

CARETAKER-GEN-SYNDROME:
Molekulargenetische und funktionelle Studien

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Alexandra Sobeck

aus
Würzburg

Würzburg 2001

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die Dissertation „CARETAKER-GEN-SYNDROME: Molekulargenetische und funktionelle Studien“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1998 bis Dezember 2001 am Institut für Humangenetik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Hoehn angefertigt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren Gegenstand von drei Postern und zwei Veröffentlichungen. Fünf weitere Veröffentlichungen sind in Vorbereitung.

Poster:

A. Sobeck, M. Wagner, S. Herterich, G. Emmert, U. Oppitz, M. Flentje, H. Hoehn, D. Schindler (1998) Mutation Analysis in the Ataxia Telangiectasia Gene, ATM. (abstract) Med Genet 1: P7-116

H. Siebert, A. Sobeck, D. Schindler (2000) Mutation analysis on 19 ataxia telangiectasia patients between 19 and 37 years of age. (abstract) Eur J Hum Genet 8: P-596

A. Sobeck, D. Schindler, R. Bendix, T. Dörk (2001) Three new exons of the ATM gene activated by aberrant splicing due to intronic mutations. (abstract) Eur J Hum Genet 9: P-0741

Veröffentlichungen:

Oppitz U, Bernthaler U, Schindler D, Sobeck A, Hoehn H, Platzner M, Rosenthal A, Flentje M. (1999) Sequence analysis of the ATM gene in 20 patients with RTOG grade 3 or 4 acute and/or late tissue radiation side effects. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 44:981-8

Detlev Schindler, Alexandra Sobeck (1999) Diagnostik von AT mittels Durchflußzytometrie und Zellzyklusanalyse. Medizinische Genetik Edition Band 1: Ataxia teleangiectatica

Alexandra Sobeck, Marion Nicke, Regina Bendix, Ulrike Hüsing, Thilo Dörk, Detlev Schindler; Alternative Splicing in the *ATM* Coding Region versus Aberrant Splicing due to atypical Mutations in the *ATM* Gene. *In Vorbereitung*

Regina Bendix, Markus Stumm, Alexandra Sobeck, Raymonda Varon, Detlev Schindler, Thilo Dörk: Human RAD50 deficiency causes a variant form of the Nijmegen breakage syndrome. *Eingereicht*

Alexandra Sobeck, Matthias Wagner, Holger Hoehn: Interaktion der FA-Proteine FANCA, FANCC und FANCG mit den Mitgliedern der RAD51-Familie im Hefe Two-Hybrid-System: *In Vorbereitung*

Michaela Thiel, Detlev Schindler, Lydia Vieten, Sonja Gräsl, Stephan Lobitz, Alexandra Sobeck, Sabine Herterich & Helmut Hanenberg: Natural Gene Therapy in Fanconi Anemia. *In Vorbereitung*

Hoehn H, Thiel M, Sobeck A, Wagner M, Schindler D: Genetic Instability in Fanconi Anemia. In: Chromosomal Instability and Aging: Basic Science and Clinical Implications (Hisama FM and Martin GM, eds). *Im Druck*, 2001

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1	EINLEITUNG	1
1.1	Genomische Instabilität	1
1.2	Entstehung von DNA-Schäden	1
1.3	DNA-Reparaturmechanismen	2
1.3.1	Base Excision Repair (BER)	2
1.3.2	Nucleotide Excision Repair (NER)	2
1.3.3	Mismatch Repair (MMR)	3
1.3.4	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	4
1.4	Zelluläre Reaktionen auf DNA-Schäden: Zellzyklusarrest oder Apoptose?	6
1.4.1	Der G1/S-Checkpoint	7
1.4.2	Der S-Phase-Checkpoint	7
1.4.3	Der G2/M-Checkpoint	7
1.4.4	DNA-Schäden und Apoptose	8
1.5	CARETAKER-GEN-SYNDROME	10
1.5.1	ATAXIA TELANGIECTASIA (AT)	11
1.5.1.1	Klinischer AT-Phänotyp	11
1.5.1.2	Zellulärer AT-Phänotyp	12
1.5.1.3	Das ATM-Protein	14
1.5.1.4	Das <i>ATM</i> -Gen	14
1.5.2	DAS NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROM (NBS)	16
1.5.2.1	Klinischer NBS-Phänotyp	16
1.5.2.2	Zellulärer NBS-Phänotyp	16
1.5.2.3	Das <i>NBS1</i> -Gen	18
1.5.2.4	Das NBS1-Protein	18
1.5.3	FANCONI ANÄMIE (FA)	20
1.5.3.1	Klinischer FA-Phänotyp	20
1.5.3.2	Zellulärer FA-Phänotyp	20
1.5.3.3	Die Fanconi-Gene und ihre Proteine	23
1.6	PROBLEMSTELLUNGEN	25
1.6.1	Ataxia Telangiectasia: Identifizierung und Charakterisierung seltener Spleißmutationen im <i>ATM</i> -Gen	25
1.6.2	Nijmegen Breakage Syndrom: Suche nach neuen Genen bei Patienten mit NBS- und NBS-ähnlichem Phänotyp	26
1.6.3	Fanconi Anämie: Suche nach einer funktionellen Verknüpfung der FA-Proteine zum System der homologen Rekombinationsreparatur	26
2	MATERIAL	28
2.1	Chemikalien	28
2.2	Aminosäuren	30
2.3	Enzyme	31
2.4	Nukleinsäuren und Nukleotide	31

2.5	Radionukleotide	33
2.6	Bakterien- und Hefestämme	33
2.7	Antikörper	33
2.8	Nährmedien und Antibiotika	34
2.9	Zelllinien	34
2.10	Geräte	34
2.11	Sonstige Materialien	35
3	METHODEN	37
3.1	Charakterisierung von Nukleinsäuren	37
3.1.1	Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegel-Elektrophorese	37
3.1.2	Die denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	38
3.1.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	38
3.1.4	Präparation von RNA aus lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten	39
3.1.5	Präparation von genomischer DNA aus lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten	39
3.1.6	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	40
3.2	Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren	40
3.2.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
3.2.2	Glätten von 5'- oder 3'-Überhängen in doppelsträngiger DNA	41
3.2.3	5'-Phosphorylierung	41
3.2.4	5'-Dephosphorylierung	42
3.2.5	Ligation	42
3.2.6	Reverse Transkription (RT)	42
3.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.2.8	Semiquantitative PCR	44
3.2.9	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	44
3.2.10	Das „Splice Scoring“-System nach SHAPIRO und SENAPATHY (1987)	45
3.3	Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle in <i>E. coli</i>	47
3.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	47
3.3.2	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	47
3.3.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Hitzetransformation	47
3.3.2.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation	48
3.3.3	Hitzetransformation	48
3.3.4	Elektroporation	49
3.3.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	49
3.3.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	49
3.3.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	49
3.4	Proteinanalytische Methoden	49
3.4.1	Proteinextraktion aus lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten	49
3.4.2	Immunpräzipitation von Proteinen	50
3.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration durch TCA-Fällung	51
3.4.4	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LÄMMLI, 1970)	51
3.4.5	„Wet-Transfer“	52
3.4.6	Immunologische Detektion von Proteinen im Western Blot	53
3.4.7	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	54
3.4.8	Der „Protein Truncation Test“ (PTT)	55
3.5	„Yeast Two Hybrid“-System und „Interaction Trap“	56
3.5.1	Kultivierung von Hefezellen	57

3.5.1.1 Flüssigkultur	58
3.5.1.2 Plattenkultur	59
3.5.1.3 Glycerinkultur	59
3.5.2 Transformation von Hefezellen	59
3.5.3 Durchführung des „Interaction Trap“	60
3.5.3.1 Transformation der Hefen	60
3.5.3.2 Test auf Selbstaktivierung des LexA-Fusionsproteins	60
3.5.3.3 Test auf Interaktion zwischen Köder- und Beute-Fusionsprotein	61
3.6 Kultivierung tierischer Zellen	61
3.6.1 Überexpression von Proteinen in Säugerzellen	61
3.6.2 Transfektion von Säugerzellen	62
4 ERGEBNISSE	63
4.1 Ataxia Telangiectasia – Suche nach seltenen Spleißmutationen und deren Konsequenzen im <i>ATM</i>-Gen	63
4.1.1 Etablierung des „Protein Truncation Test“ (PTT) zur Mutationsanalyse im <i>ATM</i> -Gen	63
4.1.2 Identifizierung trunkierender Mutationen im <i>ATM</i> -Gen von 20 AT-Patienten	67
4.1.3 Einteilung der 7 neu identifizierten Spleißmutationen des <i>ATM</i> -Gens in Subkategorien	68
4.1.4 Evaluierung der 7 neu identifizierten Spleißmutationen mit Hilfe des „Splice Scoring“-Systems nach SHAPIRO und SENAPATHY (1987)	69
4.1.5 Semiquantitative PCR und Western Blotting bei 7 AT-Zelllinien mit neuen Spleißmutationen	70
4.1.6 Zusammenfassende Charakterisierung der 7 neu identifizierten <i>ATM</i> -Spleißmutationen	72
4.2 Das Nijmegen Breakage Syndrom: Suche nach neuen Genen bei Patienten mit NBS- und NBS-ähnlichem Phänotyp	75
4.2.1 Mutationssuche und Western Blot-Analyse in Zelllinien von vier Patienten mit NBS-ähnlichem Phänotyp	75
4.2.2 Die induzierte Focibildung von MRE11 und NBS1 ist defekt in RAD50-defizienten Fibroblasten	76
4.3 Fanconi Anämie: Suche nach einer funktionellen Verknüpfung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie	79
4.3.1 Verwendung des „Interaction Trap“	79
4.3.1.1 Klonierung der <i>RAD51</i> -Familie in die Hefevektoren pEG202 und pJG4-5	79
4.3.1.2 Test auf Selbstaktivierung der LexA-Fusionskonstrukte	81
4.3.1.3 Test der Funktionalität der RAD51-Fusionsproteine	81
4.3.1.4 Durchführung des „Interaction Trap“	84
4.3.1.4.1 Test auf Aktivierung des lacZ-Reporters	84
4.3.1.4.2 Test auf Aktivierung des LEU2-Reporters und auf Doppelaktivierung beider Reportersysteme	85
4.3.2 Überexpression der FA-Proteine und der RAD51-Familie in Säugerzellen	89
4.3.2.1 Klonierung der FA-cDNAs <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> , <i>FANCG</i> und der <i>RAD51</i> -Genfamilie in pCMV-Vektoren	90
4.3.2.2 Nachweis der Überexpression der FA-Proteine und der RAD51-Familie durch Immunfluoreszenzfärbung	91
4.3.2.2.1 Transfektionsraten verschiedener Zelllinien	91
4.3.2.2.2 Lokalisation der FA- und RAD51-Proteine	92

4.3.2.2.3	Versuch der Induktion nukleärer FA-Foci durch MMC-Behandlung	94
4.3.2.2.4	Versuch der Induktion nukleärer Foci bei den RAD51-Homologen	96
4.3.2.2.5	Keine Kolo­kalisierung zwischen FA-Proteinen und RAD51-Familienmitgliedern	97
4.3.2.2.6	Reduzierte Formierung von RAD51A-Foci in primären Fibroblasten mit konstitutiver FANCA-, FANCC- oder FANCG-Überexpression	98
4.3.2.2.7	Versuch der Ko-Immunpräzipitation der FA- und RAD51-Proteine	99
5	DISKUSSION	104
5.1	Identifizierung und Charakterisierung außergewöhnlicher Spleißmutationen im <i>ATM</i> -Gen	104
5.2	Suche nach Genen, deren Defekt einen NBS-artigen Phänotyp auslöst	109
5.3	Besteht eine Verbindung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie?	113
6	ZUSAMMENFASSUNG	125
6.1	Identifizierung und Charakterisierung nicht-konservativer Spleißmutationen und deren Auswirkungen im <i>ATM</i> -Gen	125
6.2	Suche nach Gendefekten, die einen NBS-ähnlichen Phänotyp auslösen	126
6.3	Untersuchung einer möglichen Verbindung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie	127
6.4	<i>SUMMARY</i>	130
7	LITERATURVERZEICHNIS	135

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
μ	Mikro-, 10 ⁻⁶
³² P	Phosphor 32
A	Adenosin
A _x	Absorption bei der Wellenlänge x nm
Ak	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AT	Ataxia Telangiectasia
ATLD	„AT-like disorder“
ATM	„Ataxia Telangiectasia Mutated“
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BER	„Base excision repair“
BLM	„Bloom Helicase“
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BS	Bloom-Syndrom
C	Cytidin
CBP/p300	„CREB binding protein“
Ci	Curie
cpm	„counts per minute“
CS	Cockayne Syndrome
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DEB	Diepoxybutan
DNA-DSB	„DNA double strand break“
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat
ds	„double stranded“
E	Einheit(en)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERCC	„excision repair complementing cDNA“
EtBr	Ethidiumbromid
etc	<i>et cetera</i>
EtOH	Ethanol
FA	Fanconi-Anämie
FANC	FA-Komplementationsgruppe
FAZF	„Fanconi anemia zink finger“
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanosin
Gal	Galaktose
GFP	„Green fluorescent protein“
Glu	Glukose
GluHU	Glukosemedium ohne His und Ura
GluHUT	Glukosemedium ohne His, Ura und Trp
GluHUTX	X-Gal-haltiges Glukosemedium ohne His, Ura und Trp

GluHUTL	Glukosemedium ohne His, Ura, Trp und Leu
GluHUTLX	X-Gal-haltiges Glukosemedium ohne His, Ura, Trp und Leu
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	„horse raddish peroxidase“
HRR	„homologous recombinational repair“
HU	„Hydroxyurea“
IF	Immunfluoreszenz
IR	ionizing radiation
IRES	„internal ribosomal entry site“
I-Trap	„Interaction Trap“
JNK	Jun-N-terminale Kinase
k	Kilo-, 10^3
Kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
Leu	Leucin
m	Milli-, 10^{-3}
M	molar
MCS	„multiple cloning site“
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
MMC	Mitomycin C
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
MMR	mismatch repair
mRNA	Messenger-RNA
n	Nano-, 10^{-9}
NBS	Nijmegen Breakage Syndrome
NER	nucleotide excission repair
NHEJ	non-homologous end-joining
NLS	„nuclear localization signal“
Nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
ORF	„open reading frame“
PAA	Polyacrylamid
PBS	„Phosphate buffered saline“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration
PK	Proteinkinase
PVDF	„polyvinylidene fluoride“
RAD	„recombination associated DNA binding“
RB	Retinoblastom
RDS	radiation resistant DNA-synthesis
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	„Sodiumdodecylsulfat“
SNF	„sucrose non-fermenting“
SSA	„single strand annealing“
SWI	„switch“

T	Thymidin
TCA	Trichloressigsäure
TCR	„transcription coupled repair“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	„transcription factor“
TGF β	„transforming growth factor β “
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Trp	Tryptophan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Uridin
UpM	Umdrehungen pro Minute
URS	„upstream regulatory sequences“
Ura	Uracil
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	„volume per volume“
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	„weight per volume“
XC	Xylencyanol
XP	Xeroderma Pigmentosum
XRCC	„X-ray repair complementing cDNA“

Die Unterscheidung zwischen Hefeproteinen und deren humanen Homologen erfolgt – soweit nicht anders angegeben - durch Klein- und Großschreibweise (z.B. Rad51 [*S. cerevisiae*]; RAD51 [*homo sapiens*]).

Die Unterscheidung zwischen einem Gen und dessen Translationsprodukt erfolgt durch Kursiv- und Regulärschrift (z.B. *RAD51* [Gen]; RAD51 [Protein]).

1. Einleitung

1.1 Genomische Instabilität

Die Erhaltung der genomischen Integrität ist unabdingbar für das Überleben eines Organismus. Durch eine Fülle verschiedener Faktoren werden in jeder Zelle täglich an mehreren hundert Stellen Schäden in der DNA induziert, deren Behebung durch ein komplexes Netzwerk verschiedener Reparatursysteme gewährleistet ist. Sind die Zellen eines Organismus nicht mehr in der Lage, die entstandenen DNA-Schäden vollständig zu reparieren, spricht man von genomischer Instabilität, deren häufige Folge die Entartung der Zelle zur Krebszelle ist. Bei einer Reihe autosomal rezessiv erblicher Krankheiten sind Gene betroffen, deren Produkte als sogenannte „Caretaker“ des Genoms eine zentrale Rolle bei der DNA-Reparatur, der Zellproliferation und der Zellzykluskontrolle spielen. Genomische Instabilität und Prädisposition gegenüber verschiedenen Krebsformen sind generelle Charakteristika dieser Syndrome, die daher auch Modellcharakter in Hinblick auf die Mechanismen der Karzinogenese besitzen.

1.2 Entstehung von DNA-Schäden

Eine Vielzahl endo- und exogener Einflüsse ist an der Entstehung von DNA-Schäden beteiligt. Unter physiologischen Temperatur- und pH-Bedingungen ist die DNA von Warmblütlern instabil und neigt zu spontanen Veränderungen. Hydrolytische Reaktionen wie Depurinisierung und Depyrimidierung resultieren in abasischen Stellen in der DNA (LINDAHL und NYBERG 1972, LOEB und PRESTON 1986), die Deaminierung von Cytosin, Adenin, Guanin oder 5-Methylcytosin konvertiert diese Basen jeweils zu Uracil, Hypoxanthin, Xanthin und Thymin. Durch zelluläre Stoffwechselfvorgänge wie oxidative Atmung und Lipidperoxidation werden als Nebenprodukte diverse reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) wie z.B. Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikale erzeugt, die zur Oxidierung von Basen (8-OG, FAPY-Guanin oder Adenin) führen (FLOYD 1990, GUPTA und LUTZ 1999). Auch bei der DNA - Replikation und - Reparatur entstehen mutagene Veränderungen, darunter Basentransitionen wie A→G und C→T (FEIG und LOEB 1993), außerdem Insertionen oder Deletionen. Neben diesen endogenen Faktoren verursachen diverse Umwelteinflüsse teilweise schwerwiegende Veränderungen in der Struktur der DNA. Ultraviolettes Licht (UV) induziert die Bildung von kovalenten Pyrimidindimeren, ionisierende Strahlung resultiert in Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Die durch chemische Noxen, wie z.B. MMS (Methylmethansulfat), MMC (Mitomycin C) oder DEB (Diepoxybutan) verursachten Schäden umfassen Basenoxidierungen und - alkylierungen, DNA-Einzel - und Doppelstrangbrüche sowie Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen (FRIEDBERG et al. 1995).

1.3 DNA-Reparaturmechanismen

Zur Reparatur von DNA-Läsionen stehen der Zelle – je nach Art der Schädigung - unterschiedliche Reparaturmechanismen zur Verfügung, die in vier teilweise überlappende Kategorien eingeteilt werden: „Base excision repair“ (**BER**), „Nucleotide excision repair“ (**NER**), „Mismatch repair“ (**MMR**) und „DNA double strand break repair“ (**DSB repair**).

1.3.1 Base Excision Repair (BER)

BER wird hauptsächlich für die Reparatur kleinerer, endogen entstandener DNA-Schäden wie Depurinisierung, Deaminierung oder Oxidierung von Basen über das Herausschneiden einer einzelnen Base („Short-patch BER“) eingesetzt (MOL et al. 1999). Seltener ist der „Long-patch BER“, charakterisiert durch das Herausschneiden von 2-10 Nukleotiden im Bereich der Läsion, er erfolgt vorwiegend nach Induktion von Einzelstrangbrüchen in der DNA (KROKAN et al. 2000). Der „short patch BER“ beginnt mit der Erkennung und Entfernung abnormaler Basen aus dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Die entstandene abasische Stelle wird nachfolgend durch ein Zusammenspiel von APE1-Endonuclease und Poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) herausgeschnitten und das fehlende Nukleotid durch die DNA-Polymerase β eingesetzt. Die finale Ligation erfolgt durch den XRCC1/DNA-Ligase 3-Komplex. Der „long patch BER“ beinhaltet die Erkennung des Einzelstrangbruches durch den XRCC1/PARP-Komplex und involviert ferner die DNA-Polymerasen β und ϵ (FORTINI et al. 1998) sowie das „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) (GARY et al. 1999) zum Auffüllen der fehlenden Nukleotide. Die Ligation der letzten Lücke erfolgt hier über die DNA-Ligase 1. Bisher konnten keine menschlichen Erbkrankheiten identifiziert werden, die auf Defekte des BER-Weges zurückgehen, allerdings scheinen bestimmte Polymorphismen im XRCC1-Gen mit einer Prädisposition zu Lungenkrebs assoziiert zu sein (DIVINE et al. 2001).

1.3.2 Nucleotide Excision Repair (NER)

Der NER-Weg umfaßt das Herausschneiden von etwa 30 Nukleotiden im Bereich einer DNA-Läsion und kann ebenfalls in zwei Subkategorien unterteilt werden:

Der sogenannte globale NER („global genome NER“, ggNER) dient der generellen Erkennung von DNA-Deformationen aufgrund gestörter Basenpaarungen (SUGASAWA et al. 2001), wie etwa im Bereich UV-induzierter Pyrimidindimere, während der Transkriptions-gekoppelte NER („transcription coupled repair“, TCR) (TORNALETTI und HANAWALT 1999) eingeleitet wird, wenn während der Transkription die Elongation der RNA Polymerase II aufgrund einer Läsion in der DNA gestoppt wird. Nach dem jeweils ersten Schritt, Erkennen der gestörten DNA-Struktur im ggNER durch den XPC-hHR23B-Komplex bzw. Entfernung der DNA Polymerase II im TCR durch die beiden Proteine CSA und CSB, verlaufen beide Reparaturwege identisch. XPG und zwei Untereinheiten des

Transkriptionsfaktors TFIIH, XPD und XPB entwinden die DNA-Doppelhelix im Bereich der Läsion, wobei die Stabilisierung der geöffneten Helix durch XPA und das Replikationsprotein A (RPA) erfolgt. Nachdem zwei Endonukleasen, XPG und der ERCC1/XPF-Komplex, 24-32 Nukleotide des schadhaften Einzelstranges herausgeschnitten haben, erfolgt die Auffüllung der Lücke durch die regulären Komponenten des Replikationsapparates (DE LAAT et al. 1999, BATTY und WOOD 2000).

Drei chromosomale Bruchsyndrome sind mit Defekten des NER-Weges assoziiert: Xeroderma Pigmentosum (XP)(CLEAVER 1968), das Cockayne Syndrom (CS)(NOUSPIKEL et al. 1997), und Trichothiodystrophy (TTD)(CHU und MAYNE 1996). Xeroderma Pigmentosum wird ausgelöst durch Mutationen in einem der XP-Gene (XPA-XPG) und ist assoziiert mit einer mehr als 1000fach erhöhten Prädisposition zu UV-induziertem Hautkrebs. Im Gegensatz hierzu weisen weder das Cockayne Syndrome noch TTD eine Krebsprädisposition auf. CS- und TTD- Patienten zeichnen sich durch physische und neurologische Entwicklungsstörungen aus, darüberhinaus sind für TTD spröde Haare und Nägel sowie schuppige Haut typische Kennzeichen. Das Cockayne Syndrome wird verursacht durch Mutationen im CSA- oder CSB-Gen. Darüberhinaus können sowohl CS als auch TTD ebenfalls durch Mutationen in den XPD- oder XPB-Genen hervorgerufen werden. Dieses Phänomen erklärt sich aus der Tatsache, daß XPB und XPD als Untereinheiten des Transkriptionsfaktors TFIIH sowohl bei NER als auch in der Initiation der Transkription eine wichtige Rolle spielen. Mutationen in einem dieser Gene beeinflussen also nicht nur NER, sondern darüberhinaus auch die Transkription und Expression von Genen, die bei Entwicklung und Bindehautstabilität eine wichtige Rolle spielen (VERMEULEN et al. 2001).

1.3.3 Mismatch Repair (MMR)

Der MMR-Weg wird von der Zelle spezifisch eingesetzt, um Fehler zu beheben, die der DNA-Polymerase bei der Replikation unterlaufen. Neben dem Einbau falscher Nukleotide kommt es hier an Stellen repetitiver Sequenzen zu einem Stolpern der Polymerase, welches in Deletionen oder Insertionen auf dem neu synthetisierten Strang resultieren kann, so daß an der fehlerhaften Stelle kleine Ausbuchtungen einzelsträngiger DNA entstehen. Die am MMR beteiligten humanen Proteinfamilien sind Homologe der bakteriellen MutS- und MutL- Proteine aus *E. coli* (KOLODNER und MARSISCHKY 1999, HARFE und JINKS-ROBERTSON 2000). Im Überblick erfolgt der MMR-Weg in vier Schritten: (1) Erkennung der Fehlpaarung durch MutS-Homologe, (2) Rekrutierung weiterer MMR-Faktoren, u.a. MutL-Homologe, (3) Identifizierung und Entfernung des fehlerhaften Einzelstranges und (4) Neusynthese des ausgeschnittenen DNA-Fragments.

Unter den MutS-ähnlichen Proteinen ist das Heterodimer hMSH2/6 hauptsächlich in die Identifizierung fehlgepaarter Basen und 1bp-Loops involviert, während ein weiteres Dimer, hMSH2/3, vor allem größere Insertionen und Deletionen erkennt (CLARK et al. 1999). Nach der Bindung der MutS-Homologe an die DNA werden MutL-ähnliche Komplexe, hMLH1/hPMS2 und hMLH1/hPMS1

sowie diverse Replikationsfaktoren in den Komplex rekrutiert. Im weiteren Verlauf der Reparatur werden diverse Proteine aus den NER- und BER-Reparaturwegen eingesetzt, darunter die DNA-Polymerase ϵ , RPA, PCNA, die Exonuklease 1 und die FEN1-Endonuklease. Erbliche Defekte in MMR sind mit verschiedenen Krebsformen assoziiert, die auf sogenannte Mikrosatelliten-Instabilität im Bereich bestimmter Dinukleotidrepeats zurückgehen (LIU et al. 1995, JIRICNY 1998). Prominentestes Beispiel ist das Kolonkarzinom („hereditary non-polyposis colorectal cancer“, HNPCC), das durch Mutationen in den hMLH1-, hMSH2- und hMSH6-Genen ausgelöst werden kann (BRONNER et al. 1994, PAPADOPOULOS et al. 1994). Weshalb Defekte in MMR vor allem Dickdarm- und Eierstockkrebs verursachen, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht bekannt.

