



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 25 152 T2** 2005.08.11

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 970 247 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 25 152.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB98/00786**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 913 889.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/044149**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **08.10.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **21.07.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.08.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/68**

C12N 15/81, C07K 14/435, C07K 14/395,

C12N 5/12

(30) Unionspriorität:

9706414

27.03.1997

GB

(73) Patentinhaber:

Gentronix Ltd., Manchester, GB

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**WALMSLEY, Maurice, Richard, Manchester M21
9AZ, GB; HEYER, Dietrich, Wolf, Davis, US**

(54) Bezeichnung: **DETEKTION VON DNS-SCHÄDIGENDEN SUBSTANZEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zum Nachweis von Mitteln, die DNA-Schädigung verursachen oder potenzieren und Moleküle und transformierte Zellen, die nutzbringend in solchen Verfahren eingesetzt werden können.

[0002] DNA-Schädigung wird durch eine Reihe verschiedener Mittel, wie zum Beispiel Ultraviolettlicht, Röntgenstrahlen, freie Radikale, Methylierungsmittel und andere mutagene Verbindungen induziert. Diese Mittel können eine Schädigung der DNA, die den genetischen Code eines Organismus umfasst, verursachen und Mutationen in Genen hervorrufen. In Mikroorganismen können diese Mutationen zur Evolution neuer unerwünschter Stämme des Mikroorganismus führen. Es können zum Beispiel Antibiotika- und Herbizidresistente Bakterien entstehen. In Tieren können diese Mutationen zu Carcinogenese führen, oder sie können die Gameten schädigen, um Anlass zu kongenitalen Defekten bei der Nachkommenschaft zu geben.

[0003] Diese DNA-schädigenden Mittel können Nukleotide, die DNA umfassen, chemisch modifizieren und können auch die Phosphodiesterbindungen sprengen, welche die Nukleotide verknüpfen oder die Assoziation zwischen Basen (T-A oder C-G) unterbrechen. Um der Wirkung dieser DNA-schädigenden Mittel entgegenzuwirken, haben Zellen eine Anzahl von Mechanismen entwickelt. So ist zum Beispiel die SOS-Antwort in *E. coli* eine gut charakterisierte zelluläre Antwort, die durch DNA-Schädigung induziert wird, bei der eine Reihe von Proteinen exprimiert werden, einschließlich der DNA-Reparaturenzyme, welche die geschädigte DNA reparieren.

[0004] Es gibt zahlreiche Umstände, wenn die Identifikation wichtig ist, welche Mittel die DNA-Schädigung verursachen oder potenzieren können. Es ist insbesondere wichtig, Mittel nachzuweisen, die DNA-Schädigung verursachen, bei der Beurteilung, ob es sicher ist, eine Person diesen Stoffen auszusetzen. So kann zum Beispiel ein Verfahren zum Nachweis dieser Stoffe als ein Mutagenese-Assay zum Screening von Verbindungen verwendet werden, bei denen es sich um Kandidatennahrungsmittelzusatzstoffe, -medikamente oder -kosmetika handelt, um zu beurteilen, ob die Verbindung von Interesse gegebenenfalls DNA-Schädigung induziert. Alternative Verfahren zum Nachweis DNA-schädigender Mittel können zur Überwachung der Wasserversorgungen auf Kontamination mit Schadstoffen, die mutagene Verbindungen enthalten, verwendet werden.

[0005] Es sind verschiedene Verfahren, wie zum Beispiel der Ames-Test, zur Bestimmung der Toxizität eines Mittels bekannt. Entwicklungen neueren Datums werden in WO 95/00834 offenbart, die sich auf die Verwendung eines Licht emittierenden Organismus (insbesondere des Bakteriums *Photobacterium phosphoreum*) zum Messen der Toxizität von industriellen Abwässern beziehen. WO 95/07463 offenbart ein Genkonstrukt, gebildet aus DNA, die für grün fluoreszierendes Protein kodiert und DNA, die für ein regulatorisches Element (wie zum Beispiel einen durch Schwermetalle induzierten Promotor) kodiert, das zum Nachweis von Schadstoffen verwendet werden kann. WO 94/17208 offenbart die Verwendung von Stresspromotoren, einschließlich für DNA-Stress oder -schädigung, mit einem Reportergen zur Bestimmung der Toxizität einer Verbindung auf eine eukaryotische Zelle.

[0006] Gemäß einem ersten erfindungsgemäßen Aspekt ist ein rekombinantes DNA-Molekül bereitgestellt, umfassend ein regulatorisches Element, das den Promotor und 5'-regulatorische Sequenzen des RAD54-Reparaturgens, das operativ an eine DNA-Sequenz, die ein grün fluoreszierende Protein und Licht emittierende Derivate davon kodiert, gekoppelt ist.

[0007] Gemäß einem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt ist ein rekombinanter Vektor bereitgestellt, der ein DNA-Molekül gemäß dem ersten erfindungsgemäßen Aspekt und einen DNA-Vektor umfasst.

[0008] Gemäß einem dritten erfindungsgemäßen Aspekt ist eine Zelle bereitgestellt die ein DNA-Molekül gemäß dem ersten erfindungsgemäßen Aspekt oder einen rekombinanten Vektor gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt umfasst.

[0009] Gemäß einem vierten erfindungsgemäßen Aspekt ist ein Verfahren zum Nachweis eines Mittels bereitgestellt, das DNA-Schädigung verursacht oder sie potenziert, umfassend:

- (a) Aussetzen einer Hefe, die mit einem rekombinanten DNA-Molekül transformiert ist, nach einem ersten erfindungsgemäßen Aspekt an ein Mittel; und
- (b) Überwachen der Expression des Licht emittierenden Reporterproteins aus der Zelle.

[0010] Unter „regulatorischem Element“ versteht man eine DNA-Sequenz, welche die Transkription eines

Gens reguliert, mit dem sie assoziiert ist.

[0011] Unter „operativ gekoppelt“ versteht man, dass das regulatorische Element fähig ist, die Expression des Reporterproteins zu induzieren.

[0012] Unter „Reporterprotein“ versteht man ein Protein, das – wenn es als Antwort auf das regulatorische Element des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls exprimiert wird – mittels eines geeigneten Assay-Verfahrens nachweisbar ist.

[0013] Das Verfahren des vierten erfindungsgemäßen Aspekts ist zur Beurteilung geeignet, ob ein Mittel gegebenenfalls DNA-Schädigung verursachen kann. Es ist insbesondere nützlich zum Nachweis von Mitteln, die DNA-Schädigung verursachen, bei der Beurteilung, ob es sicher ist, eine Person DNA-schädigenden Mitteln auszusetzen. Das Verfahren kann zum Beispiel als ein Mutagenese-Assay zum Screening verwendet werden, ob bekannte oder nicht bekannte Mittel, wie zum Beispiel Kandidatennahrungsmittel, -medikamente oder -kosmetika, DNA-Schädigung induzieren. Als Alternative kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Überwachung von Wasserversorgungen auf Kontamination mit Schadstoffen, die DNA-schädigende Mittel enthalten, verwendet werden.

[0014] Das Verfahren des vierten erfindungsgemäßen Aspekts kann gleichermaßen zur Beurteilung verwendet werden, ob ein Mittel die DNA-Schädigung potenzieren kann. Bestimmte Mittel können zum Beispiel DNA-Schädigung durch Inhibition der DNA-Reparatur (zum Beispiel durch Verhinderung der Expression eines Reparaturproteins) verursachen, ohne eine DNA-Schädigung direkt zuzufügen. Diese Mittel sind häufig als Comutogene bekannt und schließen Mittel, wie zum Beispiel Blei ein.

[0015] Das regulatorische Element des DNA-Moleküls des ersten erfindungsgemäßen Aspekts aktiviert die Expression des Reporterproteins, wenn DNA-Schädigung auftritt. Diese regulatorischen Elemente umfassen Idealerweise eine Promotorensequenz, welche die RNA-Polymerase induziert, an das DNA-Molekül zu binden und die Transkription der DNA, die für das Reporterprotein kodiert, zu beginnen. Das regulatorische Element kann auch andere funktionelle DNA-Sequenzen, wie zum Beispiel die Translationsinitiierungssequenzen für die Ribosomenbindung oder DNA-Sequenzen, die Transkriptionsfaktoren binden, welche die Genexpression nach der DNA-Schädigung fördern, umfassen. Regulatorische Elemente können sogar für Proteine kodieren, welche zur Entfernung von Transkriptionsinhibitoren aus dem regulierten Gen wirken und dadurch die Transkription dieses Gens verstärken.

[0016] Der Promotor und 5'-regulatorische Sequenzen des RAD54-Reparaturgens können sich von Hefe und insbesondere von *Saccharomyces cerevisiae* herleiten. Es ist am bevorzugtesten, dass das regulatorische Element den Promotor und 5'-regulatorische Sequenzen des RAD54-Reparaturgens umfasst, die der als SEQ ID NO 1 identifizierten DNA-Sequenz oder einem funktionellen Analogon oder Fragment davon entsprechen.

[0017] Grün fluoreszierendes Protein (GFP) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und ist fähig, blaues Licht zu absorbieren und ein leicht nachweisbares grünes Licht zu reemittieren und ist folglich als ein Reporterprotein geeignet. GFP kann vorteilhaft als ein Reporterprotein verwendet werden, weil seine Messung einfach und reagenzlos durchgeführt wird und das Protein nicht toxisch ist.

[0018] Derivate von GFP schließen DNA-Sequenzen ein, die für Polypeptid-Analoga oder Polypeptid-Fragmente von GFP, die zum Emittieren von Licht fähig sind, kodieren. Viele dieser Derivate absorbieren und reemittieren Licht bei Wellenlängen, die anders als die von GFP sind, das endogen in *Aequorea victoria* gefunden wird. Die bevorzugten DNA-Moleküle gemäß dem ersten erfindungsgemäßen Aspekt weisen zum Beispiel eine DNA-Sequenz auf, die das S65T-Derivat von GFP kodiert (worin Serin 65 von GFP durch ein Threonin ersetzt wird). S65T-GFP besitzt den Vorteil, dass es leuchtender als GFP des Wildtyps ist (wenn es bei dem Peak seiner längsten Wellenlänge angeregt wird) und nur langsames Photobleichen aufweist. S65T-GFP produziert weiter eine Fluoreszenz einer guten Quantenausbeute und stimmt den Ausgang von Argon-Ionen-Lasern ab, die in Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierern verwendet werden. Zellen gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt, die S65T-GFP kodierende DNA-Moleküle enthalten, können gemäß dem Verfahren des vierten erfindungsgemäßen Aspekts verwendet werden und sind besonders nützlich, wenn die Lichtemission aus den Zellextrakten gemessen wird (siehe nachstehend).

[0019] Eine andere bevorzugte DNA-Sequenz kodiert für ein durch Hefe verstärktes GFP (YEGFP; „yeast enhanced GFP“), wie zum Beispiel das von Cormack et al. (1997) (in *Microbiology* 143, S. 303-311) beschriebene GFP-Derivat. Ein derartiges YEGFP weist eine Aminosäuresequenz auf, die zur Verwendung in Hefe bevorzugt

ist. Folglich ist YEGFP insbesondere zur Transformation von Zellen gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt geeignet, bei dem es sich um Hefe handelt. Wir haben weiter festgestellt, dass aus YEGFP emittiertes Licht in dieser Hefe sogar umfangreicher als das ist, das von S65T-Derivaten emittiert wird. So war zum Beispiel die Lichtausstrahlung aus dem Hefestamm FF18984 (auch bekannt als Y486), der mit einem YEGFP kodierenden DNA-Molekül transformiert war, doppelt so hoch wie die Ausstrahlung aus FF18984, der mit einem S65T-GFP kodierenden DNA-Molekül transformiert war. Wir haben festgestellt, dass YEGFP insbesondere für die Verwendung in Verfahren gemäß dem vierten erfindungsgemäßen Aspekt geeignet ist, die die Überwachung der Lichtemission aus intakten Zellen gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt (siehe ausführlichere Besprechung nachstehend) beinhalten.

[0020] DNA-Moleküle, die YEGFP kodieren, sind auch nützlich, weil YEGFP weniger wärmeempfindlich als naszierendes GFP ist.

[0021] DNA-Moleküle gemäß dem ersten erfindungsgemäßen Aspekt umfassen ein RAD54-regulatorisches Element, das operativ mit einer DNA-Sequenz gekoppelt ist, die ein GFP oder ein Licht emittierendes Derivat davon kodiert.

[0022] Das DNA-Molekül kann in einem geeigneten DNA-Vektor zur Bildung eines rekombinanten Vektors gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt enthalten sein. Der Vektor kann beispielsweise ein Plasmid, Cosmid oder ein Phage darstellen. Derartige rekombinante Vektoren sind von großem Nutzen bei der Replikation des DNA-Moleküls des ersten erfindungsgemäßen Aspekts. Rekombinante Vektoren sind weiter äußerst nützlich zum Transformieren von Zellen mit dem DNA-Molekül und können auch die Expression des Reporterproteins fördern.

[0023] Die rekombinanten Vektoren schließen häufig einen oder mehr auswählbare Marker ein, um die Auswahl von mit dem DNA-Vektor transfizierten Zellen zu ermöglichen und bevorzugt, um die Auswahl von Zellen zu ermöglichen, welche die rekombinanten Vektoren, die das DNA-Molekül des ersten erfindungsgemäßen Aspekts inkorporieren, beherbergen. Beispiele dieser auswählbaren Marker schließen Gene ein, die Resistenz gegen Kanamycin (oder G 148) und Ampicillin verleihen. Auswählbare Marker können die einschließen, welche die Prototrophie wiederherstellen, wie zum Beispiel das URA3-Gen von Hefe.

[0024] Rekombinante Vektoren können dergestalt konzipiert sein, dass sich der Vektor autonom im Cytosol der Zelle repliziert. In diesem Fall können im rekombinanten Vektor Elemente erforderlich sein, welche die DNA-Replikation induzieren. Ein geeignetes Element leitet sich vom 2 μ -Plasmid her. Solche Replikationsvektoren können Anlass zu multiplen Kopien des DNA-Moleküls in einem Transformanten geben und sind deshalb nützlich, wenn eine Überexpression (und dadurch erhöhte Lichtemission) des Reporterproteins erforderlich ist.

