betroffen sein, so dass eine hierdurch ausgelöste Inaktivierung von Hefe-Msh2p Molekülen zu einer Erhöhung der Mutationsrate führen kann.

Ob die Fehlpaarungsreparatur oder die DNA-Replikation alleine bei der erhöhten Mutationsrate eine Rolle spielt, bleibt zu klären. Die molekularen Mechanismen des Alterns sind so komplex, dass durchaus weitere Faktoren Einfluss nehmen könnten. Sollte sich bestätigen, dass MSH2 im Laufe der Alterung an Funktionalität verliert, müssen in Zukunft

Allele, die als wildtypisch eingestuft wurden, in einer replikativen Alterungsanalyse neu untersucht werden. Welchen Einfluss diese Mutationen dann im Alter ausüben, bleibt zu klären. Es könnte sein, dass Allele einen Anstieg der Mutationsrate schon nach wenigen Generationen bewirken. Ebenso kann es passieren, dass die Mutationsrate im Vergleich zum Wildtyp erst nach einer bestimmten Anzahl von Generationen steigt. Dies zeigt, dass die Rolle von Allelen im MMR-Geschehen alternder Zellen komplex sein kann und weiter untersucht werden muss.

5.2.1.1 Nachteile des verwendeten Testsystems

Das durchgeführte Experiment zur replikativen Alterung ist nicht nur mit großem zeitlichen Aufwand (4-5 Stunden pro Tag, 1 Woche insgesamt) sondern auch mit einem nicht geringen finanziellen Aufwand verbunden. Erstanschaffungskosten von ca. 1000 € fallen für den Magneten quadroMACS an, mit dem sich 4 Kulturen gleichzeitig sortieren lassen. Dies reduziert enorm den Arbeitsaufwand im Vergleich zum Sortieren mit einem Magneten, mit dem nur eine Kultur sortiert werden kann (von ca. 8 Stunden auf 4-5 Stunden für 3 Klone). Jede Sortierung von einem Klon kostet momentan ca. 10 € (nur die Säule) und jeder Klon muss 2mal sortiert werden, um Mutterzellen effizient anzureichern. Pro Versuchstag fallen somit allein 60 € zum Sortieren von 3 Klonen an. Für einen Gesamtdurchlauf von „nur“ 3 Klonen wären dies 180 €, wobei die Materialkosten, das Biotin sowie die magnetischen Microbeads hier noch nicht mit eingerechnet sind. Eine kostengünstigere Variante ist bisher noch nicht erhältlich, so dass dieses System weiter genutzt werden sollte.

5.2.2 Die *LYS2*-Reversion ist mit steigendem chronologischem Alter unterschiedlich stark ausgeprägt

Bei der chronologischen Alterungsanalyse werden Hefezellen einer stationären Flüssigkultur in definierten zeitlichen Abständen plattiert. Hierdurch fangen die Zellen an sich wieder zu teilen, wobei dann der Einfluss des steigenden chronologischen Alters auf verschiedene zelluläre Prozesse untersucht werden kann. In dieser Arbeit wurde dabei der Einfluss auf die Fehlpaarungsreparatur untersucht.

Bei den 6 untersuchten Klonen zeigte sich, dass nach 24 Tagen eine erste starke Veränderung der Mutationszahl gegenüber Tag 0 auftrat. Diese variierte aber zwischen den verschiedenen Klonen. Der Faktor der Mutationen gegenüber Tag 0 lag teilweise zwischen 10 und 20, bei einem Klon aber auch um den Faktor 2000. Wiederum andere zeigten keine erhöhte Mutationsrate. Auch nahm die Anzahl an Mutationen mit steigendem chronologischem Alter dann auch wieder ab. Ein klarer Trend lässt sich aus den hier gezeigten Daten bzgl. der *LYS2*-Reversion mit steigendem chronologischem Alter nicht erkennen. Es ist lediglich zu beobachten, dass ab Tag 24 eine erste Veränderung eintritt.

Werden die Zellen aus der stationären Kultur entnommen und plattiert, kann direkt bei der ersten Zellteilung der Replikationsfehler am *LYS2*-Lokus auftreten. Dies könnte durch wenige Moleküle „alte“ DNA-Polymerasen, die während der stationären Phase nicht abgebaut und oxidativ geschädigt wurden, verursacht werden. Bei der ersten Teilung auf der Platte sind diese noch in der DNA-Replikation involviert, bevor die Proteinsynthese wieder neue DNA-Polymerase-Moleküle erzeugt. Dies kann ebenso für Proteine der Fehlpaarungsreparatur zutreffen. „Alte“ Moleküle der Fehlpaarungsreparatur wären dann nicht in der Lage, erzeugte Fehler komplett zu beheben. Eine Schädigung der noch vorhandenen Proteine in der stationären Phase könnte mit steigendem chronologischem Alter langsam zunehmen, so dass die Auswirkung erst ab Tag 24 sichtbar wird. Demnach sollten die Mutationszahlen nach Tag 24 konstant hoch bleiben. Hier zeigte sich aber eine Abnahme. Dies könnte wieder dafür sprechen, dass die an der Replikation und Fehlpaarungsreparatur beteiligten Proteine so weit geschädigt werden, dass diese bei der ersten Replikation nach der stationären Phase immer weniger an der Replikation involviert sind. Dies würde sich dann in einer reduzierten *LYS2*-Reversion äußern, wobei das aber nicht die Beobachtung erklärt, dass die Reversion zwischen den verschiedenen Klonen so stark schwankt.

Die Theorie, dass Proteine oxidativ geschädigt werden und einen Einfluss auf genomische Instabilität nehmen, wird durch folgende Beobachtung gestützt. Die Deletion des *SOD1* Gens in Hefe führt zu einer erhöhten Reversion des *can1*-Reportergens, mit welchem Punktmutationen und Leserastermutationen gemessen werden können. Sod1p ist eine Superoxid Dismutase und spaltet reaktives Superoxid in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Hingegen führt die Überexpression von Sod1p zu einer Verringerung der genomischen Instabilität (Fabrizio, Battistella et al. 2004). Die Reversionsraten zu *CAN1^R* zeigen in der genannten Arbeit einen kontinuierlichen Anstieg mit steigendem Alter (Madia, Gattazzo et al. 2007). Ebenso trifft dies bei anderen Mutationsreportern zu, u.a. bei einer *LYS2*-Variante, die eine 4 bp lange Leserasterverschiebung trägt oder einer *TRP1*-Variante, bei der ein STOP-Kodon durch eine Punktmutation erzeugt wird (*trp1-289*; Wei, Madia et al. 2011). Um zu prüfen, ob der in dieser Arbeit verwendete *lys2_{A14}*-Reporter nicht doch auch einen kontinuierlichen Anstieg zeigen könnte, sollte dieses Experiment unter den experimentellen Bedingungen der genannten Publikationen erneut überprüft werden.

Die in dieser Arbeit gemessene genomische Instabilität lässt sich nicht pauschal auf Proteine der DNA-Replikation sowie Fehlpaarungsreparatur zurückführen. Weitere beteiligte Komponenten, die nicht direkt zur Genomstabilität beitragen, könnten indirekt Einfluss nehmen. Dies zeigt das Beispiel der Superoxid Dismutase Sod1p. Die Analyse des Alterns muss somit globaler betrachtet werden, um den Effekt des Alterns auf die genomische Stabilität zu prüfen.

6 Anhang

6.1 Sequenzvergleiche von yMsh2p und hMSH2

Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche beziehen sich immer auf die fettgedruckten Abschnitte der Proteinsequenzen. In der oberen Reihe ist die Proteinsequenz von yMsh2p angegeben, in der unteren Reihe von hMSH2. Eine konservierte Aminosäure wird zwischen den beiden Reihen als Buchstabenkode ausgegeben. Ein „+“ deutet an, dass diese Aminosäureposition ähnlich ist. Eine detaillierte bioinformatische Ausführung zum Alignment mit NCBI-Blast unter Standardeinstellungen ist zu finden in Henikoff et al. (Henikoff and Henikoff 1992). Die Darstellung von ähnlichen Aminosäuren mit absteigender Tendenz durch die Symbole „:“ und „.“ wird in der momentanen NCBI Blast Version nicht angegeben. Die Durchführung der Vergleiche ist unter 3.6.1, S. 78 zu finden.

6.1.1 yMsh2p AS 14-109 gegen hMSH2 AS 14-103

Identities Positives Gaps

36/96 (38%) 53/96 (55%) 6/96 (6%)

yMsh2p	14	SEERNFYKKYTGLPKKPLKTI RLVDKGDYYTVIGSDAIFVADSVYHTQSVLKNCQLDPVT	73
		+ E F + + G+P+KP T+RL D+GD+YT G DA+ A V+ TQ V+K + P	
hMSH2	14	AAEVGFVRRFFQGMPEKPTTT VRLFDRGDFYTAHGEDALLAAREVFKTQGVIK--YMGFAG	71
yMsh2p	74	AKNFHEPTKYVTVSLQVLATLLKLC LLDLGYKVEIY-----DKGWKLIKASAPGN	123
		AKN V +S + +K LL Y+VE+Y + W L ASPGN	
hMSH2	72	AKNLQS---- VVLSKMNFESEFVKDLLLVQRVEVYKNRAGNKASKENDWYLAYKASPGN	127

6.1.2 yMsh2p AS 14-286 gegen hMSH2 AS 14-291

Identities Positives Gaps

96/288 (33%) 162/288 (56%) 25/288 (8%)

yMsh2p	14	SEERNFYKKYTGLPKKPLKTI RLVDKGDYYTVIGSDAIFVADSVYHTQSVLKNCQLDPVT	73
		+ E F + + G+P+KP T+RL D+GD+YT G DA+ A V+ TQ V+K + P	
hMSH2	14	AAEVGFVRRFFQGMPEKPTTT VRLFDRGDFYTAHGEDALLAAREVFKTQGVIK--YMGFAG	71
yMsh2p	74	AKNFHEPTKYVTVSLQVLATLLKLC LLDLGYKVEIY-----DKGWKLIKASAPGN	123
		AKN V +S + +K LL Y+VE+Y + W L ASPGN	
hMSH2	72	AKNLQS---- VVLSKMNFESEFVKDLLLVQRVEVYKNRAGNKASKENDWYLAYKASPGN	127
yMsh2p	124	IEQVNELMNMNIDSSIIIASLKVQ WNSODGNCIIGVAFIDTTAYKVGMLDIVDNEVYSNL	183
		+ Q +++ N D S I + V+ ++ DG +GV ++D+ K+G+ + DN+ +SNL	
hMSH2	128	LSQFEDILFGNNDMSASIGV GVKMSAVDGRQVGVYVDSIQRLGLCEFPDNDQFNSL	187
yMsh2p	184	ESFLIQLGVEKCLVQDLT SNSNSNAEMQKVINVIDRCGCVVTLKNSFSEKDVELDITK	243
		E+ LIQ+G KEC++ + +M K+ +I R G ++T K ++FS KD+ DL +	
hMSH2	188	EALLIQIGPKCVL---- PGGETAGDMGKLRQIIQRGGILITERKKADFSTKDIYQDLNR	243
yMsh2p	244	LL---- GDDL-ALSLPQKYSKLSMGACNALIGYLQLLSEQDQVGKYELVEHKLKEFMKLD	298
		LL G+ + + LP+ +++++ + +A+I +L+LLS+ G++EL ++MKLD	
hMSH2	244	LLKGGKKEQMN SAVLPENOVAVSSLSAVIKFLELLSDDSNFGQFELTTFDFSQYMKLD	303