1.3.4 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (DNA-DSB-Reparatur)

Von besonderer Bedeutung für das Überleben einer Zelle ist die **DNA-DSB-Reparatur**. Bei der Rekombination der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgene und während der Meiose werden in der Zelle gezielt DSBs induziert. Andererseits entstehen unerwünschte Doppelstrangbrüche auf direktem Weg durch ionisierende Strahlung, freie Radikale und chemische Noxen sowie indirekt bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen und sogenannten „interstrand crosslinks“ (ICLs). Bereits ein einziger unreparierter DSB kann - wenn er ein überlebenswichtiges Gen betrifft – lethale Folgen für die Zelle haben. Die Reparatur solcher Brüche ist besonders schwierig, da zwei lose Enden doppelsträngiger DNA richtig wieder zusammengefügt werden müssen. DNA Doppelstrangbrüche gelten daher als gravierendste Art der DNA-Schädigung (CHU 1997). Drei verschiedene DSB-Reparaturmechanismen sind in Säugerzellen bekannt: Homologe Rekombinations-Reparatur (**HRR**), „non-homologous end-joining“ (**NHEJ**) und „single strand annealing“ (**SSA**).

HR verwendet identische Sequenzen des jeweils homologen Chromosoms als Vorlage zur korrekten Reparatur von DSBs. In der Bäckerhefe *Sacharomyces cerevisiae* sind an der HR-Reparatur die Proteine der sogenannten Rad52-Epistasis-Gruppe, Rad50-55, Rad57 und Rad59 (SONODA et al. 2001) sowie Mre11 und Xrs2 beteiligt (JEGGO 1998). Zunächst bindet Rad52 an die beiden doppelsträngigen DNA-Enden und rekrutiert scRPA (SUGIYAMA et al. 1998). Durch den Exonukleasekomplex Rad50/Mre11/Xrs2 erfolgt dann in 5'→3'-Richtung die Generierung überhängender 3'-Enden (TRUJILLO et al. 1998), an die sich kettenartig mehrere Rad51-Proteine anlagern. Diese sogenannten Rad51-Nukleoproteinfilamente vermitteln die Suche nach sequenzidentischen Regionen auf dem jeweils homologen Chromosom (BAUMANN und WEST 1998). Zur Invasion des Nukleoproteinfilaments wird die doppelsträngige DNA des homologen Stranges aufgewunden und es folgt die Elongation der 3'-Überhänge durch eine DNA-Polymerase. Die entstandenen Strangüberkreuzungen („Holliday junctions“) werden abschließend durch Resolvasen geschnitten und die letzten Lücken durch die DNA-Ligase I geschlossen (KHANNA und JACKSON 2001). In Säugerzellen verläuft die HR-Reparatur prinzipiell ähnlich (SHINOHARA und OGAWA 1998), allerdings ist die Rolle des RAD50/MRE11/NBS1-Komplexes in diesem

Zusammenhang noch nicht geklärt. Während die anderen HR-Proteine hochkonserviert sind, weist NBS1 trotz funktioneller Analogien nur limitierte strukturelle Ähnlichkeit zu Xrs2 in der Hefe auf (VARON et al. 1998). Die Vermittlung zwischen RAD52/RPA und RAD51 erfolgt bei Säugern möglicherweise über die evolutionsgeschichtlich neuen Proteine BRCA1 und BRCA2 (SCULLY und LIVINGSTON 2000).

Der Reparaturmechanismus des **SSA** wird auch als Subkategorie des HR-Weges bezeichnet, wobei hier ebenfalls hauptsächlich Proteine der RAD52-Epistasis-Gruppe beteiligt sind. Allerdings basiert SSA auf der Erkennung kurzer homologer Sequenzen zwischen den beiden gebrochenen DNA-Strängen, wie es etwa bei Oligonukleotidrepeats der Fall ist, so daß dieser Reparaturweg unvermeidlich zu Deletionen im Bereich der reparierten Bruchstelle führt (PASTINK et al. 2001).

Nach der initialen Bindung des RAD52-Proteins an die DNA-Enden erfolgt eine direkte Rekrutierung des RAD50/MRE11/NBS1-Komplexes und über die MRE11 Exonuklease-Aktivität werden zu beiden Seiten des DSB kurze ssDNA-Enden generiert (IVANOV et al. 1996). Existieren zwischen beiden 3'-Überhängen sogenannte Mikrohomologie-Regionen, erfolgt ein Annealen der Einzelstränge in diesem Bereich (PAULL und GELLERT 2000). Etwaige überstehende ssDNA-Enden werden durch die XPF/ERCC1-Endonuklease entfernt.

Der **NHEJ**-Weg wird von der Zelle neben der Reparatur induzierter DNA-DSBs vor allem bei der V(D)J-Rekombination eingesetzt; im Gegensatz zu den beiden anderen Reparaturwegen ist dieser nicht auf homologe Sequenzen zwischen den DNA-Enden angewiesen. NHEJ umfasst eine ebenfalls hochkonservierte Gruppe von Proteinen: die DNA-Ligase IV, XRCC4 sowie die DNA-abhängige Proteinkinase, DNA-PK, die aus drei Untereinheiten, KU70, KU80 und einer katalytischen Untereinheit DNA-PKcs besteht. Ein Heterodimer aus KU70/KU80 lagert sich an DNA-Doppelstrangbrüche an und stabilisiert die Bindung der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs an die doppelsträngigen DNA-Enden. Die Ligation erfolgt im Anschluss über ein weiteres Heterodimer, XRCC4/DNA-Ligase IV und ist ebenfalls von einem funktionellen RAD50/MRE11/NBS1-Komplex abhängig (MOORE und HABER 1996, JEGGO 1998).

Unter den humanen DSB-Reparaturproteinen zeichnen sich einige Angehörige des HR- oder SSA-Weges, darunter RAD51, RAD52, RAD54, NBS1, MRE11, RAD50, BRCA1 und BRCA2 durch eine besondere Eigenschaft aus. In unbeschädigten Zellen zeigen diese Proteine eine homogene Verteilung innerhalb des Zellkerns. Nach DNA-Schädigung wie etwa ionisierender Strahlung konzentrieren sie sich jedoch in punktartige Regionen innerhalb des Kerns und sind unter dem Fluoreszenzmikroskop als sogenannte „nukleäre Foci“ zu erkennen. Es wird vermutet, daß diese Strukturen unter anderem Orte aktiver DNA-DSB-Reparatur darstellen (NELMS et al. 1998). Die ersten Foci sind als feine Punkte bereits 30 Minuten nach Bestrahlung zu sehen. Im Verlauf von 48 Stunden fusionieren sie zu größeren fleckenartigen Gebilden, die schließlich wieder verschwinden oder, wie im Falle der RAD51-Foci beobachtet, teilweise als sogenannte Mikronuklei aus der Zelle ausgeschleust werden

(HAAF et al. 1999). Eine Kolokalisation mehrerer Proteine in dieselben Foci wurde bisher für NBS1, MRE11 und RAD50 (CARNEY et al. 1998) bzw. RAD51, RAD52 und RAD54 (TANAKA et al. 2000) (STRIKE und JONES 1999) beobachtet. Während keine Überlappung zwischen RAD51- und NBS1/MRE11/RAD50-Foci existiert (MASER et al. 1997), kolokalisieren BRCA1 und BRCA2 mit Proteinen beider Gruppen (SCULLY et al. 1997a, 1997b, CHEN et al. 1999b, SHARAN und BRADLEY 1998).

Die Überlappung der verschiedenen DNA-Reparaturwege und ihre komplexe Vernetzung beginnt sich seit einigen Jahren abzuzeichnen. Proteine wie z.B. BRCA1, BRCA2, NBS1, MRE11 oder DNA-PK sind dabei nicht nur in DNA-Reparaturmechanismen verwickelt, sondern häufig auch in die Kontrolle des Zellzyklus involviert, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird. Die Identifizierung des sogenannten BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex), dem Proteine wie NBS1, MRE11, RAD50, BRCA1, BRCA2, MSH2, MSH6, MLH1, ATM und BLM (Bloom Helicase) angehören, vermittelt einen Eindruck, welches komplexes Zusammenspiel zwischen verschiedenen Systemen wie homologe Rekombination, TCR, SSA, Zellzykluskontrolle, Induktion apoptotischer Signalwege etc. zur Erhaltung der genomischen Integrität in Säugerzellen aufrecht erhalten werden muß (WANG et al. 2000).

1.4 Zelluläre Reaktionen auf DNA-Schäden: Zellzyklusarrest oder Apoptose?

Eine sich teilende eukaryontische Zelle durchläuft während eines Zellzyklus mehrere Phasen: In der Synthesephase (S-Phase) wird der DNA-Gehalt verdoppelt und die replizierten Chromosomen werden in der Mitose (M-Phase) auf die beiden Tochterzellen verteilt. Beide Vorgänge folgen nicht direkt aufeinander, sondern sind durch zeitlichen Abstand voneinander getrennt: Zwischen Mitose und nächster DNA-Verdopplung liegt die G1-Phase (G für engl. „gap“, Lücke), zwischen Replikation und Mitose die G2-Phase. In der Zelle entstehen permanent neue DNA-Schäden durch Chemikalien, UV-Licht, Umweltstrahlung, endogene Stoffwechselfvorgänge etc., die vor der nächsten Mitose repariert werden müssen, um ihre Weitergabe an die Tochterzellen zu verhindern. Eine Arretierung des Zellzyklus kann an bestimmten Kontrollstationen, den sogenannten Checkpoints stattfinden. In Eukaryontenzellen existieren mindestens drei verschiedene Checkpoints, die als G1/S, S und G2/M bezeichnet werden. Der G1/S-Checkpoint verhindert die Replikation einer geschädigten DNA-Matrize, der G2/M-Checkpoint die Segregation geschädigter Chromosomen. Die Proteine, die in die Kontrolle des Zellzyklus involviert sind, gehören häufig zur Gruppe der Tumorsuppressorgene und spielen oft auch eine Rolle in DNA-Reparatur, Replikation, Rekombination und Apoptose.

Eine Reihe von Proteinen, die sogenannten Checkpoint-Kinasen, die von zentraler Bedeutung für die Steuerung der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung sind, lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: (1) Proteine, die aufgrund ihrer Homologie zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-K)

gezählt werden; zu ihnen gehören die humanen Proteine ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) und ATR (ATM- and RAD3-related) sowie deren Homologe TEL1 und MEC1 (*S. cerevisiae*), RAD3 (*S. Pombe*) und Mei41 (*Drosophila melanogaster*); (2) Proteine mit klassischer Serin/Threonin-Kinaseaktivität wie CHK1 und CHK2 (Checkpoint-Kinasen 1 und 2). Diese Proteine stehen ganz am Anfang der Signaltransduktionsketten, die als zelluläre Reaktion auf DNA-Schädigung induziert werden. Am Ende der Kette stehen Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK, „cyclin-dependent kinase“) sowie weitere Zellteilungsproteine (CDC, „cell division control“-Proteine).

1.4.1 Der G1/S-Checkpoint

Der Zellzyklusarrest im G1/S-Checkpoint wird über beide PI3-K-Familienmitglieder ATM und ATR sowie beide Checkpoint-Kinasen CHK1 und 2 reguliert. Nach DNA-Schädigung erfolgt direkt durch ATM/ATR sowie indirekt über CHK1 und 2 eine Phosphorylierung des p53-Proteins (KHANNA et al. 1998, CASPARI 2000), welche dessen proteolytischen Abbau verlangsamt und die endogene p53-Konzentration erhöht. Der Transkriptionsregulator p53 induziert nachfolgend die Expression des CDK2-Inhibitors p21, der die Aktivierung des CyclinE-CDK2-Komplexes inhibiert und somit den Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindert. Die Phosphorylierung von p53 erfolgt dabei je nach DNA-Schädigung anders: nach IR wird p53 primär durch ATM modifiziert, während nach DNA-Schädigung durch UV oder HU („hydroxyurea“, Hydroxyharnstoff) vor allem ATR zur p53-Phosphorylierung verwendet wird.

1.4.2 Der S-Phase-Checkpoint

Während der S-Phase ist die DNA besonders mutationsanfällig, da viele Fehler im Verlauf der Neusynthese entstehen. Der S-Checkpoint sollte daher besonders empfindlich reguliert werden. Entstehen während der Replikation DNA-Schäden, erfolgt zunächst die Aktivierung der Checkpoint-Kinase CHK2 durch ATM oder ATR. Die nachfolgende Phosphorylierung des CDC25A durch CHK2 resultiert in dessen proteosomaler Degradation und verhindert die Aktivierung des CyclinE(A)-CDK2-Komplexes, welcher das Durchlaufen der S-Phase reguliert. Auch die DNA-Reparaturproteine NBS1 und BRCA1 sind in die Kontrolle des S-Checkpoint involviert (PETRINI 1999, XU et al. 2001). Sie befinden sich in der Signaltransduktionskette vermutlich vor CDC25A (ABRAHAM 2001) und induzieren zugleich die Aktivierung der DNA-Reparatur via homologe Rekombination.

1.4.3 Der G2/M-Checkpoint

Besonders komplex in Bezug auf das ATM-Protein stellt sich der G2/M-Checkpoint dar: AT-Zellen, die in der G1- oder S-Phase bestrahlt werden, arretieren anschließend in G2/M, während bei AT-Zellen, die in der G2-Phase selbst geschädigt werden, kein G2/M-Arrest erfolgt (BEAMISH und

LAVIN 1994, MORGAN et al. 1997). Diese Ergebnisse deuten auf eine vernachlässigbare Funktion von ATM im G2/M-Arrest hin, außer die Zelle wird in G2 selbst geschädigt. Zur Erklärung dieses Phänomens existiert gegenwärtig folgendes Modell (ABRAHAM 2001): in Zellen, die während der G1- oder S-Phase DNA-Schädigung erfahren und dennoch bis G2 weiterlaufen, wird hauptsächlich die ATR-Kinase aktiviert, die nachfolgend CHK1 phosphoryliert. Eine Schädigung der Zelle während der G2-Phase dagegen resultiert vor allem in der Aktivierung der ATM-Kinase, die anschließend CHK2 phosphoryliert. Beide Checkpoint-Kinasen, CHK1 oder CHK2, vermitteln die Bindung sogenannter 14-3-3-Proteine an CDC25C, und verhindern so den CyclinB-CDC2-vermittelten Eintritt der Zelle in die Mitose. Ein alternativer, ATM/ATR-unabhängiger Signaltransduktionsweg zur Arretierung einer Zelle in G2/M involviert die Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene durch p53 und/oder BRCA1 (APRELICOVA et al. 2001, TAYLOR und STARK 2001), darunter p21, GADD45 und 14-3-3 σ . Die Aktivierung der DNA-Reparatursysteme bei G2/M-Arrest erfolgt wiederum durch verschiedene Induktoren wie BRCA1, ATM oder den NBS1/MRE11/RAD50-Komplex, die selbst alle in DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur involviert sind.

1.4.4 DNA-Schäden und Apoptose

Wird eine Zelle genotoxischen Einflüssen ausgesetzt, kann sie zur Schadensbehebung entweder den Zellzyklus arretieren oder statt dessen „zellulären Selbstmord“ (Apoptose) begehen. Der Zelltod ist entweder eine Folge irreparabler DNA-Schäden, die eine weitere Zellteilung unmöglich machen, oder aber eine Konsequenz aktiv eingeleiteter Apoptosemechanismen. Die verschiedenen apoptotischen Signaltransduktionswege sind überaus komplex reguliert und sowohl untereinander, als auch mit der DNA-Reparaturmaschinerie und/oder der Zellzykluskontrolle eng verknüpft (Review: COULTAS und STRASSER, 2000). Die meisten Proteine, die die zelluläre Reaktion auf DNA-Schädigung regulieren, sind zugleich in DNA-Reparaturmechanismen, Zellzykluskontrolle und apoptotische Signaltransduktionswege involviert, darunter etwa ATM, ATR, BLM, WRN, FANCC, BRCA1 und 2, Bcl-2 und p53. Apoptotische Wege werden grundsätzlich in zwei Subkategorien aufgeteilt: den **Bcl-2-abhängigen Weg** und den „**Death receptor**“-aktivierten Weg, die beide in der Induktion verschiedener Caspasen resultieren. Caspasen sind proteolytische Enzyme, die zum Abbau von Zellstrukturen und zur Aktivierung weiterer Enzyme benötigt werden. Typische morphologische Veränderungen apoptotischer Zellen umfassen die Kondensation und anschließende Fragmentierung des Chromatins, die Loslösung der Zelle aus dem umliegenden Zellverband und nachfolgend die Zerlegung der Zelle in sogenannte „apoptotic bodies“, die von anderen Zellen aufgenommen und lysosomal degradiert werden.

Der **Bcl-2-abhängige Signalweg** wird initial über Transkriptionsfaktoren wie p53 oder IRF-1 induziert, die durch Aktivierung oder Repression bestimmter Apoptose-regulierender Gene die Funktion der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bcl-2, Bcl-x(L), Bcl-w, etc. stören. Dies resultiert nacheinander in der proteolytischen Aktivierung verschiedener Initiator- und Effektor-

Caspasen, die den Zelltod auslösen. Neben seiner antiapoptotischen Funktion ist Bcl-2 auch in die Zellzykluskontrolle involviert und trägt nach seiner Phosphorylierung durch Cdc2 zur Arretierung der Zelle am G2/M-Checkpoint bei (FURUKAWA et al. 2000). Ein weiteres Beispiel der Verknüpfungen des Apoptoseweges mit DNA-Reparatur und Zellzyklus stellt die ATM-abhängige Regulation der c-Abl-Tyrosinkinase dar (SHAFMAN et al. 1997), die nach DNA-Schädigung über den JNK/SAPK-Komplex (JNK, c-Jun N-terminale Kinase; SAPK, Stress-Activated Protein Kinase) die Hemmung von Bcl-x(L) vermittelt (KHARBANDA et al. 1998). Zugleich inhibieren sowohl die c-Abl-Kinase, als auch Bcl-2 die Induktion des HR-Reparaturweges durch Modifikation des RAD51-Proteins, was dessen Bindung an einzelsträngige DNA-Stränge verhindert. Nach ionisierender Strahlung kann der JNK/SAPK-Apoptoseweg auch – als Alternative zu einem Zellzyklus-Arrest am G2/M-Checkpoint – durch eine BRCA1-induzierte Aktivierung des GADD45-Proteins (GADD45, „growth arrest and DNA damage inducible protein“) eingeleitet werden; die Rolle des ATM-Proteins ist in diesem Zusammenhang noch zu klären.

Der zweite, sogenannte „**Death Receptor**“-aktivierte Apoptoseweg involviert die „Death Receptor“-Liganden FasL, TRAIL (TNF α -Related Apoptosis Inducing Ligand) und TNF α Tumornekrosefaktor α) sowie deren Rezeptoren Fas, DR5 und TNF-R1, die über die Caspase 8 ebenfalls weitere Effektor-Caspasen aktivieren. Da in ATM-defizienten Zellen die Regulierung der DR5-Expression defekt ist, wird für den ATM/p53-abhängigen Signaltransduktionsweg auch eine Rolle in „Death Receptor“-vermittelter Apoptose vermutet (WU et al. 1999). An der Induktion der Caspase 8 sind offensichtlich je nach Art des genotoxischen Einflusses verschiedene DNA-Reparaturproteine beteiligt: eine IR-induzierte Caspase 8-Aktivierung involviert ATM und FANCC, während die Aktivierung nach MMC-Behandlung unabhängig von ATM erfolgt (VIT et al. 2001). Studien an Fanconi Anämie-Zellen ergaben außerdem einen regulatorischen Einfluß von FANCC auf die IR- oder MMC induzierte Regulation der Caspase-3 (GUILLOUF et al. 2000).

1.5 CARETAKER-GEN-SYNDROME

Unter den autosomal rezessiven Krankheiten zeichnen sich die Caretaker-Gen-Syndrome besonders durch genomische Instabilität, erhöhte Prädisposition zur Entstehung von Neoplasien und eine frühe Sterblichkeit der Patienten aus. Zur Gruppe dieser Syndrome gehören Ataxia Telangiectasia (AT), Nijmegen Breakage Syndrom (NBS), Fanconi Anämie (FA), Werner Syndrom (WS), Bloom Syndrom (BS), Cockayne Syndrom (CS), Trichothiodystrophie (TTD), Xeroderma pigmentosum (XP), Li Fraumeni Syndrom und die BRCA1-Defizienz (BRCA1, „breast cancer associated protein 1“). Einige Syndrome wie etwa AT, ATLD, NBS, WS und BS werden als monogene Krankheiten eingestuft, während bei anderen Syndromen wie FA und XP mehrere verantwortliche Gene identifiziert wurden (Tab. 1). Die betroffenen Gene bzw. Proteine haben häufig zentrale Funktionen bei zellulären Mechanismen, die zum Erhalt der genomischen Integrität beitragen, wie z.B. DNA-Reparatur, Kontrolle des Zellzyklus und Induktion apoptotischer Signaltransduktionswege und durch ein überaus komplexes Netzwerk untereinander verknüpft sind.

Tab. 1: Übersicht menschlicher Caretaker-Gen-Syndrome und der bisher identifizierten Gene

SYNDROM	GEN(E)
Ataxia Telangiectasia	<i>ATM</i> (<u>A</u> taxia <u>T</u> elangiectasia <u>M</u> utated)
ATLD (AT-like disorder)	<i>MRE11</i>
Nijmegen breakage syndrom	<i>NBS1</i>
Fanconi Anämie	<i>FANCA, FANCB, FANCC,</i> <i>FANCD1, FANCD2, FANCE</i> <i>FANCF, FANCG</i>
Werner Syndrom	<i>WRN</i> (Werner helicase)
Bloom Syndrom	<i>BLM</i> (Bloom helicase)
Cockayne Syndrom	<i>CS-A, CS-B</i> <i>XP-B, XP-D</i>
Xeroderma pigmentosum	<i>XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E,</i> <i>XP-F, XP-G</i>
Trichothiodystrophie	<i>XP-B</i> <i>XP-D</i> <i>TTD-A</i>
erblicher Brustkrebs	<i>BRCA1</i>
Li Fraumeni Syndrom	<i>p53</i>

1.5.1 Ataxia Telangiectasia (AT)

1.5.1.1 Klinischer AT-Phänotyp

AT ist eine sehr seltene autosomal rezessive Erkrankung mit einer Häufigkeit von 1:130 000, wobei der Anteil der heterozygot Betroffenen in der Bevölkerung bei etwa 1% liegt. Das verantwortliche Gen, *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated), wurde 1995 von SAVITZKY et al. identifiziert. Auf klinischer Ebene zeichnet sich AT durch progressive neuromotorische Dysfunktionen, Telangiektasien (erweiterte Blutgefäße) in den Augen und Teilbereichen des Gesichts, Thymusdegeneration, verzögertes Wachstum, Hypogonadismus und Progerie aus. Aufgrund der fortschreitenden zerebellären Ataxie sind AT-Patienten häufig schon im Kindesalter auf den Rollstuhl angewiesen. Zelluläre und humorale Immundefizienzen, insbesondere erniedrigte Konzentrationen an IgA, IgG2 und IgE, führen zu wiederholt auftretenden sinopulmonaren und gastrointestinalen Infektionen. Gleichzeitig liegen bei AT-Patienten oft erhöhte Konzentrationen an IgM vor, die möglicherweise teilweise als Ausgleich der anderen Immunglobulindefizienzen dienen. Ebenfalls erhöht ist zumeist die α -Fetoprotein-Konzentration, die ebenfalls inhibitorischen Einfluß auf das Immunsystem hat (WALDMANN und McINTIRE 1972). Typisch für AT ist eine stark erhöhte Prädisposition zu Krebs (mehrere 100-fach), insbesondere zu Lymphomen und lymphozytären Leukämien, an denen 10% der Patienten bereits im frühen Kindesalter erkranken. Die Tumorzellen tragen häufig Rearrangements in den Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgenen, die durch Translokationen zwischen den Chromosomen 7 und 14 entstehen.

Bei heterozygoten Trägern von *ATM*-Mutationen wird seit einigen Jahren eine erhöhte Inzidenz in Zusammenhang mit Brustkrebs diskutiert (ATHMA et al. 1996, SWIFT und SU 1999). Anfängliche Untersuchungen ließen unter Brustkrebspatienten einen Anteil AT-Heterozygoter von über 6 % vermuten; diese Schätzungen erwiesen sich jedoch mittlerweile als erhöht (LAVIN 1998, OLSEN et al. 2001). Die Entstehung einiger Tumorarten geht häufig mit dem Verlust eines *ATM*-Allels (Brustkrebs, Ovarialkarzinome) und/oder Mutationen im *ATM*-Gen einher, wie etwa bei prolymphozytärer T-Zell-Leukämie (T-PLL), akuter lymphoblastoide T-Zell-Leukämie (T-CLL), chronischer lymphozytärer B-Zell-Leukämie (B-CLL) und bei Mantelzell-Lymphomen (MCL). Neben klassischen AT-Phänotypen existiert eine Reihe sogenannter „AT-Varianten“, die in bestimmten Charakteristika vom klassischen Erscheinungsbild abweichen, darunter AT-Patienten ohne Teleangiektasien, ohne erhöhte α -Fetoproteinkonzentrationen, ohne immunologische Defekte oder solche, die den AT- mit dem ohnehin verwandten NBS-Phänotyp verbinden („AT-Fresno“) (CURRY et al. 1989). Diesen Syndromen könnten sowohl „milde“ Mutationen im *ATM*-Gen (McCONVILLE et al. 1996, GILAD et al 1998), als auch Mutationen in anderen, funktionell verwandten Proteinen zugrunde liegen (STEWART et al. 1999 und Kapitel 4.2.2).

1.5.1.2 Zellulärer AT-Phänotyp

Der zelluläre AT-Phänotyp zeichnet sich durch einige typische Charakteristika aus, die weitgehend mit denen des Nijmegen Breakage Syndroms (NBS) überlappen. AT-Zellen zeigen Chromosomenaberrationen, insbesondere Telomerfusionen, Inversionen und Translokationen, die häufig die Chromosomen 2 (2p11), 7 (7q35, 7p14), 14 (14q11, 14q32) und 22 (22q11) betreffen (KOJIS et al. 1991). Innerhalb dieser Regionen liegen auf den Chromosomen 7 und 14 die T-Zell-Rezeptor- und Immunglobulin-Gene, deren Störung mit den humoralen und zellulären Immundefekten bei AT-Patienten in Zusammenhang gebracht wird. AT-Zellen sind extrem sensitiv gegenüber genotoxischen Agenzien, die DNA-Doppelstrangbrüche auslösen, wie etwa ionisierende Strahlung, radiomimetische Substanzen (MMS) oder freie Sauerstoffradikale, nicht aber gegenüber UV-Strahlung (DNA-Einzelstrangbrüche) oder alkylierenden Agenzien (DNA-Quervernetzungen). Nach Bestrahlung zeigen AT-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine stark erhöhte Chromosomenbruchrate, was zur Diagnose einer Ataxia Telangiectasia als Kriterium herangezogen wird.