[0025] Als Alternative kann der rekombinante Vektor dergestalt konzipiert werden, dass der Vektor und das DNA-Molekül des ersten erfindungsgemäßen Aspekts in das Genom einer Zelle integriert werden. Eine derartige Integration weist im Vergleich zu replikativen Plasmiden den Vorteil einer verbesserten Stabilität auf. In diesem Fall sind DNA-Sequenzen erwünscht, welche die targetierte Integration (z. B. durch homologe Rekombination) begünstigen. So bevorzugt zum Beispiel die Inkorporation in den rekombinanten Vektor von Fragmenten des HO-Gens aus Chromosom IV von *Saccharomyces cerevisiae* die targetierte Integration in *Saccharomyces cerevisiae* oder davon hergeleitete Zelllinien. Es ist bevorzugt, dass das Fragment des HO-Gens die Sequenz aufweist, die als SEQ ID NO 5 identifiziert ist oder ein Derivat davon darstellt. Es ist auch möglich, multiple Kopien von integrierenden rekombinanten Vektoren in das Genom zu insertieren. Dies ermöglicht eine größere Expression und erhöht den Signalausgang weiter. Die Vektoren können zum Beispiel unter Verwendung von Sequenzen aus dem ribosomalen DNA-Array auf Chromosom XII targetiert werden.

[0026] Bevorzugte rekombinante Vektoren können aus PFA-Vektoren oder Derivaten davon gebildet werden, die im Stand der Technik bekannt sind (siehe Wach et al. (1994) *Yeast* 10, S. 1793-1808).

[0027] Bevorzugte DNA-Moleküle gemäß dem ersten erfindungsgemäßen Aspekt weisen eine DNA-Sequenz auf, die für ein GFP oder Licht emittierendes Derivat davon kodiert, das von diesen PFA-Vektoren hergeleitet ist.

[0028] Bevorzugte rekombinante Vektoren sind PFA KANMX3GFP-RAD54, pWDH443 und pWDH444, die ausführlich im Beispiel beschrieben sind. Die bevorzugten DNA-Moleküle des ersten erfindungsgemäßen Aspekts, die ein RAD54-regulatorisches Element operativ an eine DNA-Sequenz gekoppelt umfassen, die für ein GFP oder Licht emittierendes Derivat davon kodiert, kann aus diesen bevorzugtesten rekombinanten Vektoren

PFA KANMX3GFP-RAD54, pWDH443 oder pWDH444 hergeleitet werden.

[0029] Der rekombinante Vektor PFA KANMX3GFP-RAD54 umfasst den Vektor des Sequenzprotokolls SEQ ID NO 4 mit dem regulatorischen Element des Sequenzprotokolls SEQ ID NO 1 oder ein funktionelles Analogon oder Fragment davon, das zwischen die Restriktionsenzymorte Pac1 und BamH1 des Vektors von Sequenzprotokoll SEQ ID NO 4 inseriert ist.

[0030] Der bevorzugte rekombinante Vektor pWDH443 umfasst PFA KANMX3GFP-RAD54 mit einem Fragment des HO-Gens, das dem SEQ ID NO 5 entspricht, das am einmaligen BamH1-Ort des KANMX3GFP-RAD54 inseriert ist. pWDH443 umfasst die DNA, die für S65T-GFP kodiert und zur Integration in das Hefe-Genom fähig ist.

[0031] Der bevorzugte rekombinante Vektor pWDH444 umfasst ein Fragment des 2 µ-Plasmids, das mit dem großen Fragment ligiert ist, das aus dem BamH1- und Pme1-Aufschluss von pWDH443 generiert wird. Das Fragment des 2 µ-Plasmids kann genau dem großen HindIII/BamH1-Fragment entsprechen, das aus dem Plasmid pRDK249 freigesetzt wird, das im Journal Biological Chemistry, Volumen 266, S. 14049, [Fig. 1](#) (1991) im Artikel von Johnson, A.W. und Kolodner, R.D., beschrieben ist. Die DNA aus dem 2 µ-Plasmid in pWDH444 ermöglicht diesem rekombinanten Vektor, im Cytosol einer Wirtszelle autonom zu replizieren und dem rekombinanten Vektor dadurch zu ermöglichen, in hohen Kopiezahlen anwesend zu sein (was vorteilhaft sein kann, wenn eine Überexpression von GFP und eine erhöhte Licht emittierende Fähigkeit erwünscht ist).

[0032] Andere bevorzugte rekombinante Vektoren stellen yEGFP-443 und yEGFP-444 dar (siehe [Fig. 11](#) und [Fig. 12](#)).

[0033] yEGFP-443 leitet sich von pWDH443 her und umfasst das große Fragment von pWDH443, das durch den Pac1- und Asc1-Aufschluss mit dem Pac1- und Asc1-Aufschlussprodukt von SEQ ID NO 6 (das ein YEGFP kodiert) generiert wird, das in das große Fragment ligiert wird. yEGFP-443 umfasst DNA, die für YEGFP kodiert und in das Hefe-Genom integriert werden kann.

[0034] yEGFP-444 leitet sich von pWDH444 her und umfasst das große Fragment von pWDH444, das durch Pac1- und Asc1-Aufschluss generiert wird, wobei das Pac1- und Asc1-Aufschlussprodukt von SEQ ID NO 6 (das ein YEGFP kodiert) in dieses große Fragment ligiert ist. Die DNA aus dem 2 µ-Plasmid in yEGFP-444 ermöglicht, dass dieser rekombinante Vektor autonom im Cytosol einer Wirtszelle replizieren kann und dadurch dem rekombinanten Vektor ermöglicht, in hohen Kopiezahlen anwesend zu sein (was vorteilhaft sein kann, wenn eine Überexpression von GFP und erhöhte Lichtemissionsfähigkeit erwünscht sind).

[0035] Gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt wird das DNA-Molekül in eine Zelle inkorporiert. Derartige Wirtszellen können prokaryotisch oder eukaryotisch sein. Geeignete Wirtszellen schließen Bakterien-, Pflanzen-, Hefe-, Insekten- und Säugerzellen ein. Bevorzugte Wirtszellen sind Hefezellen, wie zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae*. Hefezellen sind bevorzugt, weil sie wie Bakterien leicht manipuliert werden können, sind aber eukaryotisch und weisen deshalb DNA-Reparatursysteme auf, die enger mit Menschen als denen von Bakterien verwandt sind. Folglich stellt die Verwendung solcher Hefe im erfindungsgemäßen Verfahren ein verbessertes Verfahren zum Nachweis von DNA-Schädigung im Vergleich zum Ames-Test dar. Der Ames-Test verwendet Bakterien (Stämme von *Salmonella typhimurium*), die – wenn sie einem vermutlichen DNA-schädigenden Mittel ausgesetzt werden – zu einem Genotoxizitätsergebnis (positiv oder negativ) führen können, das aufgrund der Unterschiede zwischen Prokaryoten und Eukaryoten nicht unbedingt repräsentativ für die Wirkungen solcher Mittel in Eukaryoten, wie zum Beispiel Menschen, sein würde.

[0036] Ein anderer sich aus der Verwendung von Hefezellen als ein Wirt ergebender Vorteil besteht darin, dass DNA-Reparatursysteme im Gegensatz zu Menschen in Hefe induzierbar sind, bei denen die Reparatursysteme größtenteils konstitutiv sind.

[0037] Zu bevorzugten Hefezellen zählen folgende:

- (i) Y485 in haploider Form;
- (ii) Y486 (auch bekannt als FF18984) in haploider Form
- (iii) Y485/486 in diploider Form;
- (iv) FY73
- (v) YLR030wα; und
- (vi) Y300.

[0038] Diese Stämme sind alle in den nationalen Hefestamm-Sammlungen zu finden.

[0039] Der Typ des verwendeten Hefestammes kann die Antwort auf DNA-Schädigung beeinflussen, und wir haben gefunden, dass die Lichtemission in Abhängigkeit des verwendeten Hefestamms, sehr weitgehend variieren kann. In dieser Hinsicht haben wir gefunden, dass (i), (ii) und (iii) vorstehend besonders nützliche Stämme zur Verwendung gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren sind.

[0040] Zur Expression des durch das erfindungsgemäße DNA-Molekül kodierten Proteins verwendete Wirtszellen werden idealerweise stabil transformiert, obwohl die Verwendung instabil transformierter (transienter) Zellen nicht ausgeschlossen ist.

[0041] Transformierte Zellen gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt können gemäß den folgenden Verfahren gebildet werden. PFA-Vektoren können als geeignetes Ausgangsmaterial verwendet werden, aus dem DNA-Moleküle des ersten erfindungsgemäßen Aspekts und rekombinante Vektoren des zweiten erfindungsgemäßen Aspekts gebildet werden können. Die bekannten PFA-Vektoren enthalten oder können manipuliert werden, damit sie DNA enthalten, die für GFP und Derivate davon kodiert. Solche Vektoren können anhand bekannter molekularbiologischer Verfahren manipuliert werden, um ein geeignetes regulatorisches Element nachbarständig zur GFP-Kodierungssequenz zu inserieren, wobei folglich ein DNA-Molekül des ersten erfindungsgemäßen Aspekts gebildet wird, das in einem rekombinanten Vektor gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt enthalten ist. So können sich zum Beispiel pWDH443, pWDH444, yEGFP-443 und yEGFP-444 von solchen PFA-Vektoren herleiten. Das DNA-Molekül kann aus dem rekombinanten Vektor exzidiert werden oder das im rekombinanten Vektor enthaltene DNA-Molekül kann zur Transformation einer Zelle verwendet werden und dadurch eine Zelle gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt bilden. Die Zelle ist idealerweise eine Hefezelle (zum Beispiel eine von den vorstehend beschriebenen Stämmen). Solche transformierten Zellen können gemäß dem Verfahren des vierten erfindungsgemäßen Aspekts verwendet werden, ungeachtet, ob Mittel die DNA-Schädigung induzieren oder potenzieren oder nicht. Die GFP-Expression wird als Antwort auf die DNA-Schädigung induziert und das vom GFP emittierte Licht kann leicht unter Verwendung eines Fluorimeters als ein Index der verursachten DNA-Schädigung gemessen werden. So kann zum Beispiel das vom GFP bei 511 nm (nach Anregung zwischen 475 und 495 nm – z. B. 488 nm) emittierte Licht als Antwort auf DNA-Schädigung, entweder in einer Suspension aus einer definierten Anzahl ganzer Zellen oder aus einer aus Zellen freigesetzten definierten Materialmenge nach dem Aufspalten bewertet werden.

[0042] Viele bekannte Verfahren zum Nachweis von DNA-Schädigung (einschließlich des Ames-Tests und verwandter Verfahren), bestimmen eine anhaltende DNA-Schädigung, als einen Endpunkt, entweder in der Form einer falsch reparierten DNA (Mutationen und Rekombinationen) oder einer nicht reparierten Schädigung in der Form von fragmentierter DNA. Der größte Teil der DNA-Schädigung wird jedoch repariert, bevor ein derartiger Endpunkt gemessen werden kann, und eine anhaltende DNA-Schädigung tritt nur auf, wenn die Verhältnisse so ernsthaft sind, dass der Reparaturmechanismus gesättigt wurde. Bevorzugte Verfahren des vierten erfindungsgemäßen Aspekts sind viel empfindlicher als diese bekannten Verfahren, weil sie die Reparaturaktivität nachweisen (von der wir gefunden haben, dass sie nachweisbar ist, wenn die eigentliche DNA-Schädigung nicht nachweisbar ist), die verhindert, dass der vorstehend erwähnte Endpunkt erreicht wird. Deshalb kann das Verfahren des vierten erfindungsgemäßen Aspekts zum Nachweis auf das Vorliegen von DNA-schädigenden Mitteln oder die DNA-Schädigung potenzierenden Mitteln bei Konzentrationen unter der Schwelle, bei der die eigentliche DNA-Schädigung nachgewiesen werden kann, verwendet werden.

[0043] Das Verfahren des vierten erfindungsgemäßen Aspekts ist besonders nützlich für Nachweismittel, die DNA-Schädigung bei niedrigen Konzentrationen induzieren. Die Verfahren können zum Screening von Verbindungen, wie zum Beispiel Kandidatenmedikamenten, -nahrungsmittelzusatzstoffen oder -kosmetika, verwendet werden, zur Beurteilung, ob es sicher ist, einen lebenden Organismus, insbesondere Menschen, solchen Verbindungen auszusetzen.

[0044] Als Alternative können die Verfahren des vierten erfindungsgemäßen Aspekts zum Nachweis eingesetzt werden, ob die Wasserversorgungen durch DNA-schädigende Mittel oder Mittel, die die DNA-Schädigung potenzieren, kontaminiert oder nicht kontaminiert sind. Die Verfahren können zum Beispiel zur Überwachung industrieller Abwässer auf das Vorliegen von Schadstoffen, die zu einer erhöhten DNA-Schädigung in Menschen oder anderen den Schadstoffen ausgesetzten Organismen führen kann, verwendet werden.

[0045] Wenn die Verfahren zum Nachweis verwendet werden, ob Wasserversorgungen kontaminiert oder nicht kontaminiert sind, stellen die Zellen gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt idealerweise einzelne Organismen, wie zum Beispiel Bakterien, Protozoen und insbesondere Hefe dar.

[0046] Die Expression von Licht emittierendem Reporterprotein kann gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren aus Zellextrakten (in welchem Fall Zellen mit jedweden der vorstehend beschriebenen rekombinanten DNA-Moleküle und/oder rekombinanten Vektoren verwendet werden können) oder aus Proben, die intakte ganze Zellen enthalten (in welchem Fall yEGFP-443 und yEGFP-444 transformierte Hefezellen bevorzugt verwendet werden) überwacht werden.

[0047] Es gibt mehrere Vorteile, die mit der Verwendung ganzer Zellen einhergehen. Da das Aufbrechen der Zellen keine Anforderung ist, wird die Anzahl der Behandlungsschritte reduziert. Die Herstellung von Extrakten macht das Ernten von Zellen, Waschen, Zertrümmern mit Glasperlen und Zentrifugation zum Klären des Extrakts erforderlich. Die Verringerung der Behandlungsschritte reduziert auch das Risiko für Fehler, die bei der Handhabung entstehen und trägt zu einem viel schnelleren Verfahren bei. Die Zelldichte und Lichtemission können überdies simultan gemessen werden, wobei sich eine größere Sensitivität ergibt. Deshalb wird das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt durch Züchten von mit einem rekombinanten Vektor gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt transformierten Zellen (wie zum Beispiel yEGFP-443 oder yEGFP-444), Inkubation der Zellen mit dem Mittel, das vermutlich die DNA-Schädigung verursacht, für eine prädeternierte Zeit und Überwachung der Expression des Licht emittierenden Reporterproteins direkt aus der Probe der Zellen, durchgeführt.