6.1.3 yMsh2p AS 341-375 gegen hMSH2 AS 329-363

Identities Positives Gaps

19/35 (54%) 26/35 (74%) 0/35 (0%)

yMsh2p	299	ASAIKALNLFQGPQNPFGSNNLAVSGFTSAGNSGKVTSLF QLLNHCKTNAGVRLLEWL	358
		+A++ALNLF ++ GS +LA LLN CKT G RL+N+W+	
hMSH2	304	IAAVRALNLFQGSVEDTTGSQSLAA----- LLNKCKTPQGQRLVNQWI	346
yMsh2p	359	KQPLTNIDEINKRHDLVDY LIDQIELRQMLTSEYLPMPDIRRLTKKLNKRG-NLEDVLK	417
		KQPL + + I +R +LV+ ++ ELRQ L + L PD+ RL KK ++ NL+D +	
hMSH2	347	KQPLMDKNRIEERLNLVEAFVEDAELRQTLQEDLLRRFPDLNRLAKKFQRQAANLQDCYR	406

6.1.4 yMsh2p AS 341-410 gegen hMSH2 AS 329-398

Identities Positives Gaps

31/70 (44%) 45/70 (64%) 0/70 (0%)

yMsh2p	299	ASAIKALNLFQGPQNPFGSNNLAVSGFTSAGNSGKVTSLF QLLNHCKTNAGVRLLEWL	358
		+A++ALNLF ++ GS +LA LLN CKT G RL+N+W+	
hMSH2	304	IAAVRALNLFQGSVEDTTGSQSLAA----- LLNKCKTPQGQRLVNQWI	346
yMsh2p	359	KQPLTNIDEINKRHDLVDY LIDQIELRQMLTSEYLPMPDIRRLTKKLNKRG-NLEDVLK	417
		KQPL + + I +R +LV+ ++ ELRQ L + L PD+ RL KK ++ NL+D +	
hMSH2	347	KQPLMDKNRIEERLNLVEAFVEDAELRQTLQEDLLRRFPDLNRLAKKFQRQAANLQDCYR	406

6.1.5 yMsh2p AS 599-645 gegen hMSH2 AS 581-627

Identities Positives Gaps

21/44 (48%) 30/44 (68%) 0/44 (0%)

yMsh2p	599	IINITLTYTPVFEKLSLVL AHLVDVIASFAHTSSYAPIPYIRPKLHPMDSERRTHLISSR	657
		I+NI+ Y + L+ VLA LD + SFAH S+ AP+PY+RP + + R L +SR	
hMSH2	581	IVNISSGYVEPMQTLNDVLAQLDAVVSFAHVSNGAPVPYVRPAILE-KGQGRILKASR	638

6.1.6 yMsh2p AS 685-785 gegen hMSH2 AS 666-766

Identities Positives Gaps

87/101 (86%) 95/101 (94%) 0/101 (0%)

yMsh2p	658	HPVLEMQDDISFISNDVTLES GK DFLI IITGPNMGKSTYIRQ GVISLMAQIGCFV PCE	717
		H +E+QD+I+FI NDV E K F IITGPNMGKSTYIRQ GVI LMAQIGCFV PCE	
hMSH2	639	HACVEVQDEIAFIPNDVYFEKDKQMFH IITGPNMGKSTYIRQ TGVIVLMAQIGCFV PCE	698
yMsh2p	718	EAEIAIVDAILCRVGAGDSQLKGVSTFMVEILETASILKNASKNSLI IVDELGRGT STYD	777
		AE++IVD IL RVGAGDSQLKGVSTFM E+LETASIL++A+K+SLII+DELGRGT STYD	
hMSH2	699	SAEVSIVDCILARVGAGDSQLKGVSTFMAEMLETASILRSATKDSLII IDELGRGT STYD	758
yMsh2p	778	GFGLAWAIAEHI ASKIGCFALFATHFHELT ELSEKLPNVKNMHVVAHIEKNLKEQKH DDE	837
		GFGLAWAI+E+IA+KIG F +FATHFHELT L+ ++P V N+HV A +	
hMSH2	759	GFGLAWAISEYIATKIGAF CFMATHFHELTALANQIPTVNNLHV TALTEETL -----	811

6.1.7 yMsh2p AS 647-785 gegen hMSH2 AS 628-766

Identities	Positives	Gaps
104/136 (76%)	117/136 (86%)	0/136 (0%)
yMsh2p 598	EEIINITLTYTPVFEKLSVLVAHLVDVIASFAHTSSYAPIPYIRPKLHPMD SERRTHLISSR	657
hMSH2 580	EI+NI+ Y + L+ VLA LD + SFAH S+ AP+PY+RP + + R L +SR EIVNISSGYVEPMQTLNDVLAQLDAVVVFAHVSNGAPVPYVRPAILE- KGQGRILKASR	638
yMsh2p 658	HPVLEMQDDISFISNDVTLESQKGFLLIITGPNMGGKSTYIRQVGVISLMAQIGCFVPC	717
hMSH2 639	H +E+QD+I+FI NDV E K F IITGPNMGGKSTYIRQ GVI LMAQIGCFVPC HACVEVQDEIAFIPNDVYFEKDKQMFHIIITGPNMGGKSTYIRQTVIVLMAQIGCFVPC	698
yMsh2p 718	EAETIAIVDAILCRVGAGDSQLKGVSTFMVEIILETASILKNASKNSLIIVDELGRGTSTYD	777
hMSH2 699	AE++IVD IL RVGAGDSQLKGVSTFM E+LETASIL++A+K+SLII+DELGRGTSTYD SAEVSIVDCILARVGAGDSQLKGVSTFMAEMLETASILRSATKDSLIIIDELGRGTSTYD	758
yMsh2p 778	GFGLAWAIAEHIASKIGCFALFATHFHELTELSEKLPNVKNMHVVAHIEKNLKEQKHDE	837
hMSH2 759	GFGLAWAI+E+IA+KIG F +FATHFHELT L+ ++P V N+HV A + GFGLAWAISEYIATKIGAFCMFATHFHELTALANQIPTVNNLHVLTALTEETL-----	811

6.1.8 yMsh2p AS 647-823 gegen hMSH2 AS 628-804

Identities	Positives	Gaps
127/174 (73%)	148/174 (85%)	0/174 (0%)
yMsh2p 598	EEIINITLTYTPVFEKLSVLVAHLVDVIASFAHTSSYAPIPYIRPKLHPMD SERRTHLISSR	657
hMSH2 580	EI+NI+ Y + L+ VLA LD + SFAH S+ AP+PY+RP + + R L +SR EIVNISSGYVEPMQTLNDVLAQLDAVVVFAHVSNGAPVPYVRPAILE- KGQGRILKASR	638
yMsh2p 658	HPVLEMQDDISFISNDVTLESQKGFLLIITGPNMGGKSTYIRQVGVISLMAQIGCFVPC	717
hMSH2 639	H +E+QD+I+FI NDV E K F IITGPNMGGKSTYIRQ GVI LMAQIGCFVPC HACVEVQDEIAFIPNDVYFEKDKQMFHIIITGPNMGGKSTYIRQTVIVLMAQIGCFVPC	698
yMsh2p 718	EAETIAIVDAILCRVGAGDSQLKGVSTFMVEIILETASILKNASKNSLIIVDELGRGTSTYD	777
hMSH2 699	AE++IVD IL RVGAGDSQLKGVSTFM E+LETASIL++A+K+SLII+DELGRGTSTYD SAEVSIVDCILARVGAGDSQLKGVSTFMAEMLETASILRSATKDSLIIIDELGRGTSTYD	758
yMsh2p 778	GFGLAWAIAEHIASKIGCFALFATHFHELTELSEKLPNVKNMHVVAHIEKNLKEQKHDE	837
hMSH2 759	GFGLAWAI+E+IA+KIG F +FATHFHELT L+ ++P V N+HV A + GFGLAWAISEYIATKIGAFCMFATHFHELTALANQIPTVNNLHVLTALTEETL-----	811

6.1.9 yMsh2p AS 836-888 gegen hMSH2 AS 808-860

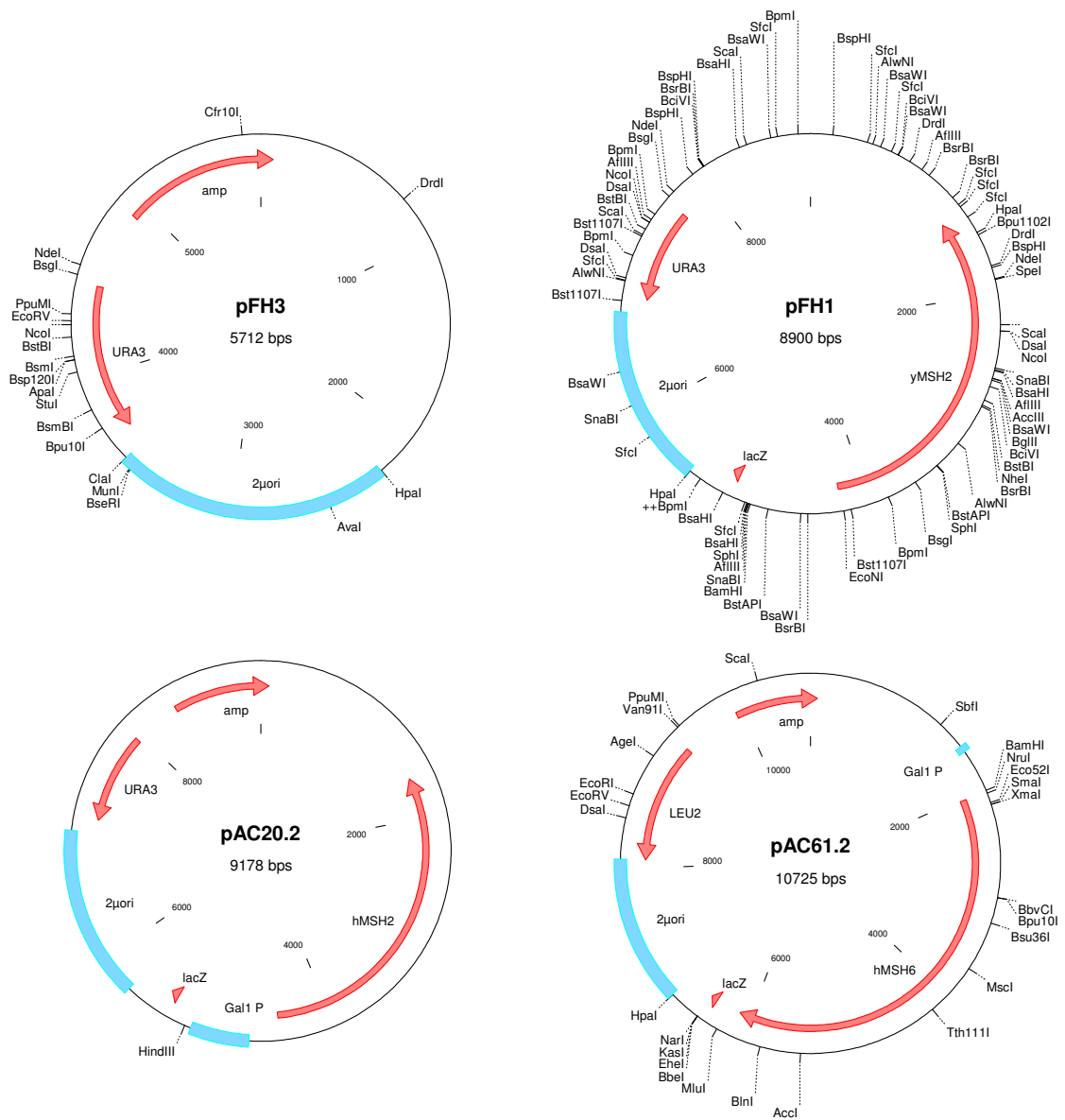
Identities	Positives	Gaps
25/53 (47%)	40/53 (75%)	0/53 (0%)
yMsh2p 836	DEDITLLYKVEPGISDQSFQGIHVAE+VQFPEKIVKMAKRKANELDDLKTNNED	888
hMSH2 808	+E +T+LY+V+ G+ DQSFQGIHVAE+ FP+ +++ AK+KA EL++ + E EETLTMLYQVKKGVCDQSFQGIHVAELANFPKHVIECAKQKALELEEFQYIGES	860