Darüberhinaus konnten in AT-Zellen regulatorische Defekte in allen drei Zellzyklus-Checkpoints, G1/S, S und G2/M nachgewiesen werden. Typisch für AT-Zellen ist dabei die sogenannte strahlenresistente DNA-Synthese („Radioresistant DNA Synthesis“, RDS), da vor der Replikation kein Zellzyklusarrest zur Einleitung der DNA-Reparatur stattfindet.

Zur Induktion des G1/S-Checkpoints nach Bestrahlung muss eine Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 entweder direkt durch ATM oder über die zwischengeschaltete CHK2-Kinase erfolgen (KASTAN et al. 1992). In AT-Zellen wird p53 nicht oder nur sehr schwach über den ATR/CHK1-Weg phosphoryliert, was für eine Transaktivierung des Cyclininhibitors p21 nicht ausreicht, so daß die Zelle trotz unreparierter Doppelstrangbrüche zur DNA-Synthese übergeht.

Der Defekt des S-Phase-Checkpoints resultiert aus der fehlenden Aktivierung (Phosphorylierung) der CHK2-Kinase durch ATM. Da die anschließende CHK2-vermittelte Degradation des CDC25 nicht stattfinden kann, durchlaufen AT-Zellen die DNA-Synthesephase ohne Arrest. Der G2/M-Checkpointdefekt in AT-Zellen erweist sich als besonders komplex: paradox erscheint dabei zunächst, daß AT-Zellen, die in der G1- oder S-Phase bestrahlt werden, in G2/M arretieren, während Zellen die in der G2-Phase bestrahlt werden, ungebremst in die Mitose übergehen (BEAMISH und LAVIN 1994, SCOTT et al. 1994). Der Grund hierfür liegt vermutlich in der zellzyklusabhängigen Kontrolle der Checkpoints durch ATM oder ATR. Erfolgt die DNA-Schädigung vor Beendigung der G1- oder S-Phase, wird in Zellen, die die G2-Phase erreichen, hauptsächlich die ATR-Kinase aktiviert, die nachfolgend ATM-unabhängig über die Regulation von CHK1 den G2/M-Block auslöst (GUO et al. 2000, LIU et al. 2000). Die ATM-abhängige Aktivierung von CHK2 hingegen erfolgt hier vermutlich nur sekundär zur Unterstützung der ATR-Kinase. Während der G2-Phase hingegen schaltet die Zelle auf ATM-abhängige Aktivierung des G2/M-Blocks um, so daß AT-Zellen, die in G2 bestrahlt werden, keinen Arrest mehr induzieren können.

Neben seiner wichtigen Funktion bei der Zellzykluskontrolle hat das ATM-Protein weitere regulatorische Aufgaben bei der DNA-Reparatur und reguliert vermutlich nach einem Zellzyklusarrest die Initiierung der HR- und/oder SSA-Reparatur (MORRISON et al. 2000). Die Bildung sogenannter „nukleärer Foci“ ist eine Eigenschaft, die viele Angehörige der drei Doppelstrangbruch-Reparaturwege (NHEJ, HR, SSA) besitzen. Die Foci werden dabei entweder als Orte aktiver DNA-Reparatur (NELMS et al. 1998) oder als irreparable Protein/DNA-Vernetzungen (HAAF et al. 1999) interpretiert. Obwohl ATM selbst nicht in nukleären Foci gefunden wird, reguliert es die Focibildung des NBS1/MRE11/RAD50-Proteinkomplexes (SSA) durch Phosphorylierung des NBS1-Proteins. In AT-Zellen hingegen ist die Focibildung dieser drei Proteine stark reduziert (GATEI et al. 2000, ZHAO et al. 2000), während gleichzeitig erhöhte Konzentrationen des RAD51-Proteins (HR) vorliegen. Die Induktion des RAD51/RAD52-vermittelten HR-Reparaturweges nach Bestrahlung erfolgt ebenfalls über ATM und dessen Interaktionspartner, die c-Abl-Kinase, die mit RAD51 und RAD52 ebenfalls in nukleäre Foci lokalisiert (CHEN et al. 1999a).

Zusammen mit der c-Abl-Kinase ist ATM darüberhinaus auch in die Induktion apoptotischer Signaltransduktionswege wie etwa den des JNK/SAPK-Komplexes involviert. Die mehrfache Phosphorylierung des Tumorsuppressors BRCA1 (Breast Cancer Associated Protein 1) durch ATM nach ionisierender Strahlung hat regulatorische Konsequenzen für Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur (CORTEZ et al. 1999, GATEI et al. 2000) und ist besonders interessant im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen ATM-Mutationen und einer Prädisposition gegenüber Brustkrebs. Eine unerwartete Rolle der ATM-Kinase in Bezug auf „Chromatin Modelling und Remodelling“ nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen konnte von KIM et al. (1999) nachgewiesen werden: Nach Bestrahlung menschlicher Fibroblasten interagiert ATM mit der Histon-Deacetylase 1 (HDAC1), die die Transkription vieler in die Zellzykluskontrolle involvierter Gene, wie etwa p21, p53 oder CyclinA via eine Modifikation der Chromatinstruktur reguliert (STIEGLER et al. 1998, KIM et al. 1999, 2000 und 2001).

Neben wichtigen Funktionen im Zusammenhang mit DNA-DSB-Reparatur und Zellzykluskontrolle hat ATM weitere regulatorische Aufgaben bei rekombinatorischen Vorgängen während der Meiose der Keimbahnzellen. Es kolokalisiert und interagiert mit dem Replikationsprotein A (RPA) sowie mit RAD51, ATR und einem Protein aus dem MMR-Reparaturweg, MLH1, entlang des sogenannten synaptonemalen Komplexes (SC), der in der meiotischen Prophase während der Paarung homologer Chromosomen zu Rekombinationszwecken ausgebildet wird (PLUG et al. 1997). Diese Daten lassen vermuten, daß ATM zusammen mit anderen Proteinen in den Austausch von DNA-Fragmenten zwischen homologen Chromosomen nach der Formierung des SC involviert ist. Zuletzt sei eine weitere mögliche Funktion des ATM-Proteins in Hinblick auf den intrazellulären Vesikel- und/oder Proteintransport erwähnt: LIM et al. (1998) beschreiben die Interaktion von ATM mit α -Adaptin, einem Angehörigen des AP-2-Komplexes, der in die Clathrin-vermittelte Rezeptorendozytose involviert ist sowie dessen Neuronen-spezifischen Homolog α -NAP und spekulieren über den

möglichen Zusammenhang dieser Ergebnisse mit einigen AT-assoziierten phänotypischen Charakteristika, wie etwa die Insulinresistenz von AT-Patienten, das veränderte Aktin-Zytoskelett von AT-Zellen, die humoralen Defekte sowie ein Exozytosedefekt in AT-Lymphozyten.

1.5.1.3 Das ATM-Protein

Das ATM-Protein ist mit 3057 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 360 kDa eines der größten bekannten menschlichen Proteine. Aufgrund der Homologie der carboxyterminalen Region (~350 AS) zur katalytischen Domäne der Phosphatidylinositol-3-Kinasen wird ATM dieser Gruppe zugeordnet, deren Kinaseaktivität in der Phosphorylierung anderer Proteine an Serin- oder Threonin-Positionen besteht (SAVITZKY et al. 1995b). Aufgrund von Sequenzvergleichen werden in die PI3-Kinasefamilie außerdem die zu ATM homologen Proteine DNA-PK und ATR (ATM und RAD3-related Protein) (*homo sapiens*), TEL1 und MEC1 (*S. cerevisiae*), RAD3 (*S. pombe*), Mei-41 (*Drosophila melanogaster*) sowie die Hefeproteine TOR1/TOR2 bzw. deren menschliche Homologe FRAP und RAF1 eingeordnet. Weitere Domänen innerhalb der ATM-Proteinsequenz sind ein Leucinzipper (AS-Position 1217-1238), eine prolinreiche Region (1373-1382) sowie ein sogenanntes helix–turn–helix-Motif (2655-2698). Der Leucinzipper, der bei vielen regulatorischen Proteinen beschrieben ist (CREB, Jun/AP1-Familie), dient vermutlich der Interaktion mit DNA oder anderen Proteinen oder zur Dimerisierung des ATM-Proteins. Die prolinreiche Region mit der Sequenz DPAPNPPHFP interagiert mit der sogenannten SH3-Domäne der c-Abl-Kinase, über die auch andere Proteine wie z.B. AAP1 (ABL-Associated Protein 1) oder Abi-2 (Abl interactor protein 2) mit c-Abl interagieren. Das helix-turn-helix-Motiv wird eigentlich von bakteriellen Transkriptionsregulatoren zur Bindung an doppelsträngige DNA verwendet, es findet sich aber - außer bei ATM - auch in anderen humanen Proteinen wie z.B. CHD-4 (Chromodomain Helicase-DNA-Binding Protein 4). Interaktionen über andere Bereiche der ATM-Sequenz, wie etwa mit p53 über die N-terminalen 246 AS, lassen weitere wichtige Bindedomänen des ATM-Proteins vermuten.

1.5.1.4 Das ATM-Gen

Das *ATM*-Gen erstreckt sich über 150 kb auf Chromosom 11q22-23 und enthält 66 Exons, von denen Exon 12 mit 372 Nukleotiden das größte ist. Sein Primärtranskript hat eine Länge von 13 kb, die kodierende Region ist 9171 bp lang (PLATZER et al. 1997). Über 350 *ATM*-Mutationen wurden bisher identifiziert, sie sind abrufbar im Internet unter www.vmresearch.org/atm.htm. Die Mutationen sind zufällig über die gesamte Region des Gens verteilt und zumeist auf einzelne oder wenige Patienten beschränkt. Ausnahmen in Form sogenannter Gründermutationen finden sich innerhalb einiger Bevölkerungsgruppen, wie z.B. in Tschechien, Norwegen, Polen, Costa Rica oder auf den britischen Inseln.

Über 70 % der Mutationen im *ATM*-Gen führen zu einer Trunkierung und völligen Destabilisierung des ATM-Proteins (GILAD et al. 1996, CONCANNON und GATTI 1997, TELATAR et al. 1998), so daß in den Zellen der meisten klassischen AT-Patienten kein Protein mehr nachgewiesen werden kann. Zu den trunkierenden Mutationen zählen Nonsense-Mutationen sowie Insertionen und Deletionen, die zu einer Verschiebung des Leserasters führen. Ein hoher Anteil solcher Leserasterverschiebungen wird durch Punktmutationen an den Konsensussequenzen der Exon-Intron-Grenzen, den sogenannten Akzeptor- und Donor-Spleißstellen verursacht, wodurch häufig das entsprechende Exon auf mRNA-Ebene deletiert ist (McCONVILLE et al. 1996, BROEKS et al. 1998, TERAOKA et al. 1999).

Betrifft eine Spleißmutation eine weniger konservierte Position innerhalb der Konsensussequenz, besitzt sie möglicherweise keine vollständige Penetranz und resultiert in sogenanntem „leaky splicing“, wodurch noch geringe Mengen an residualem ATM-Protein exprimiert werden können. Einige solcher Mutationen wurden bereits identifiziert und mit einer mildereren und/oder varianten Form von AT in Zusammenhang gebracht. GILAD et al. (1998) fanden in vier Patienten mit verringerter Radiosensitivität die Mutation 3576G→A, die das letzte Nukleotid in Exon 26 betrifft. In Großbritannien zeigen 10–15 % der betroffenen AT-Familien einen mildereren Phänotyp mit „late-onset ataxia“ und geringer Radiosensitivität. Der hier zugrundeliegende Defekt ist eine „leaky“ Spleißmutation im Intron, IVS40+1126AG, die zur Insertion eines zusätzlichen Exons (137 bp) in die kodierende Sequenz der ATM-cDNA führt (McCONVILLE et al. 1996). Beide Mutationen ermöglichen eine geringe Expression des Wildtyp-ATM-Proteins.

Schätzungen anhand der in der ATM-Mutations-Datenbank (www.vmrsearch.org/atm.htm) aufgelisteten Einträge ergeben einen ungewöhnlich hohen Anteil an Spleißmutationen im *ATM*-Gen von über 30 % (TERAOKA et al. 1999), während bei betroffenen Genen anderer menschlicher Erbkrankheiten die Häufigkeit der Spleißmutationen bei nur 15 % liegt (KRAWCZAK et al. 1992).

1.5.2 Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS)

1.5.2.1 Klinischer NBS-Phänotyp

Das sehr seltene autosomal rezessive Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) gehört ebenfalls zur Gruppe der Chromosomenbruchs Syndrome. Das verantwortliche Gen, *NBS1*, wurde 1998 identifiziert (VARON et al. 1998, CARNEY et al. 1998). Da NBS einige zelluläre Eigenschaften mit AT gemeinsam hat, wurde es vor der Identifizierung des *NBS1*-Gens häufig als AT-Variante oder BBS (Berlin Breakage Syndrom) bezeichnet, obwohl sich der klinische Phänotyp klassischer NBS-Patienten deutlich von dem klassischer AT-Patienten unterscheidet. Typisch bei NBS-Patienten sind Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, ein „vogelähnliches“ Gesicht, milde bis moderate geistige Retardierung, kutane Telangiectasien und Cafe-au-lait-Spots sowie kongenitale Fehlbildungen. Defekte des Immunsystems, insbesondere die erniedrigten Konzentrationen an IgA, IgG, IgG2 und IgG4, resultieren in wiederholten sinopulmonaren und gastrointestinalen Infektionen. Im Gegensatz zu AT weisen NBS-Patienten keine erhöhten α -Fetoproteinwerte auf. Die Krebsprädisposition ist besonders gegenüber B-Zell-Lymphomen stark erhöht (CHRZANOWSKA et al. 1995), es werden jedoch auch Leukämien, Gliome, Medulloblastome und Rhabdomyosarkome beschrieben (The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, 2000). Im Kontrast zu AT-Überträgern wurde bei NBS-Heterozygoten kein erhöhtes Brustkrebsrisiko festgestellt (CARLOMAGNO et al. 1999). Auch bei Patienten mit B- oder T-Zell-Lymphomen wurden keine Mutationen im *NBS1*-Gen identifiziert (HAMA et al. 2000, STUMM et al. 2001), dagegen konnten VARON et al. (2001) einen Zusammenhang zwischen Missense-Mutationen im *NBS1*-Gen und einem deutlich erhöhten Risiko für akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter nachweisen.

Wie auch bei Ataxia telangiectasia existieren für das Nijmegen Breakage Syndrom variante Phänotypen, die sich etwa durch fehlende immunologische Defekte (BARBI et al. 1991) oder verringerte Translokationsraten zwischen den Chromosomen 7 und 14 (TUPLER et al. 1997) auszeichnen. Die Identifizierung von Mutationen im *LigaseIV*-Gen bei NBS-ähnlichen Patienten (Dr. Pat Concannon, persönl. Mitteilung) legt nahe, daß neben Mutationen im *NBS1*-Gen auch Defekte in weiteren Angehörigen des NHEJ-Weges für die Ausprägung eines NBS-ähnlichen Phänotyps verantwortlich sein könnten.

1.5.2.2 Zellulärer NBS-Phänotyp

Viele zelluläre Eigenschaften des Nijmegen Breakage Syndroms sind mit denen der Ataxia Telangiectasia identisch, darunter ein verlangsamtes Wachstum der Zellen in Kultur sowie die erhöhten chromosomalen Bruchraten, die nach der Induktion von Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung weiter ansteigen. Die häufigste Chromosomenaberration ist eine Inversion in Chromosom 7, Inv(7)(p13q35), typische Translokationen sind t(7;14)(p13;q11) und t(7;14)(q35;q11).

Weitere Gemeinsamkeiten mit AT sind Defekte in den Zellzyklus-Checkpoints S und G2/M sowie strahlenresistente DNA-Synthese (RDS). Über den Defekt des G1/S-Checkpoint liegen widersprüchliche Daten vor: Während JONGMANS et al. (1997) in NBS-Zellen einen Defekt des G1/S-Checkpoint mit einer stark verzögerten/fehlenden p53-Induktion beschreiben, beobachteten YAMAZAKI et al. (1998) einen korrekten G1/S-Arrest und eine nur leicht verzögerte Induktion von p53. Eine nachfolgende Arbeit beschreibt die p53-Induktion in NBS-Zellen als intermediär zwischen AT- und gesunden Zellen (ANTOCCIA et al. 1999).

Zur Induktion der Zellzyklusarreste sowie der DNA-DSB-Reparatur muß NBS1 von der ATM-Kinase durch Phosphorylierung an Ser343 aktiviert werden. Die defekte Phosphorylierung/Aktivierung der Checkpointkinase CHK2 in NBS-Zellen kann durch Komplementation mit der NBS1-Wildtypsequenz behoben werden, nicht aber durch Transfektion mit einer Ser343-Mutante (BUSCEMI et al. 2001). Studien in *S. cerevisiae* ergaben, daß die Phosphorylierung des CHK2-Homologs RAD53 von einem funktionellen NBS1/MRE11/RAD50-Komplex abhängig ist, nicht jedoch von KU80, RAD51 oder RAD52, was eine spezifische Funktion des N/M/R-Komplexes bei der Induktion der Zellzyklusarreste nach Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen vermuten lässt (GRENON et al. 2001). Darüberhinaus deuten die Interaktion des NBS1 mit E2F-Transkriptionsfaktoren und PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) während der S-Phase auf eine wichtige Rolle des N/M/R-Komplexes bei dem Erhalt genomischer Stabilität durch Regulation und Progression der DNA-Replikation hin. Außerdem haben NBS1 und MRE11 – wie auch ihre Homologe in der Hefe – Einfluß auf den Erhalt der chromosomalen Telomerlänge durch Interaktion mit den Telomer-Repeat-bindenden Faktoren, TRF1 und TRF2, die als „Schutzkappen“ die Telomere vor Degradation bewahren (ZHU et al. 2000).

Neben derartigen Schutzfunktionen hat der N/M/R-Komplex vor allem eine zentrale Bedeutung bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. und wird mittlerweile mit allen drei DNA-DSB-Reparaturwegen, HR, SSA und NHEJ in Verbindung gebracht (IVANOV et al. 1996, MOORE und HABER 1996, LEWIS et al. 1999, KARRAN 2000, DE JAGER et al. 2001). Die Komplexbildung erfolgt durch direkte Bindung von NBS1 und RAD50 an das MRE11-Protein, während die Interaktion zwischen NBS1 und RAD50 nur indirekt verläuft (DOLGANOV et al. 1996, DONG et al. 1999). Nach DNA-Schädigung durch genotoxische Agenzien erfolgt zunächst eine NBS1-abhängige Phosphorylierung von MRE11, die für die anschließende Lokalisierung des Komplexes in nukleäre Foci notwendig ist. Nukleäre Foci werden als Orte aktiver DNA-Reparatur gedeutet, wobei durch die Exonukleaseaktivität des MRE11-Proteins überhängende DNA-Einzelstränge erzeugt werden, deren weitere Prozessierung durch eines der drei DSB-Reparatursysteme erfolgt. In NBS1-defizienten Zellen bleiben MRE11 und RAD50 vorwiegend zytoplasmatisch und bilden keine Foci, obwohl die Bindung zwischen diesen beiden Proteinen nicht gestört ist (CARNEY et al. 1998).

Ähnlich verhält es sich in Zellen von Patienten mit AT-ähnlichem Phänotyp („AT-like disorder“, ATLD), bei denen interessanterweise Mutationen im *MRE11*-Gen identifiziert werden konnten:

residuales MRE11 kann sowohl NBS1, als auch RAD50 binden, dennoch sind weder NBS1 noch MRE11 zur IR-induzierten Focibildung fähig (STEWART et al. 1999). Da in ATLD-Zellen auch die intrazellulären Konzentration an NBS1 und RAD50 erniedrigt sind, führen Veränderungen in einem Mitglied des Komplexes möglicherweise zu einer Destabilisierung der übrigen Komplexproteine. Interessanterweise ist in ATM-defizienten Zellen die Focibildung des N/M/R-Komplexes stark reduziert, aber nicht völlig aufgehoben (MASER et al. 1997, STEWART et al. 1999). Der enge funktionelle Zusammenhang zwischen den drei Proteinen ATM, NBS1 und MRE11 sowie die starke phänotypische Überlappung in AT-, NBS- und ATLD-Zellen legen nahe, bei Patienten mit AT- oder NBS-ähnlichem Phänotyp nach Defekten in funktionell verwandten Genen zu suchen.

1.5.2.3 Das *NBS1*-Gen

Das *NBS1*-Gen wurde 1998 von VARON et al. identifiziert. Es liegt auf Chromosom 8q21 und erstreckt sich über eine Länge von 50 kb. Die kodierende Region umfasst 2265 bp und setzt sich aus 16 Exons zusammen. Im Gegensatz zum *ATM*-Gen, über das die Mutationen gleichmäßig verteilt sind, haben über 90 % aller NBS-Patienten dieselbe Mutation im *NBS1*-Gen: 657del5 (ACAAA), die in einer Leserahmenverschiebung und vorzeitiger Trunkierung des Translationsproduktes resultiert. Diese Gründermutation wird auch als „slavische Mutation“ bezeichnet, da Zentraleuropa (v.a. Polen und Tschechien) mit Hilfe von Haplotyp Mapping-Analysen als ihre Ursprungsregion identifiziert werden konnte (VARON et al. 1998). Die übrigen bisher identifizierten Mutationen sind im Internet unter www.vmaresearch.org/nbs.htm aufgelistet, sie umfassen drei weitere Deletionen, eine Insertion und eine Nonsense-Mutation. Einige Basensubstitutionen, die in einem Aminosäureaustausch resultieren, wurden bei heterozygoten Trägern mit akuter lymphoblastischer Leukämie korreliert, darunter S93L, D95N und I171V.

1.5.2.4 Das *NBS1*-Protein

Das *NBS1*-Protein hat eine Länge von 754 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 85 kDa. Es besitzt zwei Domänen: eine „Forkhead-associated“-Domäne (FHA, AS-Position 24 – 83) und eine „Breast cancer carboxy-terminal“-Domäne (BRCT, AS-Position 113 – 182). Die FHA-Domäne ist hauptsächlich bei Proteinkinasen, wie z.B. den Checkpoint-Kinasen Rad53 (*S. cerevisiae*) und cds1 (*S. pombe*) sowie bei einigen Transkriptionsfaktoren zu finden und vermittelt vermutlich spezifische Phospho-Serin- bzw. -Threonin-Interaktionen (HOFMANN und BUCHER 1995, DUROCHER et al. 1999). Die BRCT-Domäne ist typisch für Proteine, die in die Regulierung der Zellzyklus-Checkpoints nach DNA-Schädigung involviert sind (BORK et al. 1997), wie etwa XRCC1, DNA Ligase III und IV. Interessanterweise hat das *NBS1*-Protein keinerlei Homologien zu weiteren bekannten Proteinen, während die meisten anderen DNA-DSB-Reparaturproteine, wie auch die zwei anderen Komponenten des N/M/R-Komplexes, MRE11 und RAD50, hochkonservierte Homologien zu Proteinen in der

Bäckerhefe aufweisen. Funktionelle Homologie scheint aber zu Xrs2 aus *S. cerevisiae* zu bestehen, das im Komplex mit Mre11 und Rad50 äquivalente Aufgaben erfüllt. Die Aktivierung des NBS1-Proteins durch die ATM-Kinase erfolgt durch Phosphorylierung an Ser343 und ist die Voraussetzung für einen funktionellen S-Phase-Arrest nach DNA-Schädigung und die Induktion der DNA-DSB-Reparatur. Die Phosphorylierung ermöglicht die Komplexbildung mit den Proteinen MRE11 und RAD50, von denen allerdings nur MRE11 direkt mit NBS1 interagiert. Verschiedene Bereiche der NBS1-Sequenz sind für die MRE11-Bindung, die nukleäre Lokalisation des Proteins sowie die Fähigkeit zur Focibildung verantwortlich (DESAI-MEHTA et al. 2001, TAUCHI et al. 2001). Der C-terminale Bereich ist für die Bindung des MRE11-Proteins sowie die DNA-Reparaturaktivität des N/M/R-Komplex unabdingbar, gleichzeitig sind aber NBS1-Fragmente mit einer Deletion der C-terminalen 100 Aminosäuren durchaus noch zur nukleären Lokalisation und Focibildung imstande. Umgekehrt kann ein NBS1-Fragment mit einer Deletion der N-terminalen 400 Aminosäuren (NBS1-Fragment 354 – 754) noch MRE11 und RAD50 in den Kern rekrutieren. Obwohl hier eine Komplementation der Strahlensensitivität beobachtet wird (DESAI-MEHTA et al. 2001), ist die Fähigkeit zur Focibildung gestört. Diese Ergebnisse legen nahe, daß NBS1 sowohl für die Kern-Rekrutierung, als auch die Fociformierung des N/M/R-Komplexes verantwortlich ist. Für eine funktionelle DNA-Reparatur und das Überleben der Zelle nach ionisierender Strahlung ist die direkte Interaktion zwischen NBS1 und MRE11 nötig.

Bezüglich der Lokalisation der Proteine MRE11 und RAD50 in Zellen von NBS-Patienten, existieren gegenwärtig widersprüchliche Daten. CARNEY et al. (1998) konnten in keiner der im Rahmen ihrer Arbeit untersuchten NBS-Linien residuales NBS1-Protein detektieren und beobachteten für MRE11 und RAD50 eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisierung. MASER et al. (2001) zeigten jedoch, daß in Zellen von NBS-Patienten, die homozygot für die Gründermutation 657del5 sind (was für 90 % aller NBS-Patienten gilt), zwei kleinere NBS1-Fragmente exprimiert werden. Das kleinere Fragment, NBS1^{p26}, resultiert aus der Translation der Gensequenz vor der 5 bp-Deletion, während das größere, NBS1^{p70}, durch die Verwendung eines alternativen Startcodons innerhalb des verschobenen Leserahmens der Gensequenz nach der Deletion mit einem zusätzlichen N-terminalen Bereich entspricht. In 657del5-Zellen zeigen NBS1^{p70}-Färbungen eine überwiegend nukleäre Lokalisation, für MRE11 wird eine etwa 50 %ige Kernlokalisierung beschrieben.

Derartige Mutationen, die in einem sogenannten hypomorphen Defekt resultieren und die Expression eines Proteinfragmentes mit residualer Funktionstüchtigkeit erlauben, wurden auch für Zellen von ATLD-Patienten mit Mutationen im MRE11-Gen beschrieben. Da Knockout-Mutationen in *NBS1*, *MRE11* oder *RAD50* bei Mäusen oder Hamstern lethale Folgen haben, liegt die Vermutung nahe, daß hypomorphe Defekte in diesen Gene die Voraussetzung für die Überlebensfähigkeit eines Embryos darstellen. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Auswirkungen der übrigen Mutationen (Deletionen und Insertionen), die in Zellen von NBS-Patienten identifiziert wurden.