[0048] Wenn ganze Zellen verwendet werden, sind sie bevorzugt in einem Wachstumsmedium von geringer Fluoreszenz enthalten. Dies kann die Notwendigkeit umgehen, dass die Zellen vor der Durchführung von Messungen gewaschen werden müssen und können folglich die Anzahl von Schritten im Verfahren weiter reduzieren. Die bevorzugte Hefe kann zum Beispiel gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt in F1-Medium gezüchtet werden (beschrieben in Walmsley et al. (1983) Mol. Gen. Genet. 192, S. 361-365).

[0049] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens können FF18984-Zellen mit yEGFP-444 transformiert und in F1-Medium gezüchtet werden. Ein vermutliches DNA-schädigendes Mittel (z. B. ein Nahrungsmittelzusatzstoff oder potenzielles Medikament oder ein in einer Wasser- oder Abwasserprobe enthaltenes Mittel) kann dann dem die Zellen enthaltenden F1-Medium zugefügt werden. Die Zellen dürfen dann für eine definierte Zeitdauer wachsen, nach welcher Zeit eine Probe der Zellen entnommen und die Fluoreszenz davon gemessen wird. Diese Messung kann durch Bestimmung der Zellkonzentration und Fluoreszenz in der Probe unter Verwendung der Nephelometrie (Lichtstreuung) bewirkt werden. Die Zellen können zum Beispiel bei 600 nm illuminiert werden und das gestreute Licht (bei 600 nm) bei 90° bezogen auf den einfallenden Strahl bestimmt werden. Das vom GFP emittierte Licht kann durch Anregung bei 495 nm und das bei 518 nm emittierte Fluoreszenzlicht bei 90° bezogen auf den einfallenden Strahl gemessen werden. Beide Messungen können in einer einzigen Küvette vorgenommen werden. Eine normalisierte Lichtemission des GFP wird durch Dividieren des GFP-Fluoreszenzwertes durch den Lichtstreuungswert der ganzen Zelle (bei 600 nm) berechnet. Diese erfindungsgemäße Ausführungsform besitzt den Vorteil, dass sie mit einem Minimum an Schritten (d. h. einer Inkubationsperiode gefolgt von direkter Fluoreszenzmessung) leicht durchgeführt werden kann.

[0050] Das erfindungsgemäße Verfahren sollte idealerweise empfindliche Fluorimeter einsetzen und die Lichtstreuung reduzieren, damit diese Lichtemission vom Reporterprotein akkurat gemessen werden kann. Wir haben ermittelt, dass die Sensitivität unter Verwendung eines Filters von 495 nm, das zwischen die Probenkammer und den Emissionsdetektor des Fluorimeters eingeführt wird, verbessert werden kann. Ein derartiges Filter reduziert weiter den Impakt der Lichtstreuung und verbessert die Empfindlichkeit des Verfahrens, wenn ganze Zellen enthaltende Proben verwendet werden.

[0051] Die vorliegende Erfindung wird nun durch Beispiele unter Bezugnahme auf die begleitenden Zeichnungen beschrieben, worin:

[0052] [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung von DNA darstellt, die für den RAD54-Promotor kodiert, der zeigt, wo die in Beispiel 1 verwendeten PCR-Primer an die DNA binden;

[0053] [Fig. 2](#) eine schematische Darstellung von DNA darstellt, die für den RAD54-Promotor kodiert, der durch die PCR-Amplifikation, wie in 1.1 von Beispiel 1 beschrieben, hergestellt wird;

[0054] [Fig. 3](#) eine schematische Darstellung des in Beispiel 1 bei der Herstellung von erfindungsgemäßen DNA-Molekülen verwendeten PFA KANMX3GFP-Konstrukts darstellt;

[0055] [Fig. 4](#) eine schematische Darstellung des rekombinanten Vektors PFA KANMX3GFP-RAD54 von Bei-

spiel 1 darstellt, der ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül inkorporiert;

[0056] **Fig. 5** eine schematische Darstellung des rekombinanten Vektors pWDH443 von Beispiel 1 darstellt, der ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül inkorporiert;

[0057] **Fig. 6** eine schematische Darstellung des rekombinanten Vektors pWDH444 von Beispiel 1 darstellt, der ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül inkorporiert;

[0058] **Fig. 7** ein Diagramm darstellt, das eine Zunahme der Fluoreszenz erläutert, die in Zellen gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt auftritt, wenn die Zellen einem DNA-schädigenden Mittel ausgesetzt werden;

[0059] **Fig. 8** ein Diagramm darstellt, das den zeitlichen Verlauf der Induktion von Helligkeit durch ein DNA-schädigendes Mittel für eine mit pWDH444 transformierte Zelle erläutert;

[0060] **Fig. 9** ein Diagramm darstellt, das den zeitlichen Verlauf der Induktion von Helligkeit durch ein DNA-schädigendes Mittels für eine mit pWDH443 transformierte Zelle erläutert;

[0061] [Fig. 10](#) ein Diagramm darstellt, das die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen eines DNA-schädigenden Mittels auf die Helligkeit des Zellextrakts durch ein DNA-schädigendes Mittel für Extrakte aus einer mit pWDH444 transformierten Zelle erläutert;

[0062] [Fig. 11](#) eine schematische Darstellung des rekombinanten Vektors yEGFP-443 von Beispiel 3 darstellt, der ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül inkorporiert;

[0063] [Fig. 12](#) eine schematische Darstellung des rekombinanten Vektors yEGFP-444 von Beispiel 2 darstellt, der ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül inkorporiert; und

[0064] **Fig. 13** ein Diagramm darstellt, das Emissionsspektren von Hefezellen, nicht transformierten und transformierten Zellen mit yEGFP-444 +/- 0,01% MMS erläutert.

BEISPIEL 1

1.1 VERFAHREN

1.1.1 Herstellung von DNA, die für den RAD54-Promotor kodiert.

[0065] Es wurde ein DNA-Fragment hergestellt, welches die Promotor-Region des RAD54-Gens enthält und schematisch in [Fig. 2](#) dargestellt ist.

[00666] Das RAD54-Gen befindet sich auf Chromosom VII der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenz des gesamten Genoms für *Saccharomyces cerevisiae* ist in öffentlichen Datenbanken erhältlich. Auf die Genom-Datenbank für zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae* kann über die World Wide Web an vielen Orten, wie zum Beispiel <http://genome-www.stanford.edu/>, zugegriffen werden. Die relevante Region von Chromosom VII, die das RAD54-Gen und regulatorische Element von Interesse enthält, überspannt die Basen 193710-198141.

[0067] Das DNA-Fragment, enthaltend die Promotor-Region des RAD54-Gens, wurde durch die Polymerasekettenreaktionsamplifikation (PCR-Amplifikation) der vorgeschalteten nicht kodierenden Region von RAD54 zwischen dem RAD54-Startcodon (ATG) und dem nächsten Gen (SUT1) hergestellt. Diese Region überspannt 1729 Basenpaare und enthält alle Sequenzen, von denen bekannt ist, dass sie an der RAD54-Regulation (d. h. dem regulatorischen Element) beteiligt sind. Diese Region ist durch SEQ ID NO 1 kodiert.

[0068] Die PCR-Amplifikation wurde unter Verwendung von zwei PCR-Primern, die als BAM54 und 54PAC bezeichnet werden, die im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO 2 bzw. SEQ ID NO 3 identifiziert sind, durchgeführt.

[0069] BAM54 umfasst die folgenden 31 Basen:
5' cctccgqatccgacatacgaatgacctcaatg 3'

[0070] Designgemäß enthält BAM54 die Basen ggatcc zur Gewährleistung, dass das PCR-Produkt einen BamH1-Restriktionsort und die Basen gacatacgtacgacctcaatg enthielt, die den ersten 20 Basen nach dem SUT1-Gen entsprechen, damit BAM54 an das gewünschte DNA-Fragment binden kann. Die 5'-Basen cctcc wurden zugefügt zur Gewährleistung, dass BamH1 am Einführungsort schneiden konnte.

[0071] 54PAC umfasst die folgenden 44 Basen:
5' cctccgtaattaacatcagttataaggaaatatatgtgtacc 3'

[0072] Designgemäß enthielt 54PAC die Basen ttaattaa zur Gewährleistung, dass das PCR-Produkt einen Pac1-Restriktionsort enthielt, die Basen cagttataaggaaatatatgtgtacc den ersten 27 vorgeschalteten Basen des RAD54-Gens entsprechen, damit 54PAC an das gewünschte DNA-Fragment binden kann, und die 5'-Basen cctccg wurden zugefügt, zur Gewährleistung, dass Pac1 am Einführungsort schneiden konnte. Der Primer 54PAC bildet den Antisense-Strang des amplifizierten Fragments, und folglich stellen die Basen in 54PAC, die schließlich für ein Reporterprotein eines DNA-Moleküls gemäß dem ersten erfindungsgemäßen Aspekt kodieren, „Antisense-Codons“ dergestalt dar, dass die Basen cat eingeführt wurden, um die Aminosäure Methionin zuzufügen, die in einem rekombinanten Vektor des zweiten erfindungsgemäßen Aspekts als ein Startcodon wirkt und die Basen cctccgtaattaacat auch eine „Antisense“-Kodierungssequenz darstellen.

[0073] [Fig. 1](#) zeigt eine schematische Darstellung der 5'- und 3'-Anteile des DNA-Fragments (1), das PCR-amplifiziert wurde und erläutert, wo Primer BAM54 (2) und 54PAC (3) an das Fragment binden. [Fig. 1](#) zeigt weiter den BamH1-Restriktionsort (4) und den Pac1-Ort (5), die in das PCR-amplifizierte Fragment (1) eingeführt wurden. Der Start der Transkription, die Codons für die ersten 5 Aminosäuren eines Proteins, die vom RAD54-Promotor exprimiert werden, und die Richtung der Transkription sind auch bekannt.

[0074] Nach der PCR-Amplifikation wurde die für den RAD54-Promotor kodierende DNA zur Bildung eines erfindungsgemäßen rekombinanten Vektors in einen PFA-Vektor inseriert (siehe 1.3).

1.1.2 Das PFA KANMX3GFP-Konstrukt.

[0075] Zur Konstruktion von erfindungsgemäßen rekombinanten Vektoren wurde ein PFA-Vektor verwendet. Die PFA-Plasmidreihe wurde zuvor veröffentlicht (Wach et al. (1994) Yeast 10, S. 1793-1808).

[0076] Ein Plasmid PFA KANMX3GFP leitete sich vom bekannten Plasmid PFA KANMX3 her (gezeigt in [Fig. 1B](#), Seite 1797 von Wach et al.). Im von den Erfindern verwendeten Plasmid wurden die lacZ-Sequenzen von PFA KANMX3 zur Bildung von PFA KANMX3GFP durch GFP-Sequenzen ersetzt. Die Sequenz von PFA KANMX3GFP ist als SEQ ID NO 4 angeheftet (siehe [Fig. 3](#)).

[0077] PFA KANMX3GFP enthält eine DNA-Sequenz, die für das S65T-Derivat von GFP kodiert, das einen Pac1-Ort eben nach dem Startcodon der Transkription des GFP-Gens aufweist. S65T wurde als ein Pac1/Asc1-Fragment in den Vektor inseriert. PFA KANMX3GFP enthält auch DNA (2689 bp), die für ein Gen kodiert, das Kanamycin-Resistenz verleihen kann.

1.1.3 Das KANMX3GFP-RAD54-Konstrukt (siehe [Fig. 4](#))

[0078] Die DNA, kodierend für den RAD54-Promotor (siehe 1.1) und PFA KANMX3GFP (siehe 1.2), wurde mit den Restriktionsenzymen BamH1 und Pac 1 behandelt. Das KANMX3GFP-RAD54-Konstrukt wurde dann durch einmaliges Ligieren der DNA, kodierend für den RAD54-Promotor (mit den klebrigen Enden von BamH1 und Pac 1) in das linearisierte PFA KANMX3GFP zwischen dem einmaligen BamH1- und Pac 1-Ort nachbarständig an die S65T kodierende Sequenz hergestellt. Zur Erleichterung des Klonierens wurde PFA KANMX3GFP auch mit Sma1 behandelt. Der Sma1-Ort in PFA KANMX3GFP liegt zwischen BamH1 und Pac1, deshalb verhinderte die Sma1-Behandlung die Rezirkularisierung des Vektors. Der Pac1-Ort stellt einen „In-frame“ dergestalt dar, dass das S65T-Gen transkribiert werden kann.

1.1.4 Das pWDH443-Konstrukt

[0079] Das KANMX3GFP-RAD54-Konstrukt wurde am einmaligen BamH1-Ort geschnitten, dann mit DNA-Polymerase (poll) und intestinaler Phosphatase vom Kalb behandelt, um stumpfe und nicht selbst ligierbare Enden zu produzieren. Ein Dra1-Fragment (siehe SEQ ID NO 5) des HO-Gens wurde dann zwischen den stumpfen Enden des behandelten KANMX31-RAD54-Konstrukts zur Bildung des pWDH443-Konstrukts ligiert.

[0080] Das HO-Gen wird auf Chromosom IV des Hefe-Chromosoms gefunden, und die Sequenzen sind in der Genom-Datenbank für *Saccharomyces cerevisiae* hinterlegt, die sich in der öffentlichen Domäne befindet. Auf die Datenbank kann über die World Wide Web an vielen Orten zugegriffen werden, zum Beispiel über <http://genome-www.stanford.edu/>.

[0081] Das Dral-Fragment des HO-Gens enthält einen BamH1-Ort an den Basen 711–716 von SEQ ID NO 5 und wurde zur Förderung der Integration des Konstrukts in das Hefe-Genom durch die bekannten Verfahren der homologen Integration eingesetzt.