6.2 Aminosäuresequenzen der nukleären Lokalisierungssignale (NLS) von Hefe-Msh2p

Die NLS-Sequenzen sind fett gedruckt und groß dargestellt. Die Aminosäuren sind in 10er Blöcken aufgeteilt. Referenz für NLS-Sequenzen, Hayes, Sevi et al. 2009.

521 Igfd**PDK**KLK Lenhhlhgwc mrlrtrndake **IRKHKK**yl 560

6.3 Plasmidkarten



6.4 Darstellung von biotinylierten Hefezellen in der Durchflusszytometrie

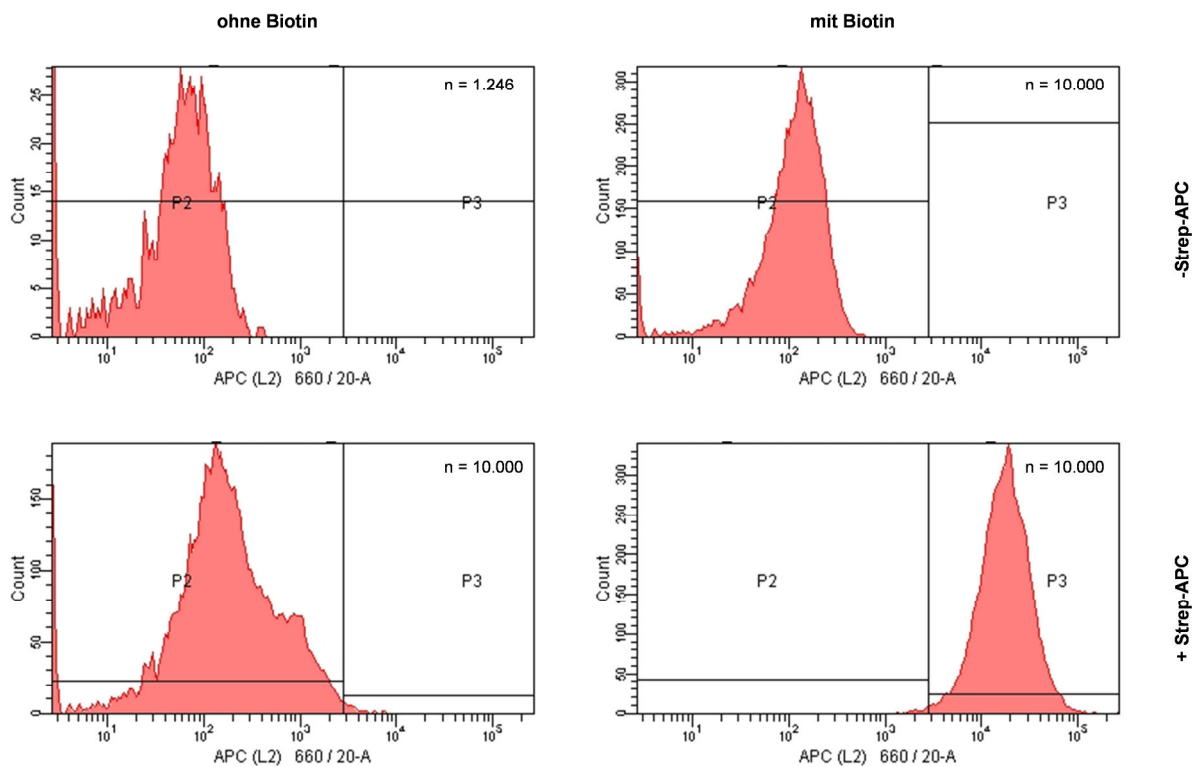


Abb. 61: Ergänzendes Material zu der in Abb. 51 (S. 119) gezeigten FACS-Messung zur Quantifizierung von biotinylierten Zellen. Gezeigt sind zu Abb. 51 korrespondierende Grafiken, mit denen die Grenze zwischen fluoreszierenden (Population P3) und nicht-fluoreszierenden Zellen (Population P2) bestimmt wurde. Diese wurde bei ca. 2×10^3 auf der X-Achse gesetzt, da sich rechts davon die biotinylierte Hefepopulation nachweisen ließ. APC (L2) 660/20-A = relative Fluoreszenz, Count = Anzahl Hefezellen.

6.5 Sinkende Lebendzellzahl mit steigendem replikativen Alter

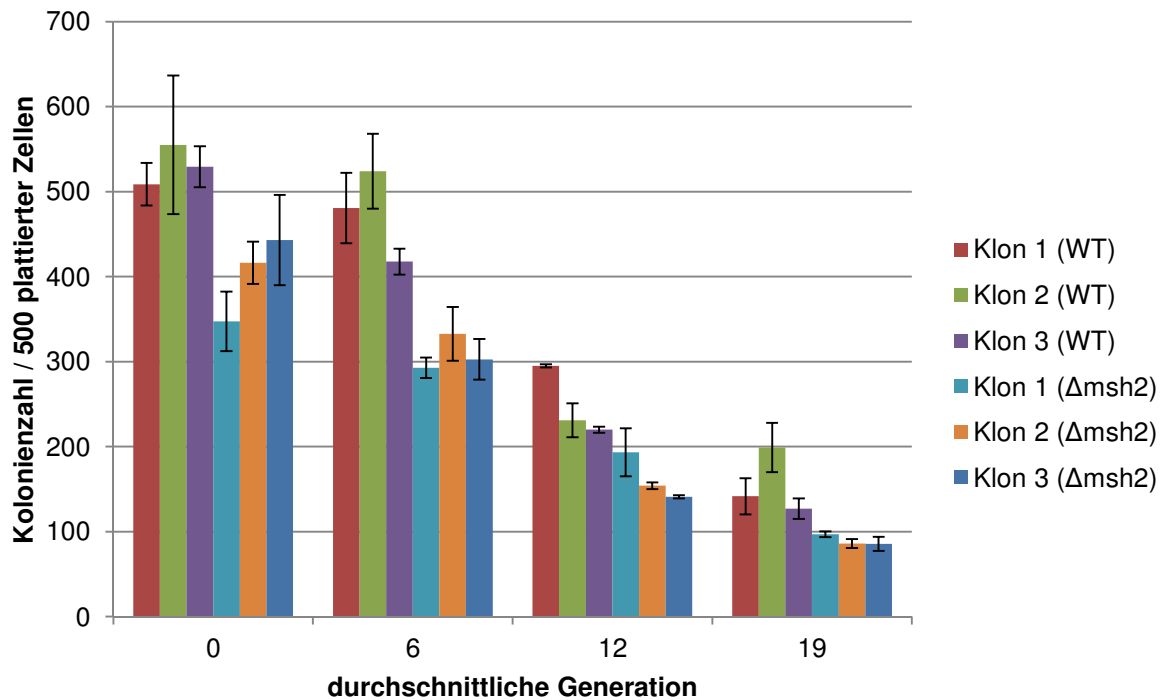


Abb. 62: Abnahme der Lebendzellzahl von replikativ alten Zellen. Für die Lebendzellzahlbestimmung replikativ alter Zellen wurden zu jedem dargestelltem Zeitpunkt 500 Zellen auf SD+24-Platten plattiert. Es zeigte sich, dass mit steigendem Alter die Anzahl der gebildeten Kolonien abnahm. Der Δ msh2-Stamm zeigte im Durchschnitt eine geringere Vitalität, was auf die inaktivierte Fehlpaarungsreparatur zurückzuführen sein könnte. Mutationen können gehäuft akkumulieren, so dass essentielle Gene für die Zellvitalität betroffen sein könnten.

6.6 Mikroskopie von replikativ alten Hefezellen

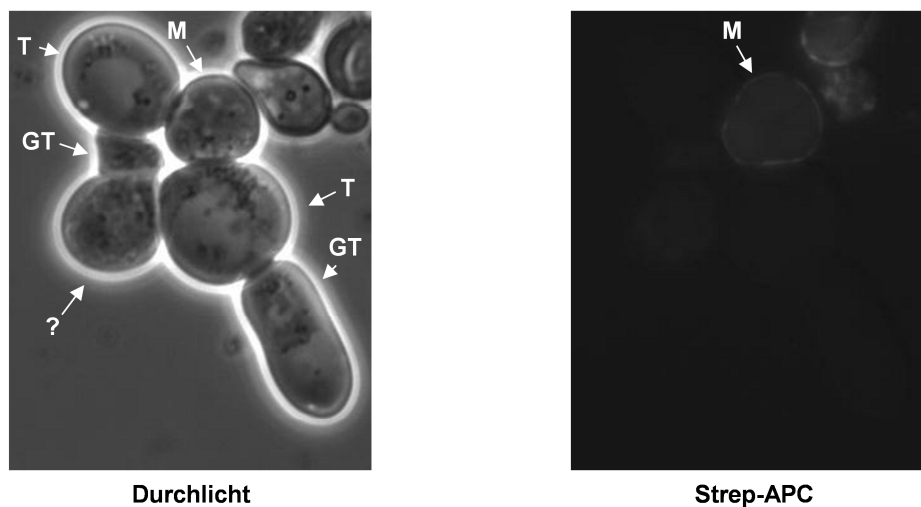


Abb. 63: Nicht-abgetrennte Tochterzellen an einer 19 Generationen alten Mutterzelle. M = Mutterzelle (biotinyliert, siehe Strep-APC), T = Tochterzelle, GT = Großtochterzelle, ? = wahrscheinlich Groß-Großtochter. Strep-APC = Streptavidin-Allophycocyanin