1.5.3 Fanconi Anämie (FA)

1.5.3.1 Klinischer FA-Phänotyp

Zum typischen klinischen Erscheinungsbild der Fanconi Anämie (FA) gehören Wachstumsretardierung, Fehlentwicklungen des Skeletts wie z.B. fehlende oder abnorme Radien und Daumen, Fehlentwicklungen von Herz und Niere, Hypogonadismus und eingeschränkte Fertilität, Hyper- oder Hypopigmentierung und Cafe-au-lait-Spots. Besonders prominent ist eine Fehlentwicklung der hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks, die sehr häufig in einer sogenannten aplastischen Anämie, d.h. einem Mangel an allen Blutzelltypen, resultiert (JOENJE und PATEL 2001). Wie bei AT weist das Blutserum von FA-Patienten erhöhte α -Fetoproteinwerte auf (CASSINAT et al. 2000). Typisch ist außerdem die Prädisposition zu bestimmten Krebsarten, insbesondere zu akuter myeloischer Leukämie (AML) und Schwammzellkarzinomen. Die Häufigkeit der Fanconi Anämie liegt bei etwa 1-5/Mio, die Häufigkeit der heterozygoten Überträger wird auf 0.3-1 % geschätzt. Für Heterozygote wurden bisher eine erhöhte Prädisposition zu AML (XIE et al. 2000) und zu familiärer T-ALL (akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie) (RISCHEWSKI et al. 2000) festgestellt.

1.5.3.2 Zellulärer FA-Phänotyp

Obwohl mindestens acht verantwortliche FA-Gene existieren, ist der zelluläre Phänotyp der einzelnen Komplementationsgruppen recht homogen. FA-Zellen zeigen eine erhöhte spontane Chromosomenbruchrate, die bei 1-3 Brüchen pro Zelle liegt und zu charakteristischen Chromosomenaberrationen, wie etwa Ringchromosomen und Quadriradialfiguren führt. Im Gegensatz zu AT oder NBS sind FA-Zellen besonders sensitiv gegenüber bifunktionell alkylierenden Agenzien wie Mitomycin C (MMC), Diepoxybutan (DEB) oder Cisplatin, die Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen auslösen und die chromosomale Bruchrate stark erhöhen. Ebenfalls typisch für FA-Zellen ist eine abnorme Verzögerung der G2-Phase: bis zu 45% aller FA-Zellen arretieren unter physiologischen Sauerstoffbedingungen vorübergehend oder dauerhaft in der G2-Phase des Zellzyklus, 25% bereits nach Durchlaufen der ersten Teilungsrunde (KUBBIES et al. 1985, SABATIER und DUTRILLAUX 1988, SEYSCHAB et al. 1995), die sich nach Induktion von DNA-Quervernetzungen noch deutlicher darstellt (BERGER et al. 1993). Erst kürzlich konnte die Ursache der G2-Phasenverzögerung auf einen Defekt des S-Phasen-Checkpoint zurückgeführt werden: Fanconizellen arretieren nach Behandlung mit quervernetzenden Agenzien (MMC, DEB, Psoralenderivate) nicht in der S-Phase, sondern betreiben sogenannte Schadens-resistente DNA-Synthese („Damage Resistent DNA Synthesis“, DRDS). Da die DNA-Schäden während der Replikation unrepariert bleiben und die Replikationsmaschinerie selbst anfällig für Mutationen ist, kommt es zu einer weiteren Anhäufung von DNA-Läsionen, die schließlich am G2/M-Kontrollpunkt

erkannt werden und zu einer Akkumulation arretierter Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus führen (CENTURION et al. 2000, SALA-TREPAT et al. 2000).

Defekte der beiden anderen Zellzyklus-Checkpoints, G1/S und G2/M konnten bisher in FA-Zellen nicht identifiziert werden (JOHNSTONE et al. 1997, HEINRICH et al. 1998). Wie die FA-Proteine in die Arretierung der Zelle nach DNA-Schädigung involviert sind, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt, allerdings lassen sowohl die Interaktion von FANCC mit CDC2/CyclinB (KRUYT et al. 1997, KUPFER et al. 1997) sowie die post-transkriptionelle, Zellzyklus-abhängige Regulation der FANCC-Expression (HEINRICH et al. 2000) eine Rolle der FA-Proteine bei der Zellzykluskontrolle vermuten.

Eine zentrale Funktion des FANCC-Proteins wird v.a. auch bei der Regulierung apoptotischer Signaltransduktionswege diskutiert. FANCC-Zellen schlagen nach MMC-Behandlung im Anschluss an den G2-Phasen-Arrest einen p53-unabhängigen Apoptoseweg ein (ROSSELLI et al. 1995, KRUYT et al. 1996), obwohl die hohe Apoptoserate der Zellen nicht in direktem Zusammenhang mit der MMC-Hypersensitivität steht (RIDET et al. 1997). Stark erhöhte Apoptoseraten nach einer Behandlung hämatopoietischer Vorläuferzellen der Komplementationsgruppe C mit zytotoxischen Agenzien wie IFN- γ oder TNF- α legen eine Verbindung zwischen FANCC und dem „Death receptor“-vermittelten Apoptoseweg nahe (KOH et al. 1999); unterstützt wird diese These durch die Tatsache, daß die Überexpression des FANCC-Proteins eine Fas-abhängige Induktion des Apoptoseweges verhindern kann (WANG et al. 1998).

Weitere Untersuchungen zeigten, daß FANCC einen vermutlich inhibitorischen direkten oder indirekten Einfluß auf die Aktivierung der Caspase 8 hat (RATHBUN et al. 2000) und möglicherweise als Schalterelement der Zelle die Entscheidung zwischen Nekrose- und Apoptose-Mechanismen mitträgt (GUILLOUF et al. 1999). Als direkte Interaktoren des FANCC-Proteins wurden in diesem Zusammenhang bisher zwei Proteine mit anti-apoptotischer Funktion identifiziert: das HSP70-Chaperon, das Zellen vor Hitze-induzierter Apoptose schützt (HSP70, Heat Shock Protein 70) sowie GSTP1 (Glutathion S-Transferase Protein1-1), welches eine Schutzfunktion bei oxidativem Stress innehat. Interessanterweise ist die extreme Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress ein weiteres Merkmal aller FA-Komplementationsgruppen. Es gibt Hinweise darauf, daß nach einer Behandlung der FA-Zellen mit MMC oder DEB nicht die resultierenden DNA-Quervernetzungen, sondern die intrazelluläre Generierung von Sauerstoffradikalen unter physiologischen Bedingungen (20 % O₂) für die extreme Sensitivität der Zellen gegenüber diesen Agenzien verantwortlich ist. Eine MMC-Behandlung der FA-Zellen bei 5 % O₂ oder eine Überexpression von Antioxidantien, wie etwa Thioredoxin, behebt die Sauerstoffsensitivität bei FA-Zellen (CLARKE et al. 1997, RUPPITSCH et al. 1998). Die inhibitorische Wirkung von FANCC auf die NADPH-Cytochrome-P450 Reduktase, einem Enzym, das intrazellulär toxische Sauerstoffradikale produziert, weist auf eine antioxidative Wirkung des FANCC-Proteins hin (KRUYT und YOUSSEFFIAN 2000).

Als eine der wichtigsten Funktionen wird für die FA-Proteine, wie bei allen Chromosomenbruchsyndromen, eine Rolle bei der DNA-Reparatur vermutet. Von verschiedenen Gruppen wurde ein Modell entwickelt, demzufolge nacheinander die FA-Proteine FANCA, FANCG, FANCC, FANCE und FANCF zu einem nukleären Komplex zusammenfinden (DE WINTER et al. 2000 c, GARCIA-HIGUERA et al. 2000) und gemeinsam das FANCD2-Protein aktivieren (GARCIA-HIGUERA et al. 2001). Da FANCA, FANCC und FANCG sowohl nukleäre, als auch zytoplasmatische Lokalisierung zeigen, geht man davon aus, daß diese drei Proteine bereits im Zytoplasma komplexieren (GARCIA HIGUERA et al. 1999). Im ersten Schritt erfolgt eine Bindung zwischen FANCG und FANCA, die sich gegenseitig stabilisieren (CHRISTIANSON und BAGBY 2000, GARCIA-HIGUERA et al. 2000, REUTER et al 2000). Zur Bindung von FANCC sowie zur Rekrutierung der drei Proteine FANCA, FANCG und FANCC in den Zellkern muß FANCA durch einen bisher unbekanntem Interaktor phosphoryliert werden (YAMASHITA et al. 1998), dies könnte möglicherweise durch das noch nicht identifizierte FANCB geschehen. Nach der Lokalisierung des Dreierkomplexes in den Kern erfolgt die Bindung von FANCE an FANCC und FANCF and FANCG (DE WINTER et al. 2000 c, MEDHURST et al. 2001). Für eine zentrale Rolle dieses Komplexes aus fünf FA-Proteinen bei der DNA-Reparatur wurden erst durch die Identifizierung und Charakterisierung des FANCD2-Proteins (TIMMERS et al. 2001, GARCIA-HIGUERA et al. 2001) konkrete Hinweise gefunden. Das FANCD2-Protein wird nach DNA-Schädigung der Zelle durch MMC oder ionisierende Strahlung über Monoubiquitinierung an Lys561 durch ein noch nicht identifiziertes Protein modifiziert und aktiviert. Diese Aktivierung geschieht in Abhängigkeit von einem funktionellen FA-Komplex, da in FA-Zellen der Komplementationsgruppen A, C, E, F und G keine Modifizierung von FANCD2 stattfindet (GARCIA-HIGUERA et al. 2001). Das aktivierte FANCD2 wandert anschließend in nukleäre Foci, wo es mit BRCA1 kolokalisiert. Das BRCA1-Protein gehört zur Gruppe der Caretaker-Proteine und ist neben seiner Funktion bei der Zellzykluskontrolle und Apoptose in verschiedene DNA-DSB-Reparatursysteme involviert, darunter auch in NER und homologe Rekombinations-Reparatur (HRR) (DE SILVA et al. 2000, WANG et al. 2001, DRONKERT und KANAAR 2001). die auch an der Behebung sogenannter „interstrand crosslinks“ (ICLs) beteiligt sind. Da der Defekt der ICL-Reparatur charakteristisch für FA-Zellen ist, existiert möglicherweise eine Verbindung zwischen den FA-Proteinen und der homologen Rekombinations-Reparatur, bei der das RAD51-Protein eine zentrale Rolle spielt.

Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang die Angehörigen der RAD51-Proteinfamilie, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3, die mit RAD51(A) in einem Komplex zusammenarbeiten (SCHILD et al. 2000) und zur Erhaltung der chromosomalen Stabilität von Bedeutung sind (CUI et al. 1999, TAKATA et al. 2000). Studien an Knockout-Hühnerzelllinien, bei denen jeweils eines dieser Gene ausgeschaltet wurde, konnten zeigen, daß die Knockout-Hühnerzellen eine extreme Sensitivität gegenüber ICL-induzierenden Agenzien wie MMC oder DEB besitzen und keine RAD51-Foci bilden können (CUI et al. 1999, TAKATA et al. 2001).

Eine Beteiligung der FA-Proteine an der Erhaltung genomischer Stabilität könnte neben einer direkten Beteiligung an bestimmten DNA-Reparaturwegen, Zellzykluscheckpoints und Apoptoseregulation auch indirekt über sogenannte Chromatin Modelling-/Remodelling-Mechanismen geschehen. Die Packungsdichte des Chromatins beeinflusst die Interaktionen der DNA-Reparaturproteine und Transkriptionsfaktoren mit geschädigter DNA. HOATLIN et al. (1999) konnten zeigen, daß FANCC mit dem transkriptionellen Repressor FAZF interagiert, dessen Homolog PLZF bestimmte Regionen der CpG-Inseln bindet und mit HDAC1 (Histon-Deacetylase 1) interagiert. In einer „Yeast Two Hybrid“-Studie wurden mehrere Interaktoren von FANCA, FANCC und FANCG identifiziert, die eine Rolle im Chromatin Remodelling spielen (Tanja Reuter, Dissertation 2000). Eine Fraktionierung zellulärer Bestandteile ergab eine Bindung der FA-Proteine FANCA, FANCC und FANCG an Chromatin und nukleäre Matrix, die durch MMC-Behandlung der Zellen noch verstärkt wird. In meiotischen Zellen allerdings werden die FA-Proteine vom Chromatin getrennt und sind auch in nukleären Matrix-Fractionen nicht nachweisbar (QIAO et al. 2001).

1.5.3.3 Die Fanconi-Gene und ihre Proteine

Von den acht bekannten FA-Komplementationsgruppen (FAA, B, C, D1, D2, E, F und G) konnten bisher sechs FA-Gene, *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF* und *FANCG* identifiziert werden. Die Häufigkeit der identifizierten Mutationen ist unter den Komplementationsgruppen nicht homogen verteilt: zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden die meisten Mutationen im *FANCA*-Gen gefunden, gefolgt von *FANCG*, *FANCC*, *FANCF*, *FANCD2* und *FANCE* (Tabelle 1).

Die FA-Proteine weisen mit Ausnahme von FANCD2 keinerlei Homologien zu anderen bekannten Proteinen auf. Das humane FANCD2 hingegen ist hochkonserviert in *A. thaliana*, *C. elegans* und *Drosophila*. Das Modell der Zusammensetzung des FA-Komplexes ist in Abb. 1 dargestellt. Obwohl FANCB und FANCD1 noch nicht identifiziert werden konnten, vermutet man für FANCB eine Rolle in der Phosphorylierung des FANCA-Proteins (Abb. 1) (DE WINTER et al. 2000 c), während für FANCD1 bei der DNA-Reparatur eine FANCD2-vermittelte Funktion postuliert wird (GROMPE und D'ANDREA 2001).

1.6 Problemstellungen – molekulargenetische und funktionelle Studien an drei Caretaker-Gen-Syndromen

Die Caretaker-Gene spielen eine zentrale Rolle bei der Erhaltung genomischer Stabilität. Mutationen in einigen dieser Gene sind mit den sogenannten Chromosomenbruchsyndromen assoziiert. Obwohl jedem dieser Syndrome unterschiedliche Gendefekte zugrundeliegen, gibt es auffällige Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen zellulären Phänotypen, zu denen diverse Defekte in DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Steuerung apoptotischer Vorgänge zählen. Diese Gemeinsamkeiten sind vor allem auf die funktionelle Verknüpfung der komplex regulierten Signalwege zurückzuführen, in die die Caretaker-Proteine involviert sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Studien an den beiden eng verwandten Syndromen Ataxia Telangiectasia (AT) und Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) sowie an dem ebenfalls zu AT in Verbindung stehenden Syndrom Fanconi Anämie (FA) durchgeführt.

1.6.1 Ataxia Telangiectasia: Identifizierung und Charakterisierung seltener Spleißmutationen im *ATM*-Gen

Im *ATM*-Gen wurden bisher über 300 verschiedene Mutationen identifiziert, von denen 60 – 70 % in einer Trunkierung des *ATM*-Proteins resultieren. Aus den Einträgen der *ATM*-Mutations-Datenbank geht hervor, daß ein signifikanter Anteil der Aberrationen aus Exondeletionen und kleineren Deletionen/Insertionen direkt an den Exongrenzen besteht. Obwohl die jeweils zugrundeliegende Mutation auf genomischer Ebene häufig nicht identifiziert wurde, liegt die Vermutung nahe, daß es sich hier in vielen Fällen um Spleißmutationen handelt. Unter dieser Annahme läge der Anteil an Spleißmutationen im *ATM*-Gen mit 30 – 35 % weit über dem anderer betroffener Gene mit nur ~15 % (KRAWCZAK et al. 1992).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob das *ATM*-Primärtranskript eine besondere Labilität gegenüber Mutationen an den Spleißstellen der Exon-Intron-Grenzen aufweist. Möglicherweise führen im *ATM*-Gen auch Veränderungen an weniger konservierten Positionen innerhalb der Spleiß-Konsensussequenzen zu völlig aberrantem Spleißen, die in anderen Genen keine oder nur partielle Penetranz besitzen.

Um dieser Frage nachzugehen, sollte zunächst in Zellen von 20 AT-Patienten mit Hilfe des „Protein Truncation Test“ (PTT) eine Mutationssuche auf cDNA-Ebene durchgeführt werden, um sämtliche Veränderungen des Spleißmusters zu detektieren. Anschließend sollten die zugrundeliegenden Mutationen auf genomischer Ebene identifiziert und mit Hilfe des „RNA splice scoring“-Systems näher charakterisiert werden. Zusätzlich sollte anhand quantitativer PCR die Penetranz der jeweiligen Spleißmutation bestimmt und die Möglichkeit des „leaky splicing“ evaluiert werden. Die Auswirkung der Mutationen auf Proteinebene sollte zusätzlich durch Western Blotting überprüft werden.

1.6.2 Nijmegen Breakage Syndrom: Suche nach neuen Genen bei Patienten mit NBS-und NBS-ähnlichem Phänotyp

Über 90 % aller NBS-Patienten haben Mutationen im *NBS1*-Gen. Das NBS1-Protein ist vielfach von einer Aktivierung durch die ATM-Kinase abhängig und steht in direktem funktionellen Zusammenhang mit zwei weiteren Proteinen, MRE11 und RAD50, mit denen es nach DNA-Schädigung im Komplex in sogenannte nukleäre Foci wandert und aktiv an allen drei bekannten Systemen der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (HR, NHEJ und SSA) beteiligt ist. Die Identifizierung von Mutationen im *MRE11*-Gen bei Patienten mit AT-ähnlichem Phänotyp zeigt die enge Verbindung zwischen diesen Proteinen und legt die Vermutung nahe, daß Defekte in funktionell verwandten Proteinen einen NBS-artigen Phänotyp verursachen können. Die Identifizierung von Mutationen im *DNA-LigaseIV*-Gen bei NBS-Patienten (Dr. Pat Concannon, pers. Mitteilung) macht die übrigen Proteine des „non-homologous end-joining“-Reparaturweges (NHEJ) besonders interessant.

Zur Identifizierung neuer NBS-Gene sollte im Rahmen dieser Arbeit bei fünf Patienten mit NBS-artigem oder -ähnlichem Phänotyp in relevanten Genen/Proteinen durch direkte Sequenzierung/Western Blot-Analyse nach Defekten gesucht werden. Als potentielle Kandidaten wurden die Gene *MRE11*, *RAD50*, *DNA-LigaseIV*, *XRCC4*, *KU70* und *KU80* ausgewählt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ferner in der Gruppe von Dr. Thilo Dörk (Medizinische Hochschule Hannover) bei einer Patientin mit NBS-ähnlichem Phänotyp ein Defekt im *RAD50*-Gen identifiziert. Zur näheren Charakterisierung des zellulären Phänotyps sollte im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung der RAD50-Defizienz auf die intrazelluläre Verteilung und Focibildung der beiden RAD50-Komplexparker NBS1 und MRE11 untersucht werden.

1.6.3 Fanconi Anämie: Suche nach einer funktionellen Verknüpfung der FA-Proteine zum System der homologen Rekombinationsreparatur

Obwohl mittlerweile sechs der mindestens acht FA-Gene identifiziert wurden, ist die Funktion der FA-Proteine bei der DNA-Reparatur nach wie vor ungeklärt. Ein besonders auffälliges Merkmal bei FA-Zellen aller Komplementationsgruppen ist ihre Hypersensitivität gegenüber DNA-Quervernetzungen. Zur Behebung solcher Quervernetzungen („interstrand crosslinks“, ICL) stehen der Zelle mehrere Reparatursysteme zur Verfügung, darunter auch die homologe Rekombinationsreparatur, in deren Mittelpunkt das RAD51-Protein steht. Aufgrund schwacher Homologien werden gegenwärtig fünf Proteine, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 in die sogenannte RAD51-Familie eingeordnet. Es wird vermutet, daß die RAD51-Familie in einem Komplex zusammenarbeitet und an diversen homologen Rekombinationsvorgängen wie z.B. DNA-Reparatur oder Austausch genetischer Information während der Meiose beteiligt ist.

Faszinierenderweise sind Hühnerzellen mit Defekten in den Genen der RAD51-Familie – ähnlich Fanconizellen – extrem sensitiv gegenüber ICLs und weisen ebenfalls hohe chromosomale Bruchraten auf.

Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit die Frage nach einer funktionellen Verbindung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Familie gestellt. Zur Identifizierung physikalischer Interaktionen zwischen drei FA-Proteinen, FANCA, FANCC, FANCG und den Mitgliedern der RAD51-Familie sollte ein „Interaction Trap“ im „Yeast Two Hybrid“-System durchgeführt werden. Identifizierte Interaktionen sollten anschließend durch Immunpräzipitationen in humanen Zellen bestätigt und eine etwaige zelluläre Kolo-kalisation der Interaktionspartner durch Immunfluoreszenzfärbungen analysiert werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose (Typ 1: Low Elektroendosmosis)	Sigma, Steinheim
Albumin aus Rinderserum (Fraktion V)	Sigma, Steinheim
Ammoniumacetat	Riedel-de-Haën, Seelze
Ammoniumcarbonat	Riedel-de-Haën, Seelze
Ammoniumchlorid	Riedel-de-Haën, Seelze
Ammoniumhydrogencarbonat	Riedel-de-Haën, Seelze
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit, USA
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Riedel-de-Haën, Seelze
Chloroform	Fluka, Buchs, CH
Citronensäure	Grüssing, Filsum
D(+)-Galaktose	Merck, Darmstadt
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Merck, Darmstadt
d-Biotin	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Boehringer, Mannheim
Eisen-(III)-chlorid	Merck, Darmstadt
Essigsäure (99 %)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol, pa	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	Ebert und Jacobi, Würzburg
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Formaldehydlösung (37 %)	Roth, Karlsruhe

Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin (86 %)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropylalkohol	Fluka, Buchs, CH
Kaliumacetat	Grüssing, Filsum
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumsulfat	Riedel-de-Haën, Seelze
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mangan-(II)-chlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Steinheim
MOPS	Roth, Karlsruhe
N, N'-Methylen-Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Serva, Heidelberg
Na ₂ EDTA	Boehringer, Mannheim
Natriumacetat	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumcarbonat	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Nonident P 40 (NP 40)	Sigma, München
ortho-Phosphorsäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Phenol	Riedel-de-Haën, Seelze
Phosphorsäure (85 %)	Fluka, Buchs, CH

PMSF	Boehringer, Mannheim
Polyethylenglycol 3350	Sigma, Steinheim
Polyvinylalkohol	Sigma, Steinheim
RotiLoad (4x)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Spermin	Serva, Heidelberg
Stickstoff, flüssig	Tyczka, Würzburg
TCR (Template Suppression Reagent)	PE Biosystems, Weiterstadt
TEMED	Serva, Heidelberg
Thiamin	Sigma, Steinheim
Trichloressigsäure (99 %)	Riedel-de-Haën, Seelze
Tri-Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck, Darmstadt
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg
Ziegenserum	Dianova, Hamburg

Alle Chemikalien wurden in Analysequalität eingesetzt. Stammlösungen wurden entweder sterilfiltriert oder 20 min bei 120 °C dampfsterilisiert. Pipettenspitzen und Minireaktionsgefäße wurden bei 110 °C, Glasmaterial durch dreistündiges Erhitzen bei 150 °C sterilisiert.