[0082] Das pWDH443-Konstrukt kann mit BamH1 geschnitten und zur Transformation von Hefe (Y485/486) mit der G418-Selektion (einem Derivat von Kanamycin) verwendet werden. Die Transformation wurde unter Verwendung des bekannten Lithiumacetat-Verfahrens (siehe http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/human_genetics/gietz/Trafo.html) durchgeführt.

[0083] Das pWDH443-Konstrukt integriert in das Hefe-Genom am HO-Locus. pWDH443 ist ein bevorzugter rekombinanter Vektor gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt und mit pWDH443 transformierte Zellen sind bevorzugte Zellen gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt.

1.1.5 Das pWDH444-Konstrukt (siehe [Fig. 6](#)).

[0084] Das pWDH444-Konstrukt wurde dann (durch Manipulation von pWDH443) dergestalt entwickelt, dass das Konstrukt zur Replikation im Inneren eines Hefewirtes zum Vorliegen als Multikopien fähig war. Um dies zu erreichen, wurden ein DNA-Fragment (stumpf an einem Ende und BamH1 geschnitten am anderen), enthaltend Sequenzen, die für cis-wirkende Replikationsfaktoren aus dem natürlich vorkommenden 2 µ-Plasmid in Hefe kodieren, Hefe-URA3-Gen (Uracil-Prototrophie) und bakterielle Plasmid-pBR322-Sequenzen, die Replikationsfähigkeit (ORI) und Ampicillin-Resistenz (AMPr) gegen das Konstrukt (bei Erhaltung in *E. coli*) verleihen, in mit BamH1 und Pme1 geschnittenes pWDH443 ligiert. Anhand dieses Schneidens wurde ein Fragment von pWDH443 entfernt, das einen Not1-Ort enthielt. Das Ligationsgemisch wurde vor der Transformation mit Not1 geschnitten, um die Rezirkularisierung von pWDH443 zu verhindern. Der BamH1-Ort im HO-Fragment (siehe vorstehend) und das HO-Fragment sind deshalb im pWDH444 frankiert.

[0085] Das 2 µ-Plasmid-Fragment enthielt Sequenzen, die der Sequenz von Hefe der 2µ-Herkunft, des URA3-Gens, des pBR322-ORI und der Ampicillin-Resistenz entsprechen, werden als ein angrenzendes Fragment in mehreren Plasmiden gefunden. (Zum Beispiel der als Yep420 bezeichnete Shuttle-Vektor.) Das von den Erfordern verwendete 2 µ-Plasmid-Fragment entspricht genau dem großen HindIII/BamH1-Fragment, das aus dem Plasmid pRDK249, beschrieben im Journal Biological Chemistry, Volumen 266, S. 14049, [Fig. 1](#) (1991) im Artikel von Johnson, A.W. und Kolodner, R.D., freigesetzt wird. Das Plasmid wurde zuerst spezifisch mit HindIII geschnitten, dann mit DNA-Polymerase 1 zur Herstellung eines stumpfen Endes behandelt. Das Plasmid wurde dann mit BamH1 behandelt, wobei ein Fragment hergestellt wurde, das an einem Ende stumpf ist und am anderen Ende ein BamH1 aufweist. Dieses Fragment wurde mittels Gelelektrophorese gereinigt.

[0086] Das pWDH444-Konstrukt wurde zur Transformation von Hefe (wie für pWDH443 beschrieben) verwendet, das für entweder Uracil-Prototrophie (URA3) oder G418-(Kanamycin)-Resistenz selektierte und zur autonomen Replikation mit der Hefe fähig war. pWDH444 ist ein bevorzugter rekombinanter Vektor gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt, und mit pWDH444 transformierte Zellen sind gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt bevorzugte Zellen.

1.2. EXPERIMENTE ZUR FLUORESZENZBESTIMMUNG.

[0087] Durch GFP bei 511 nm (nach Anregung bei 488 nm) emittiertes Licht aus Hefezellen, die mit pWDH443 und pWDH444 transformiert sind und GFP exprimieren, wurde in einem Fluorimeter bei Abwesenheit (Kontrollen) oder Anwesenheit von Verbindungen, von denen bekannt ist, dass sie DNA-Schädigung induzieren, wie zum Beispiel Methylmethansulfonat (MMS), gemessen. Die Proben wurden als ganze Zellen oder als Zellextrakte bestimmt.

1.2.1. Stämme und Wachstumsbedingungen.

[0088] Hefestämme Y485 und Y486 in haploider Form oder Y485/486 in diploider Form waren in diesem Beispiel enthalten (siehe vorstehend).

[0089] Die Medien YP plus 2% Glucose (YPD) und synthetische Medien plus 2% Glucose (SD) wurden wie in Kaiser et al. (1994) (Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, NY: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, NY.), beschrieben, hergestellt.

1.2.2. Fluoreszenz-Assays.

[0090] Eine in SD-Medium gezüchtete Zellkultur in der stationären Phase wurde als Inokulumquelle verwendet. Aliquote von Zellen (30 µl) wurden in 3 ml SD in 15-ml-Reagenzröhrchen inokuliert. Die Hälfte der Röhrchen wurde mit 0,01% MMS supplementiert (die übrigen Röhrchen blieben als Kontrollen zurück). Die Röhrchen wurden 16 h bei 25°C auf einem orbitalen Schüttler bei 120 U/min inkubiert, dann unter Aufrechterhaltung des Rührens in eine Eisbox transferiert. Die Zellen wurden dann in 1,5 ml fassende Eppendorf-Röhrchen transferiert, durch Zentrifugation (10s) geerntet, zweimal in sterilem destilliertem Wasser gewaschen und in 250 µl Extraktionspuffer resuspendiert.

[0091] Für die Fluoreszenzmessungen ganzer Zellen wurden die gewaschenen Zellen direkt in Küvetten, die 2,75 ml steriles destilliertes Wasser enthielten, überführt.

[0092] Für Studien an Zellextrakten wurden den Röhrchen mit Zellen 100 µl Glasperlen mit einem Durchmesser von 400-600 nm zugefügt, die dann in einen BIO 101 Fastprep FP120 zur mechanischen Aufspaltung der Zellen gegeben wurden. Nach der 30-sekündigen Zentrifugation wurde der Überstand in ein reines Röhrchen überführt. Das Pellet aus Perlen wurde in weiteren 250 µl Extraktionspuffer gewaschen, und dieses wurde dem Überstand aus der vorherigen Extraktion zugefügt. 200 µl des gepoolten Extrakts in 300 µl Wasser wurden dann in eine Küvette überführt.

[0093] Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Perkin Elmer LS50 Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden auf 488 nm bzw. 511 nm eingestellt, wobei die Spaltweite 10 nm betrug. Zur Bereinigung von Variationen der Zellzahl/Proteinextraktionseffizienz wurde für jede Küvette bei entweder 600 nm (für ganze Zellen) oder 280 nm (für Extrakte) die Lichtabsorption aufgezeichnet. Die aus dem Fluorimeter erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden dann durch die Absorptionsablesungen dividiert, um den „Helligkeitswert“ zu erhalten, eine willkürliche Einheit, die von der Probenkonzentration unabhängig ist. Andere Datenhandhabungseinzelheiten werden entweder im Text oder in den Figuren angesprochen.

1.2.3 Ergebnisse

[0094] Für pWDH443-transformierte Hefe zeigten sowohl die Paarungstypen (Y485 und Y486) als auch die diploiden Zellen (Y485/486) statistisch signifikante Zunahmen der Fluoreszenz, wenn sie 0,002% und 0,01% MMS ausgesetzt wurden.

[0095] Wie in [Fig. 7](#) ersichtlich ist, zeigte pWDH443-transformierte Hefe (Y485, Y486 und die diploiden Zellen [Y485/486]) auch eine Zunahme der Helligkeit bei Vorliegen des DNA-schädigenden Mittels MMS (Y485i, Y486i und Diploidi) im Vergleich zu nicht transformierten Zellen die auch dem MMS (Y485, Y486 und Diploid) ausgesetzt wurden.

[0096] Die Fluoreszenz begann eine Stunde nach der Induktion mit 0,05% MMS zuzunehmen. [Fig. 8](#) und [Fig. 9](#) zeigen zeitliche Verläufe der Induktion von Helligkeit durch MMS im haploiden Hefestamm Y486, der mit pWDH444 (Y486p + MMS) bzw. pWDH443 (Y486i + MMS) transformiert wurde. Die Wirkung von MMS auf nicht transformierte Zellen (Y486 + MMS) und die Helligkeit in unbehandelten Zellen (Y486, Y486p und Y486i) wird auch gezeigt.

[0097] [Fig. 10](#) erläutert, dass 0,02% und 0,05% MMS zu einer Zunahme der Fluoreszenz im haploiden Hefestamm Y486 führt, der mit pWDH444 (Y486p) transfiziert wurde, aber keine signifikante Wirkung bei nicht transformierten Zellen (Y486) besitzt. SDS wurde als eine Kontrolle der Aushebung der Fluoreszenz aus GFP eingeschlossen.

[0098] Proteinextrakte aus nicht transformierten Hefezellen und sowohl mit pWDH443 als auch pWDH444 transformierten Hefezellen wurden in einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Anti-GFP-Antikörpers nachgewiesen. GFP wurde in nicht transformierten Zellen nicht nachgewiesen und wurde nur bei niedrigen Konzentrationen in nicht induzierten transformierten Zellen nachgewiesen. Wenn jedoch mit pWDH443 oder pWDH444 transformierte Hefezellen mit MMS induziert wurden, trat eine erhebliche Zunahme der GFP-Antikörperbindung auf. Diese Zunahme verhielt sich proportional zu der gemessenen Fluoreszenz und

bestätigte folglich, dass die Zunahme der Fluoreszenz auf die DNA-Schädigung zurückzuführen war, die den RAD54-Promoter induzierte und danach zur GFP-Expression führte.

[0099] Diese Daten erläutern, dass mit pWDH443 und pWDH444 transformierte Hefe eine erhöhte Fluoreszenz (bei 511 nm) bei Vorliegen eines DNA-schädigenden Mittels emittiert. Demzufolge sind pWDH443 und pWDH444 gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt hoch bevorzugte rekombinante Vektoren, und die mit pWDH443 und pWDH444 transformierten Zellen sind gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt hoch bevorzugte Zellen. Diese transformierten Hefezellen sind zur Verwendung gemäß dem Verfahren des vierten erfindungsgemäßen Aspekts sehr geeignet, obwohl erkannt werden wird, dass alternative, rekombinante Vektoren gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt konstruiert werden können und Zellen, die mit diesen alternativen, rekombinanten Vektoren transformiert werden, in den erfindungsgemäßen Rahmen fallen.

[0100] Mit pWDH443 und pWDH444 transformierte Zellen können in einem Verfahren gemäß dem vierten erfindungsgemäßen Aspekt als ein Mittel zum Screening von Verbindungen, wie zum Beispiel Kandidatenmedikamenten, -nahrungsmittelzusatzstoffen oder -kosmetika zur Beurteilung, ob es sicher ist, einen lebenden Organismus, insbesondere Menschen, solchen Verbindungen auszusetzen oder die Zellen können zum Nachweis verwendet werden, ob die Wasserversorgungen durch DNA-schädigende Mittel oder Mittel, die die DNA-Schädigung potenzieren, kontaminiert sind.

BEISPIEL 2

[0101] Der rekombinante Vektor yEGFP-444 wurde gebildet und zur Transformation von Hefezellen verwendet, die YEGFP als Antwort auf ein DNA-schädigendes Mittel (MMS) exprimierten.

2.1. VERFAHREN

2.1.1. Stämme und Wachstumsbedingungen.

[0102] In diesem Beispiel verwendeter Hefestamm:

- (i) FF18984 (MAT α Leu2-3,112 Ura3-52 Lys2-I His7-1)
- (ii) YLR030w α (MAT α His3 Δ 200 Ura3-52)

[0103] Die verwendeten Medien waren die gleichen wie die unter 1.2.1 beschriebenen.

2.1.2 DNA-Konstrukte

[0104] Das modulare Design von pWDH444 (siehe Beispiel 1) ermöglichte den einfachen Ersatz des S65T-Derivats von GFP durch das YEGFP-Gen (Cormack et al., 1997 vorstehend) zur Bildung des bevorzugten rekombinanten Vektors yEGFP-444 (siehe [Fig. 12](#)).

[0105] YEGFP wurde unter Verwendung von Primern, die flankierende Pac1- und Asc1-Restriktionsenzymorte zufügen, um das PCR-Produkt von SEQ ID NO 6 zu ergeben, PCR-amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde dann mit Pac1 und Asc1 geschnitten.

[0106] Das S65T-GFP-Gen wurde durch Schneiden mit Pac1 und Asc1 aus pWDH444 freigesetzt, und die Gelelektrophorese wurde zur Reinigung des übrigen Vektorfragmentes (d. h. des großen Fragments) verwendet.

[0107] Das größere Pac1- und Asc1-Fragment des PCR-Produkts wurde dann in das große Fragment von pWDH444 zur Bildung von yEGFP-444 ligiert.

2.2 EXPERIMENTE ZUR FLUORESZENZBESTIMMUNG.

2.2.1 Fluoreszenz-Assays.

[0108] Die Beurteilung der GFP-Fluoreszenz in ganzen Zellen wurde im Wesentlichen wie unter 1.2 (vorstehend) beschrieben durchgeführt.

2.2.2 Ergebnisse

[0109] Die Lichtausstrahlung aus den mit Plasmid yEGFP-444 transformierten Zellen war sogar größer als die aus den mit pWDH443 oder pWDH444 transformierten Zellen. Tabelle 1 erläutert faktisch, dass sich die Lichtausstrahlung aus mit yEGFP-444 transformierten FF18984 im Vergleich zu mit pWDH444 transformierten FF18984 mehr als verdoppelte.

TABELLE 1:

Vergleich der Fluoreszenzabgabe aus yEGFP-444 und pWDH444.