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht von spontanen DNA-Schäden und Polymerase-Fehlern im Zellzyklus.....	13
Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der eukaryotischen DNA-Replikation.	14
Abb. 3: Mögliche Fehler der DNA-Replikation.	16
Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der DNA-Fehlpaarungsreparatur mit den wichtigsten Schritten in <i>E. coli</i> und <i>H. sapiens</i>	19
Abb. 5: Beitrag der einzelnen Mechanismen zur Erhöhung der Replikationsgenauigkeit.....	21
Abb. 6: Modelle zur Rolle von ATP zur Reparaturinitiation und zur Suche des Strangunterscheidungssignals. ...	23
Abb. 7: Aufbau des humanen MSH2 Proteins.	25
Abb. 8: Humane Gene, die Mikrosatelliten tragen.	26
Abb. 9: Prozentuale Verteilung von Mutationen in den humanen DNA-Fehlpaarungsreparaturgenen <i>hMSH2</i> , <i>hMLH1</i> und <i>hMSH6</i>	27
Abb. 10: Das „Three-Step Model“ für die Analyse von unklassifizierten Varianten (UV) von Fehlpaarungsreparaturgenen.	28
Abb. 11: Prinzip des <i>lys2_{A14}</i> -Reportersystems.....	32
Abb. 12: Modell des dominant-negativen Mutatorphänotyps, ausgelöst durch die Ko-Expression von humanem MSH2 und MSH6.....	33
Abb. 13: Das erste Hefe-Mensch-Msh2 Hybrid.	35
Abb. 14: Morphologische Veränderungen von <i>S. cerevisiae</i> Zellen während des replikativen Alterns.....	36
Abb. 15: Prinzip der Klonierung von <i>yhMSH2</i> -Hybriden.	54
Abb. 16: Prinzip der Klonierung von <i>yhMSH2_5</i>	55
Abb. 17: Benutzeroberfläche von FALCOR.....	58
Abb. 18 Schematische Darstellung der Isolation alter Mutterzellen durch paramagnetische Sortierung.	60
Abb. 19: Schema zur Gewinnung von Proteinextrakten nach verschiedenen Generationszeiten im replikativen Alter	63
Abb. 20: Verdünnungsschema zum Plattieren von chronologisch gealterten <i>S. cerevisiae</i> Zellen.....	65
Abb. 21: Schematische Darstellung zum Integrieren einer Punktmutation in den humanen Teil des Hefe-Mensch- <i>MSH2</i> -Hybridgens.	69
Abb. 22: Schematische Darstellung der Integration eines humanen <i>MSH2</i> -Fragments in den Hefe- <i>MSH2</i> Lokus.	70
Abb. 23: Schema der Verifikation eines integrierten Hefe-Mensch- <i>MSH2</i> Hybrids in den Hefe- <i>MSH2</i> Lokus..	71
Abb. 24: Schematische Darstellung der Integration eines Hefe-Mensch- <i>MSH2</i> Hybridgens in den Hefe- <i>MSH2</i> Lokus mittels Plasmid-Restriktion.....	72
Abb. 25: Übersicht von Hefe-Mensch-Msh2p Hybriden.....	82
Abb. 26: Kinetik zur Bestimmung der Überexpressionsmenge von Plasmid-basiertem Hefe-Msh2p (<i>yMsh2p</i>)....	86
Abb. 27: Proteinmengenbestimmung der Hefe-Mensch-Msh2 Hybride.....	88
Abb. 28: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse von Hefe-Mensch- <i>MSH2</i> Hybriden.	90
Abb. 29: Überblick über die genomischen <i>yMSH2</i> Loci von E134, Dag60, yB7 und yB8.....	93
Abb. 30: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Mutationsraten der Stämme aus Abb. 29.	94
Abb. 31: Proteinnachweis des Hybrids <i>yhMsh2_1</i> im Stamm yB8.	94
Abb. 32: Überblick über die genomischen <i>yMSH2</i> Loci von Dag60, E134, yB3, yB17 und yB18.....	96
Abb. 33: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse des Kontrollstamms yB3.	97
Abb. 34: Proteinnachweis des Kontrollstamms yB3.	98
Abb. 35: Proteinnachweis von Hefe-Msh2p der Hybridstämme yB17 und yB18.	98

Abb. 36: Das humane MSH2 Protein mit den in dieser Arbeit untersuchten Allelen.....	99
Abb. 37: Das Hybrid yhMsh2_6 mit den 3 zu untersuchenden Allelen.	100
Abb. 38: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Allele des yhMsh2_6 Hybrids.....	101
Abb. 39: Proteinmengen der Allele des yhMsh2_6 Hybrids.....	101
Abb. 40: Das Hybrid yhMsh2_1 mit den 7 integrierten Allelen.....	102
Abb. 41: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Allele im yhMsh2_1 Hybrid.	103
Abb. 42: Proteinmengenbestimmung der Allele des yhMsh2 Hybrids im $\Delta msh2$ Stamm.	104
Abb. 43: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Allele des yhMsh2_1 Hybrids im Wildtypstamm E134.	106
Abb. 44: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der Allele des yhMsh2_1 Hybrids unter endogenen Bedingungen.	107
Abb. 45: Proteinmengen der Allele des yhMsh2_1 Hybrids unter endogenen Bedingungen.....	108
Abb. 46: Mikroskopische Analyse von GFP-fusioniertem yMsh2p, yhMsh2_1 sowie dessen Allele.....	110
Abb. 47: Grafische Darstellung der quantitativen Analyse der hMSH2-Allele im dominant-negativen Mutatorphänotyp.....	112
Abb. 48: Co-Immunopräzipitation von Allelen des N-Terminus von hMSH2 durch hMSH6.	113
Abb. 49: Co-Immunopräzipitation von Allelen des C-Terminus von hMSH2 durch hMSH6.	114
Abb. 50: Fließschema zur Gewinnung und Untersuchung von replikativ gealterten Zellen.	117
Abb. 51: Nachweis von biotinylierten Zellen.	119
Abb. 52: Quantifizierung der Sortierungseffizienz von alten biotinylierten Zellen.....	121
Abb. 53: Visueller Nachweis für das Binden von paramagnetischen Anti-Biotin Microbeads an biotinylierte Mutterzellen.	122
Abb. 54: Einfluss des replikativen Alterns auf die <i>LYS2</i> -Revertantenzahl.	123
Abb. 55: Analyse der Hefe-Msh2p Proteinmengen im Wildtyp E134 nach verschiedenen Generationen.	125
Abb. 56: Quantifizierung von PI-positiven und PI-negativen Hefezellen nach verschiedenen Generationen.	127
Abb. 57: Nachweis von Hefe-Msh2p bei lebenden und toten replikativ gealterten Zellen.	129
Abb. 58: Der Einfluss des chronologischen Alterns auf die Fehlpaarungsreparatur.	133
Abb. 59: Zusammenfassung der konstruierten Hefe-Mensch-Msh2 Hybriden in Bezug auf Funktionalität und Proteinmenge unter Überexpressionsbedingungen.....	136
Abb. 60: Modelle zur erhöhten Revertantenzahl im replikativen Alter.	153
Abb. 61: Ergänzendes Material zu der in Abb. 51 (S. 119) gezeigten FACS-Messung zur Quantifizierung von biotinylierten Zellen.....	162
Abb. 62: Abnahme der Lebendzellzahl von replikativ alten Zellen.....	163
Abb. 63: Nicht-abgetrennte Tochterzellen an einer 19 Generationen alten Mutterzelle.....	163

8 Literatur

Aaltonen, L. A., P. Peltomaki, J. P. Mecklin, H. Jarvinen, J. R. Jass, J. S. Green, H. T. Lynch, P. Watson, G. Tallqvist, M. Juhola and et al. (1994). "Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients." Cancer Res **54**(7): 1645-1648.

Acharya, S., P. L. Foster, P. Brooks and R. Fishel (2003). "The coordinated functions of the E. coli MutS and MutL proteins in mismatch repair." Mol Cell **12**(1): 233-246.

Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A. S. Kondrashov and S. R. Sunyaev (2010). "A method and server for predicting damaging missense mutations." Nat Methods **7**(4): 248-249.

Aguilaniu, H., L. Gustafsson, M. Rigoulet and T. Nystrom (2003). "Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis." Science **299**(5613): 1751-1753.

Allen, D. J., A. Makhov, M. Grilley, J. Taylor, R. Thresher, P. Modrich and J. D. Griffith (1997). "MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism." EMBO J **16**(14): 4467-4476.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.

Amici, A., R. L. Levine, L. Tsai and E. R. Stadtman (1989). "Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions." J Biol Chem **264**(6): 3341-3346.

Amin, N. S., M. N. Nguyen, S. Oh and R. D. Kolodner (2001). "exo1-Dependent mutator mutations: model system for studying functional interactions in mismatch repair." Mol Cell Biol **21**(15): 5142-5155.

Antony, E. and M. M. Hingorani (2003). "Mismatch recognition-coupled stabilization of Msh2-Msh6 in an ATP-bound state at the initiation of DNA repair." Biochemistry **42**(25): 7682-7693.

Antony, E., S. Khubchandani, S. Chen and M. M. Hingorani (2006). "Contribution of Msh2 and Msh6 subunits to the asymmetric ATPase and DNA mismatch binding activities of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2-Msh6 mismatch repair protein." DNA Repair (Amst) **5**(2): 153-162.

Arana, M. E. and T. A. Kunkel (2010). "Mutator phenotypes due to DNA replication infidelity." Semin Cancer Biol **20**(5): 304-311.

Arcangioli, B. and B. Lescure (1986). "Structural features of the DNA template required for transcription in vitro by yeast RNA polymerase B (II)." Eur J Biochem **155**(1): 69-75.

Arlow, T., K. Scott, A. Wagenseller and A. Gammie (2012). "Proteasome inhibition rescues clinically significant unstable variants of the mismatch repair protein Msh2." Proc Natl Acad Sci U S A.

Bacon, J. S., E. D. Davidson, D. Jones and I. F. Taylor (1966). "The location of chitin in the yeast cell wall." Biochem J **101**(2): 36C-38C.