2.2 Aminosäuren

L-Arginin	Merck, Darmstadt
L-Aspartat	Merck, Darmstadt
L-Glutamat	Merck, Darmstadt
L-Histidin/HCl	Merck, Darmstadt
L-Leucin	Merck, Darmstadt
L-Lysinmonohydrochlorid	Merck, Darmstadt
L-Methionin	Merck, Darmstadt
L-Phenylalanin	Sigma, Steinheim
L-Serin	Sigma, Steinheim

L-Threonin	Merck, Darmstadt
L-Tyrosin	Merck, Darmstadt
L-Valin	Merck, Darmstadt
L-Tryptophan	Merck, Darmstadt

2.3 Enzyme

Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP)	Amersham, Freiburg
Polynukleotidkinase (PNK) aus T4 infizierten <i>E. coli</i>	Biozym, Hessisch Oldendorf
RNase A	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen und Puffer	New England Biolabs, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, USA
Trypsin-EDTA	Gibco, Karlsruhe

2.4 Nukleinsäuren und Nukleotide

dATP	Fluka, Buchs, CH
Lachs-Sperma-DNA	Sigma, Steinheim

cDNA-Klone:

pREP4-FANCA	T. Reuter, Portland, USA
pREP4-FANCC	T. Reuter, Portland, USA
pREP4-FANCG	T. Reuter, Portland, USA

Plasmide:

pEG202, pJG4-5	T. Reuter, Portland, USA
pSH18-34, pSH17-4, pRFMH1	T. Reuter, Portland, USA
pCMV-Tag 2 und 3	Stratagene, USA
MIEG2 (GFP-Vektor)	H.Hanenberg, Düsseldorf

Oligodeoxyribonukleotide (MWG Biotech, München):

ATM-Primer für PTT:

UC1-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGAGTCTAGTACTTAATGATC-3'

UC2-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGATCTGCTAGTGAATGAGATAAG-3'

UC3-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGCACTGACCACCAGTATAGTTC-3'

UC4-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGAGGTGGAGGATCAGTC-3'

UC5-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGCTGACAATCATCACCAAGTTC-3'
UC6-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGAGCCAGCAAATTCTAGTGCC-3'
UC7-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGCACTTCCATTGACAAGACTTG-3'
UC8-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGCAAACCTGGATTCAGAGTCAG-3'
UC9-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGGAGAGCTGGAAAGCATTGGG-3'
UC10-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGCCAAAGAGGAAGTAGGTCTC-3'
UC11-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGTCAGAAGTGTTGAGGCAC-3'
UC12-TR: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGGCCGTGATGACCTGAGAC-3'

DC1-TR: 5'-TTACTGTGACTTCTGAAGGTGATC-3'
DC2-TR: 5'-TTACAGAAGACAGCGATCCAGTG-3'
DC3-TR: 5'-TTAGGGTACTCTTCTCCAGGAAG-3'
DC4-TR: 5'-TTACACAAGGTGAGGTTCTAATCC-3'
DC5-TR: 5'-TTACCCAAGCTCCTCCTAAGCC-3'
DC6-TR: 5'-TTACTGTAGATAGGCCAGCATTGG-3'
DC7-TR: 5'-TTACTGGCTCCCCTATACTTCTG-3'
DC8-TR: 5'-TTACTCAGGGCAAGACTCTGCTC-3'
DC9-TR: 5'-TTAGCCTCTGTTCGATCCTCATC-3'
DC10-TR: 5'-TTACAATGGGGACAGTTCCTGTG-3'
DC11-TR: 5'-TTACATCTCCGGCCTCTGCTG-3'
DC12-TR: 5'-TTAGATCACACCCAAGCTTTCCATC-3'

Klonierungsprimer der RAD51-Familie

RAD51Afor: 5'-TGGCTGCCATGGGGAGGCGGTATGGCAATGCAGATGCAGCTTGAAG-3'
RAD51Arev: 5'-GGTCGACCATGGTTATCAGTCTTTGGCATCTCCCACTCC-3'
RAD51Bfor: 5'-TGGCTGGAATTCGGAGGCGGTATGGGTAGCAAGAACTAAAACG-3'
RAD51Brev: 5'-GGTCGACTCGAGTTACTAGGAATTTCCAGAGGCTTG-3'
RAD51Cfor: 5'-TGGCTGGAATTCGGAGGCGGTATGCGCGGGAAGACGTTCCG-3'
RAD51Crev: 5'-GGACGACTCGAGTTATTATAATTCTTCTCTGGGTCTCG-3'
RAD51Dfor: 5'-TGGCTGGAATTCGGAGGCGGTATGGGCGTGCTCAGGGTTCG-3'
RAD51Drev: 5'-GGTCGAGAATTTCTTATCATGTCTGATCACCTGTAATGTGG-3'

XRCC2for: 5'-TGGCTGGAATTCGGAGGCGGTATGTGTAGTGCCTTCCATAGG-3'
XRCC2rev: 5'-GGTCGAGAATTCTTATCAACAAAATTCAACCCCACTTTC-3'
XRCC3for: 5'-TGGCTGGAATTCGGAGGCGGTATGGATTTGGATCTACTGGACCTG-3'
XRCC3rev: 5'-GGTCGACTCGAGTTATCAGTGGGACTGGGTCCCAGGTGTCCTCG-3'

2.5 Radionukleotide

Adenosin-5'-[γ ³² P]triphosphat (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
2'-Deoxyadenosin-5'-[α ³² P]triphosphat (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
³⁵ S-Methionin (1000 Ci/mmol)	Amersham, Freiburg

2.6 Bakterien- und Hefestämme

Hefestamm <i>S. cerevisiae</i> EGY 48	T. Reuter, Portland, USA
Bakterienstamm <i>E. coli</i> XL1-blue	Stratagene, Amsterdam, NL
Bakterienstamm <i>E. coli</i> JM109	Stratagene, Amsterdam, NL
Bakterienstamm <i>E. coli</i> TOP 10	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Antikörper

Name	Antigen	Herkunft/Typ	Referenz od. Hersteller
ATM Ab-3	ATM	Hase	Oncogene, UK
NB 100-104	ATM	Hase	Novus Biologicals, UK
NB 100-143	NBS1	Hase	Novus Biologicals, UK
p95NBS1 (Ab-1)	NBS1	Hase	Novus Biologicals, UK
NB 100-155	RAD51	Hase	Novus Biologicals, UK
NB 100-142	MRE11	Hase	Novus Biologicals, UK
RAD50-13B3	RAD50	Maus	GeneTex, Cambridge, UK
sc-789	c-Myc-Tag	Hase	Santa Cruz, Heidelberg
AntiFLAG M1	FLAG-Tag	Maus	Sigma, Steinheim
Alexa Fluor 488	Hase IgG	Ziege	Molecular Probes, NL
Alexa Fluor 594	Maus IgG	Ziege	Molecular Probes, NL
Alexa Fluor 594	Hase IgG	Ziege	Molecular Probes, NL
HRP-anti-Hase	Hase IgG	Ziege	Amersham, Freiburg
HRP-anti-Maus	Maus IgG	Ziege	Amersham, Freiburg

2.8 Nährmedien und Antibiotika

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit, USA
Kanamycin	Sigma, München

2.9 Zelllinien

HEK293: „Human embryonic kidney“-Zellen; Tumorzelllinie

AT- und NBS-EBV: EBV-transformierte Lymphoblasten- und Fibroblasten-Zelllinien von AT- und NBS-Patienten

COS-7: SV40-transformierte „African green monkey“-Nierenzellen (*Cercopithecus aethiops*, grüne Meerkatze)

LFAPEG, LFCPEG und LFGPEG: stabil transformierte humane Fibroblasten mit jeweiliger Überexpression von FANCA, FANCC, oder FANCG

2.10 Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer	PE Biosystems, Weiterstadt
Apparatur für die horizontale Gelelektrophorese GNA-100	Pharmacia, Freiburg
Apparatur für die horizontale Gelelektrophorese	BioRad, München
Apparatur für die vertikale Gelelektrophorese	Eigenbau des Instituts für für Biochemie, Würzburg
Blockthermostat	Gebr. Liebisch, Bielefeld
Brutschrank (Bakterien)	Infors HT, Stuttgart
Brutschrank (Hefe)	Memmert, Schwabach
Brutschrank (humane Zelllinien)	Heraeus, Hanau
Thermocycler 96	Pharmacia, Freiburg
Elektroporationsapparat „Gene pulser“	Bio-Rad, München
Elscript400 Densitometer	Hirschmann
Entwicklermaschine	Noras, Würzburg
Flüssigkeits-Szintillationszähler LS 3801	Beckmann, München
Fotoprinter	Herolab, Wiesbaden
Geltrockner Slab Gel Dryer Model 1125	BioRad, München

Inkubationsrundschüttler	Infors, München
Magnetrührer	Janke und Kunkel KG
Miniwasserbad MWB	Jualbo, Seelbach
Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
Rotoren JA-20, JS 13.1	Beckman, München
Schwenkinkubator	Bachofer, Reutlingen
Schüttelbrutschrank	Infors, München
Schüttelinkubator	Infors, München
Schüttler Köttermann 4010	Köttermann, Uetze
Spannungsgerät LKB ECPS 3000/150	Pharmacia, Freiburg
Spannungsgeräte EPS 500/400	Pharmacia, Freiburg
Speed Vac Concentrator SVC 100	Savant Instruments
Spektralphotometer „Dosascat“	Dosatec, München
Spektralphotometer „Ultrospec plus“	Pharmacia, Freiburg
Spektralphotometer DU 50	Beckman, München
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Zentrifuge J-6B, J2-21, T J-6	Beckman, München
Thermocycler 96	MWG-Biotech, Ebersberg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf, Heidelberg
Tisch-Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen
Tischzentrifuge (Picofuge)	Stratagene, Amsterdam (NL)
UV-Auflicht-Strahler (Duo Minuvis)	Desaga, Heidelberg
UV-Durchlicht-Strahler	Bachofer, Reutlingen
Western-Blot Spannungsgerät	Bio-Rad, München
Western-Blot Transferzelle	Bio-Rad, München
Vortexgerät	Hartenstein, Würzburg

2.11 Sonstige Materialien

BigDye-Sequenzierkit	PE Biosystems, Weiterstadt
JETprep Plasmid Miniprep Kit/200	Genomed, Bad Oeynhausen
JETsorb Gel Extraction Kit/300	Genomed, Bad Oeynhausen
Kaleidoskope Prestained Standard	BioRad
Mini-, Midi- und MaxiprepKit	Qiagen, Hilden
Nukleobond AX-Säulen, Größe 5 und 500	Macherey-Nagel, Oensingen
„Jetprep Plasmid Miniprep Kit“	Genomed, Bad Oeynhausen

Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Faltenfilter	Macherey & Nagel, Düren
große Petrischalen für Hefeplatten (Ø 14 cm)	Greiner, Frickenhausen
kleine Petrischalen für Hefe- und Bakterienplatten (Ø 9 cm)	Greiner, Frickenhausen
Kodak xAR-5-Röntgenfilm	Kodak, Stuttgart
Messküvetten (1.5 ml)	Brand, Wertheim
MinireaktionsgeäÙe	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Peptidstandard für Massenspektrometrie	AK Spengler
Polypropylensäulen	Bio-Rad, München
PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Röntgenfilm Radiolix B	Perutz, Würzburg
Sterilfilter (PorengröÙe 0,22 µm und 0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Sterilfilter (PorengröÙe 0,45 bzw. 0,2 mm)	Schleicher & Schuell, Dassel
TNT-Expressionsmastermix	Promega, Mannheim
Whatman 3MM Filterpapier	Whatman Ltd., Maidstone, UK

3. Methoden

3.1 Charakterisierung von Nukleinsäuren

3.1.1 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegel-Elektrophorese

Die horizontale Agarosegel-Elektrophorese wird zur Charakterisierung und Reinigung doppelsträngiger DNA eingesetzt (SAMBROOK et al. 1989). Agarose wirkt als Molekularsieb, wobei die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von linearer doppelsträngiger DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl ihrer Nukleotidpaare ist. Durch Vergleich mit DNA-Fragmenten bekannter Länge kann die Größe eines zu analysierenden DNA-Fragments ermittelt werden. Der Trennbereich von Agarosegelen erstreckt sich von 0,1 kb (2 % Agarose) bis zu 100 kb (0,3 % Agarose). Als Puffersystem wird 1 x TBE verwendet. Die Agarose wird durch Aufkochen in 1 x TBE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wird Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer mit Taschenformer gegossen. Ethidiumbromid, das bei Anregung mit Licht im UV-Bereich fluoresziert, interkaliert bevorzugt zwischen GC-Paare der Nukleinsäuren. Die Nukleinsäurebanden können so bei Bestrahlung mit UV-Licht auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden. Für das Befüllen der Agarosegeltaschen werden die DNA-Proben mit 2,5 x HSE-Probenpuffer vermischt. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von ca. 10 V/cm Elektrodenabstand in 1 x TBE-Puffer durchgeführt. Zur Größenbestimmung der Nukleinsäurefragmente werden DNA-Längenstandards der Firma Gibco (100 bp ladder, 1 kb ladder) eingesetzt.

1 x TBE-Puffer:	890 mM	Tris
	890 mM	Borsäure
	20 mM	Na ₂ EDTA
		pH 8,3
2,5 x HSE-Puffer	4 M	Harnstoff
	50 %	Saccharose
	50 mM	Na ₂ EDTA
	0,05 %(w/v)	Bromphenolblau
	0,05 %(w/v)	Xylencyanol

3.1.2 Die denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) dient der Auftrennung von Nukleinsäuren bis zu einer Größe von 1000 bp (SAMBROOK et al. 1989), sie wird für radioaktive Sequenzierungen oder zur Auswertung quantitativer PCR (3.2.8) verwendet. Durch Zugabe denaturierender Agenzien wie Harnstoff wird die Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen verhindert, so daß die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren ausschließlich von ihrer Länge abhängig ist. Man gießt die Gellösung nach Zugabe der beiden Radikalbildner APS und TEMED zwischen zwei Glasplatten und läßt sie nach Einsetzen des Taschenformers in horizontaler Lage auspolymerisieren. Anschließend werden die Glasplatten in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Die DNA-Proben werden vor dem Beladen der Geltaschen mit Formamid-Probenpuffer vermischt, für 2 min bei 90 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgt bei 30-40 W, als Laufpuffer wird 1x TBE verwendet.

10x TBE-Puffer:	890 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	890 mM	Borsäure
	80 mM	EDTA
Formamid-Probenpuffer:	95 %	Formamid
	10 mM	EDTA
	0,1 %	Bromphenolblau
	0,1 %	Xylencyanol
6% PAA-Lösung, pH 8,3: (für 20 x 40 cm-Platten)	20 ml	Acrylamid/Bisacrylamidlösung, (29:1, 30%)
	51 g	Harnstoff
	10 ml	10x TBE
	ad 100 ml	ddH ₂ O
	650 µl	APS (10%)
	120 µl	TEMED

3.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Entfernung verunreinigender Fragmente nach einer Plasmidhydrolyse werden die entsprechenden DNA-Fragmente stets in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Produkte einer Polymerase-Kettenreaktion und deren Restriktionshydrolysate werden ohne Gelaufreinigung direkt aus dem Reaktionsansatz isoliert. Für die Aufreinigung der DNA-Fragmente wird stets das „DNA Gel and PCR

Elution System“ von Amersham eingesetzt. Zur Elution der DNA werden 10 mM Tris, pH 8,0 oder ddH₂O verwendet.

3.1.4 Präparation von RNA aus lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt mit dem Micro RNA Isolation Kit der Firma Stratagene. Grundsätzlich erfolgt die Präparation nach Angaben des Herstellers mit leichten Abweichungen. Die nacheinander verwendeten Volumina für die RNA-Isolierung aus $3-4 \times 10^6$ Zellen sind nachfolgend angegeben:

Denaturing Solution	500 µl
β-Mercaptoethanol	3,6 µl
2M NaOAc	50 µl
Phenol (sauer)	500 µl
Chorophorm:Isoamylalkohol (21:1)	100 µl
ddH ₂ O (RNase frei)	100 µl
Isopropanol	500 µl
75% EtOH	1000 µl

Nach dem letzten Waschen wird das RNA-Pellet 5 min an der Luft getrocknet und anschließend in 40-50 µl RNase-freiem ddH₂O gelöst. Zur längeren Lagerung der RNA wird das getrocknete Pellet bei -80 °C eingefroren.

3.1.5 Präparation von genomischer DNA aus lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten

Zur Präparation genomischer DNA wird eine Aussalzungsmethode in modifizierter Form verwendet. Etwa 5×10^6 Zellen werden zweimal in einem Falconröhrchen mit je 10 ml PBS-Puffer gewaschen (1000 rpm, 10 min, RT). Nach dem Entfernen des Überstandes wird das Zellpellet in 850 µl SE-Puffer gelöst. Zum Abbau der RNA und der Proteine wird die Suspension nach Zugabe von 125 µl Pronase E (1 µg/ml), 10 µl Rnase A (10 µg/µl) und 25 µl 20% SDS bei 55 °C für mindestens drei Stunden inkubiert. Anschließend werden nochmals 10 µl Rnase A (10 µg/µl) zupipettiert und der Ansatz eine weitere Stunde bei RT stengelassen. Die Lösung wird mit 400 µl 6M NaCl gründlich vermischt (vortexen, 20 s), bis eine milchige Färbung eintritt. Der Zellschrott wird durch Zentrifugation bei 4500 rpm für 15 min sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 2 Vol 100 % Ethanol erfolgt die Fällung der DNA in Form eines weißer Fadens. Dieser wird mit einer

hakenförmig gebogenen Glaspipette gefischt und kurz in 70% EtOH gewaschen. Die DNA wird anschließend in 50-200 µl TE-Puffer aufgenommen und durch Rotation über Nacht bei RT gelöst.

3.1.6 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen (SAMBROOK et al. 1989)

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung läßt sich über die Extinktion bei 260 nm bestimmen. Die Nukleinsäure-Präparation sollte so verdünnt werden, daß die Messung einen Wert zwischen 0,1 und 0,8 Absorptionseinheiten ergibt. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentrationen aus den Absorptionswerten erfolgt nach der untenstehenden Übersicht.

Nukleinsäure:	eine A ₂₆₀ -Einheit entspricht:
ds DNA & RNA	50 µg
ss DNA & RNA	40 µg
ss Oligonukleotide(15-18 Nt)	30 µg

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung kann über das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm festgestellt werden. Ein A₂₆₀/A₂₈₀-Quotient von 1,9 entspricht reiner RNA oder DNA. Ist die Nukleinsäurelösung mit Phenol oder Proteinen kontaminiert, fällt dieser Quotient niedriger aus.

3.2 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

3.2.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktions-Endonukleasen der Klasse II spalten doppelsträngige DNA an spezifischen Positionen. Sie besitzen meist palindrome Erkennungssequenzen und hydrolysieren innerhalb oder außerhalb dieser Sequenz in jedem Strang eine bestimmte Phosphodiesterbindung. Erfolgt die Spaltung genau innerhalb der Mitte der der Erkennungssequenz, entstehen nach der Hydrolyse glatte DNA-Enden („blunt ends“). Erfolgt die Spaltung dagegen auf beiden DNA-Strängen versetzt zueinander, entstehen überhängende 5'- oder 3'-DNA-Enden („sticky ends“). Die Aktivität der Enzyme wird in Units (U) angegeben. Ein U entspricht der Enzymmenge, die unter optimalen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, etc.) 1 µg einer Vergleichs-DNA (meist genomische DNA des λ-Phagen) innerhalb einer Stunde zu spalten vermag. Wegen der inhibitorischen Wirkung von Glycerin in den Enzymlösungen sollte das Volumen an zugegebener Enzymlösung nicht mehr als 0,1 Vol des Reaktionsansatzes betragen.

Ein präparativer Ansatz wird generell in einem Volumen von 50 µl bei der vom Enzymhersteller angegebenen optimalen Temperatur – meist 37 °C - für mindestens eine Stunde inkubiert. Die Art des verwendeten Reaktionspuffers richtet sich nach den Anforderungen des Enzyms an Salzkonzentration und pH-Wert und kann den Herstellerangaben entnommen werden. Pro µg DNA werden 1-10 U

Enzym eingesetzt, es werden maximal 10 µg DNA je 50 µl Reaktionsansatz verwendet. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch ein Erhitzen des Reaktionsansatzes gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben. Die Vollständigkeit der Spaltung wird im Agarosegel überprüft und die entsprechende(n) Bande(n) ausgeschnitten und wie in 3.1.3 beschrieben eluiert.

3.2.2 Glätten von 5'- oder 3'- Überhängen in doppelsträngiger DNA

Sollen nach einer Restriktionshydrolyse für eine Ligation zwischen DNA-Fragment und Vektor die DNA-Enden geglättet werden, kann im Falle eines 5'-Überhangs komplementär aufgefüllt oder im Falle eines 3'-Überhangs der Einzelstrang abgebaut werden. Für beide Reaktionen verwendet man das selbe Enzym, die T4-DNA Polymerase, die gleichzeitig 5'→3'-Polymerase- und 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Sie füllt rückstehende 3'-Enden auf und baut überhängende 3'-Enden ab. Beide Reaktionen werden für 20 min bei 12 °C durchgeführt:

0,1 µl dNTPs, 10 mM
 1-3 µl T4 DNA Polymerase (1U/µl)
 1,0 µl T4 DNA Polymerase Puffer
 0,1 µl BSA (50 µg/ml)
 ad 10 µl ddH₂O

3.2.3 5'-Phosphorylierung

Zur blunt-end-Klonierung von PCR-Produkten müssen diese zunächst an beiden 5'-Enden phosphoryliert werden. Dies erfolgt mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK):

<u>Phosphorylierungsansatz:</u>	18 µl	gereinigtes PCR-Produkt
	1 mmol/l	ATP-Lösung
	3 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
	3 µl	10 x T4-PNK-Puffer
	ad 30 µl	ddH ₂ O

3.2.4 5'-Dephosphorylierung

Nach der Restriktionshydrolyse eines Plasmides müssen die 5'-Phosphatgruppen beiderseits abgespalten werden, um eine Religation des linearisierten DNA-Stranges zu verhindern. Besonders nach der Hydrolyse mit nur einer Endonuklease ist dieser Schritt unabdingbar, da die 5'-und 3'-überhängenden Enden des Plasmides zueinander komplementär sind; er wird aber grundsätzlich auch bei nicht-kompletären Überhängen zur Sicherheit durchgeführt. Um eine zusätzliche Aufreinigung der DNA nach der Restriktionshydrolyse zu vermeiden, wird die Dephosphorylierung im selben Reaktionsansatz durch die Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP) durchgeführt; je nach Temperaturoptimum des Restriktionsenzym erfolgt die Zugabe der SAP entweder zeitgleich oder im Anschluß an die Hydrolyse bei 37 °C. Die Denaturierung der SAP wird durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min erreicht.

3.2.5 Ligation

Für die *in vitro*-Rekombination von DNA werden Fragmente aus Restriktionshydrolysaten durch die enzymatisch katalysierte Bildung von Phosphodiesterbindungen ligiert. Für diese Reaktion wird die ATP-abhängige Ligase des T4-Phagen verwendet. In einen 10 µl-Ansatz werden folgende Komponenten pipettiert: 10-100 ng Plasmid-DNA (geschnitten und dephosphoryliert), das zu ligierende DNA-Fragment (phosphoryliert), 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 1-2 U T4-DNA-Ligase. Vektor und Fragment werden in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:10 eingesetzt. "Blunt-end"-Klonierungen benötigen eine Inkubation bei 14 °C im Ligationswasserbad über Nacht, für "sticky-end"-Klonierungen genügt auch eine Inkubation bei RT für 30 min.

3.2.6 Reverse Transkription (RT)

Das Umschreiben von mRNA in komplementäre einzelsträngige DNA (cDNA) erfolgt über das Enzym reverse Transkriptase (RT), das drei aufeinanderfolgende Reaktionen katalysiert: RNA-abhängige DNA-Synthese, RNA-Hydrolyse und DNA-abhängige DNA-Synthese. Die Synthese erfolgt stets in 5'→3'-Richtung, wie bei allen Polymerasen kann keine *de novo*-Synthese ohne Primer stattfinden.

In dieser Arbeit erfolgt die RT im Anschluß an die Präparation von Gesamt-RNA aus humanen Zellen. Zum Reaktionsstart wird ein Thymin-Oligomer aus 12-18 Nukleotiden verwendet, das an die Poly-(A)-Sequenz am 3'-Ende eukaryontischer mRNAs bindet und als Primer für die Polymerasereaktion fungiert. Die Synthese der einzelsträngigen cDNA erfolgt aus den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (A,C,G,T).

Im Reaktionsansatz werden zunächst mögliche Sekundärstrukturen der mRNA aufgeschmolzen, um die Bindung des Oligo-(dT)-Primers an die RNA-Matrize zu gewährleisten.

1 µl	Oligo-(dT) ₁₂₋₁₈ (500µg/ml)
1 - 3 µg	Gesamt-RNA
ad 12 µl	ddH ₂ O

Die Mischung wird für 10 min auf 70 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Anschließend werden folgende Komponenten zugegeben:

4 µl	5x First Strand Buffer
2 µl	0,1M DTT
1 µl	10 mM dNTP Mix

Der Ansatz wird für zwei Minuten auf 42 °C erwärmt, dann erfolgt die Zugabe von 1µl RT (200 U/µl). Die Reaktion wird für 50 min bei 42 °C inkubiert, anschließend denaturiert man das Enzym durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min. Die synthetisierte cDNA kann anschließend als Template in eine Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt oder zur Lagerung bei -80 °C eingefroren werden.

3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) dient der hochspezifischen enzymatischen *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Ist die Zielsequenz bekannt, ermöglicht die PCR eine exponentiell verlaufende Amplifizierung des jeweiligen durch Primer definierten DNA-Fragmentes über eine repetitive Abfolge (30-35 Zyklen) folgender Temperaturschritte:

- 1 Denaturierung des DNA-Matrizenstranges bei 95 °C
- 2 Hybridisierung der Primer (18-30 bp) an ihre komplementäre Zielsequenz auf dem Matrizenstrang; dies erfolgt während der „annealing-Phase“ (54 °C – 68 °C)
- 3 Elongation der DNA-Kette durch die DNA-Polymerase bei 72 °C

Die optimalen Inkubationszeiten- und Temperaturen müssen für jedes DNA-Fragment in Abhängigkeit von Primern und Template separat ermittelt werden. Generell wird zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für die Schmelztemperatur folgende Formel verwendet:

$$T_M = 4x (G+C) + 2x (A+T)$$

Die Elongationszeiten sind abhängig von der Schnelligkeit der verwendeten DNA-Polymerase; für die Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) wird eine Syntheserate von etwa 1000 bp/min geschätzt. PCR-Ansätze erfolgen generell in einem Volumen von 25 µl in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß.

PCR Standard-Ansatz:	0,05-0,5 µg	Matrizen-DNA
	1,25 pmol	„forward“-Primer
	1,25 pmol	„reverse“-Primer
	0,5 µl	dNTPs (10 mM)
	0,25 µl	Pfu-Puffer (10 x)
	0,20 µl	Pfu-Polymerase (1 U/µl)
	ad 25 µl	ddH ₂ O

Nach erfolgter Synthese überprüft man ein Aliquot des Reaktionsansatzes im analytischen Agarosegel, die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt mit dem GFX-Kit der Firma Amersham.

3.2.8 Semiquantitative PCR

Um bei nicht vollständig durchschlagenden Spleißmutationen den verbleibenden Anteil normal gespleißter Transkripte eines Allels quantitativ abschätzen zu können, verwendet man eine abgewandelte Form der PCR. Hierbei wird nur eine limitierte Zahl an PCR-Zyklen (20-25) durchgeführt, um die Amplifizierung eines Gens oder Genfragmentes proportional zur dessen Ausgangskonzentration zu gewährleisten. Zusätzlich zum Standard-PCR-Ansatz (3.2.7) wird α -³²P-ATP zugegeben, um die synthetisierte DNA radioaktiv zu markieren. Anschließend werden 10 µl der PCR-Reaktion mit 5 µl Formamid-Probenpuffer vermischt und in einem 6% denaturierendem Polyacrylamidgel (3.1.2) aufgetrennt. Das Gel wird getrocknet und anschließend über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert. Die Intensität der DNA-Bandenschwärze wird auf dem Röntgenfilm mit Hilfe eines Elscript400-Densitometers bestimmt.

3.2.9 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Nukleotidsequenz von PCR-Produkten, Plasmid-DNA und Plasmid-inserierten cDNA-Fragmenten wird mit Hilfe der Didesoxy-Methode nach SANGER et al. (1977) durchgeführt. Dabei wird eine Polymerisierungsreaktion der DNA-Matrize in Anwesenheit jeweils eines 2'-3'-Didesoxyribonukleotids durchgeführt; der Einbau eines solchen ddNTP-Moleküls führt zum sofortigen Abbruch der Reaktion. Durch den statistisch willkürlich erfolgenden Einbau von ddNTP-Molekülen kommt es verteilt über das gesamte DNA-Fragment an jeder Nukleotidposition mehrmals zum Kettenabbruch.

Die Sequenzreaktionen wurden anfänglich zunächst radioaktiv mit α ³²P-ATP und α ³³P-ATP, insgesamt jedoch überwiegend mit dem ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. PCR-Produkte werden vor der Sequenzierreaktion, wie unter 3.1.3 beschrieben, aufgereinigt.

Der Sequenzieransatz wird wie folgt pipettiert:

- 1 μ l Sequenzierprimer (10 μ M)
- 2 μ l „BigDye“-Mastermix
- 2-7 μ l gereinigte DNA
- ad 10 μ l HPLC-Wasser

Die Sequenzierung wird in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler durchgeführt. Die Proben werden anschließend nach Vorschrift gefällt, in je 20 μ l TSR (Template Suppression Reagent) aufgenommen, für 2 min bei 80 °C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Die Sequenzanalyse erfolgt mit dem „ABI 310 Sequencer“.