Rekombinanter Vektor	Helligkeit (HE) + MMS	Helligkeit (HE) - MMS
yEGFP-444	100	45
	97	41
	93	47
	Durchschnitt = 96,7	Durchschnitt = 44,3
pWDH444	45	27
	54	29
	48	26
	Durchschnitt = 49	Durchschnitt = 27,3

[0110] Wir haben gefunden, dass pWDH443 und pWDH444 zur Verwendung gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind, wenn die Lichtentwicklung (als Antwort auf DNA-Schädigung) aus sich von Zellen gemäß dem vierten erfindungsgemäßen Aspekt herleitenden Zellextrakten (damit ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis erreicht wird) gemessen wird. pWDH443 und pWDH444 sind, teilweise infolge der Lichtstreuung, von begrenztem Gebrauch für Messungen der ganzen Zelle. Es gibt nur einen schmalen Unterschied zwischen den in der GFP-Beurteilung verwendeten Anregungswellenlängen von (475-495 nm) und Emissionswellenlängen (ca. 512 nm). Unter Verwendung von yEGFP-444, zusammen mit einem empfindlichen Spektrophotometer, wurde es möglich, das GFP-Signal als eine korrekt positionierte Schulter auf dem Fluoreszenz-Scan zu erkennen.

[0111] [Fig. 13](#) erläutert Emissionsspektren (Anregung bei 488 nm) aus 0,2 OD600-Einheiten von FF18984-Zellen, mit yEGFP-444 +/- 0,01% MMS nicht transformierten und transformierten Zellen. Die Zellen wurden vor der Resuspension in 1 x TE und weiterer Verdünnung zweimal in sterilem Wasser gewaschen. Das niedrigste Spektrum stellt die Fluoreszenz dar, die von nicht transformierten Zellen mit einem MMS-Challenge gemessen wurden, und das nächste zeigt die gleichen Zellen ohne MMS. Das mittlere Spektrum stellt FF18984-Zellen dar, die mit dem yEGFP-444-Konstrukt ohne MMS-Challenge transformiert wurden, während das obere Spektrum das Ergebnis eines MMS-Insults auf die gleichen transformierten Zellen zeigt.

[0112] Andere Experimente wurden zur Verfeinerung des Assays durchgeführt. Um den Impakt der Lichtstreuung weiter zu reduzieren, wurde ein 495-nm-Filter zwischen der Probenkammer und dem Emissionsdetektor eingesetzt. Dies verstärkte sehr weitgehend die Empfindlichkeit des Instrumentes dergestalt, dass der Unterschied zwischen nicht induzierten und induzierten Zellen mit dem vergleichbar war, der mit Zellextrakten erhalten wurde. Wenn die Zellen weiter in F1-Medium (vorstehend) gezüchtet wurden, war es nicht notwendig, die Zellproben vor dem Transferieren an das Spektrophotometer zu waschen.

[0113] Wir führten auch Experimente zum Nachweis durch, dass die Lichtausstrahlung aus Zellen gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt für die DNA-Schädigung und nicht für einen Zellzyklus-Phänotyp spezifisch war. Diese Experimente beinhalteten die Exposition transformierter Zellen gegenüber Hydroxyharnstoff und Nocodazol, die die Mitose auf verschiedene Weisen verzögern können.

[0114] Hydroxyharnstoff greift auf zwei Ebenen in die DNA-Synthese ein: Er inhibiert die Ribonukleotidreduktase, wobei die Versorgung von Präkursoren für die DNA-Synthese eingeschränkt wird, und er inhibiert die DNA-Ligase, ein Enzym, das für die Reparatur von Nicks (Einzelstrangbrüchen) in der DNA-Hauptkette verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu inhibiert Nocodazol die Mikrotubuli-Bildung und unterbindet folglich primär das Zellwachstum durch Verhinderung der normalen Chromosomensegregation während der Mitose. Bei Kon-

zentrationen dieser beiden Chemikalien, die das Zellwachstum in einem ähnlichen Ausmaß wie unser MMS-Behandlungsregime inhibierten, trat keine nachweisbare Induktion des GFP-Reportergens auf, was darauf hinweist, dass die Lichtemission nicht mit dem Zellzyklus verwandt war und durch die DNA-Schädigung induziert wurde, welche die Aktivierung des RAD54-Promotors induzierte.

BEISPIEL 3

[0115] Das modulare Design von pWDH443 (siehe Beispiel 1) kann auch exploitiert werden, um einen einfachen Ersatz des S65T-Derivats von GFP durch das YEGFP-Gen zur Bildung des bevorzugten rekombinanten Vektors yEGFP-443 zu ermöglichen (siehe [Fig. 11](#)).

[0116] Das in Beispiel 2 beschriebene Verfahren kann zur Herstellung von yEGFP-443 mit der Ausnahme befolgt werden, dass pWDH443 anstelle von pWDH444 verwendet wurde.

[0117] Die mit yEGFP-443 transformierten Zellen sind für die Verwendung gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet.

[0118] Mit yEGFP-444 und pWDH444 transformierte Zellen sind besonders nützlich zum Nachweis der DNA-Schädigung, ohne dass die Zellen zur Bildung eines Extrakts zum Assay aufgespalten werden müssen. Die Kombination des YEGFP-Gens, eines empfindlichen Wirtsstammes (z. B. FF18984), eines Mediums mit geringer Fluoreszenz (z. B. F1) und optimal der Begrenzung der Lichtstreuung in der Nachweisvorrichtung (z. B. unter Verwendung eines 495-nm-Filters) ermöglicht, dass man von dem zeitraubenden und komplexen Assay von Zellextrakten auf direkte Messungen von Proben, die ganze Zellen enthalten, übergehen kann.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: University of Manchester Institute of Science and Technology

(B) STRASSE: Postfach 88

(C) STADT: Manchester

(D) STAAT: Greater Manchester

(E) LAND: Großbritannien

(F) POSTLEITZAHL: M60 1QD

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: NACHWEIS DER DNA-SCHÄDIGUNG

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) MASCHINENLESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release Nr. 1.0, Version Nr. 130 (EPO)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 1729 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GACATACGAT GACCTCAATG ATTTAGATTA TGTGTTGCAC TTTTATAGAC CTACCAAAAA	60
TCCAGTGCCT ACACATAATC TTTCATAAAG ATACCTGAAA CAATAACCAG AAAGATCGGC	120
AAAAAAATTT TTTTCTTTG CCGAGATCAC AAACCTACTA TGACGAAAAA GCTTGAAGTT	180
TAGATGAGTA AGGAAAATAC AAGTGACGCT TTTATATGGT GCAAGGAACA AAAACTAAAA	240
ACAACAAGGC AAATGTGGAT CTGTCTATGTA TGGCAACGAC AGCAGGATGG CTCACAAAAA	300
AAGACAAAAA AACTAAGGC AAAAGAACAA AGCTCCTCTC CTGCTCAAGA AACGTATTGT	360
TGAAAAACCA CCGTCGTAAG AAAGTTTTTC TGTGACCTAT AATGGTTTAA AATCGGCCCA	420
TTTTTTTCC CTCTTTTGTG GTCCAGTCTT TCTCATCTC GAGGGAAATT CGACACAAAC	480
AGCGGAGAAG TGTGGCTAAA CCGGCAAGTG CCTGCAAGAT CCACAGAACT AACCGCACGA	540
ACTGGCGGTC AGAAAAGAGC CTGTTCCGGA AAGAGAGAAA CAGAGAAACG ATCATGATGG	600
GAAAGCGGGG ATTCGGCGAA GAACGAGACT GGAAAGGGAA AAAGAGAAAT ACTGGTGGAA	660
GTATTCGGAC CTTTGGCGAA GTCCGAACCC TTGAAACCCA AAGATGATCG ATGATTCATT	720
TTTCAATGCG CTACGGTTCC TGCCGCTCGT GGAACCCCA CGCAAAACAT ATTATTCGCT	780
TCTCTCTGCT GACAACTCCG GTTTACGTTA TACCGTATTA GGATCACTAT AAGGGTTCCT	840
TCCGGAGGAG GGGGGAGGGG AAGAATGTAC ATCGTCATAA GGCCTTTATG GTGTGAAGTG	900
GGTTTTGCGT GGAAAATTCG TTTTCAATGA TATAGAGCCC ACGCATATAC GTACATACTA	960
GTGGCCAAAA GCGTGGGGTG GGCGGACAAA GCTACACTGG TAAAATACAG GATTCTATGA	1020
ACAATAACAA CAACCAGCTC ACGTTGCTGA ACAGCCGAGG TCAGCCGATG CAACCGAGGT	1080
TTCCAAAGTA GCATTCTGT GCTAGCTATG TCTGTAGGTT TACATTTAAT GGTGCGTGGT	1140
TCCAGCTTCA TGTGCTTGCA TGTGATGTCC TGCAGATGGT AAGAAGATTC TGAAAGCCGC	1200
GCTAGGAGAA AAATATTCTG CTCGAAGATC TGTCCTCTTA AGTAGAAAGC GTGAAATTGT	1260
TGCGTTCTTG CATTACTACT CAACGCGTAC GCAATGCGT CTACTGCACC TGCATGATAA	1320
AGCTTATGTA TCAAAAATTT AACATCTTGA AAATACACAA GTGGTGCAAA GATGTGTCAC	1380
GTTCTGGACC TGAGTGGTGC CATGTATGCT ATTTAACATG CAAAGGGGAA GACCCTTCCG	1440
CCTTACTGCA ATAATAAAAA GTATTTTACG CGTTACCCAA TATAGCAAAG TTTCGCGCAA	1500
AAAAAAAAT AAAAAACAAT TACAAACAAA AAGAAAAAAA AGGAAATAAT AGAAGATCTA	1560
ACTGAAGCGA AGGCCAAAAC TCTTCTCACT TGACGTAATA GCGATACAA AATCTAGAGC	1620
AGCAACTTTT CTCTTTCTTC ACTAAAGCTG CTACGAAAGT ATAGAAAAAT CAAACGCTCA	1680
GAACCTAGCT CTATTCAAG GTACCATATA TATTTCTTA TAACTGATG	1729

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CCTCCGGATC CGACATACGA TGACCTCAAT G

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 44 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CCTCCGTTAA TTAACATCAG TTATAAGGAA ATATATATGG TACC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 5902 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Beide

(D) TOPOLOGIE: Beide

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GAACGCGGCC GCCAGCTGAA GCTTCGTACG CTGCAGGTCG ACGGATCCCC GGGTTAATTA	60
ACAGTAAAGG AGAAGAACTT TTCACTGGAG TTGTCCCAAT TCTTGTTGAA TTAGATGGTG	120
ATGTTAATGG GCACAAATTT TCTGTCAGTG GAGAGGGTGA AGGTGATGCA ACATACGGAA	180
AACTTACCCT TAAATTTATT TGCCTACTG GAAAACCTACC TGTTCATGG CCAACACTTG	240
TCCTACTTTT CTCTTATGGT GTTCAATGCT TTTCAAGATA CCCAGATCAT ATGAAACGGC	300
ATGACTTTTT CAAGAGTGCC ATGCCCGAAG GTTATGTACA GGAAAGAACT ATATTTTCA	360
AAGATGACGG GAACTACAAG ACACGTGCTG AAGTCAAGTT TGAAGGTGAT ACCCTTGTTA	420
ATAGAATCGA GTTAAAAGGT ATTGATTTTA AAGAAGATGG AAACATTCTT GGACACAAAT	480
TGGAATACAA CTATAACTCA CACAATGTAT ACATCATGGC AGACAAACAA AAGAATGGAA	540
TCAAAGTTAA CTTCAAAATT AGACACAACA TTGAAGATGG AAGCGTTCAA CTAGCAGACC	600
ATTATCAACA AAATACTCCA ATTGGCGATG GCCCTGTCTT TTTACCAGAC AACCATTACC	660
TGTCCACACA ATCTGCCCTT TCGAAGATC CCAACGAAA GAGAGACCAC ATGGTCCTTC	720
TTGAGTTTGT AACAGCTGCT GGGATTACAC ATGGCATGGA TGAATATAC AAATAGGGCG	780
CGCCACTTCT AAATAAGCGA ATTTCTTATG ATTTATGATT TTTATTATTA AATAAGTTAT	840
AAAAAAATA AGTGTATACA AATTTTAAAG TGACTCTTAG GTTTTAAAC GAAAATTCTT	900
ATTCTTGAGT AACTCTTTCC TGTAGGTCAG GTTGCTTTCT CAGGTATAGT ATGAGGTCGC	960
TCTTATTGAC CACACCTCTA CCGGCAGATC CGCTAGGGAT AACAGGGTAA TATAGATCTG	1020
CCCCCGGGA AGGCGAACCC GATCGGATGC ATCCTCTCTG CTGCCATGAT GCTGAAGTTG	1080
TCGTTGAACA TGGTTGCTGC CGGCGAGGCG GTCGAGCAGG CAGTGCAGGA GGTGTTGGAC	1140
TCGGGAGTCA GAACGGGCGA CCTGCTCGGC TCGAGCTCCA CTTCGGAGGT TGGCGACGCC	1200
ATTGCGCTTG CAGTTAAGGA AGCCTTGCGC AGGCAATCCG CAGCTGGTCT GAGCTAGCCT	1260
CGAGGACCCT TCTCTTTAGA CTATTCTACT CTTATGCACG TAAAAATTC TAGGAAATAT	1320
GTATTAACTA GGAGTAAAT AACCGGCTAG TGGCATTCT ATAGCGTCT GTTTACATCT	1380
ACATCACACA TTTGAGTGT ATATCTCGCA ACGTTGGCGT TAAATAGGCA GTCAATGGCC	1440
CGACCATCT ATGTTGTTA GGTGATGCC ATCTTTGTAC AGCTTGCTC GTCCCCGCCG	1500
GGTCACCCGG CCAGCGACAT GGAGGCCAG AATACCCTCC TTGACAGTCT TGACGTGCGC	1560
AGCTCAGGGG CATGATGTGA CTGTCGCCCC TACATTTAGC CCATACATCC CCATGTATAA	1620
TCATTGTCAT CCATACATTT TGATGGCCGC ACGGCGCGAA GCAAAAATTA CGGCTCCTCG	1680