- Badaracco, G., P. Valsasini, M. Foiani, R. Benfante, G. Lucchini and P. Plevani (1986). "Mechanism of initiation of in vitro DNA synthesis by the immunopurified complex between yeast DNA polymerase I and DNA primase." Eur J Biochem **161**(2): 435-440.
- Barnes, D. E. and T. Lindahl (2004). "Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells." Annu Rev Genet **38**: 445-476.
- Ben Yehuda, A., A. Globerson, S. Krichevsky, H. Bar On, M. Kidron, Y. Friedlander, G. Friedman and D. Ben Yehuda (2000). "Ageing and the mismatch repair system." Mech Ageing Dev **121**(1-3): 173-179.
- Ben Yehuda, S., I. Dix, C. S. Russell, S. Levy, J. D. Beggs and M. Kupiec (1998). "Identification and functional analysis of hPRP17, the human homologue of the PRP17/CDC40 yeast gene involved in splicing and cell cycle control." RNA **4**(10): 1304-1312.
- Bjornson, K. P. and P. Modrich (2003). "Differential and simultaneous adenosine di- and triphosphate binding by MutS." J Biol Chem **278**(20): 18557-18562.
- Boland, C. R. and F. J. Troncale (1984). "Familial colonic cancer without antecedent polyposis." Ann Intern Med **100**(5): 700-701.
- Brieger, A., J. Trojan, J. Raedle, G. Plotz and S. Zeuzem (2002). "Transient mismatch repair gene transfection for functional analysis of genetic hMLH1 and hMSH2 variants." Gut **51**(5): 677-684.
- Bruni, R., D. Martin and J. Jiricny (1988). "d(GATC) sequences influence Escherichia coli mismatch repair in a distance-dependent manner from positions both upstream and downstream of the mismatch." Nucleic Acids Res **16**(11): 4875-4890.
- Budd, M. E. and J. L. Campbell (1993). "DNA polymerases delta and epsilon are required for chromosomal replication in Saccharomyces cerevisiae." Mol Cell Biol **13**(1): 496-505.
- Burdett, V., C. Baitinger, M. Viswanathan, S. T. Lovett and P. Modrich (2001). "In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6765-6770.
- Burgers, P. M. and K. J. Gerik (1998). "Structure and processivity of two forms of Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase delta." J Biol Chem **273**(31): 19756-19762.
- Burtner, C. R., C. J. Murakami, B. K. Kennedy and M. Kaerberlein (2009). "A molecular mechanism of chronological aging in yeast." Cell Cycle **8**(8): 1256-1270.
- Chang, I. Y., M. Jin, S. P. Yoon, C. K. Youn, Y. Yoon, S. P. Moon, J. W. Hyun, J. Y. Jun and H. J. You (2008). "Senescence-dependent MutS alpha dysfunction attenuates mismatch repair." Mol Cancer Res **6**(6): 978-989.
- Chao, E. C., J. L. Velasquez, M. S. Witherspoon, L. S. Rozek, D. Peel, P. Ng, S. B. Gruber, P. Watson, G. Rennert, H. Anton-Culver, H. Lynch and S. M. Lipkin (2008). "Accurate classification of MLH1/MSH2 missense variants with multivariate analysis of protein polymorphisms-mismatch repair (MAPP-MMR)." Hum Mutat **29**(6): 852-860.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura and L. A. Loeb (1992). "8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions." J Biol Chem **267**(1): 166-172.

- Clark, A. B., M. E. Cook, H. T. Tran, D. A. Gordenin, M. A. Resnick and T. A. Kunkel (1999). "Functional analysis of human MutS α and MutS β complexes in yeast." Nucleic Acids Res **27**(3): 736-742.
- Conde-Perezprina, J. C., A. Luna-Lopez, V. Y. Gonzalez-Puertos, T. Zenteno-Savin, M. A. Leon-Galvan and M. Konigsberg (2012). "DNA MMR systems, microsatellite instability and antioxidant activity variations in two species of wild bats: *Myotis velifer* and *Desmodus rotundus*, as possible factors associated with longevity." Age (Dordr) **34**(6): 1473-1492.
- Conde-Perezprina, J. C., A. Luna-Lopez, N. E. Lopez-Diazguerrero, P. Damian-Matsumura, A. Zentella and M. Konigsberg (2008). "Msh2 promoter region hypermethylation as a marker of aging-related deterioration in old retired female breeder mice." Biogerontology **9**(5): 325-334.
- Constantin, N., L. Dzantiev, F. A. Kadyrov and P. Modrich (2005). "Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction." J Biol Chem **280**(48): 39752-39761.
- Couch, F. J., L. J. Rasmussen, R. Hofstra, A. N. Monteiro, M. S. Greenblatt and N. de Wind (2008). "Assessment of functional effects of unclassified genetic variants." Hum Mutat **29**(11): 1314-1326.
- Cunningham, J. M., E. R. Christensen, D. J. Tester, C. Y. Kim, P. C. Roche, L. J. Burgart and S. N. Thibodeau (1998). "Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability." Cancer Res **58**(15): 3455-3460.
- Das Gupta, R. and R. D. Kolodner (2000). "Novel dominant mutations in *Saccharomyces cerevisiae* MSH6." Nat Genet **24**(1): 53-56.
- de la Chapelle, A. (2004). "Genetic predisposition to colorectal cancer." Nat Rev Cancer **4**(10): 769-780.
- Debacker, K., A. Frizzell, O. Gleeson, L. Kirkham-McCarthy, T. Mertz and R. S. Lahue (2012). "Histone deacetylase complexes promote trinucleotide repeat expansions." PLoS Biol **10**(2): e1001257.
- Dherin, C., E. Gueneau, M. Francin, M. Nunez, S. Miron, S. E. Liberti, L. J. Rasmussen, S. Zinn-Justin, B. Gilquin, J. B. Charbonnier and S. Boiteux (2009). "Characterization of a highly conserved binding site of Mlh1 required for exonuclease I-dependent mismatch repair." Mol Cell Biol **29**(3): 907-918.
- Dirnberger, D. and K. Seuwen (2007). "Signaling of human frizzled receptors to the mating pathway in yeast." PLoS One **2**(9): e954.
- Drost, M., J. B. Zonneveld, S. van Hees, L. J. Rasmussen, R. M. Hofstra and N. de Wind (2012). "A rapid and cell-free assay to test the activity of lynch syndrome-associated MSH2 and MSH6 missense variants." Hum Mutat **33**(3): 488-494.
- Drotschmann, K., A. B. Clark and T. A. Kunkel (1999). "Mutator phenotypes of common polymorphisms and missense mutations in MSH2." Curr Biol **9**(16): 907-910.
- Drotschmann, K., A. B. Clark, H. T. Tran, M. A. Resnick, D. A. Gordenin and T. A. Kunkel (1999). "Mutator phenotypes of yeast strains heterozygous for mutations in the MSH2 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2970-2975.
- Drotschmann, K., R. P. Topping, J. E. Clodfelter and F. R. Salsbury (2004). "Mutations in the nucleotide-binding domain of MutS homologs uncouple cell death from cell survival." DNA Repair (Amst) **3**(7): 729-742.

- Drotschmann, K., W. Yang, F. E. Brownell, E. T. Kool and T. A. Kunkel (2001). "Asymmetric recognition of DNA local distortion. Structure-based functional studies of eukaryotic Msh2-Msh6." J Biol Chem **276**(49): 46225-46229.
- Drummond, J. T. and A. Bellacosa (2001). "Human DNA mismatch repair in vitro operates independently of methylation status at CpG sites." Nucleic Acids Res **29**(11): 2234-2243.
- Dutkowski, R. T., R. Lesh, L. Staiano-Coico, H. Thaler, G. J. Darlington and M. E. Weksler (1985). "Increased chromosomal instability in lymphocytes from elderly humans." Mutat Res **149**(3): 505-512.
- Egilmez, N. K. and S. M. Jazwinski (1989). "Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Bacteriol **171**(1): 37-42.
- Eisen, J. A. (1998). "A phylogenomic study of the MutS family of proteins." Nucleic Acids Res **26**(18): 4291-4300.
- Ellison, A. R., J. Lofing and G. A. Bitter (2001). "Functional analysis of human MLH1 and MSH2 missense variants and hybrid human-yeast MLH1 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." Hum Mol Genet **10**(18): 1889-1900.
- Eltschinger, S., E. Greganova, M. Heller, P. Butikofer and M. Altmann (2012). "Eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) domain I from *S. cerevisiae* is required but not sufficient for inter-species complementation." PLoS One **7**(7): e42338.
- Entian, K. D., T. Schuster, J. H. Hegemann, D. Becher, H. Feldmann, U. Guldener, R. Gotz, M. Hansen, C. P. Hollenberg, G. Jansen, W. Kramer, S. Klein, P. Kotter, J. Kricke, H. Launhardt, G. Mannhaupt, A. Maierl, P. Meyer, W. Mewes, T. Munder, R. K. Niedenthal, M. Ramezani Rad, A. Rohmer, A. Romer, A. Hinnen and et al. (1999). "Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach." Mol Gen Genet **262**(4-5): 683-702.
- 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., L. Battistella, R. Vardavas, C. Gattazzo, L. L. Liou, A. Diaspro, J. W. Dossen, E. B. Gralla and V. D. Longo (2004). "Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **166**(7): 1055-1067.
- Fabrizio, P. and V. D. Longo (2003). "The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*." Aging Cell **2**(2): 73-81.
- Fabrizio, P. and V. D. Longo (2007). "The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*." Methods Mol Biol **371**: 89-95.
- Fan, H. C., J. Wang, A. Potanina and S. R. Quake (2011). "Whole-genome molecular haplotyping of single cells." Nat Biotechnol **29**(1): 51-57.
- Fang, W. H. and P. Modrich (1993). "Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction." J Biol Chem **268**(16): 11838-11844.
- Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner (1993). "The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer." Cell **75**(5): 1027-1038.

- Friedhoff, P., E. Thomas and A. Pingoud (2003). "Tyr212: a key residue involved in strand discrimination by the DNA mismatch repair endonuclease MthH." J Mol Biol **325**(2): 285-297.
- Funk, B. (2010). "Charakterisierung von Msh2 Hefe/Mensch Hybridproteinen im DNA Fehlpaarungsreparatursystem der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*." Diplomarbeit.
- Gammie, A. E., N. Erdeniz, J. Beaver, B. Devlin, A. Nanji and M. D. Rose (2007). "Functional characterization of pathogenic human MSH2 missense mutations in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **177**(2): 707-721.
- Ganguly, B. B. (1993). "Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors: related to donor's age." Mutat Res **295**(3): 135-148.
- Gassman, N. R., J. E. Clodfelter, A. K. McCauley, K. Bonin, F. R. Salsbury, Jr. and K. D. Scarpinato (2011). "Cooperative nuclear localization sequences lend a novel role to the N-terminal region of MSH6." PLoS One **6**(3): e17907.
- Genschel, J., S. J. Littman, J. T. Drummond and P. Modrich (1998). "Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha." J Biol Chem **273**(31): 19895-19901.
- Ghodgaonkar, M. M., F. Lazzaro, M. Olivera-Pimentel, M. Artola-Boran, P. Cejka, M. A. Reijns, A. P. Jackson, P. Plevani, M. Muzi-Falconi and J. Jiricny (2013). "Ribonucleotides misincorporated into DNA act as strand-discrimination signals in eukaryotic mismatch repair." Mol Cell **50**(3): 323-332.
- 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.
- Goldfarb, T. and E. Alani (2005). "Distinct roles for the *Saccharomyces cerevisiae* mismatch repair proteins in heteroduplex rejection, mismatch repair and nonhomologous tail removal." Genetics **169**(2): 563-574.
- Goldstein, A.L., and McCusker, J.H. 1999: Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **15**, 1541-15.
- Golubov, A., Y. Yao, P. Maheshwari, A. Bilichak, A. Boyko, F. Belzile and I. Kovalchuk (2010). "Microsatellite instability in *Arabidopsis* increases with plant development." Plant Physiol **154**(3): 1415-1427.
- Gorbalenya, A. E. and E. V. Koonin (1990). "Superfamily of UvrA-related NTP-binding proteins. Implications for rational classification of recombination/repair systems." J Mol Biol **213**(4): 583-591.
- Gorbunova, V., A. Seluanov, Z. Mao and C. Hine (2007). "Changes in DNA repair during aging." Nucleic Acids Res **35**(22): 7466-7474.
- Gorman, J., A. J. Plys, M. L. Visnapuu, E. Alani and E. C. Greene (2010). "Visualizing one-dimensional diffusion of eukaryotic DNA repair factors along a chromatin lattice." Nat Struct Mol Biol **17**(8): 932-938.
- Gorman, J., F. Wang, S. Redding, A. J. Plys, T. Fazio, S. Wind, E. E. Alani and E. C. Greene (2012). "Single-molecule imaging reveals target-search mechanisms during DNA mismatch repair." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(45): E3074-3083.