3.2.10 Das „Splice Scoring“-System nach SHAPIRO und SENAPATHY (1987)

Um innerhalb der genomischen Sequenz eines Gens die Exon/Intron-Grenzen identifizieren zu können, wurde von SHAPIRO und SENAPATHY (1987) mit Hilfe einer Gen-Datenbank eine systematische Analyse der RNA-Spleißstellen eukaryontischer Gene durchgeführt und die Konservierung der Nukleotidpositionen an den 5'-Akzeptor- und 3'-Donor-Spleißstellen (ss) bestimmt. Zusätzlich zu den hochkonservierten Dinukleotidpositionen **gt** (5'-ss) und **ag** (3'-ss) existieren an beiden Exongrenzen weitere konservierte Nukleotidpositionen. Für Primaten ergeben sich dabei folgende Konsensussequenzen:

5'-Spleißstelle: A G - g t (ag) a g t
 -2 -1 +1 +2 +3 +4 +5 +6

3'-Spleißstelle: (tc) (tc) (tc) (tc) (tc) (tc) (ct) (tc) (tc) (tc) (acgt) c a g - G
 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 +1

[Exonnukleotide sind stets in Großbuchstaben, Intronnukleotide in Kleinbuchstaben angegeben.]

Anhand der Häufigkeit der Nukleotide an jeder Position innerhalb der Konsensussequenzen wurde ein sogenanntes Splice Scoring System entwickelt, mit dessen Hilfe die Wertigkeit, d. h. die Sequenzkonservierung der jeweiligen Spleißstellen in Prozent (verglichen mit der optimalen Konsensussequenz) errechnet werden kann. Dabei wird jedem Nukleotid an jeder Position innerhalb der Konsensusfolge eine bestimmte Prozentzahl zugeordnet und anschließend die Wertung der 5'- und 3'-Spleißstelle mit Hilfe zweier Formeln berechnet.

Tab. 3: Wertungen der einzelnen Nukleotidpositionen innerhalb der 5'- und 3'-Spleiß-Konsensussequenzen

5'-Spleißstelle					3'-Spleißstelle						
Position	A	C	G	T	Konsensus- sequenz	Position	A	C	G	T	Konsensus- sequenz
-3	32	37	19	12		-14	9	31	15	45	TC
-2	58	13	15	15	A	-13	9	33	13	45	TC
-1	10	4	78	8	G	-12	7	31	11	51	TC
+1	0	0	100	0	G	-11	7	35	7	51	TC
+2	0	0	0	100	T	-10	10	35	7	47	TC
+3	57	2	39	2	AG	-9	10	35	11	44	TC
+4	71	8	12	19	A	-8	7	43	7	42	CT
+5	5	6	84	5	G	-7	9	41	8	42	TC
+6	16	15	22	47	T	-6	6	39	6	48	TC
						-5	6	40	8	46	TC
						-4	23	29	23	24	---
						-3	3	74	1	22	C
						-2	100	0	0	0	A
						-1	0	0	100	0	G
						+1	28	13	49	10	G

Wertung der 5'-ss: Wert der Spleißstelle (%) = $100 (T - \min T) / (\max T - \min T)$

mit T = Summe der Prozentzahlen der Nukleotide in der Sequenz
 $\min T$ = geringste errechenbare Summe der Prozentzahlen
 $\max T$ = höchste errechenbare Summe der Prozentzahlen

Wertung der 3'-ss: Wert der Spleißstelle (%) = $100 [(T1-L1)/(H1-L1) + (T2-L2)/(H2-L2)]/2$

mit $T1$ = Summe der besten acht aus zehn Prozentwerte im Polypyrimidintrakt
 $T2$ = Summe der vier Prozentwerte an der cagG-Konsensus-Position
 $L1$ = Summe der niedrigstmöglichen acht aus zehn Prozentwerte im Pyrimidintrakt
 $L2$ = Summe der vier niedrigstmöglichen Prozentwerte an der cagG-Konsensus-Position
 $H1$ = Summe der höchstmöglichen acht aus zehn Prozentwerte im Polypyrimidintrakt
 $H2$ = Summe der vier höchstmöglichen Prozentwerte an der cagG-Position

3.3 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle in *E. coli*

3.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme (XL1blue, DH5 α und TOP10) werden in LB-Flüssigkultur oder auf festen LB-Agarplatten kultiviert. Je nach Bedarf werden dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 60 °C folgende Antibiotika zugesetzt:

	100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Ampicillin
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Kanamycin
LB-Medium:	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Pepton / Trypton
	10 g	NaCl
	in 1 l	ddH ₂ O lösen
LB-Platten:	plus 20 g	BactoAgar

In Flüssigkultur werden *E. coli* bei 37 °C im Schüttler (140 Upm) über Nacht inkubiert. Auf Agarplatten erfolgt die Inkubation bei 37 °C im Thermoschrank für 14-24 h. Zur Lagerung rekombinanter *E. coli*-Stämme werden die Bakterien in 40 % (v/v) sterilem Glycerin suspendiert und bei -70 °C eingefroren.

3.3.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

3.3.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Hitzetransformation

Die natürliche Aufnahme von Plasmiden durch Bakterien ist sehr gering. Durch eine spezielle Behandlung der Zellen mit divalenten Kationen vor der Transformation ist es jedoch möglich, diese auf 10^6 bis 10^7 Transformanten pro μg Plasmid zu steigern. Bakterienzellen werden nach folgender Methode kompetent für die hitzevermittelte Transformation mit Plasmiden gemacht: eine Bakterienkolonie wird über Nacht in 25 ml LB-Medium bei 37 °C im Rundschüttler vermehrt. Von dieser Vorkultur werden 2 ml in 200 ml LB-Medium überführt und man inkubiert die Kultur bei 37 °C im Rundschüttler, bis nach etwa 4 h eine optische Dichte von $A_{600}=0.5$ ($4-7 \times 10^7$ Zellen) erreicht ist. Jetzt werden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert und anschließend sedimentiert (Beckman Kühlzentrifuge; SS34 Rotor; 3000 Upm; 4 °C; 5 min). Das Sediment wird in 20 ml Tfb1 suspendiert, dann 15 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (siehe oben). Danach werden die Zellen in 10 ml Tfb2 aufgenommen, in 200 μl -Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Im allgemeinen liegt die Zahl der Transformanden nach dieser Prozedur bei 10^4 bis 10^6 pro μg DNA.

Lösung Tfb1:	0,3 M	KOAc
	0,5 M	MnCl ₂
	0,1 M	CaCl ₂
	15 % (w/v)	Glycerin
Lösung Tfb2:	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	KCl
	15 % (w/v)	Glycerin

3.3.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

1 l LB-Medium werden mit 5 ml einer Übernachtskultur eines *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,4-0,6 bei 600 nm wachsen gelassen. Die Bakterien wurden 15-30 min im Eisbad abgekühlt und 15 Minuten mit 4000 Upm bei 4°C abzentrifugiert. Um die folgenden Schritte bei annähernd $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausführen zu können, werden alle Gegenstände und Lösungen vorgekühlt. Das Bakterien-Sediment wird zunächst mit 1 l ddH₂O und anschließend mit 500 ml ddH₂O gewaschen. Danach wird das Sediment in 20 ml eiskaltem 10 % Glycerin suspendiert und erneut abzentrifugiert. Schließlich werden die Bakterien in 2 ml eiskaltem 10 % Glycerin aufgenommen, in Aliquots von 50 μl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.3.3 Hitzetransformation

200 μl der kompetenten Bakteriensuspension werden mit maximal 10 μl Plasmid-DNA-Lösung gemischt und 10 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wird der Ansatz einer 2 minütigen Hitzeschock-Inkubation bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt und nochmals 10 min Inkubation auf Eis inkubiert. Je nach Art der plasmidvermittelten Antibiotikaresistenz werden die 200 μl Zellsuspension entweder direkt (Ampicillin) oder nach 30 min Inkubation in SOB-Medium (Kanamycin) mit einem Drygalski-Spatel auf einer vorgewärmten Antibiotika-haltigen LB-Platte ausgestrichen. Die Bakterien werden über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Bei erschwerten Klonierungsbedingungen, z.B. geringe Ligationseffizienz, Instabilität des DNA-Inserts in Bakterienzellen, extrem niedrige Transfektionsraten in selbst hergestellten kompetenten Zellen etc., wurden super-thermokompetente TOP10-Bakterien der Firma Invotrogen verwendet und gemäß dem Herstellerprotokoll transformiert.

3.3.4 Elektroporation

Die Methode der Elektroporation hat den Vorteil, daß unabhängig von der Vektorgröße eine sehr hohe Transformationsrate (bei *E. coli* bis zu 10^{10} Transformanten/ μg DNA in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm) erreicht werden kann. Diese Methode eignet sich daher besonders gut für das Einbringen großer Vektoren in Bakterienzellen. Die elektrokompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 1-2 μl der DNA-Lösung versetzt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gefüllt. Die Elektroporation erfolgt mit Hilfe eines „Gene Pulser“-Gerätes der Firma BioRad. Die Küvetten werden in die Apparatur eingesetzt und einem „Stromstoß“ unter folgenden Bedingungen ausgesetzt: 25 μF , 2,5 kV, 200 Ω . Anschließend werden die Zellen in 1 ml LB-Medium suspendiert, 90 min bei 37 °C im Blaudeckelgefäß unter Schütteln inkubiert und auf Agarplatten ausplattiert.

3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.3.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischem Maßstab

Pro Plasmidpräparation werden *E. coli* Bakterien in 3-5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Für die Isolierung von Plasmid-DNA in analytischem Maßstab wird der „Plasmid Spin Prep Kit“ der Firma Quiagen nach Herstellervorschrift angewendet. Die Elution der DNA erfolgt standardmäßig in 50 μl 10mM Tris-HCl, pH 8,0.

3.3.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab

Für die Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab wird nach Vorschrift des „Plasmid Maxi Prep Kit“ der Firma Quiagen gearbeitet. Die Vermehrung der *E. coli* Zellen erfolgt in einem Volumen von 100 – 250 ml LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht. Die DNA wird nach der letzten Fällung in 200 – 500 μl Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen.

3.4 Proteinanalytische Methoden

3.4.1 Proteinextraktion aus lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten

Die Zellen werden zunächst zweimal in 1x PBS-Puffer gewaschen (1000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wird anschließend in 30–100 μl vorgekühltem RIPA-Aufschlußpuffer aufgenommen und die Reaktion zur Lyse 30 min auf Eis gestellt. DNA, RNA, Zell- und Membran-Fragmente werden anschließend in einer gekühlten Ultrazentrifuge (Heräus) bei 4 °C für 12 min, 14000 rpm sedimentiert, die Proteine befinden sich nun im Überstand. Zur Konzentrationsbestimmung des Proteinextraktes wird wie unter 3.4.3 beschrieben verfahren.

3.4.2 Immunpräzipitation von Proteinen

Um eine direkte physikalische Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, präpariert man zunächst einen Gesamt-Proteinextrakt aus Zellen. Anschließend fischt man eines der beiden im Komplex vorliegenden Proteine mit Hilfe eines Agarose-gekoppelten Antikörpers aus dem Gesamtproteinextrakt und wäscht alle nicht gebundenen Proteine aus der Lösung heraus. Nur das an den Antikörper gebundene Protein sowie sein potentieller Bindungspartner bleiben nach den Waschschrritten zurück. Dieses gereinigte Lysat trennt man in einem SDS-PAA-Gel aufweist die entsprechenden Proteine mittels Western Blot (3.4.6) nach. Immunpräzipitationen werden im Rahmen dieser Arbeit an Proteinextrakten aus HEK293-, HEK293T- und COS-7 –Zellen vorgenommen. In jede Schale einer „6-well“-Platte wird 250 µl IP-Lysispuffer gegeben. Die Platten werden waagrecht 15 min auf Eis inkubiert und anschließend die Zellen mit einem Gummispatel von den Plattenböden gelöst. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Lysats in einer Kanüle werden die Zellen geschert und dann bei 4°C für 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.

Vom Überstand werden 50 µl als Kontrolllysat abgezweigt und auf Eis gelagert. Die restlichen 200 µl Überstand können je nach Proteinexpression unterschiedlich zur Immunpräzipitation eingesetzt werden. Für überexprimierte Proteine, sowie Proteine, die in hoher Konzentration in der Zelle vorliegen, werden 100 µl Lysat, entsprechend 1×10^6 Zellen eingesetzt. Zur Immunpräzipitation endogener, schwach exprimierter Proteine, wie etwa die Fanconi Anämie-Proteine wird die fünffache Menge Lysat benötigt, sowie von allen übrigen Reagenzien die dreifache Menge.

In einen Ansatz mit 100 µl Lysat werden 400 µl Lysis-Puffer und 5 µl Serum gegeben und 90 min bei 4°C leicht geschwenkt. Dann werden 30 µl Protein A/G plus Agarose zugegeben, 30 min bei 4 °C rotiert und dann 3 min bei 800g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird mit 0,3 – 1,0 µg Antikörperlösung bzw 5 µl Antiserum für mindestens 3 h oder über Nacht bei 4 °C unter langsamen Rotieren inkubiert.

Nach Zugabe von 20 µl Protein A/G plus Agarose und 30 min leichtem Rotieren wird die Agarose wiederum durch kurze Zentrifugation (3 min, 800g) sedimentiert. Der Überstand wird sorgfältig abgenommen und verworfen, die Protein-Agarose durch dreimalige Zugabe von 500 µl eiskaltem Lysis-Puffer und anschließendes Abzentrifugieren gewaschen. Bei jedem Waschschrtritt wird während 30 sec drei bis fünfmal vorsichtig invertiert. Die Proteinagarose wird anschließend in 15-20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 3 min auf 96°C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert (15 sec, 14000 Upm). 10-15 µl werden in einem SDS-PAA-Gel analysiert.

Tab. 4: Zusammensetzung verschiedener Lysepuffer bei der Immunpräzipitation

IP-Lysepuffer: (1)	10	mM	Tris		IP-Lysepuffer: (2)	50	mM	Tris
	150	mM	NaCl			150	mM	NaCl
	1	%	NP-40			1	%	NP-40
	0,5	%	Deoxycholat					---
	1	mM	EDTA					---
	1	mM	DTT					---
	1/25		Protease- Inhibitor- Cocktail			1/25		Protease- Inhibitor- Cocktail
	ad 9,6	ml	ddH ₂ O			ad 9,6	ml	ddH ₂ O

3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration durch TCA-Fällung

Dieses Prinzip der Protein-Konzentrationsmessung beruht auf einer Fällungsreaktion der Proteine mit TCA, die nephelometrisch im Streulichtphotometer (Dosascat, Dosatec, München) verfolgt wird. Die maximale Streuung, die beim Übergang von der Rayleigh-Streuung (an kleinen Molekülen) zur Debye-Streuung (an großen Molekülen) auftritt, ist der gesamten Proteinkonzentration proportional. Der besondere Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß auch sehr geringe Proteinkonzentrationen bestimmt werden können und die Messung unabhängig von sonst störenden Einflüssen wie Detergenzien ist.

Von der zu messenden Proteinlösung wird eine 1:10 bis 1:20 Verdünnung hergestellt. 50 µl der Verdünnung werden dann im Meßröhrchen durch Zugabe von 450 µl TCA gefällt und die Streulichteinheiten im zuvor kalibrierten Dosascat-Gerät laut Herstellerprotokoll bestimmt.

3.4.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970)

Zur Auftrennung von Proteinen mit einer Größe zwischen 30 kD und 200 kD wird ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet, das aus einem unteren 8,5-10 % Trenngel und einem oberen 3-5% Sammelgel mit unterschiedlichen pH-Werten und Ionenstärken besteht. Zur Auftrennung größerer Proteine werden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 4% eingesetzt. Durch Anlagerung von SDS-Molekülen an die Proteine entstehen negativ geladene Komplexe, die beim Durchlaufen des Sammelgels eine Konzentrierung erfahren. Nach dem Übertritt in das Trenngel erfolgt dann die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes. Die Wanderung von Proteinen bekannter Größe kann während der Gelelektrophorese anhand eines farbigen Protein-Längenstandards (Kaleidoskope prestained high molecular weight marker, BioRad) verfolgt werden. Für alle Proteingele werden Glasplatten und Elektrophoresekammern der Firma BioRad verwendet, die auch zum anschließenden „Wet Transfer“ (3.4.5) auf eine Membran verwendet werden können.

Als Laufpuffer wird zur Elektrophorese ein Tris-Glycin-SDS-Puffer (Sigma) verwendet. Die Proteinproben werden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit denaturierendem 4x Probenpuffer (Roth) versetzt und für 3 min bei 90 °C erhitzt, um etwaige Sekundärstrukturen zu zerstören, die Einfluss auf das Wanderungsverhalten des Proteins im Gel haben könnten. Es werden 50 – 100 µg Gesamt-Proteinextrakte pro Gelspur eingesetzt. Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgt bei konstant 15 mA/Gel, bis die sichtbare blaue Farbfront das Trenngel erreicht hat. Die Auftrennung der Proteine in Trenngel erfolgt bei konstant 30 mA/Gel.

Elektrophorese-Puffer:	0,2 M	Glycin
	45 mM	Tris
	0,15 % (w/v)	SDS
	pH 8,6	
4x Trenngel-Puffer:	18,17 g	Tris-HCl
	4 ml	SDS (10 %)
	ad 100 ml	ddH ₂ O
	pH 8.8	
4x Sammelgel-Puffer:	6,06 g	Tris-HCl
	4 ml	SDS (10 %)
	ad 100 ml	ddH ₂ O
	pH 6.8	
SDS-Probenpuffer:	2 ml	Glycerin
	2 ml	SDS (10 %)
	0,25 mg	Bromphenolblau
	2,5 ml	4x Sammelgel-Puffer
	ad 9,5 ml	ddH ₂ O
erst kurz vor Gebrauch:	0,5 ml	β-Mercaptoethanol

3.4.5 „Wet-Transfer“

Der Vorteil des „Wet Transfer“ liegt in der Möglichkeit, die Pufferlösung zu kühlen, wodurch das Gel-Membran-„Sandwich“ vor Erwärmung geschützt werden kann. Somit offeriert diese Methode längere Transfer-Zeiten als der „Semi-Dry-Transfer“. Insbesondere sehr große Proteine, die sich normalerweise nur schlecht auf eine Membran übertragen lassen, können auf diese Art effizienter transferiert werden. Für den „Wet-Transfer“ werden die „Biorad Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“-Apparatur und PVDF-Membranen (Millipore) verwendet. Die Membran wird durch kurzes Eintauchen in 96 % MeOH und anschließendes 10 minütiges Schwenken in Transfer-Puffer für den

Blot vorbereitet. Das Gel wird vor dem Transfer 2-5 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Whatman-Papiere und Schaumstoffauflagen werden ebenfalls kurz in Transfer-Puffer angefeuchtet. Nach dem Zusammenbau des Gel-Membran-„Sandwiches“ (Abb. 2) erfolgt der Blot im Kühlraum bei konstant 40 V über Nacht.

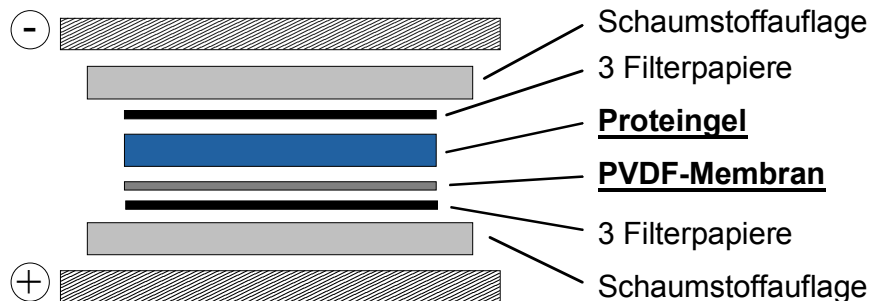


Abb. 2: Schematische Darstellung des „Wet-Transfers“ in der „Biorad Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“

Transfer-Puffer:	5 g	Tris
	29 g	Glycin
	400 ml	MeOH
	ad 1,5 l	ddH ₂ O

3.4.6 Immunologische Detektion von Proteinen im Western Blot

Der Nachweis von Proteinen aus einem Zellextrakt erfolgt mit Hilfe des Western Blot. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (3.4.4) und dem Transfer auf eine PVDF-Membran (3.4.5) kann ein Protein durch spezifische Antikörper auf der Membran nachgewiesen werden. Dabei wird der primär bindende Antikörper im nachfolgenden Schritt selbst durch einen sekundären, enzymgekoppelten Antikörper erkannt. Die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper sind an die Meerrettich-Peroxidase (horse raddish peroxidase, HRP) gekoppelt, deren Aktivität geeignete Substrate umsetzt; deren Produkt kann anschließend durch Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgt der Nachweis eines bestimmten Proteins in mehreren Schritten unter permanentem Schütteln bei RT:

- 1x 5 min Waschen in TBST
- Blocken unspezifischer Bindestellen mit 5% fettarmer Milch in TBST, 30 min
- Inkubieren mit dem primären Antikörper in TBST, 1h
- 3x 5 min Waschen in TBST
- Inkubieren mit dem sekundären Antikörper in TBST, 30 min
- 3-5x 5 min Waschen in TBST

Anschließend wird die Membran in einer Mischung der beiden Detektionslösungen Peroxidverbindung und Luminol/ Enhancer für 3-5 min geschwenkt. Das fluoreszierende Produkt emittiert Licht einer Wellenlänge von 425 nm; dieses wird durch Auflegen eines Röntgenfilms (1 min bis 2 h) nachgewiesen.

3.4.7 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Durch Immunfluoreszenzfärbung (IF) können Proteine direkt in der Zelle angefärbt werden. Das Prinzip des Nachweises gleicht dem des Western Blot: Ein erster Antikörper bindet spezifisch an ein bestimmtes Protein und wird nachfolgend von einem zweiten Antikörper erkannt. Der sekundäre Antikörper ist in diesem Fall an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und nachfolgend selbst Licht einer anderen Wellenlänge emittiert. Die Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle kann auf diese Weise mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Um den Kern deutlich vom Zytoplasma unterscheiden zu können, werden die Zellen zusätzlich mit DAPI, einem in die DNA interkalierenden Farbstoff angefärbt. Für die IF sind vor allem adhärente Zellen geeignet, die zunächst in „12-well“-Platten mit kleinen Deckgläschen (\varnothing 1 cm) ausgesät werden. Die Zellen setzen sich innerhalb weniger Stunden auf den Gläschen fest. Nach 24 – 72 h werden Deckgläschen aus den „12-well“-Platten herausgenommen und die auf der Oberseite angewachsenen Zellen darauf fixiert. Die Anfärbung intrazellulärer Proteine erfolgt wie nachstehend beschrieben.

- 1 3x 5 min waschen in PBS
- 2 Fixieren der Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei 4 °C für 10 min
- 3 3x 5 min waschen in PBS
- 4 Permeabilisieren der Zellmembran mit 0,1% Triton X-100 in PBS bei 4 °C für 3 min
- 5 Blocken unspezifischer Bindestellen mit Serum (optimal ist Serum desjenigen Organismus, dem der sekundäre Antikörper entstammt), 30 min, RT oder 4 °C, ÜN
- 6 Inkubation mit dem primären Antikörper, 1-10 $\mu\text{g/ml}$ PBS, für mindestens 1 h, RT
- 7 3x 5 min waschen in PBS
- 8 Inkubation mit dem sekundären, fluoreszenzgekoppelten Antikörper, 1:50 – 1:1000, für 30 min, RT
- 9 Inkubation mit DAPI für 2 min, RT
- 10 3x 5 min waschen in PBS
- 11 Trocknen der Deckgläschen für 5 – 10 min

Anschließend werden pro Deckglas 5 μl Vectashield Mounting Medium (Vector) auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf den Tropfen gelegt. Vor der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop werden die Gläschen auf dem Objektträger mit Nagellack fixiert.

Absorptions- und Emissions-Optima verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe

	Absorption (nm)	Emission (nm)	Emissionsfarbe
Alexa Fluor 488 (Ziege anti Kaninchen)	495	519	grün
Alexa Fluor 594 (Ziege anti Maus)	590	617	rot
DAPI	358	461	blau

3.4.8 Der „Protein Truncation Test“ (PTT)

Der PTT wird als Vortest bei der Mutationanalyse auf cDNA-Ebene eingesetzt. Er dient der Erkennung aller Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch (oder auch einer Vergrößerung) des resultierenden Proteins führen; in diese Kategorie gehören Nonsense-Mutationen sowie Deletionen, Insertionen oder Splice-Mutationen, die eine Leserasterverschiebung zur Folge haben. Bei Genen, die hauptsächlich von derartigen Störungen betroffen sind, können mit dem PTT bis zu 80% aller existierenden Mutationen gefunden werden. Dabei birgt der PTT besonders für die Mutationsanalyse in großen Genen, wie etwa dem *ATM*-Gen mit 9171 nt codierender Region, einen enormen zeitlichen Vorteil: Man unterteilt die kodierende Region des Gens in kleinere Fragmente, die anschließend in einer gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktion in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt werden. Ist eines dieser Polypeptide im PTT auffällig, muß nur in der entsprechenden relativ kurzen Region des Gens nach der zugrundeliegenden Mutation gesucht werden.

Der PTT erfolgt prinzipiell in vier Schritten:

- 1 Aus cDNA werden durch PCR mit geeigneten Primern ein oder mehrere Fragmente des zu untersuchenden ORFs amplifiziert
- 2 Die PCR-Produkte werden mit Hilfe eines gekoppelten Transkriptions/Translations-Systems unter Einbau einer radioaktiven Aminosäure (^{35}S -Met) in die jeweilige Proteinsequenz übersetzt
- 3 Die entstandenen Polypeptide werden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht

Für eine erfolgreiche Transkription und Translation müssen die PCR-Primer bestimmte Sequenzen an ihren 5'-Termini tragen. Der Forward-Primer besitzt die T7-RNA-Polymerase Promotorsequenz zum Transkriptionsstart, gefolgt von der sogenannten Kozak-Konsensus-Sequenz, die bei Eukaryonten für die Initiation der Translation benötigt wird und einem „in-frame“-Startkodon, ATG. Um am Ende der Translation einen korrekten Translationsstop in der Polypeptidkette zu gewährleisten, befindet sich am 5'-Ende des Reverse-Primers ein in-frame-Stopkodon, TAA. Die gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation wird mit dem „TNT T7 Coupled Transcription/Translation System“ (Promega) unter

Zugabe von ^{35}S -Methionin durchgeführt, um die entstehende Polypeptidkette radioaktiv zu markieren. Die Reaktion wird in einem Ansatzvolumen von 12,5 μl bei 30 °C, 90 min durchgeführt.