CTGCAGACCT GCGAGCAGGG AAACGCTCCC CTCACAGACG CGTTGAATTG TCCCCACGCC	1740
GCGCCCCTGT AGAGAAATAT AAAAGGTTAG GATTTGCCAC TGAGGTTCTT CTTTCATATA	1800
CTTCCTTTTA AAATCTTGCT AGGATACAGT TCTCACATCA CATCCGAACA TAAACAACCA	1860
TGGGTAAGGA AAAGACTCAC GTTTCGAGGC CGCGATTAAA TTCCAACATG GATGCTGATT	1920
TATATGGGTA TAAATGGGCT CGCGATAATG TCGGGCAATC AGGTGCGACA ATCTATCGAT	1980
TGTATGGGAA GCCCGATGCG CCAGAGTTGT TTCTGAAACA TGGCAAAGGT AGCGTTGCCA	2040
ATGATGTTAC AGATGAGATG GTCAGACTAA ACTGGCTGAC GGAATTTATG CCTCTTCGA	2100
CCATCAAGCA TTTTATCCGT ACTCCTGATG ATGCATGGTT ACTCACCCT GCGATCCCCG	2160
GCAAAACAGC ATTCAGGTA TTAGAAGAAT ATCCTGATTC AGGTGAAAAT ATTGTTGATG	2220
CGCTGGCAGT GTTCCTGCGC CGGTTGCATT CGATTCTGT TTGTAATTGT CCTTTTAACA	2280
GCGATCGCGT ATTTGCTCTC GCTCAGGCGC AATCACGAAT GAATAACGGT TTGGTTGATG	2340
CGAGTGATTT TGATGACGAG CGTAATGGCT GGCCTGTTGA ACAAGTCTGG AAAGAAATGC	2400
ATAAGCTTTT GCCATTCTCA CCGGATTGAG TCGTCACTCA TGGTGATTTT TCACTTGATA	2460
ACCTTATTTT TGACGAGGGG AAATTAATAG GTTGTATTGA TGTGGACGA GTCGGAATCG	2520
CAGACCGATA CCAGGATCTT GCCATCCTAT GGAAGTGCCT CGGTGAGTTT TCTCCTTCAT	2580
TACAGAAACG GCTTTTTCAA AATATGGTA TTGATAATCC TGATATGAAT AAATTGCAGT	2640
TTCAATTGAT GCTCGATGAG TTTTCTAAT CAGTACTGAC AATAAAAAGA TTCTTGTTTT	2700
CAAGAACTTG TCATTTGTAT AGTTTTTTTA TATTGTAGTT GTTCTATTTT AATCAAATGT	2760
TAGCGTGATT TATATTTTTT TTGCGCTCGA CATCATCTGC CCAGATGCGA AGTTAAGTGC	2820
GCAGAAAGTA ATATCATGCG TCAATCGTAT GTGAATGCTG GTCGCTATAC TGCTGTCGAT	2880
TCGATACTAA CGCGGCCATC CAGTGTGAC TAGGGTTGCT GCCATCGGCC TCGCTCGCGT	2940
CTTTGCCGGA TAGCAAGAGC GCCTTTGGCC TCTACGAGCC CTGCCACGGC TCTGCGCCCG	3000
ATCTGCCCGC CGGGAAGGCG AACCAGATCG GATGCATCCT CTCTGCTGCC ATGATGCTGA	3060
AGTTGTGCTT GAACATGGTT GCTGCCGGCG AGGCGGTGCA GCAGGCACTG CAGGAGGTGT	3120
TGGACTCGGG AGTCAGAACG GCGACCTGC TCGGCTCGAG CTCCACTTCG GAGGTTGGCG	3180
ACGCCATTGC GCTTGCAGTT AAGGAAGCCT TGCGCAGGCA ATCCGCAGCT GGTCTGAGCT	3240
AGCCTCGAGG ACCCTTCTCT TTAGACTATT CTACTCTTAT GCACGTAAAA AATTCTAGGA	3300
AATATGTATT AACTAGGAGT AAAATAACCG GCTAGTGGCA TTCATATAGC CGTCTGTTTA	3360
CATCTACATC ACACATTTTC AGTGTATATC TCGCAACGTT GCGTTAAAT AGGCAGTCAA	3420
TGGCCCGACC ATTCTATGGT GTTTAGGTCG ATGCCATCTT TGTACGTTTA AACGAGCTCG	3480

AATTCATCGA TGATATCAGA TCCACTAGTG GCCTATGCGG CCGCGGATCT GCCGGTCTCC	3540
CTATAGTGAG TCGTATTAAT TTCGATAAGC CAGGTTAACC TGCATTAATG AATCGGCCAA	3600
CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT GCGTATTGGG CGCTCTTCCG CTTCTCTCGT CACTGACTCG	3660
CTGCGCTCGG TCGTTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG	3720
TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG	3780
GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC	3840
GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA	3900
TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT	3960
ACCGGATACC TGTCGCGCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA ATGCTCACGC	4020
TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC	4080
CCCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA	4140
AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT	4200
GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA	4260
GTTTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT	4320
TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT	4380
ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT	4440
CAGTGGAACG AAAACTCAG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC	4500
ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA	4560
ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA	4620
TTTGTTCAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC	4680
TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT	4740
TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA	4800
TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT	4860
AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTACG CTCGTCGTTT	4920
GGTATGGCTT CATTGAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG	4980
TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC	5040
GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC	5100
GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG	5160
CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA	5220

ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACCTCTC AAGGATCTTA	5280
CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGAC CCAACTGATC TTCAGCATCT	5340
TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAAG	5400
GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTCA ATATTATTGA	5460
AGCATTTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT	5520
AAACAAATAG GGGTCCGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC	5580
ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTCGCG	5640
CGTTTCGGTG ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC GGTCACAGCT	5700
TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA GCCCGTCAGG GCGCGTCAGC GGGTGTGGC	5760
GGGTGTCGGG GCTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG AGTGCACCAT	5820
ATGGACATAT TGTCGTTAGA ACGCGGCTAC AATTAATACA TAACCTTATG TATCATACAC	5880
ATACGATTTA GGTGACACTA TA	5902

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 909 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TTTAAAATGC TTTCTGAAAA CACGACTATT CTGATGGCTA ACGGTGAAAT TAAAGACATC	60
GCAAACGTCA CGGCTAACTC TTACGTTATG TGCGCAGATG GCTCCGCTGC CCGCGTCATA	120
AATGTCACAC AGGGCTATCA GAAATCTAT AATATACAGC AAAAAACCAA ACACAGAGCT	180
TTGAAGGTG AACCTGGTAG GTTAGATCCC AGGCGTAGAA CAGTTTATCA GCGTCTTGCA	240
TTACAATGTA CTGCAGGTCA TAAATTGTCA GTCAGGGTCC CTACCAAACC ACTGTTGGAA	300
AAAAGTGGTA GAAATGCCAC CAAATATAAA GTGAGATGGA GAAATCTGCA GCAATGTCAG	360
ACGCTTGATG GTAGGATAAT AATAATTCCA AAAAACCATC ATAAGACATT CCCAATGACA	420
GTTGAAGGTG AGTTTGCCGC AAAACGCTTC ATAGAAGAAA TGGAGCGCTC TAAAGGAGAA	480
TATTTCAACT TTGACATTGA AGTTAGAGAT TTGGATTATC TTGATGCTCA ATTGAGAATT	540
TCTAGCTGCA TAAGATTTGG TCCAGTACTC GCAGGAAATG GTGTTTATC TAAATTTCTC	600
ACTGGACGTA GTGACCTTGT AACTCCTGCT GTAAAAAGTA TGGCTTGGAT GCTTGGTCTG	660
TGGTTAGGTG ACAGTACAAC AAAAGAGCCA GAAATCTCAG TAGATAGCTT GGATCCTAAG	720
CTAATGGAGA GTTTAAGAGA AAATGCGAAA ATCTGGGGTC TCTACCTTAC GGTGTTGTGAC	780
GATCACGTTT CGTACGTGC CAAACATGTA AGGCTTCATT ATGGAGATGG TCCAGATGAA	840
AACAGGAAGA CAAGGAATTT GAGGAAAAAT AATCCATTCT GGAAAGCTGT CACAATTTTA	900
AAGTTTAAA	909

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 756 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Beide