- Gradia, S., S. Acharya and R. Fishel (1997). "The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch." Cell **91**(7): 995-1005.
- Grafstrom, R. H. and R. H. Hoess (1983). "Cloning of mutH and identification of the gene product." Gene **22**(2-3): 245-253.
- Grilley, M., K. M. Welsh, S. S. Su and P. Modrich (1989). "Isolation and characterization of the Escherichia coli mutL gene product." J Biol Chem **264**(2): 1000-1004.
- Guerrette, S., T. Wilson, S. Gradia and R. Fishel (1998). "Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Mol Cell Biol **18**(11): 6616-6623.
- Guldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer and J. H. Hegemann (1996). "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast." Nucleic Acids Res **24**(13): 2519-2524.
- Güldener, U., Heinisch, J., Köhler G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. 2002: A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucleic Acids Research **30**, e23 .
- Hall, B. M., C. X. Ma, P. Liang and K. K. Singh (2009). "Fluctuation analysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbruck fluctuation analysis." Bioinformatics **25**(12): 1564-1565.
- Hall, M. C. and S. W. Matson (1999). "The Escherichia coli MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity." J Biol Chem **274**(3): 1306-1312.
- Hardt, K., S. B. Heick, B. Betz, T. Goecke, H. Yazdanparast, R. Kuppers, K. Servan, V. Steinke, N. Rahner, M. Morak, E. Holinski-Feder, C. Engel, G. Moslein, H. K. Schackert, M. von Knebel Doeberitz, C. Pox, J. H. Hegemann and B. Royer-Pokora (2011). "Missense variants in hMLH1 identified in patients from the German HNPCC consortium and functional studies." Fam Cancer **10**(2): 273-284.
- Harrington, J. M. and R. D. Kolodner (2007). "Saccharomyces cerevisiae Msh2-Msh3 acts in repair of base-base mispairs." Mol Cell Biol **27**(18): 6546-6554.
- Hartwell, L. H. and M. W. Unger (1977). "Unequal division in Saccharomyces cerevisiae and its implications for the control of cell division." J Cell Biol **75**(2 Pt 1): 422-435.
- Hayes, A. P., L. A. Sevi, M. C. Feldt, M. D. Rose and A. E. Gammie (2009). "Reciprocal regulation of nuclear import of the yeast MutSalpha DNA mismatch repair proteins Msh2 and Msh6." DNA Repair (Amst) **8**(6): 739-751.
- Hegemann, J. H. and S. B. Heick (2011). "Delete and repeat: a comprehensive toolkit for sequential gene knockout in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae." Methods Mol Biol **765**: 189-206.
- Henikoff, S. and J. G. Henikoff (1992). "Amino acid substitution matrices from protein blocks." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10915-10919.
- Heick, SB (2008). „Funktionelle Analyse von Punktmutationen in den humanen DNA-Fehlpaarungsreparaturproteinen hMLH1 und hMSH2 in Saccharomyces cerevisiae.“Diplomarbeit.

- Herbst, F. (2006). "Funktionelle Analyse humaner DNA-Reparaturproteine in *Saccharomyces cerevisiae*." Diplomarbeit.
- Holland, I. B. and M. A. Blight (1999). "ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans." J Mol Biol **293**(2): 381-399.
- Hombauer, H., C. S. Campbell, C. E. Smith, A. Desai and R. D. Kolodner (2011). "Visualization of eukaryotic DNA mismatch repair reveals distinct recognition and repair intermediates." Cell **147**(5): 1040-1053.
- Ionov, Y., M. A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata and M. Perucho (1993). "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis." Nature **363**(6429): 558-561.
- Ishimi, Y. (1997). "A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex." J Biol Chem **272**(39): 24508-24513.
- Jass, J. R. (2006). "Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term." World J Gastroenterol **12**(31): 4943-4950.
- Jez, M., T. Bas, M. Veber, A. Kosir, T. Dominko, R. Page and P. Rozman (2013). "The hazards of DAPI photoconversion: effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem." Histochem Cell Biol **139**(1): 195-204.
- Johnson, R. E., G. K. Kovvali, L. Prakash and S. Prakash (1996). "Requirement of the yeast MSH3 and MSH6 genes for MSH2-dependent genomic stability." J Biol Chem **271**(13): 7285-7288.
- Junop, M. S., G. Obmolova, K. Rausch, P. Hsieh and W. Yang (2001). "Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair." Mol Cell **7**(1): 1-12.
- Junop, M. S., W. Yang, P. Funchain, W. Clendenin and J. H. Miller (2003). "In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination." DNA Repair (Amst) **2**(4): 387-405.
- Kadyrov, F. A., L. Dzantiev, N. Constantin and P. Modrich (2006). "Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair." Cell **126**(2): 297-308.
- Kadyrov, F. A., S. F. Holmes, M. E. Arana, O. A. Lukianova, M. O'Donnell, T. A. Kunkel and P. Modrich (2007). "*Saccharomyces cerevisiae* MutLalpha is a mismatch repair endonuclease." J Biol Chem **282**(51): 37181-37190.
- Kariola, R., R. Otway, K. E. Lonqvist, T. E. Raevaara, F. Macrae, Y. J. Vos, M. Kohonen-Corish, R. M. Hofstra and M. Nystrom-Lahti (2003). "Two mismatch repair gene mutations found in a colon cancer patient--which one is pathogenic?" Hum Genet **112**(2): 105-109.
- Kennedy, B. K., N. R. Austriaco, Jr. and L. Guarente (1994). "Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span." J Cell Biol **127**(6 Pt 2): 1985-1993.
- Knudsen, N. O., F. C. Nielsen, L. Vinther, R. Bertelsen, S. Holten-Andersen, S. E. Liberti, R. Hofstra, K. Kooi and L. J. Rasmussen (2007). "Nuclear localization of human DNA mismatch repair protein exonuclease 1 (hEXO1)." Nucleic Acids Res **35**(8): 2609-2619.

- Kourtis, N. and N. Tavernarakis (2011). "Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships." EMBO J **30**(13): 2520-2531.
- Kramer, B., W. Kramer and H. J. Fritz (1984). "Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*." Cell **38**(3): 879-887.
- Krichevsky, S., G. Pawelec, A. Gural, R. B. Effros, A. Globerson, D. B. Yehuda and A. B. Yehuda (2004). "Age related microsatellite instability in T cells from healthy individuals." Exp Gerontol **39**(4): 507-515.
- Kroutil, L. C., K. Register, K. Bebenek and T. A. Kunkel (1996). "Exonucleolytic proofreading during replication of repetitive DNA." Biochemistry **35**(3): 1046-1053.
- Kumar, C., S. C. Piacente, J. Sibert, A. R. Bukata, J. O'Connor, E. Alani and J. A. Surtees (2011). "Multiple factors insulate Msh2-Msh6 mismatch repair activity from defects in Msh2 domain I." J Mol Biol **411**(4): 765-780.
- Kumar, D., A. L. Abdulovic, J. Viberg, A. K. Nilsson, T. A. Kunkel and A. Chabes (2011). "Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools." Nucleic Acids Res **39**(4): 1360-1371.
- Kumar, P., S. Henikoff and P. C. Ng (2009). "Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm." Nat Protoc **4**(7): 1073-1081.
- Lahue, R. S., K. G. Au and P. Modrich (1989). "DNA mismatch correction in a defined system." Science **245**(4914): 160-164.
- Lahue, R. S., S. S. Su and P. Modrich (1987). "Requirement for d(GATC) sequences in *Escherichia coli* mutHLS mismatch correction." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(6): 1482-1486.
- Lamers, M. H., A. Perrakis, J. H. Enzlin, H. H. Winterwerp, N. de Wind and T. K. Sixma (2000). "The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch." Nature **407**(6805): 711-717.
- Lamers, M. H., H. H. Winterwerp and T. K. Sixma (2003). "The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair." EMBO J **22**(3): 746-756.
- Lang, G., Parsons, E. and Gammie, A. (2013). "Mutation rates, spectra, and genom-wide distribution of spontaneous mutations in mismatch repair deficient yeast." G3 (Bethesda) **4**;3(9): 1453-65.
- Langen, M. (2011). "Der Zusammenhang zwischen Aneuploidie und Alterung im Modellsystem Hefe." Dissertation.
- Langle-Rouault, F., G. Maenhaut-Michel and M. Radman (1987). "GATC sequences, DNA nicks and the MutH function in *Escherichia coli* mismatch repair." EMBO J **6**(4): 1121-1127.
- Larrea, A. A., S. A. Lujan and T. A. Kunkel (2010). "SnapShot: DNA mismatch repair." Cell **141**(4): 730 e731.
- Laskey, R. A. and M. A. Madine (2003). "A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks." EMBO Rep **4**(1): 26-30.

- 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.
- Leach, F. S., N. C. Nicolaidis, N. Papadopoulos, B. Liu, J. Jen, R. Parsons, P. Peltomaki, P. Sistonen, L. A. Aaltonen, M. Nystrom-Lahti and et al. (1993). "Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Cell **75**(6): 1215-1225.
- Lebbink, J. H., A. Fish, A. Reumer, G. Natrajan, H. H. Winterwerp and T. K. Sixma (2010). "Magnesium coordination controls the molecular switch function of DNA mismatch repair protein MutS." J Biol Chem **285**(17): 13131-13141.
- Lee, S. D., J. A. Surtees and E. Alani (2007). "Saccharomyces cerevisiae MSH2-MSH3 and MSH2-MSH6 complexes display distinct requirements for DNA binding domain I in mismatch recognition." J Mol Biol **366**(1): 53-66.
- Li, F., L. Tian, L. Gu and G. M. Li (2009). "Evidence that nucleosomes inhibit mismatch repair in eukaryotic cells." J Biol Chem **284**(48): 33056-33061.
- Li, G. M. (2008). "Mechanisms and functions of DNA mismatch repair." Cell Res **18**(1): 85-98.
- Lin, D. P., Y. Wang, S. J. Scherer, A. B. Clark, K. Yang, E. Avdievich, B. Jin, U. Werling, T. Parris, N. Kurihara, A. Umar, R. Kucheralapati, M. Lipkin, T. A. Kunkel and W. Edelmann (2004). "An Msh2 point mutation uncouples DNA mismatch repair and apoptosis." Cancer Res **64**(2): 517-522.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature **362**(6422): 709-715.
- Lindstrom, D. L., C. K. Leverich, K. A. Henderson and D. E. Gottschling (2011). "Replicative age induces mitotic recombination in the ribosomal RNA gene cluster of Saccharomyces cerevisiae." PLoS Genet **7**(3): e1002015.
- Liu, H. X., L. Cartegni, M. Q. Zhang and A. R. Krainer (2001). "A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes." Nat Genet **27**(1): 55-58.
- Loeb, L. A. and R. J. Monnat, Jr. (2008). "DNA polymerases and human disease." Nat Rev Genet **9**(8): 594-604.
- Lowth, B. R., J. Kirstein-Miles, T. Saiyed, H. Brotz-Oesterhelt, R. I. Morimoto, K. N. Truscott and D. A. Dougan (2012). "Substrate recognition and processing by a Walker B mutant of the human mitochondrial AAA+ protein CLPX." J Struct Biol **179**(2): 193-201.
- Luhr, B., J. Scheller, P. Meyer and W. Kramer (1998). "Analysis of in vivo correction of defined mismatches in the DNA mismatch repair mutants msh2, msh3 and msh6 of Saccharomyces cerevisiae." Mol Gen Genet **257**(3): 362-367.
- Lutzen, A., N. de Wind, D. Georgijevic, F. C. Nielsen and L. J. Rasmussen (2008). "Functional analysis of HNPCC-related missense mutations in MSH2." Mutat Res **645**(1-2): 44-55.
- Lynch, H. T., T. J. Drouhard, G. S. Schuelke, K. A. Biscione, J. F. Lynch and B. S. Danes (1985). "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family." Cancer Genet Cytogenet **15**(3-4): 209-213.