TNT T7 Quick Master Mix	10	μl
^{35}S -Methionin, 1000Ci/mmol, 10 mCi/ml	1	μl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	1,5	μl

Anschließend werden zur Analyse der Translationsprodukte 2,5 μl der Reaktion mit 10 μl SDS-Probenpuffer vermischt, 2 min auf 100 °C erhitzt, und in die Taschen eines 10% SDS-Polyacrylamidgels gefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgt wie unter 3.4.4 beschrieben, bis die blaue Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hat. Das Gel wird auf einem Gelrockner für ca. 30 min getrocknet, in eine Zellophanhülle eingeschlagen und über Nacht auf einen ^{35}S -sensitiven Röntgenfilm exponiert. Weist ein Polypeptid im Vergleich zur Kontrollbande ein verändertes Wanderungsverhalten im Gel auf, wird das PCR-Produkt des jeweils kodierenden Genfragmentes aufgereinigt (3.1.3) und einer Sequenzanalyse unterzogen (3.2.9).

3.5 „Yeast Two Hybrid“-System und „Interaction Trap“

Mit Hilfe des „Yeast Two Hybrid“-Systems können Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Hefe als Wirtsorganismus untersucht werden. Dabei können die bei diesem Test eingesetzten Hefestämme aufgrund ihrer Auxotrophien nur bei Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Proteinen überleben. „Two Hybrid“-Systeme machen sich die Domänenstruktur eukaryontischer Transkriptionsfaktoren zunutze, die häufig aus zwei Bestandteilen zusammengesetzt sind: aus einer Domäne für die spezifische DNA-Bindung und einer für die Transkriptionsaktivierung (KEEGAN et al. 1986). Beide Domänen können zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren ausgetauscht werden, ohne daß deren Funktionsfähigkeit eingeschränkt wird (BRENT und PTASHNE 1984), und es ist für die Transkriptionsaktivierung nicht notwendig, daß die DNA-bindende und die transkriptionsaktivierende Domäne miteinander kovalent verbunden sind (MA und PTASHNE 1987). Die zu untersuchenden Proteine werden im „Interaction Trap“ als Fusionsproteine mit jeweils einer der beiden Domänen eingesetzt. Das sogenannte „Köderprotein“ wird mit der DNA-bindenden Domäne des bakteriellen LexA-Repressors fusioniert (BRENT und PTASHNE 1985), während das „Beuteprotein“ in Fusion mit der transkriptionsaktivierenden Domäne B42 vorliegt (MA und PTASHNE 1987).

Das Hybridprotein mit der aktivierenden Domäne wird nun in einen Hefestamm eingeschleust, der das Hybridprotein mit der DNA-bindenden Domäne exprimiert. Eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen bringt die zwei Domänen in räumliche Nähe, wodurch die Transkription eines Reportergens induziert wird. Anhand des Reportergenproduktes kann die Interaktion nachgewiesen werden.

Als Reporter wird entweder das lacZ-Gen (kodiert von dem Plasmid pSH18-34) verwendet, wodurch die Interaktion in einer Blaufärbung der Hefezellen resultiert, oder man verwendet ein Gen, das die Hefe zur Synthese einer Aminosäure benötigt. Läßt man diese Aminosäure im Medium weg, können nur solche Zellen wachsen, in denen aufgrund einer Interaktion die Expression dieses Reportergens stattgefunden hat. Im Rahmen dieser Arbeit wird als Reporter das LEU2-Gen zur Selektion des Wachstums auf Leucin-defizienten Platten verwendet.

Als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle werden LexA-Gal4- und LexA-Bicoid-Fusionsproteine eingesetzt. Das LexA-Gal4-Fusionsprotein ist ein starker Aktivator beider Reportersysteme und wird vom Plasmid 17-4 kodiert. Das durch pRFMHI kodierte LexA-Bicoid-Fusionsprotein ist dagegen transkriptionell inert.

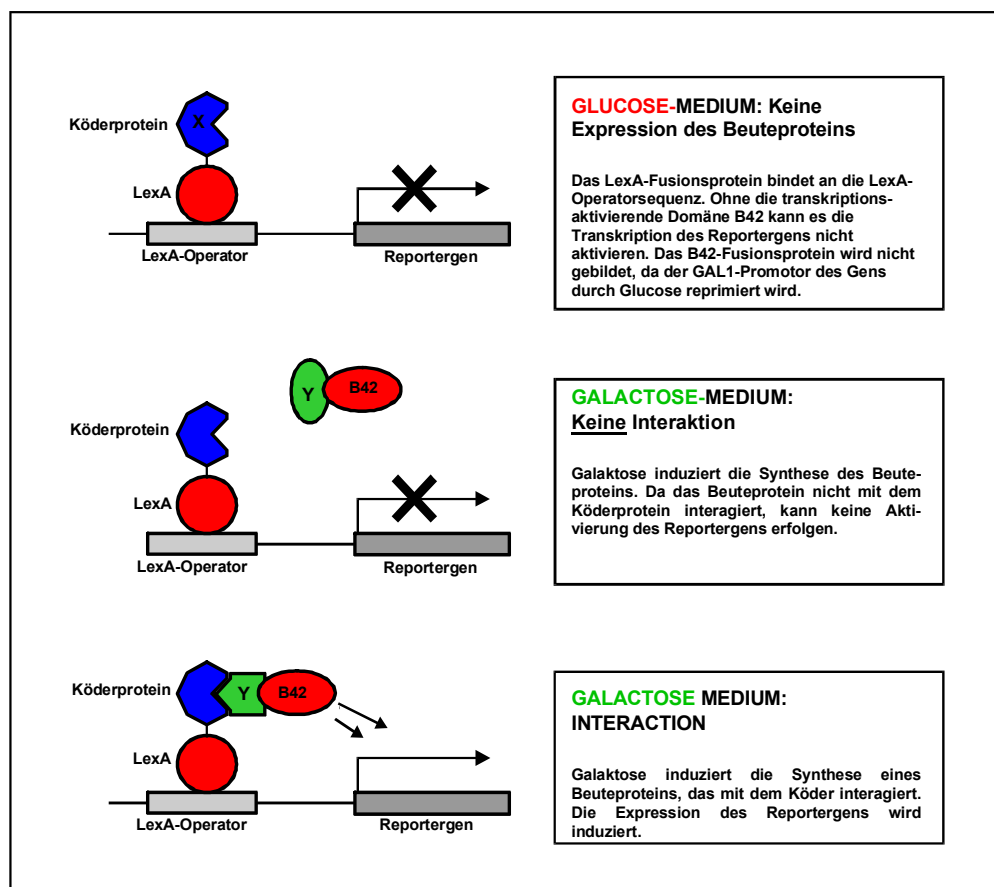


Abb. 3: Prinzip des „Interaction Trap“.

3.5.1 Kultivierung von Hefezellen

Hefen werden entweder in Flüssigkultur oder auf Agarplatten kultiviert, die optimale Wachstumstemperatur beträgt 30 °C. In Flüssigkultur läßt sich die Zahl der Hefezellen/ml anhand der Absorption bei 600 nm bestimmen. Ein gemessener A_{600} -Wert von 1,0 entspricht einer Zelldichte von ca. $3 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$. In dieser Arbeit werden Hefezellen des Stammes EGY48 verwendet.

3.5.1.1 Flüssigkultur

Zur Vermehrung in Flüssigkultur werden alle Hefezellen in Kolben bei 180 rpm, 30 °C geschüttelt. Nicht transformierte Hefen werden in YPD-Vollmedium vermehrt, plasmid-transformierte Hefen werden zur Selektion in entsprechendem Minimalmedium unter Entzug bestimmter Metabolite geschüttelt. Minimalmedien werden zur Selektion auf bestimmte auxotrophe Fähigkeiten der Hefe verwendet. Das Fehlen bestimmter Metabolite im Medium kann nur durch deren de novo Synthese ausgeglichen werden. Dies macht man sich nach einer Plasmidtransformation zunutze, indem man auf die Funktionalität eines Gens selektioniert, das auf dem transformierten Plasmid lokalisiert ist. Der verwendete Hefestamm EGY48 ist auxotroph für die Synthese der vier Metabolite Histidin, Uracil, Tryptophan und Leucin. Die His-, Ura- und Trp- Auxotrophie wird durch plasmid-kodierte Gene komplementiert, die Leu-Auxotrophie durch Interaktion von Köder- und Beute-Protein. Zum Erhalt eines Plasmids wird die entsprechende Substanz in Minimalmedium wegelassen.

YPD-Vollmedium:	1 % (w/v)	Yeast Extract
	2 % (w/v)	Trypton
	2 % (w/v)	Glucose
für Platten:	plus 2 % (w/v)	BactoAgar

Minimalmedium	2 % (w/v)	Glukose od. Galaktose
	0,67 % (w/v)	Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren
	1 x	AS-Mischung
	1 x	Selektionsmetaboliten
für Platten	plus 2 % (w/v)	BactoAgar

Alle Komponenten des Minimalmediums werden getrennt hergestellt und autoklaviert. Die Hefe-Stickstoffbasis wird in entsprechender Menge in ddH₂O autoklaviert, die übrigen Komponenten werden nach dem Autoklavieren separat zugegeben.

AS- (+ Adenin) Mischung: (20x)	Adeninsulfat	40	µg/ml	L-Phenylalanin	50	µg/ml
	L-Arginin	20	µg/ml	L-Serin	375	µg/ml
	L-Aspartat	100	µg/ml	L-Threonin	200	µg/ml
	L-Glutamat	100	µg/ml	L-Tyrosin	30	µg/ml
	L-Lysin	30	µg/ml	L-Valin	150	µg/ml
	L-Methionin	20	µg/ml			

Selektions-Metaboliten:	24 µg/ml	L-Histidin
(100x)	72 µg/ml	L-Leucin
	50 µg/ml	L-Tryptophan
	24 µg/ml	Uracil

3.5.1.2 Plattenkultur

Alle Nährstoffe entsprechen denen der Flüssigkultur, zusätzlich werden noch 2% (w/v) BactoAgar zugegeben. Alle Agarplatten werden für die Inkubation bei 30 °C zum Schutz vor Austrocknung mit Parafilm umwickelt, die Inkubation der Hefen bei 40 °C erfolgt für 2-4 Tage.

Für den Nachweis des lacZ-Reportergens werden dem X-Gal-Plattenmedium nach dem Abkühlen des auf etwa 65°C zusätzlich X-Gal in Dimethylformamid in einer Endkonzentration von 80 mg/l und 1 x BU-Salze zugesetzt. Die BU-Salze stabilisieren den für die β-Galaktosidase optimalen pH-Wert von 7,0 innerhalb der Agarplatten.

10 x BU-Salze:	7 % (w/v)	Na ₂ HPO ₄
	3 % (w/v)	NaH ₂ PO ₄
		auf pH 7,0 justieren

3.5.1.3 Glycerinkultur

Hefezellen werden aus einer über Nacht im Schüttler vermehrten Flüssigkultur zentrifugiert (400 Upm, 5 min, 4 °C). Das Sediment wird in 2-3 Sediment-Volumen Glycerinpuffer aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Glycerinpuffer:	10 mM	Tris/HCl; pH 7,5
	10 mM	MgCl
	15 %	Glycerin

3.5.2 Transformation von Hefezellen

Für alle Plasmide wird die Standard-Transformation nach GIETZ und WOODS (1995) verwendet, die auch für die gleichzeitige Transformation zweier Plasmide geeignet ist. Zur Transformation wird eine Hefekolonie in 4-6 ml des entsprechenden Mediums angeimpft und über Nacht in einem 15 ml Falconröhrchen geschüttelt.

Am nächsten Morgen wird die Suspension in ein 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit frischem Medium auf eine OD600 von 0,2-0,4 verdünnt. Die Kultur wird dann für 2-6 Stunden in einem 30 °C-Schüttler inkubiert, bis eine OD600 zwischen 0,8 und 1,2 erreicht ist. Die Kultur wird abzentrifugiert

(400 Upm, 5 min, 4 °C) und das Sediment zweimal in je 20 ml ddH₂O gewaschen. Die Hefezellen werden dann in 1 ml 0,1 M Lithiumacetat bei 30°C für 5 min inkubiert. Diese Suspension wird anschließend auf so viele Reaktionsgefäße aufgeteilt, wie Transformationen durchgeführt werden sollen. In der Tischzentrifuge (13000 Upm, 30 s, RT) werden die Hefezellen pelletiert und dann pro Ansatz die nachfolgend aufgelisteten Lösungen auf das Sediment gegeben.

- 240 µl PEG 3500 (50 % w/v)
- 36 µl 1,0 M Lithiumacetat
- 25 µl ss-Lachssperma-DNA (2,0 mg/ml), wird zuvor 15 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis gekühlt
- 30 µl ddH₂O
- bis zu 5 µl Plasmid-DNA (100 ng-2 µg)

Die Transformationsansätze werden durch Vortexen für mind. 1 min gemischt und dann bei 42°C für 20 min inkubiert. Je nach Hefe-Zelldichte werden 50-200 µl des Transformationsansatzes auf vorgetrocknete Platten ausplattiert.

3.5.3 Durchführung des „Interaction Trap“

3.5.3.1 Transformation der Hefen

Hefen des Stammes EGY48 werden nacheinander mit drei verschiedenen Vektoren transformiert :

- (1) mit dem pEG202 Vektor, der ein LexA-Fusionsprotein („Köder“) kodiert
- (2) mit dem pSH18-34 Vektor, der das lacZ-Reportergen trägt
- (3) mit dem pJG4-5 Vektor, der ein B42-Fusionsprotein („Beute“) kodiert.

Nach der dritten Transformation werden die Hefen auf Glu HUT-Platten ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

3.5.3.2 Test auf Selbstaktivierung des LexA-Fusionsproteins

Falls das LexA-Fusionsprotein selbst transkriptionsaktivierende Eigenschaften besitzt, vermag es die Transkription der beiden Reportergene, LEU2 und lacZ, auch ohne Interaction mit dem B42-Fusionsprotein zu aktivieren; in diesem Fall kann das Protein nicht in Fusion mit der DNA-bindenden LexA-Domäne im Interaction trap eingesetzt werden. Zur Überprüfung der LexA-Fusionsproteine auf selbstaktivierende Eigenschaften werden Hefezellen nach der Transformation mit zwei Plasmiden, pEG202 und pSH18-34, auf folgende Platten in mehreren Verdünnungsreihen aufgetropft:

- Glu HU
- Glu HUL
- Glu HUX

Bei starkem Wachstum auf Glu HUL- oder starker Blaufärbung auf GluHUX-Platten liegt eine transkriptionsaktivierende Eigenschaft des lexA-Fusionsproteins vor.

3.5.3.3 Test auf Interaktion zwischen Köder- und Beute-Fusionsprotein

Sind alle drei Vektoren (siehe 3.5.3.1) in die Hefezellen transformiert worden, kann auf Aktivierung der beiden Reportersysteme, LEU2 und lacZ getestet werden. Zur vergleichenden Phänotypisierung im Interaction trap werden 3-5 Kolonien von einer Minimalplatte gekratzt und in 100 µl ddH₂O suspendiert. Von dieser Suspension stellt man mehrere Verdünnungen (1:1, 1:20, 1:400) her, von denen jeweils 10-15 µl auf eine vorgetrocknete Agarplatte aufgetropft werden. Zur Selektion auf LEU2- und lacZ- Aktivierung sowie zur Doppelselektion auf beide Reportersysteme, LEU2/lacZ, werden die Hefesuspensionen auf folgende Agarplatten getropft:

GluHUT			[Kontrolle der Hefezellendichte pro Tropfen]
GluHUTL	⇔	GalHUTL	[Aktivierung des LEU2-Reporters]
GluHUTX	⇔	GalHUTX	[Aktivierung des lacZ-Reporters]
GluHUTLX	⇔	GalHUTLX	[Aktivierung von LEU2 <i>und</i> lacZ]

3.6 Kultivierung von Säugerzellen

Im Rahmen dieser Arbeit werden humane lymphoblastoide B-Zellen, Fibroblasten, sowie HEK293, HEK293T und COS-7 Zellen verwendet. Zur Kultivierung der Lymphoblasten wird RPMI-Medium mit 15% FKS verwendet. Primäre Fibroblasten werden in MEM-Medium mit 10% FKS, transformierte Fibroblasten sowie HEK, HEK293 und COS-7 Zellen in MEM-Medium mit 15% FKS kultiviert. Zum Einfrieren werden Zellen in einem 15 ml Falkonröhrchen sedimentiert und in Einfriermedium aufgenommen. Das stufenweise Abkühlen der Zellsuspension auf -80 °C erfolgt in einer Isopropanol-Einfrierbox; anschließend werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.6.1 Überexpression von Proteinen in Säugerzellen

Die Überexpression eines bestimmten Proteins in Säugerzellen ist dann sinnvoll, wenn keine spezifischen Antikörper gegen das Protein zur Verfügung stehen oder die zelleigene endogene Proteinexpression zu schwach für einen direkten Nachweis ist. Im ersten Fall wird das Protein in Fusion mit einem sogenannten „Tag“ exprimiert, einer kurzen Aminosäuresequenz, die von spezifischen, kommerziell erhältlichen Antikörpern erkannt wird. In der vorliegenden Arbeit werden „pCMV-Tag“-Vektoren verwendet, die eine Proteinexpression mit N-terminalem FLAG (DYKDDDDK)- oder c-myc (EQKLISEEDL)- Tag ermöglichen. Durch entsprechende Promotorsequenzen können die pCMV-Vektoren sowohl in Säugerzellen als auch in *E. coli* repliziert werden; ein zusätzlich vom Plasmid kodiertes Resistenzgen erlaubt die Selektion mit G418 oder Kanamycin. Nach der Transfektion der Plasmide in die Säugerzellen kann die Proteinexpression nach 24-72 h durch Western Blot oder Immunfluoreszenzfärbung überprüft werden.

3.6.2 Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion adhärenter Zellen (HEK293, COS-7) erfolgt mit dem „FuGENE 6 Transfection Reagent“ der Firma Roche. In einer 35 mm Gewebekulturschale werden Zellen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40-70 % im 37 °C Brutschrank inkubiert. Pro Transfektion werden jeweils 2 µg Plasmid-DNA und 6 µl FuGENE eingesetzt. Das Volumen des Kulturmediums wird vor der Transfektion auf 2,5 ml /Schale reduziert.

Pro Transfektion werden die Reagenzien in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß in folgender Reihenfolge zugegeben:

- 1 94 µl FKS-freies Medium
- 2 6 µl FuGENE (*direkt* in das Medium pipettieren)
- 3 2µg Plasmid-DNA (mit 0,1 – 2,0 µg/µl)

Die Komponenten werden durch vorsichtiges Schnippen gegen das Gefäß vermischt und für 30 min bei RT inkubiert.

Anschließend wird die Lösung tropfenweise in die Kulturschale gegeben und durch Schwenken gut verteilt. Da das Transfektionsreagenz nicht toxisch für die Zellen ist, entfällt das Wechseln des Mediums. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz werden in einem Kontrollansatz Zellen mit einem GFP-Vektor (GFP, green fluorescent protein) transfiziert, nach etwa 24 h erscheinen die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 496 nm leuchtend grün.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ataxia Telangiectasia – Suche nach seltenen Spleißmutationen und deren Konsequenzen im *ATM*-Gen

Das *ATM*-Gen (*ATM*, Ataxia Telangiectasia Mutated) ist überdurchschnittlich häufig von Spleißmutationen betroffen. Neben Punktmutationen innerhalb der hochkonservierten intronischen Dinukleotidpositionen gt und ag an den 5'-Donor- und 3'-Akzeptor-Spleißstellen, respektive, können auch Veränderungen der umliegenden, weniger konservierten 5'- bzw. 3'-Konsensussequenzen in aberrantem Spleißen resultieren. Zur Identifizierung solcher Mutationen in Zellen klassischer AT-Patienten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst eine intensive Mutationssuche mit Hilfe des „Protein Truncation Test“ (PTT) durchgeführt (3.4.8) und der Schweregrad der identifizierten Spleißmutationen mit Hilfe des „RNA Splice Scoring“-Systems (SHAPIRO und SENAPATHY, 1987) berechnet (3.2.10). Die Penetranz der Spleißmutationen wurde anschließend durch semiquantitative PCR analysiert (3.2.8) und die Konzentrationen an residualem ATM-Protein in den entsprechenden lymphoblastoiden AT-Zelllinien durch Western Blotting bestimmt (3.4.4 – 3.4.6).

4.1.1 Etablierung des „Protein Truncation Test“ (PTT) zur Mutationsanalyse im *ATM*-Gen

Die kodierende Region des *ATM*-Gens ist mit einer Länge von 9171 bp sehr lang. Eine direkte Sequenzierung der *ATM*-cDNA, bzw. der 66 AT-Exons wäre daher mit einem hohem Zeitaufwand verbunden. Da circa 70 % aller *ATM*-Mutationen in einer Trunkierung des Proteins resultieren, wurde als Vortest zur Mutationsanalyse der „Protein Truncation Test“ (PTT) etabliert. Das Prinzip des PTT beruht auf einer gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation, bei der – im Fall großer Gene - verschiedene überlappende cDNA-Fragmente separat in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt werden. Die entstehenden Oligopeptide werden dabei durch den Einbau von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert (3.4.8) und anschließend über ein denaturierendes PAA-Gel aufgetrennt (3.4.4). Liegt in einem cDNA-Fragment eine trunkierende Mutation vor, ist das resultierende Oligopeptid verkürzt und weist im Vergleich zu einer normalen Kontrolle ein verändertes Wanderungsverhalten im Gel auf. Das entsprechende kodierende cDNA-Fragment wurde anschließend mit Hilfe eines ABI 310 Sequencers analysiert. Zur Durchführung des PTT wurde die *ATM*-cDNA in 12 überlappende Bereiche unterteilt. Aus lymphoblastoiden AT-Zellen wurde Gesamt-RNA gewonnen (3.1.4) und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (3.2.6). Die Amplifikation der 12 cDNA-Fragmente mittels PCR erfolgte mit den unter 2.4 aufgeführten PTT-Primern. Die Forward-Primer

waren zur anschließenden Transkription und Translation am 5'-Ende mit einer speziellen Nukleotidfolge konzipiert:

Sie tragen die T7-RNA-Polymerase Promotorsequenz zum Transkriptionsstart, gefolgt von der sogenannten Kozak-Konsensus-Sequenz, die bei Eukaryonten für die Initiation der Translation benötigt wird sowie ein in-frame-Startkodon, ATG:



Um einen korrekten Translationsstop der naszierenden Polypeptidkette zu gewährleisten, wurde der Reverse-Primer am 5'-Ende mit einem Stopkodon, TAA, konzipiert. Die Fragmentlängen der 12 überlappenden PCR-Produkte sowie die Länge ihrer Translationsprodukte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Position und Länge der überlappenden PCR-Fragmente der *ATM*-cDNA sowie erwartete Größen der translatierten Proteinfragmente

Nummer	Fragment (PCR)		Polypeptid
	Position (cDNA)	Länge (bp)	Grösse (kDa)
1	-39 - 1212	1251	47.1
2	958 - 2184	1226	46.6
3	1633 - 2879	1246	40.0
4	2539 - 3570	1031	39.0
5	3235 - 4384	1149	43.8
6	3904 - 5097	1193	45.0
7	4813 - 6046	1233	47.0
8	5659 - 6929	1270	49.0
9	6538 - 7802	1264	48.9
10	7258 - 8329	1071	41.1
11	7846 - 8929	1083	41.4
12	8152 - 9173	1021	39.3

Nach erfolgter RT-PCR wurden die Fragmente auf einem analytischen Agarosegel überprüft. Lag auf einem der beiden transkribierten *ATM*-Allele eine Spleißmutation vor, die auf cDNA-Ebene zur vollständigen oder partiellen Deletion eines Exons führte, wurden durch die RT-PCR der entsprechenden cDNA-Abschnitte zwei Fragmente unterschiedlicher Länge amplifiziert, die leicht als Doppelbande im Agarosegel erkennbar waren (Abb. 4a und 4b). In solchen Fällen wurden beide DNA-Banden getrennt aus dem Agarosegel eluiert und direkt einer Sequenzanalyse unterzogen.

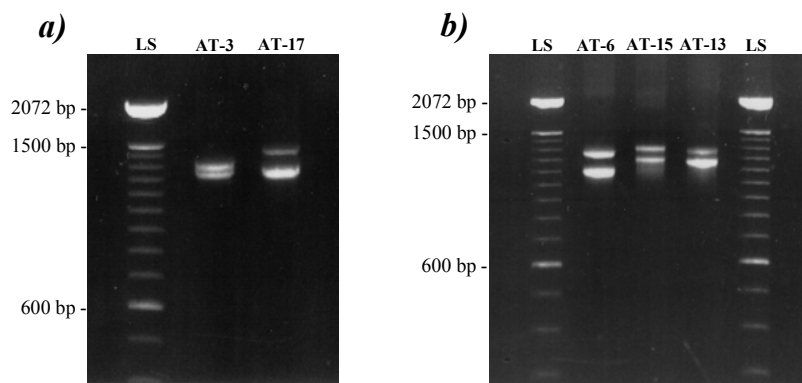


Abb. 4: Doppelbanden verschiedener PCR-Fragmente aus cDNA der Zelllinien AT-3, AT-17, AT-6, AT-15 und AT-13. a) Insertionen: 58 nt (AT-3) und 166 nt (AT-17) in PCR-Fragment 3; Deletionen: 165 nt (exon 7, AT-6) in PCR-Fragment 1, 103 nt (exon 44, AT-15) in PCR-Fragment 8, 114 nt (exon 53, AT-13) in PCR-Fragment 9.

Die übrigen PCR-Produkte wurden ohne weitere Aufreinigung in die gekoppelte Transkriptions-Translations-Reaktion unter Zugabe von ³⁵S-Methionin eingesetzt. Die Translationsprodukte wurden auf einem 10 % PAA-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und über Nacht auf einen ³⁵S-sensitiven Röntgenfilm exponiert. Wies ein Translationsprodukt im Vergleich zu einer normalen Kontrollbanden ein abweichendes Wanderungsverhalten im Gel auf (Abb. 5), wurde die Sequenz des jeweils kodierenden PCR-Produktes nach der zugrundeliegenden Mutation durchsucht. Zusätzlich wurden alle auf cDNA-Ebene identifizierten Mutationen auch auf die zugrundeliegenden Veränderungen auf genomischer Ebene analysiert (siehe auch Abb. 6 a und b).