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```

ATGTTAATTA ACTCTAAAGG TGAAGAATTA TTCACTGGTG TTGTCCCAAT TTTGGTTGAA      60
TTAGATGGTG ATGTTAATGG TCACAAATTT TCTGTCTCCG GTGAAGGTGA AGGTGATGCT      120
ACTTACGGTA AATTGACCTT AAAATTTATT TGTACTACTG GTAAATTGCC AGTTCCATGG      180
CCAACCTTAG TCACTACTTT CGGTTATGGT GTTCAATGTT TTGCGAGATA CCCAGATCAT      240
ATGAAACAAC ATGACTTTTT CAAGTCTGCC ATGCCAGAAG GTTATGTTCA AGAAAGAACT      300
ATTTTTTTCA AAGATGACGG TAACTACAAG ACCAGAGCTG AAGTCAAGTT TGAAGGTGAT      360
ACCTTAGTTA ATAGAATCGA ATTAAAAGGT ATTGATTTTA AAGAAGATGG TAACATTTTA      420
GGTCACAAAT TGAATACAA CTATAACTCT CACAATGTTT ACATCATGGC TGACAAACAA      480
AAGAATGGTA TCAAAGTTAA CTTCAAAATT AGACACAACA TTGAAGATGG TTCTGTTCAA      540
TTAGCTGACC ATTATCAACA AAATACTCCA ATTGGTGATG GTCCAGTCTT GTTACCAGAC      600
AACCATTACT TATCCACTCA ATCTGCCTTA TCCAAAGATC CAAACGAAAA GAGAGACCAC      660
ATGGTCTTGT TAGAATTTGT TACTGCTGCT GGTATTACCC ATGGTATGGA TGAATTGTAC      720
AAATAACTGC AGGGCGCGCC ACTTCTAAAT AAGCGA                                756

```

Patentansprüche

1. Rekombinantes DNA-Molekül, umfassend ein regulatorisches Element, umfassend den Promotor und 5' regulatorische Sequenzen des RAD54-Reparatwgens, das operativ an eine DNA-Sequenz gekoppelt ist, die ein grün fluoreszierendes Protein und Licht emittierende Derivate davon kodiert.
2. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 1, worin das regulatorische Element die als SEQ ID NO 1 identifizierte DNA-Sequenz oder ein funktionelles Analogon oder Fragment davon umfasst.
3. Rekombinantes DNA-Molekül nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die DNA-Sequenz das S65T-Derivat von grün fluoreszierendem Protein kodiert.
4. Rekombinantes DNA-Molekül nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die DNA-Sequenz, die ein Licht emittierendes Reporterprotein kodiert, das Hefe-verstärkte Derivat des grün fluoreszierenden Proteins kodiert.
5. Rekombinanter Vektor, umfassend ein DNA-Molekül nach einem der vorangehenden Ansprüche und einen DNA-Vektor.
6. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 5, worin der Vektor zur autonomen Replikation im Cytosol einer Zelle bestimmt ist.
7. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 6, worin der Vektor sich vom 2 µ-Plasmid herleitende DNA enthält.
8. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 7, worin der Vektor zur Integration in das Genom einer Zelle bestimmt ist.

9. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 8, worin der Vektor DNA enthält, kodierend für einen Teil des HO-Gens aus Chromosom IV von Hefe.
10. Rekombinanter Vektor nach einem der Ansprüche 5 bis 9, worin sich der Vektor von PFA-Vektoren und Derivaten davon herleitet.
11. Rekombinanter Vektor PFA KANMX3GFP-RAD54, umfassend den Vektor von Sequenzprotokoll SEQ ID NO 4 und das regulatorische Element von Sequenzprotokoll SEQ ID NO 1, inseriert zwischen den Pac1- und BamH1-Restriktionsenzymorten des Vektors des Sequenzprotokolls SEQ ID NO 4.
12. Rekombinanter Vektor pWDH443, umfassend den rekombinanten Vektor nach Anspruch 11 mit einem Fragment des HO-Gens, das SEQ ID NO 5 entspricht, inseriert am BamH1-Ort des Vektors.
13. Rekombinanter Vektor yEGFP-443, umfassend das große Fragment des rekombinanten Vektors nach Anspruch 12, das durch den Pac1- und Asc1-Aufschluss generiert wird, ligiert an das große Fragment des YEGFP von SEQ ID NO 6, das durch den Pac1- und Asc1-Aufschluss generiert wird.
14. Rekombinanter Vektor, umfassend ein Fragment des 2 µ-Plasmids, ligiert mit dem großen Fragment, das aus dem BamH1- und Pme1-Aufschluss des rekombinanten Vektors nach Anspruch 12 generiert wird.