- Lynch, H. T., P. M. Lynch, S. J. Lanspa, C. L. Snyder, J. F. Lynch and C. R. Boland (2009). "Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications." Clin Genet **76**(1): 1-18.
- Lynch, H. T., M. W. Shaw, C. W. Magnuson, A. L. Larsen and A. J. Krush (1966). "Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds." Arch Intern Med **117**(2): 206-212.
- Madia, F., C. Gattazzo, P. Fabrizio and V. D. Longo (2007). "A simple model system for age-dependent DNA damage and cancer." Mech Ageing Dev **128**(1): 45-49.
- Maga, G. and U. Hubscher (2003). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners." J Cell Sci **116**(Pt 15): 3051-3060.
- Makarova, I. V., A. A. Kazakov, A. V. Makarova, N. V. Khaidarova, L. V. Kozikova, V. V. Nenasheva, L. V. Gening, V. Z. Tarantul and L. E. Andreeva (2012). "Transient expression and activity of human DNA polymerase iota in loach embryos." Biotechnol Lett **34**(2): 205-212.
- Marra, G. and C. R. Boland (1995). "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives." J Natl Cancer Inst **87**(15): 1114-1125.
- Martinez, S. L. and R. D. Kolodner (2010). "Functional analysis of human mismatch repair gene mutations identifies weak alleles and polymorphisms capable of polygenic interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(11): 5070-5075.
- Mazur, D. J., M. L. Mendillo and R. D. Kolodner (2006). "Inhibition of Msh6 ATPase activity by mispaired DNA induces a Msh2(ATP)-Msh6(ATP) state capable of hydrolysis-independent movement along DNA." Mol Cell **22**(1): 39-49.
- McCulloch, S. D., L. Gu and G. M. Li (2003). "Bi-directional processing of DNA loops by mismatch repair-dependent and -independent pathways in human cells." J Biol Chem **278**(6): 3891-3896.
- McCulloch, S. D. and T. A. Kunkel (2008). "The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases." Cell Res **18**(1): 148-161.
- McMurray, M. A. and D. E. Gottschling (2003). "An age-induced switch to a hyper-recombinational state." Science **301**(5641): 1908-1911.
- Mechanic, L. E., B. A. Frankel and S. W. Matson (2000). "Escherichia coli MutL loads DNA helicase II onto DNA." J Biol Chem **275**(49): 38337-38346.
- Meira, L. B., N. E. Burgis and L. D. Samson (2005). "Base excision repair." Adv Exp Med Biol **570**: 125-173.
- Mendillo, M. L., V. V. Hargreaves, J. W. Jamison, A. O. Mo, S. Li, C. D. Putnam, V. L. Woods, Jr. and R. D. Kolodner (2009). "A conserved MutS homolog connector domain interface interacts with MutL homologs." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(52): 22223-22228.
- Mendizabal, I., G. Rios, J. M. Mulet, R. Serrano and I. F. de Larrinoa (1998). "Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance." FEBS Lett **425**(2): 323-328.
- Morrison, A., H. Araki, A. B. Clark, R. K. Hamatake and A. Sugino (1990). "A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*." Cell **62**(6): 1143-1151.
- Mortimer, R. K. and J. R. Johnston (1959). "Life span of individual yeast cells." Nature **183**(4677): 1751-1752.

- Mukherjee, S. and M. Feig (2009). "Conformational change in MSH2-MSH6 upon binding DNA coupled to ATPase activity." Biophys J **96**(11): L63-65.
- Mukherjee, S., S. M. Law and M. Feig (2009). "Deciphering the mismatch recognition cycle in MutS and MSH2-MSH6 using normal-mode analysis." Biophys J **96**(5): 1707-1720.
- 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.
- Murakami, C. J., C. R. Burtner, B. K. Kennedy and M. Kaeberlein (2008). "A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **63**(2): 113-121.
- Nagasaka, T., J. Rhees, M. Kloor, J. Gebert, Y. Naomoto, C. R. Boland and A. Goel (2010). "Somatic hypermethylation of MSH2 is a frequent event in Lynch Syndrome colorectal cancers." Cancer Res **70**(8): 3098-3108.
- Ng, P. C. and S. Henikoff (2001). "Predicting deleterious amino acid substitutions." Genome Res **11**(5): 863-874.
- Nick McElhinny, S. A., D. A. Gordenin, C. M. Stith, P. M. Burgers and T. A. Kunkel (2008). "Division of labor at the eukaryotic replication fork." Mol Cell **30**(2): 137-144.
- Nick McElhinny, S. A., B. E. Watts, D. Kumar, D. L. Watt, E. B. Lundstrom, P. M. Burgers, E. Johansson, A. Chabes and T. A. Kunkel (2010). "Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(11): 4949-4954.
- Obmolova, G., C. Ban, P. Hsieh and W. Yang (2000). "Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA." Nature **407**(6805): 703-710.
- Ollila, S., D. Dermadi Bebek, J. Jiricny and M. Nystrom (2008). "Mechanisms of pathogenicity in human MSH2 missense mutants." Hum Mutat **29**(11): 1355-1363.
- Ollila, S., L. Sarantaus, R. Kariola, P. Chan, H. Hampel, E. Holinski-Feder, F. Macrae, M. Kohonen-Corish, A. M. Gerdes, P. Peltomaki, E. Mangold, A. de la Chapelle, M. Greenblatt and M. Nystrom (2006). "Pathogenicity of MSH2 missense mutations is typically associated with impaired repair capability of the mutated protein." Gastroenterology **131**(5): 1408-1417.
- Ou, J., R. C. Niessen, J. Vonk, H. Westers, R. M. Hofstra and R. H. Sijmons (2008). "A database to support the interpretation of human mismatch repair gene variants." Hum Mutat **29**(11): 1337-1341.
- Patel, P. H., H. Kawate, E. Adman, M. Ashbach and L. A. Loeb (2001). "A single highly mutable catalytic site amino acid is critical for DNA polymerase fidelity." J Biol Chem **276**(7): 5044-5051.
- Pavlov, Y. I., C. Frahm, S. A. Nick McElhinny, A. Niimi, M. Suzuki and T. A. Kunkel (2006). "Evidence that errors made by DNA polymerase alpha are corrected by DNA polymerase delta." Curr Biol **16**(2): 202-207.
- Pavlov, Y. I., I. M. Mian and T. A. Kunkel (2003). "Evidence for Preferential Mismatch Repair of Lagging Strand DNA Replication Errors in Yeast." Current Biology **13**(9): 744-748.
- Peltomaki, P. (2001). "Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer." Hum Mol Genet **10**(7): 735-740.

- Percesepe, A., P. Kristo, L. A. Aaltonen, M. Ponz de Leon, A. de la Chapelle and P. Peltomaki (1998). "Mismatch repair genes and mononucleotide tracts as mutation targets in colorectal tumors with different degrees of microsatellite instability." Oncogene **17**(2): 157-163.
- Pfau, S. J. and A. Amon (2012). "Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man." EMBO Rep **13**(6): 515-527.
- Philippsen, P., M. Thomas, R. A. Kramer and R. W. Davis (1978). "Unique arrangement of coding sequences for 5 S, 5.8 S, 18 S and 25 S ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae* as determined by R-loop and hybridization analysis." J Mol Biol **123**(3): 387-404.
- Pluciennik, A., L. Dzantiev, R. R. Iyer, N. Constantin, F. A. Kadyrov and P. Modrich (2010). "PCNA function in the activation and strand direction of MutL α endonuclease in mismatch repair." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(37): 16066-16071.
- Pluciennik, A. and P. Modrich (2007). "Protein roadblocks and helix discontinuities are barriers to the initiation of mismatch repair." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12709-12713.
- Polaczek, P., A. P. Putzke, K. Leong and G. A. Bitter (1998). "Functional genetic tests of DNA mismatch repair protein activity in *Saccharomyces cerevisiae*." Gene **213**(1-2): 159-167.
- Prelich, G., C. K. Tan, M. Kostura, M. B. Mathews, A. G. So, K. M. Downey and B. Stillman (1987). "Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein." Nature **326**(6112): 517-520.
- Preston, B. D., T. M. Albertson and A. J. Herr (2010). "DNA replication fidelity and cancer." Semin Cancer Biol **20**(5): 281-293.
- 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.
- Pursell, Z. F., I. Isoz, E. B. Lundstrom, E. Johansson and T. A. Kunkel (2007). "Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication." Science **317**(5834): 127-130.
- Qiu, J., Y. Qian, V. Chen, M. X. Guan and B. Shen (1999). "Human exonuclease 1 functionally complements its yeast homologues in DNA recombination, RNA primer removal, and mutation avoidance." J Biol Chem **274**(25): 17893-17900.
- Radman, M. (1980). "DNA methylation, mismatch correction and genetic stability." Progress in Environmental Mutagenesis: 121-130.
- Raevaara, T. E., M. K. Korhonen, H. Lohi, H. Hampel, E. Lynch, K. E. Lonqvist, E. Holinski-Feder, C. Sutter, W. McKinnon, S. Duraisamy, A. M. Gerdes, P. Peltomaki, M. Kohonen-Ccorish, E. Mangold, F. Macrae, M. Greenblatt, A. de la Chapelle and M. Nystrom (2005). "Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1." Gastroenterology **129**(2): 537-549.
- Ramilo, C., L. Gu, S. Guo, X. Zhang, S. M. Patrick, J. J. Turchi and G. M. Li (2002). "Partial reconstitution of human DNA mismatch repair in vitro: characterization of the role of human replication protein A." Mol Cell Biol **22**(7): 2037-2046.
- Reenan, R. A. and R. D. Kolodner (1992). "Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins." Genetics **132**(4): 963-973.

- Reverter-Branchat, G., E. Cabisco, J. Tamarit and J. Ros (2004). "Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction." J Biol Chem **279**(30): 31983-31989.
- Rosenbaum, J. C., E. K. Fredrickson, M. L. Oeser, C. M. Garrett-Engle, M. N. Locke, L. A. Richardson, Z. W. Nelson, E. D. Hetrick, T. I. Milac, D. E. Gottschling and R. G. Gardner (2011). "Disorder targets disorder in nuclear quality control degradation: a disordered ubiquitin ligase directly recognizes its misfolded substrates." Mol Cell **41**(1): 93-106.
- Rydberg, B. (1978). "Bromouracil mutagenesis and mismatch repair in mutator strains of *Escherichia coli*." Mutat Res **52**(1): 11-24.
- Sambrook, J., T. Maniatis, et al. (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor NY.
- Sankila, R., L. A. Aaltonen, H. J. Jarvinen and J. P. Mecklin (1996). "Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer." Gastroenterology **110**(3): 682-687.
- Saturno, J., J. M. Lazaro, F. J. Esteban, L. Blanco and M. Salas (1997). "o29 DNA polymerase residue Lys383, invariant at motif B of DNA-dependent polymerases, is involved in dNTP binding." J Mol Biol **269**(3): 313-325.
- Schmutte, C., R. C. Marinescu, M. M. Sadoff, S. Guerrette, J. Overhauser and R. Fishel (1998). "Human exonuclease I interacts with the mismatch repair protein hMSH2." Cancer Res **58**(20): 4537-4542.
- Schneider, R., C. Schneider, M. Kloor, A. Furst and G. Moslein (2012). "Lynch syndrome: clinical, pathological, and genetic insights." Langenbecks Arch Surg **397**(4): 513-525.
- Schofield, M. J., F. E. Brownell, S. Nayak, C. Du, E. T. Kool and P. Hsieh (2001). "The Phe-X-Glu DNA binding motif of MutS. The role of hydrogen bonding in mismatch recognition." J Biol Chem **276**(49): 45505-45508.
- Semsei, I. (2000). "On the nature of aging." Mech Ageing Dev **117**(1-3): 93-108.
- Sharma, D., A. F. Say, L. L. Ledford, A. J. Hughes, H. A. Sehorn, D. S. Dwyer and M. G. Sehorn (2013). "Role of the conserved lysine within the Walker A motif of human DMC1." DNA Repair (Amst) **12**(1): 53-62.
- Shcherbakova, P. V. and T. A. Kunkel (1999). "Mutator phenotypes conferred by MLH1 overexpression and by heterozygosity for mlh1 mutations." Mol Cell Biol **19**(4): 3177-3183.
- Sherman, J. M., E. M. Stone, L. L. Freeman-Cook, C. B. Brachmann, J. D. Boeke and L. Pillus (1999). "The conserved core of a human SIR2 homologue functions in yeast silencing." Mol Biol Cell **10**(9): 3045-3059.
- Shimodaira, H., N. Filosi, H. Shibata, T. Suzuki, P. Radice, R. Kanamaru, S. H. Friend, R. D. Kolodner and C. Ishioka (1998). "Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*." Nat Genet **19**(4): 384-389.
- Sinclair, D. A. and L. Guarente (1997). "Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast." Cell **91**(7): 1033-1042.
- Smith, R. W. and H. P. Nasheuer (2002). "Control of complex formation of DNA polymerase alpha-primase and cell-free DNA replication by the C-terminal amino acids of the largest subunit p180." FEBS Lett **527**(1-3): 143-146.

- 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.
- Streisinger, G., Y. Okada, J. Emrich, J. Newton, A. Tsugita, E. Terzaghi and M. Inouye (1966). "Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **31**: 77-84.
- Studamire, B., G. Price, N. Sugawara, J. E. Haber and E. Alani (1999). "Separation-of-function mutations in *Saccharomyces cerevisiae* MSH2 that confer mismatch repair defects but do not affect nonhomologous-tail removal during recombination." Mol Cell Biol **19**(11): 7558-7567.
- Su, S. S. and P. Modrich (1986). "Escherichia coli mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(14): 5057-5061.
- Takahashi, M., H. Shimodaira, C. Andreutti-Zaugg, R. Iggo, R. D. Kolodner and C. Ishioka (2007). "Functional analysis of human MLH1 variants using yeast and in vitro mismatch repair assays." Cancer Res **67**(10): 4595-4604.
- Tennen, R. I., J. E. Haye, H. D. Wijayatilake, T. Arlow, D. Ponzio and A. E. Gammie (2012). "Cell-cycle and DNA damage regulation of the DNA mismatch repair protein Msh2 occurs at the transcriptional and post-transcriptional level." DNA Repair (Amst).
- Tishkoff, D. X., A. L. Boerger, P. Bertrand, N. Filosi, G. M. Gaida, M. F. Kane and R. D. Kolodner (1997). "Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7487-7492.
- Tran, H. T., J. D. Keen, M. Krickler, M. A. Resnick and D. A. Gordenin (1997). "Hypermutability of homonucleotide runs in mismatch repair and DNA polymerase proofreading yeast mutants." Mol Cell Biol **17**(5): 2859-2865.
- Tran, P. T., J. A. Simon and R. M. Liskay (2001). "Interactions of Exo1p with components of MutLalpha in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9760-9765.
- Vasen, H. F., E. A. Sanders, B. G. Taal, F. M. Nagengast, G. Griffioen, F. H. Menko, J. H. Kleibeuker, J. J. Houwing-Duistermaat and P. Meera Khan (1996). "The risk of brain tumours in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)." Int J Cancer **65**(4): 422-425.
- Viguera, E., D. Canceill and S. D. Ehrlich (2001). "Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation." EMBO J **20**(10): 2587-2595.
- Vogelsang, M., A. Comino, N. Zupanec, P. Hudler and R. Komel (2009). "Assessing pathogenicity of MLH1 variants by co-expression of human MLH1 and PMS2 genes in yeast." BMC Cancer **9**: 382.
- Vogelsang, M. and R. Komel (2011). "Non-truncating hMLH1 variants identified in Slovenian gastric cancer patients are not associated with Lynch Syndrome: a functional analysis report." Fam Cancer **10**(2): 255-263.
- Wagner, R., Jr. and M. Meselson (1976). "Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(11): 4135-4139.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick and N. J. Gay (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." EMBO J **1**(8): 945-951.

- Wanat, J. J., N. Singh and E. Alani (2007). "The effect of genetic background on the function of *Saccharomyces cerevisiae* mlh1 alleles that correspond to HNPCC missense mutations." Hum Mol Genet **16**(4): 445-452.
- Wang, H. and J. B. Hays (2004). "Signaling from DNA mispairs to mismatch-repair excision sites despite intervening blockades." EMBO J **23**(10): 2126-2133.
- Wang, Y., W. Friedl, C. Lamberti, M. Jungck, M. Mathiak, C. Pagenstecher, P. Propping and E. Mangold (2003). "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes." Int J Cancer **103**(5): 636-641.
- Warren, J. J., T. J. Pohlhaus, A. Changela, R. R. Iyer, P. L. Modrich and L. S. Beese (2007). "Structure of the human MutS α DNA lesion recognition complex." Mol Cell **26**(4): 579-592.
- Warthin, A. S. (1913). "Hereditary with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913." Arch Intern Med **117**: 6.
- Watkins, J. L., R. Murphy, J. L. Emtage and S. R. Wentz (1998). "The human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Gle1p is required for poly(A)⁺ RNA export." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6779-6784.
- Wei, K., A. B. Clark, E. Wong, M. F. Kane, D. J. Mazur, T. Parris, N. K. Kolas, R. Russell, H. Hou, Jr., B. Kneitz, G. Yang, T. A. Kunkel, R. D. Kolodner, P. E. Cohen and W. Edelmann (2003). "Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility." Genes Dev **17**(5): 603-614.
- Wei, M., F. Madia and V. D. Longo (2011). "Studying age-dependent genomic instability using the *S. cerevisiae* chronological lifespan model." J Vis Exp(55).
- Wildenberg, J. and M. Meselson (1975). "Mismatch repair in heteroduplex DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(6): 2202-2206.
- Woodside, A. M. and F. P. Guengerich (2002). "Effect of the O6 substituent on misincorporation kinetics catalyzed by DNA polymerases at O(6)-methylguanine and O(6)-benzylguanine." Biochemistry **41**(3): 1027-1038.
- Yamamoto, A., M. J. Schofield, I. Biswas and P. Hsieh (2000). "Requirement for Phe36 for DNA binding and mismatch repair by *Escherichia coli* MutS protein." Nucleic Acids Res **28**(18): 3564-3569.
- Yamane, S., M. Yamaoka, M. Yamamoto, T. Maruki, H. Matsuzaki, T. Hatano and S. Fukui (1998). "Region specificity of chromosome III on gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Gen Appl Microbiol **44**(4): 275-281.
- Yue, P., E. Melamud and J. Moulton (2006). "SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies." BMC Bioinformatics **7**: 166.
- Zaanan, A., K. Meunier, F. Sangar, J. F. Flejou and F. Praz (2011). "Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications." Cell Oncol (Dordr) **34**(3): 155-176.
- Zhang, H., B. Richards, T. Wilson, M. Lloyd, A. Cranston, A. Thorburn, R. Fishel and M. Meuth (1999). "Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1." Cancer Res **59**(13): 3021-3027.

Zhang, Y., F. Yuan, S. R. Presnell, K. Tian, Y. Gao, A. E. Tomkinson, L. Gu and G. M. Li (2005). "Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system." Cell **122**(5): 693-705.

Zhou, C., B. D. Slaughter, J. R. Unruh, A. Eldakak, B. Rubinstein and R. Li (2011). "Motility and segregation of Hsp104-associated protein aggregates in budding yeast." Cell **147**(5): 1186-1196.

Zong, C., S. Lu, A. R. Chapman and X. S. Xie (2012). "Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell." Science **338**(6114): 1622-1626.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Laufe der Jahre während meiner Promotion unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Johannes Hegemann für das Überlassen eines schönen Hefethemas in einem *C.p.*-dominierten Labor bedanken. Die vielen Anregungen und die hohe Diskussionsbereitschaft haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und haben es ebenso ermöglicht, noch vieles aus diesem kleinen Einzeller herauszuholen. Ebenfalls danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit im letzten „freien“ Jahr meiner Promotion.

Prof. Dr. Rolf Wagner danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Der Deutschen Krebshilfe danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ein großes Danke geht natürlich auch an meine ehemaligen Kollegen, von denen mich viele über die Jahre begleitet haben. Da ich bestimmt irgendwen vergessen werde, fühlt euch alle angesprochen! Ja, auch du! Vielen Dank für die schöne, wenn auch anstrengende Zeit, die Einarbeitung, die Unterstützung bei Fachfragen, Kaffeepausen, dem Internet, Floskeln, Singstar, Witze, Grillen, Filme, Basteln, Flasche im Auge, Bier, Würfelspiele, fürs Mitnehmen, fürs Vorbeibringen, fürs Nachgucken, für die Mondverschwörung & Co (NBB), fürs Eis essen, Rad fahren, Cocktails, Kopieren und vieles mehr.

Vielen Dank an meine Familie, meine Schwiegereltern und besonders meine Frau. Alle haben ebenso viel dazu beigetragen, dass ich die Promotion wahrnehmen konnte und in entsprechenden Momenten auch Zeit hatte, diese zu Papier zu bringen. Vielen Dank.

10 Erklärung

Düsseldorf, Januar 2014

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.

Sven Boris Heick