15. Rekombinanter Vektor pWDH444, umfassend das große HindIII/BamH1-Fragment, das aus dem Plasmid pRDK249 freigesetzt wird, ligiert mit dem großen Fragment, das aus dem BamH1- und Pme1-Aufschluss des rekombinanten Vektors nach Anspruch 12 generiert wird.
16. Rekombinanter Vektor yEGFP-444, umfassend das große Fragment des rekombinanten Vektors nach Anspruch 15, das durch den Pac1- und Asc1-Aufschluss generiert wird, ligiert an das große Fragment des YEGFP von SEQ ID 6, das durch den Pac1- und Asc1-Aufschluss generiert wird.
17. Zelle, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1–4.
18. Zelle, enthaltend einen rekombinanten Vektor nach einem der Ansprüche 5–16.
19. Zelle nach Anspruch 17 oder 18, welche eine Hefe darstellt.
20. Hefe nach Anspruch 19, worin die Hefe einen Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* darstellt.
21. Hefe nach Anspruch 19, die Y485 in haploider Form darstellt.
22. Hefe nach Anspruch 19, als FF18984 oder Y486 bezeichnet, in haploider Form.
23. Hefe nach Anspruch 19, welche Y485/486 in diploider Form darstellt.
24. Verfahren zum Nachweis des Vorliegens eines Mittels, das DNA-Schädigung verursacht oder sie potenziert, umfassend:
 - (a) Aussetzen einer Hefe, die mit einem rekombinanten DNA-Molekül transformiert ist, umfassend ein regulatorisches Element, umfassend den Promotor und 5' regulatorische Sequenzen des RAD54-Reparaturgens, das operativ an eine DNA-Sequenz gekoppelt ist, die ein grün fluoreszierendes Protein und Licht emittierende Derivate davon kodiert, einem Mittel;
und
 - (b) Überwachen der Expression des Licht emittierenden Reporterproteins aus der Zelle.
25. Verfahren nach Anspruch 24, worin Mittel zur Beurteilung gescreent werden, ob es sicher ist, einen lebenden Organismus derartigen Verbindungen auszusetzen.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, worin die Mittel Kandidatenmedikamente, -nahrungsmittelzusatzstoffe oder -kosmetika darstellen.
27. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, worin das Mittel ein Kontaminant der Wasserversorgung darstellt.

28. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, worin das Mittel ein Kontaminant von industriellen Abwässern darstellt.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 24–28, worin die Expression von Licht aus ganzen Zellen gemessen wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29, umfassend Züchten von Zellen, die mit einem rekombinanten Vektor nach Anspruch 13 oder 16 transformiert sind, Inkubieren der Zellen mit dem Mittel für eine prädefinierte Zeit und Überwachen der Expression des Licht emittierenden Reporterproteins direkt aus einer Probe der Zellen.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 – 30, worin die Zellen in einem Wachstumsmedium mit geringer Fluoreszenz gezüchtet werden.

32. Verfahren nach Anspruch 31, worin die Zellen in F1-Medium gezüchtet werden.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 – 28, worin die Expression von Licht aus einem Extrakt der Zellen gemessen wird.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen



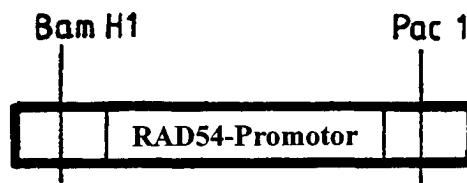


FIG. 2

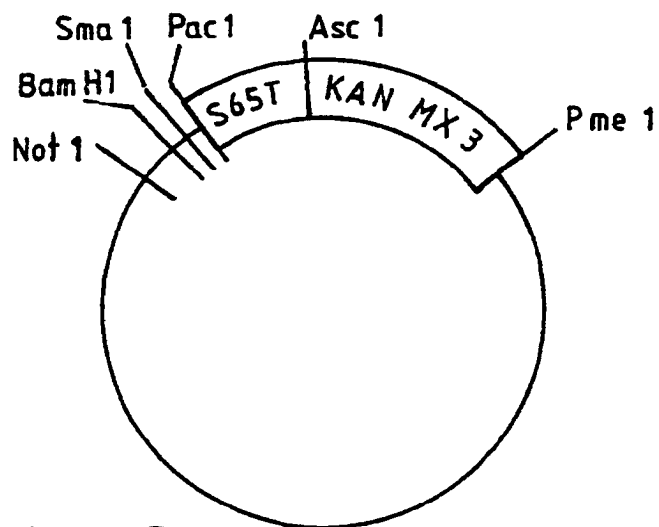


FIG. 3

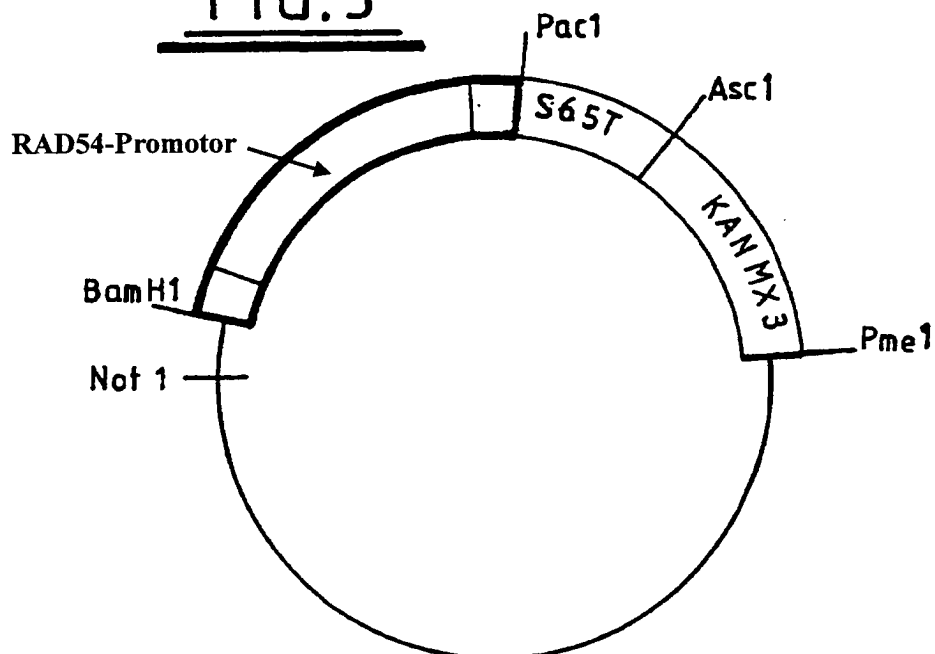
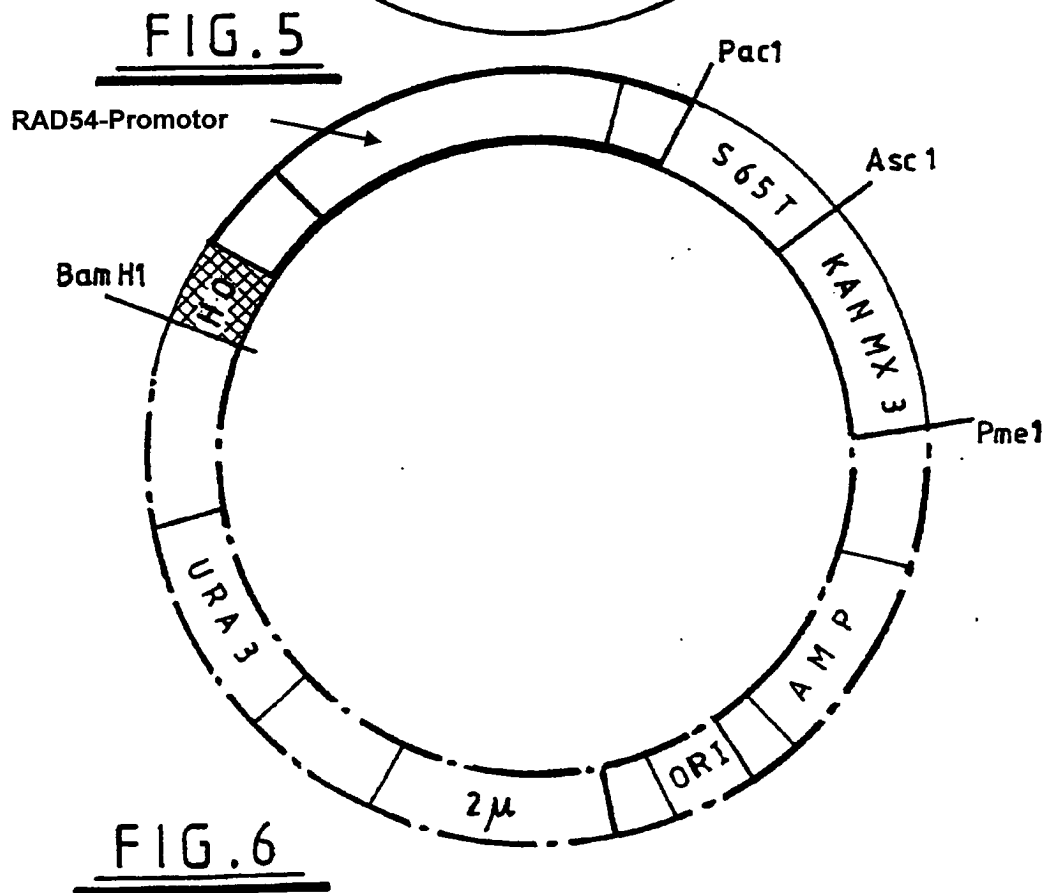
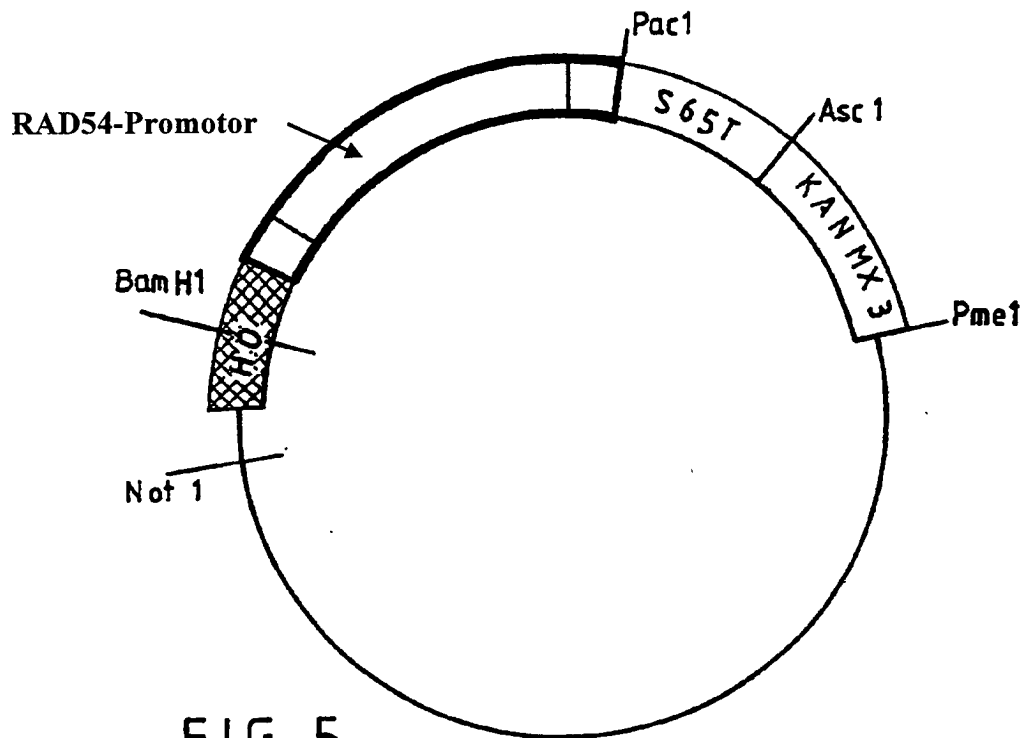


FIG. 4



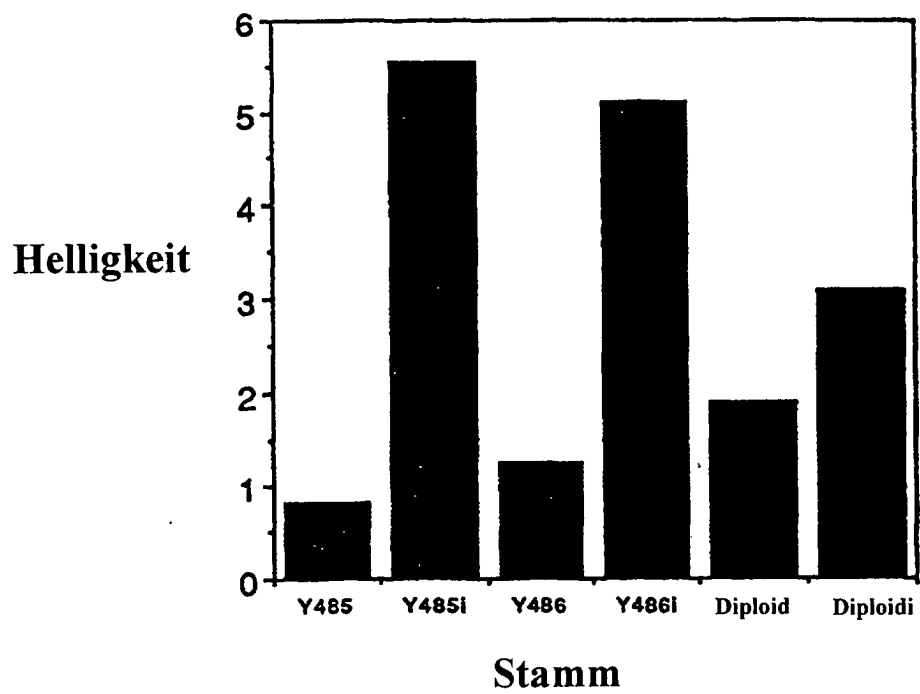


FIG. 7

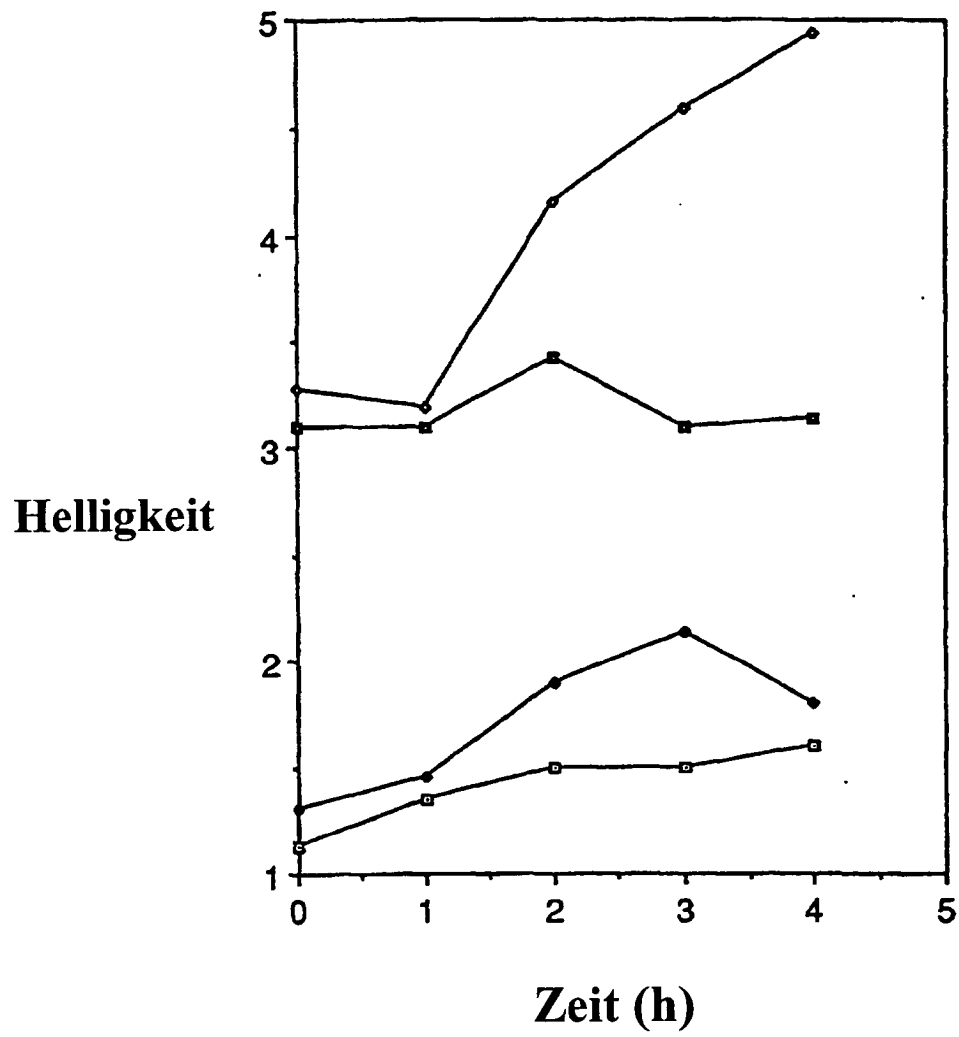
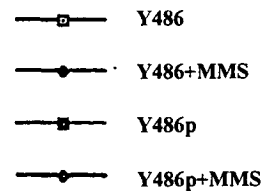


FIG. 8



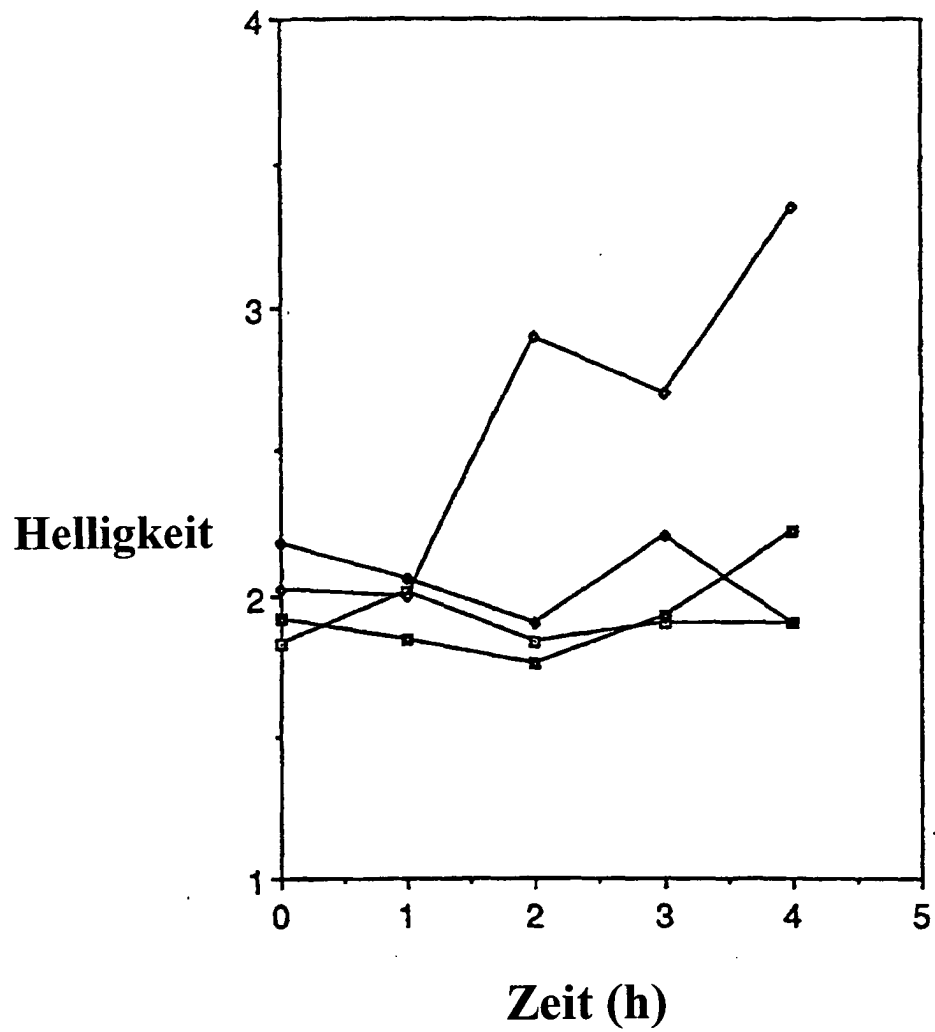


FIG. 9

—□— Y486
—●— Y486+MMS
—■— Y486i
—○— Y486i+MMS

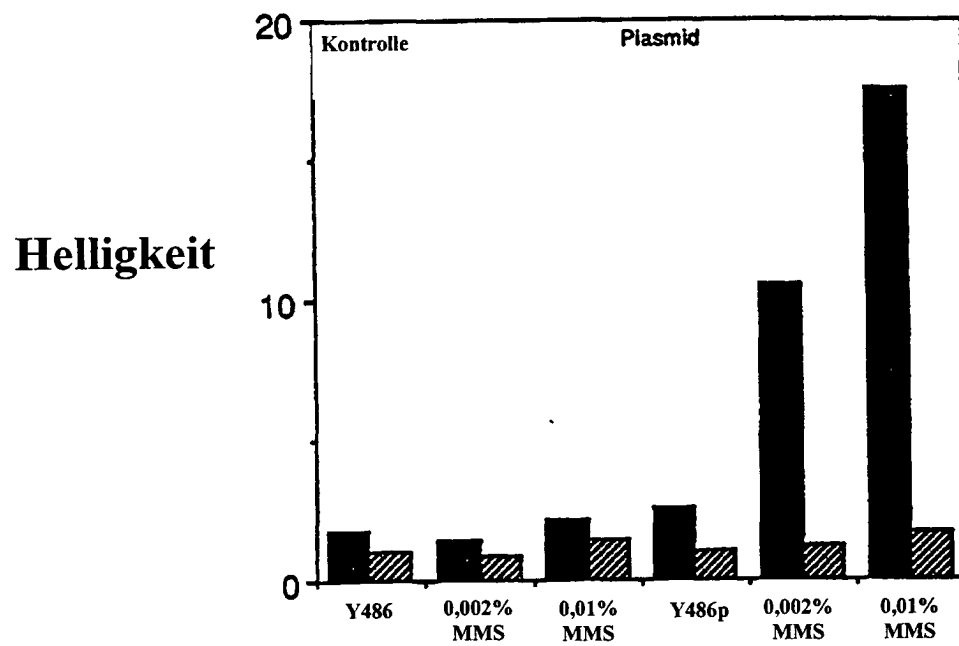


FIG. 10

Helligkeit
 Leuchtendes SDS

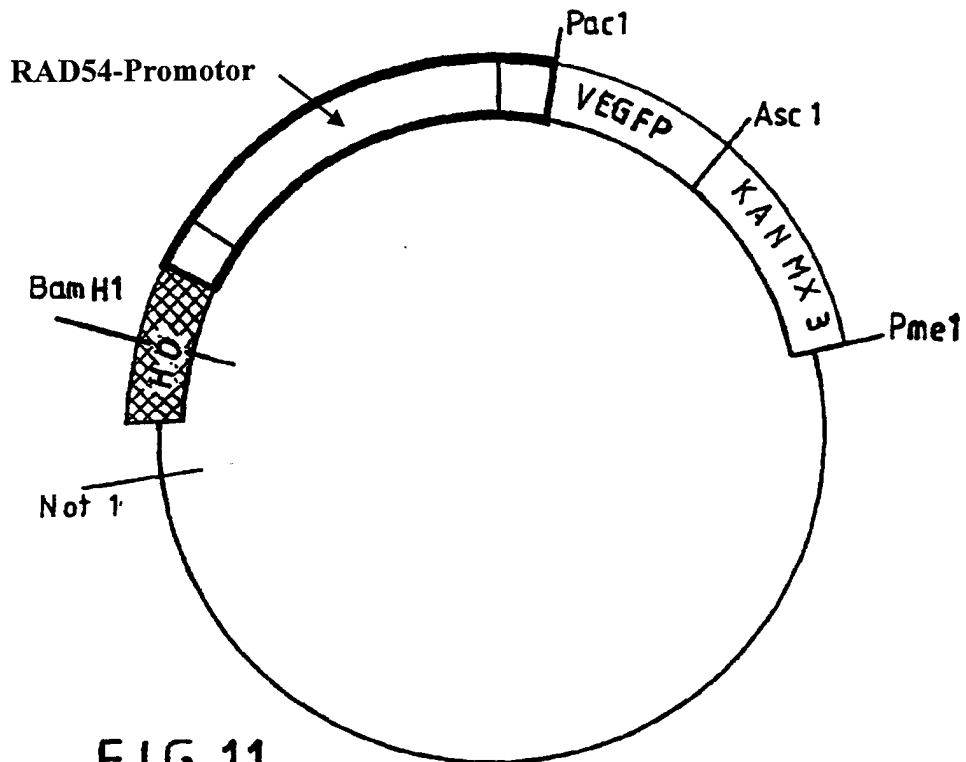


FIG.11

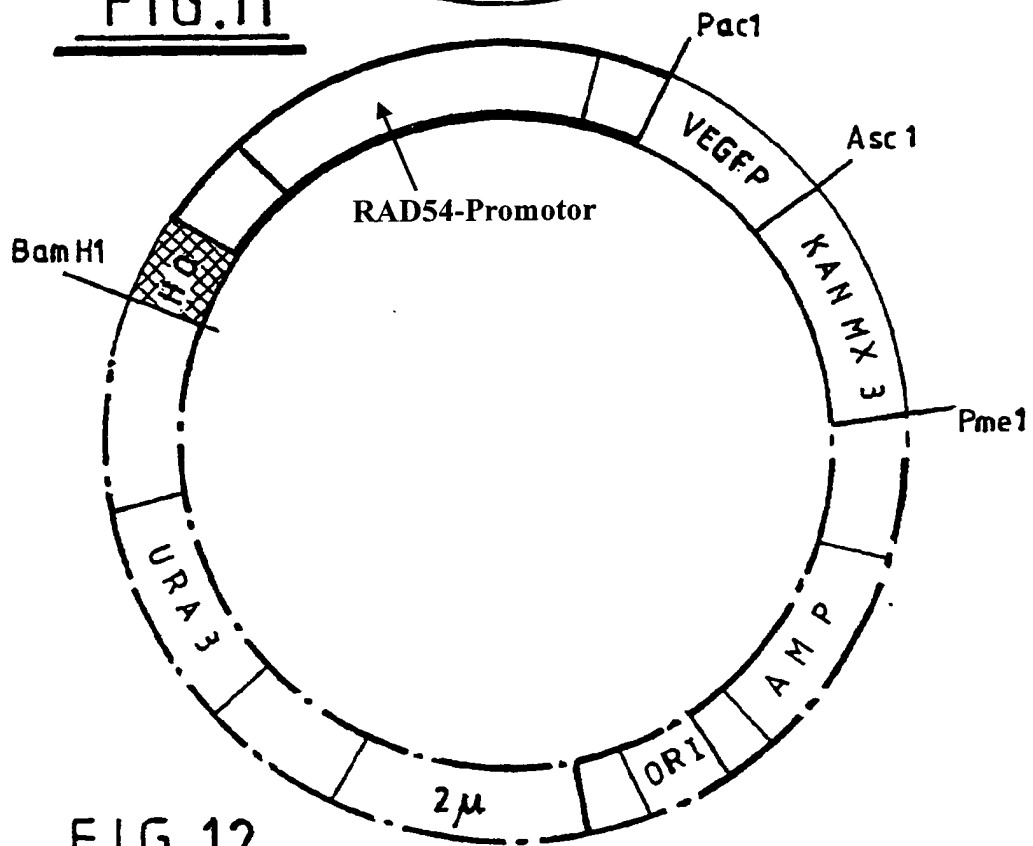


FIG.12

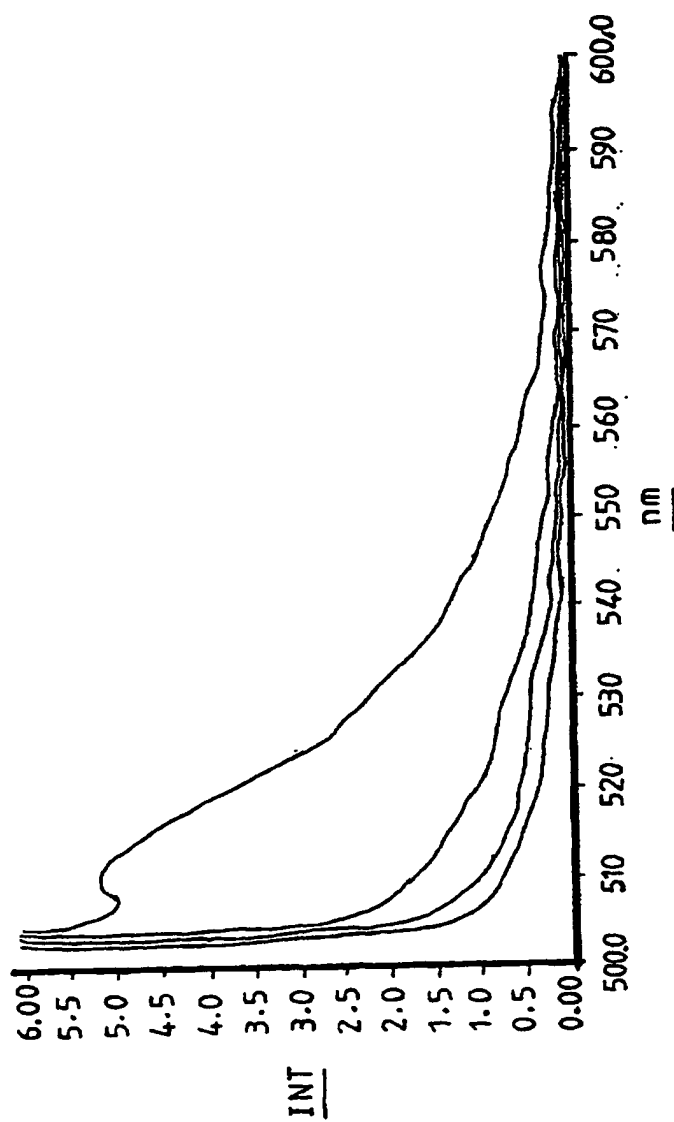


FIG. 13