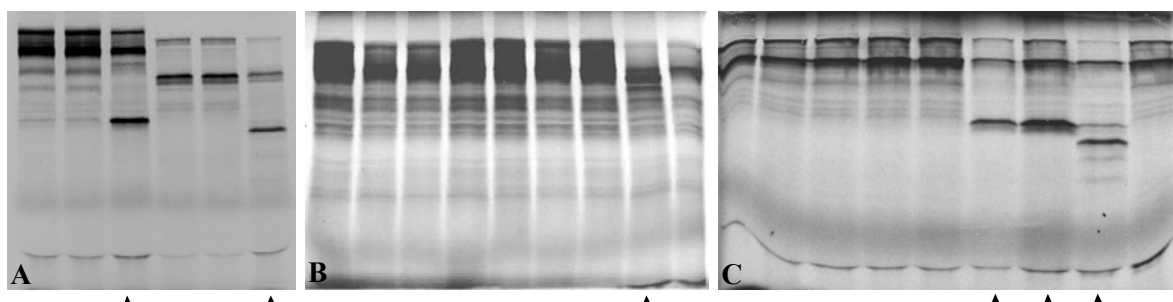


Abb. 5: Protein Truncation Test. Autoradiographie ³⁵S-markierter PTT-Translationsprodukte. Trunktierte Proteinbanden (Pfeile) von links nach rechts: A, PTT-Fragmente 3+4, Linie 18 (linke 3 Spuren) und Linie 9 (rechte 3 Spuren). B, PTT Fragment 7, Linie 2. C, PTT Fragment 12, Linien 7+8 (Geschwister) sowie Linie 9.

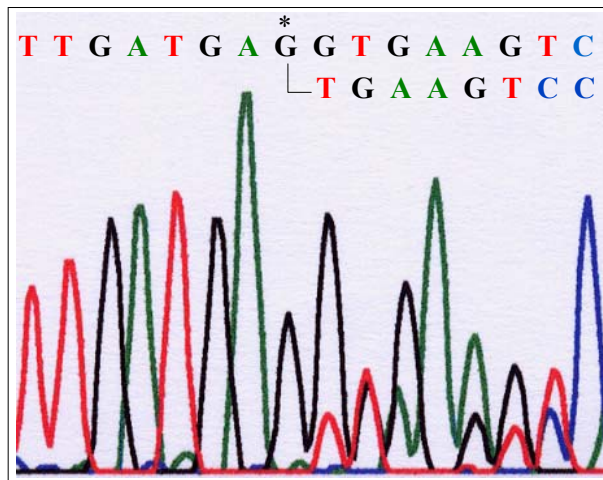


Abb. 6a: Zelllinie 13; Sequenzierung des PCR-Fragmentes Nummer 5 aus cDNA, Mutation 3802delG. Das delierte Nukleotid ist durch * gekennzeichnet. Obere Reihe: Wildtypsequenz, untere Reihe: Sequenz nach der Deletion.

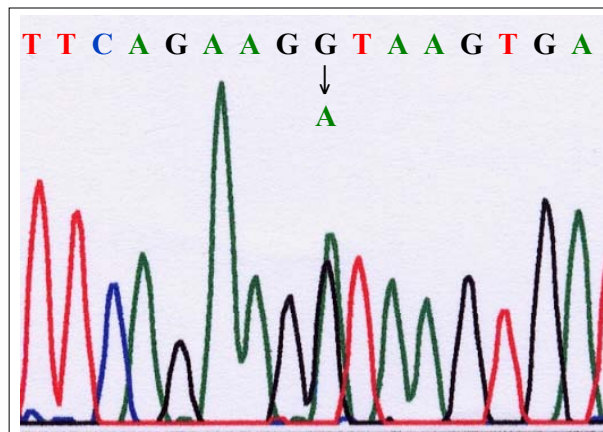


Abb. 6b: Zelllinie 9; Sequenzierung des PCR-Fragmentes von Exon 62 aus genomischer DNA, Mutation: IVS62+1G→A.

4.1.2 Identifizierung trunkierender Mutationen im *ATM*-Gen von 20 Patienten

Unter Verwendung des PTT wurden in 20 AT-Patienten 25 der 40 obligat vorliegenden Mutationen im *ATM*-Gen identifiziert, was einer Detektionsrate von 62 % entspricht. Alle identifizierten Mutationen sind in der nachfolgenden Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 6: Liste aller identifizierter Mutationen im *ATM*-Gen.

Zelllinie	Kürzel	genomische Mutation	Exon(s)	Konsequenz Transkript	Effekt Protein
1	BJA	ND	----	----	----
2	BRA	5932G→T	42	stop	T
3	BYI	IVS19-384A→G (55706A→G)	19/20	Insertion 58 nt zwischen Exons 19/20	FS, T
4	CKE	3576G→A (letztes bp in Ex.on 26)	26	skipping Exon 26	in frame-Deletion 58 AS
5	HEC	IVS53-2A→C	54	skipping Exon 54 und Deletion der ersten 11 nt von Exon 54	in frame-Deletion 53 AS oder FS, T
		5932G→T	42	stop	T
6	KIA	23526-23547 del 18nt (Grenze Exon/Intron 7)	7	skipping Exon 7	in frame-Deletion 55 AS
7 + 8	KII + KIT (Geschwister)	IVS53-2A→C	54	skipping Exon 54 und Deletion der ersten 11 bp von Exon 54	in frame-Deletion v 53 AS oder FS, T
		8793T→A	61	stop	T
9	KNS	IVS23-2A→G	23/24	Insertion von 14 nt zw. Exons 23 und 24	FS, T
		IVS62+1G→A	62	skipping Exon 62	FS, T
10	KRT	ND	----	----	----
11	KSA	8050C→T (homozygot)	57	stop	T
12	PLR	4024G→T	29	stop	T
		8385 – 8394 del 10 nt	59	stop nach 8412	FS, T
13	PLS	3802delG	28	stop nach 3802	FS, T
		IVS53+1G→A	53	skipping Exon 53	in frame-Deletion 38 AS
14	RHM	8385 mit 8394 del 10 nt	59	stop nach 8412	FS, T
15	SKR	6198G→C (letztes bp in exon 44)	44	skipping Exon 44	FS, T
16	SRD	5932G→T	42	stop	T
17	SRMA	IVS15-913A→G (42982A→G)	15/16	Insertion von 166 nt zw. Exons 15 und 16	FS, T
18	SRMN	IVS16-1G→C	17	Skipping der ersten 19 nt von Exon 17	FS, T
19	SYM	ND	----	----	----
20	WNM	ND	----	----	----

[Tabelle 6 auf der vorherigen Seite zeigt die Übersicht über die in 20 AT-Zelllinien identifizierten Mutationen. Spleißmutationen und ihre Konsequenzen sind in Fettdruck abgebildet. Die Numerierung der Nukeotide erfolgt nach der cDNA-Sequenz, die von Savitzky et al. (1995b, GenBank accession number U33841) beschrieben wurde. Das Nukleotid an Position 1 entspricht dem ersten Nukleotid des ATG-Startkodons in Exon 4. Abkürzungen: FS, frame shift; T, Trunkierung; nt, Nukleotid(e).]

Unter den trunkierenden Mutationen befanden sich insgesamt 8 Nonsense-Mutationen, 5 direkte Deletionen und 12 Spleißmutationen, wobei einige Mutationen in mehreren AT-Zelllinien identifiziert wurden (Tab. 6). Die Spleißmutation IVS53-2A→G lag in Zellen von drei AT-Patienten jeweils heterozygot vor, es wurden daher 10 unterschiedliche Spleißmutationen in 20 AT-Zelllinien gefunden, von denen sieben zuvor noch nicht beschrieben worden waren.

4.1.3 Einteilung der 7 neu identifizierten Spleißmutationen des *ATM*-Gens in Subkategorien

Charakterisiert man die 7 verschiedenen Spleißmutationen in Bezug auf ihre Position innerhalb der genomischen Spleiß-Konsensussequenzen im *ATM*-Gen, ergibt sich die in Tabelle 7 dargestellte Verteilung; zur Übersicht sind die Konsequenzen jeder Spleißmutation auf cDNA-Ebene nochmals dargestellt:

Tab. 7: Lokalisierung der neu identifizierten *ATM*-Spleißmutationen innerhalb der Spleiß-Konsensussequenzen und Darstellung ihre Konsequenz auf cDNA-Ebene.

Mutationen an den “canonical splice sites”: (3)	IVS16-1G→C	skipping der ersten 19 nt von Exon 17 (FS, T)
	IVS23-2A→G	Insertion von 14 nt zwischen die Exons 23 und 24 (FS, T)
	IVS53+1G→A	skipping Exon 53
Deletion der Exon/Intron-Grenze: (1)	23526 – 23547 del 18 nt (Exon 7)	skipping Exon 7 (in frame)
nicht-konservative Spleißmutationen: (3)	42982A→G (Exons 15/16)	Insertion von 166 nt (Pseudoexon) zwischen Exons 15/16 (FS, T)
	55706A→G (Exons 19/20)	Insertion von 58 nt (Pseudoexon) zwischen Exons 19/20 (FS, T)
	6198G→C (Exon 44)	skipping Exon 44 (FS, T)

4.1.4 Evaluierung der 7 neu identifizierten Spleißmutationen mit Hilfe des „Splice Scoring“-Systems (SHAPIRO und SENAPATHY 1987)

Um innerhalb der genomischen Sequenz eines Gens die Exon/Intron-Grenzen identifizieren zu können, wurde von SHAPIRO und SENAPATHY (1987) mit Hilfe einer Gen-Datenbank eine systematische Analyse der RNA-Spleißstellen eukaryontischer Gene durchgeführt und die Konservierung der Nukleotidpositionen an den 5'-Akzeptor- und 3'-Donor-Spleißstellen (ss) bestimmt. Zusätzlich zu den hochkonservierten Dinukleotidpositionen **gt** (5'-ss) und **ag** (3'-ss) wurden an beiden Exongrenzen weitere konservierte Nukleotidpositionen identifiziert. An der 5'-Spleißstelle sind dies die Positionen -2 bis +6, an der 3'-Spleißstelle die Positionen -14 bis +1.

Um für die im Rahmen dieser Dissertation neu identifizierten 7 Spleißmutationen die Änderung der Spleißstellenwerte bzw. die Wertung neu entstandener Spleißstellen zu bestimmen, wurde der jeweilige Wert für die Wildtyp- versus die mutierte Sequenz, und - falls vorhanden - auch für die alternativ genutzte Spleißstellensequenz berechnet (3.2.10). Zusätzlich wurde für jedes Exon die Wertung der zweiten, nicht mutierten Spleißstelle bestimmt. Die verschiedenen Wertungen sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tab. 8: Wertungen der Spleiß-Konsensussequenzen (in Prozent) an der 5'-Akzeptor- bzw. 3'-Donor-Spleißstelle der betroffenen Exons. Bei Mutationen, die zu aberrantem Spleißen eines zusätzlichen Exons führen, beziehen sich die Wertungen des "Wildtyps" auf die intronischen 5'- bzw. 3'- „Pseudo“-Spleiß-Konsensussequenzen, die normalerweise nicht zu einem Spleißen der Pseudoexons führen. E, Exon.

Mutation	Linie	5'-ss Wildtyp	5'-ss Mutation	5'-ss alternative Spleißstelle	3'-ss Wildtyp	3'-ss Mutation	3'-ss alternative Spleißstelle
IVS16-1G→C	18	94.3	---	---	74.7	59.0	73.8
IVS23-2A→G	9	81.0	---	---	88.2	72.2	81.6
IVS53+1G→A	13	93.0	74.8	---	82.5	---	---
23526-23547 del 18 (E 7)	6	88.7	0	---	77.9	---	---
42982A→G [ins 166 nt], E 15/16)	17	73.2	85.6	---	95.5	---	---
55706A→G [ins 58 nt] (Exon 19/20)	3	61.1	79.4	---	86.1	---	---
3576G→A (E 26)	4	74.3	60,0	---	82.27	---	---
6198G→C (E 44)	15	74.8	61.3	---	84.7	---	---

4.1.5 Semiquantitative PCR und Western Blotting aus 7 AT-Zelllinien mit neuen Spleißmutationen

Das Prinzip der semiquantitativen PCR (3.2.8) beruht auf einer möglichst linearen Amplifizierung von cDNA-Fragmenten. Um bestimmte Transkripte in direktem Verhältnis zur ursprünglich vorliegenden Kopienzahl zu vervielfältigen, wird die mRNA zunächst durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend unter Verwendung von α -³²P-ATP in eine PCR mit 25 Zyklen eingesetzt, da die Amplifikation bei höheren Zykluszahlen logarithmische Eigenschaften annimmt.

Diese Quantifizierung ist besonders zur Evaluierung von Spleißmutationen von Interesse: Liegt auf einem Allel eine Spleißmutation mit unvollständiger Penetranz vor, kommt es zum sogenannten "leaky splicing", d.h. das Primärtranskript wird trotz der Mutation teilweise noch richtig gespleißt. Durch semiquantitative PCR mit 25 Zyklen werden die jeweiligen Anteile gespleißter und ungespleißter mRNA-Moleküle linear amplifiziert, so daß ihr Verhältnis zueinander zahlenmäßig gleichbleibt (3.2.8). Die PCR-Fragmente werden anschließend auf einem denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt (3.1.2). Nach der Exposition des Gels auf einen Röntgenfilm erscheinen die unterschiedlich gespleißten Fragmente als Doppelbanden, deren Intensität mit Hilfe eines Densitometers bestimmt wird. Besitzt die Bande, die das DNA-Fragment mit der Spleißaberration repräsentiert, eine geringere Intensität als die Bande mit der Wildtypsequenz, liegt das fehlerhaft gespleißte *ATM*-Transkript in den Zellen in geringerer Konzentration vor, was als Hinweis auf "leaky splicing" gedeutet werden kann.

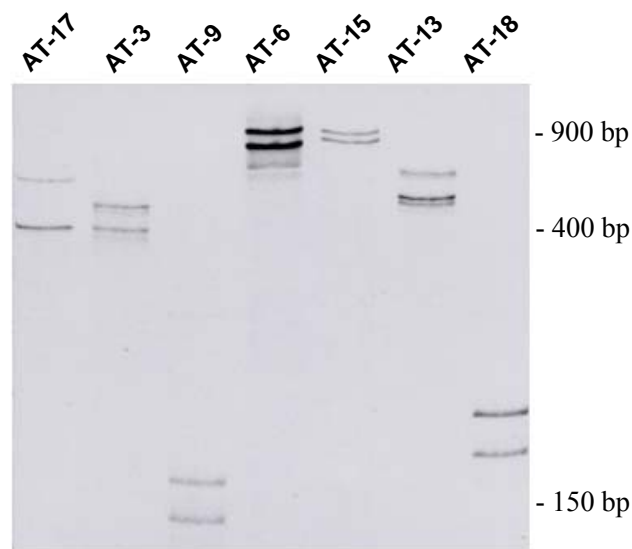
Falls eine Mutation keine vollständige Penetranz besitzt und "leaky splicing" ermöglicht, liegt folglich ein Teil der mRNA-Moleküle in korrekter Wildtyp-Form vor, die eine Translation des Vollängen-*ATM*-Proteins ermöglicht. Dieses sollte – wenn auch in geringer Konzentration – durch eine Western Blot-Analyse in Gesamt-Proteinextrakten der entsprechenden AT-Zellen nachweisbar sein.

Für die 7 AT-Zelllinien 3, 6, 9, 13, 15, 17 und 18, die jeweils eine der in Tabelle 8 aufgeführten Spleißmutationen tragen, wurden sowohl semiquantitative PCRs aus cDNA, als auch Western Blots aus Gesamt-Proteinextrakten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 a und b zusammengefaßt. Für die PCR wurden PTT-Primer und Primer aus bereits existierenden Laborbeständen verwendet. Die nach der Durchführung der semiquantitativen PCR erwarteten Fragmentlängen der sieben PCR-Doppelbanden sind zur Übersicht in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Quantitative PCR zur Amplifizierung der Wildtyp - versus der aberrant gespleißten Sequenz im Bereich der jeweiligen Insertion bzw. Deletion. Erwartete Fragmentlängen der Doppelbanden nach quantitativer PCR. Die mit * markierten Fragmentlängen entsprechen dem jeweils mutierten PCR-Fragment.

AT-Linie	Länge der oberen Bande (bp)	Länge der unteren Bande (bp)
17	541*	357
3	398*	340
9	159	145*
6	927	762*
15	932	829*
13	544	430*
18	301	282*

a)



b)

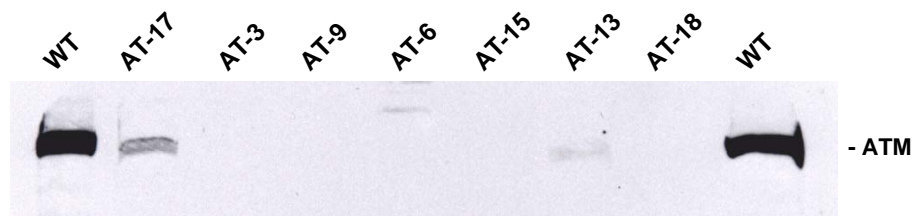


Abb. 7: Quantitative PCR und Western Blotting der 7 AT-Linien mit neuen Spleißmutationen. a) Quantitative PCR aus cDNA der AT-Linien 3, 6, 9, 13, 15, 17 und 18. Bei den Doppelbanden AT-17 und AT-3 entspricht die obere Bande dem PCR-Fragment mit der Spleißaberration, bei den Doppelbanden AT-3, AT-9, AT-6, AT-15, AT und AT-18 repräsentiert die untere Bande das PCR-Fragment mit der Spleißaberration. b) Western Blots aus Gesamt-Proteinextrakten der AT-Zelllinien 3, 6, 9, 13, 15, 17 und 18. WT, gesunde Kontrolle. Je Spur wurden 100 µg Proteinextrakt aufgetragen.

4.1.6 Zusammenfassende Charakterisierung der 7 neu identifizierten Spleißmutationen

Von den 7 neu identifizierten Spleißmutationen lagen drei klassische Spleißmutationen innerhalb der hochkonservierten Akzeptor- bzw. Donor-Spleißstellen, eine genomische Deletion zerstörte die 5'-Akzeptor-Spleißstelle völlig, eine Mutation betraf die etwas weniger konservierte letzte Exonposition und zwei weitere Punktmutationen tief im Intronbereich resultierten im Spleißen eines zusätzlichen Exons in die kodierende Region des *ATM*-Transkriptes.

Unter den drei klassischen Spleißmutationen resultierte allerdings nur eine, IVS53+1G→A, in einem ausschließlichen Skippen des betroffenen Exons (53) während die anderen zwei, IVS16-1G→C und IVS23-2A→G, ein komplexeres Spleißmuster zeigten.

- Die Mutation IVS53+1G→A in der AT-Linie 13 resultiert in einem starken Abfall des 5'-ss (93,0→74,8) und einer Deletion des Exons 53, erhält aber den Leserahmen der kodierenden Sequenz. Die Veränderung des zweiten Allels wurde ebenfalls identifiziert, es handelt sich um die trunkierende Mutation 3802delG, die vermutlich zur Instabilität der mRNA oder des verkürzten Proteins führt. Die semiquantitative PCR zeigte, daß die Fragment-Bande mit der Exon 53 -Deletion im Vergleich zum Wildtyp-Fragment mit einer Ratio von 85:15 stärker amplifiziert war, was auf eine Instabilität des zweiten *ATM*-Transkriptes hinweist. Durch Western Blot-Analyse konnte in der AT-Zelllinie 13 noch 5 % residuales ATM-Protein nachgewiesen werden. Da das Skippen des Exons 53 ohne Leserasterverschiebung zu einer internen Deletion von 38 AS führt, wäre eine nahezu Vollängen-Expression des ATM-Proteins möglich, allerdings führen selbst "in frame"-Deletionen im *ATM*-Gen fast immer zu einer totalen Destabilisierung des Proteins. Die hier vorliegende Deletion von 38 AS ist das erste Beispiel einer kompletten Exondeletion im *ATM*-Gen, die in geringem Maße noch eine Expression des trunkierten ATM-Proteins zuläßt.

In zwei weiteren Fällen klassischer Spleißmutationen innerhalb der 3'-Donor-Konsensussequenzen wurden anstelle eines Exonskippings ausschließlich alternative Spleißstellen verwendet, deren Nutzung in einer Leserahmenverschiebung der kodierenden Region resultiert. Interessanterweise lagen die Wertungen der alternativ verwendeten Spleißstellen nur geringfügig unter denen der Wildtypsequenzen:

- Die Mutation IVS16-1G→C der AT-Linie 18 führt zur Nutzung einer strangabwärts gelegenen alternativen Spleißstelle, so daß 19 nt am 5'-Ende des Exons 16 deletiert werden. Der Abfall des 3'-ss von 74.7 auf 59.0 aktiviert die kryptische Spleißstelle (3'-ss = 73.8). Quantitative PCR zeigte, daß bei Fragment 18 das Verhältnis der oberen Wildtyp- zur unteren (del 19 nt-) Bande etwa 15 : 85 ist, was auf eine Instabilität des anderen Allels hindeutet. Entsprechend war kein ATM-Protein im Western Blot detektierbar.
- Die Mutation IVS23-2A→G der AT-Linie 9 resultiert in der Verwendung einer strangaufwärts im Intron liegenden alternativen Spleißstelle und führt daher zu einer Insertion von 14 nt Intronsequenz

zwischen die Exons 23 und 24, die ebenfalls den Leserahmen verschiebt. Die Mutation senkt die ursprüngliche 3'-ss von 88.2 auf 72.2; die alternativ verwendete Spleißstelle hat einen Wert von 81.6 und lässt aufgrund der Ergebnisse der quantitativen PCR keinerlei "leaky splicing" vermuten. Auch hier war im Western Blot keine ATM-Bande zu sehen.

- Bei der AT-Linie 6 wird durch die Mutation 23526 – 23547del18 die 5'- Spleißstelle des Exon 7 vollständig zerstört. Dies resultiert ausschließlich in einem kompletten Exonskipping, da bei dieser Mutation offenbar keine alternative Konsensussequenz in unmittelbarer Nähe genutzt werden kann. Nach quantitativer PCR zeigten beide Banden des Fragmentes 6 gleiche Intensität. Das Fehlen des Exons 7 lässt den Leserahmen der kodierenden *ATM*-Sequenz intakt und führt auf Proteinebene zu einer internen Deletion von 55 AS. Da im Western Blot kein ATM-Protein detektierbar war, führt diese Deletion offenbar zu einer Destabilisierung des Proteins.

Die übrigen drei Mutationen lagen nicht innerhalb der hochkonservierten Dinukleotidpositionen der Spleiß-Konsensussequenzen (siehe Tab. 7):

- Die Mutation 6198G→C (AT-Linie 15) betrifft das letzte Nukleotid des Exons 44, direkt an der Grenze zur intronischen Donor-Spleißstelle gt und führt zur Leserahmenverschiebung. Die letzte Exonposition ist im Scoring System nach SHAPIRO und SENAPATHY mit 78 von 100 Punkten am zweithöchsten bewertet. Entsprechend sinkt der 5'-ss durch die Mutation von 74.8 auf 61.3. Quantitative PCR ergab keinerlei "leaky splicing" des Exons 44 und im Western Blot war kein ATM-Protein nachweisbar.

In den anderen beiden Fällen wurde durch eine tief im Intron lokalisierte Punktmutation eine kryptische Spleißstelle aktiviert, die zu einem Spleißen eines zusätzlichen "Pseudo"-Exons in die kodierende Sequenz der *ATM* mRNA führt (Abb. 8).

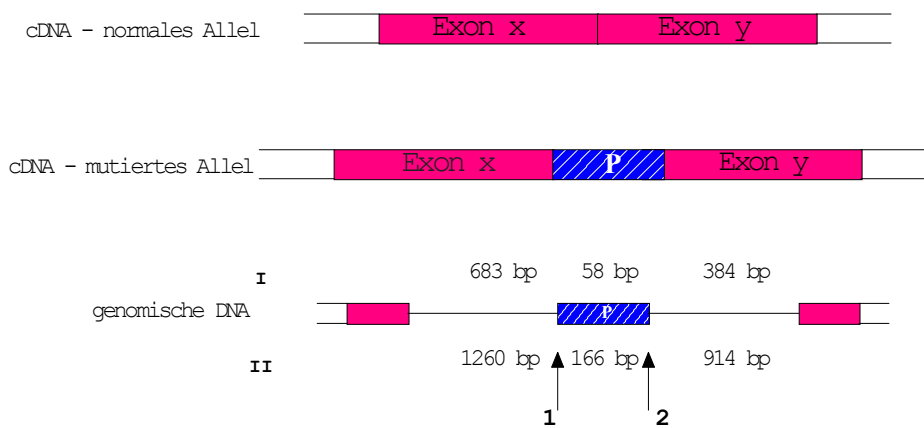
- Die Mutation 42982A→G (Position: IVS15+1170 bzw. IVS15-913) der AT-Linie 17 aktiviert eine kryptische Donor-Spleißstelle: das Nukleotid "G" an Position 42982 ist nach dem Spleißvorgang an der letzten Position des Pseudoexons "15b" lokalisiert (AA-gt → AG-gt, Abb. 8) und hebt die Wertung der kryptischen 5'-Spleißstelle von 73.2 auf 85.6, während die latent vorhandene 3'-Spleißstelle des Pseudoexons mit einer Wertung von 95.5 außergewöhnlich hoch liegt.

Die Insertion der 166 nt des Exons 15b zwischen die Exons 15 und 16 führt zu einer Verschiebung des Leserasters. Trotz der hohen Spleißstellenwerte des Pseudoexons zeigte die quantitative PCR ein Verhältnis von 25 : 75 zwischen größerer (ins 166nt-) und kleinerer (Wildtyp-) Bande, was entweder auf "leaky splicing" des Pseudoexons oder eine Instabilität der Transkripte mit Insertion zurückzuführen wäre. Im Western Blot konnte noch eine ATM-Proteinkonzentration von 15 % nachgewiesen werden; da allerdings die zweite Mutation in Linie 17 mit Hilfe des PTT nicht gefunden wurde, könnte die residuale Expression des *ATM*-Gens auch auf eine milde Mutation des anderen Allels zurückzuführen sein.

- Eine zusätzliche 5'-Spleißstelle generiert auch die Mutation 55706A→G (Position: IVS19+684 bzw. IVS19-384) in AT-Linie 3; das Nukleotid "G" an Position 55706 ist hier direkt in der neu

entstandenen *gt* – Konsensussequenz lokalisiert (TT-*at* → TT-*gt*, Abb. 8), die das Spleißen des Pseudoexons 19b (58 nt) zwischen die Exons 19 und 20 auslöst und ebenfalls den Leserahmen verschiebt. Die bereits vorliegende 3'-Spleißstelle hat einen Wert von 86.7, während die 5'-Spleißstellenwertung durch die Mutation von 61.1 auf 69.4 gehoben wird. Die Möglichkeit eines "leaky splicing" des Pseudoexons 19b konnte allerdings durch quantitative PCR ausgeschlossen werden; die Western Blot-Analyse zeigt kein nachweisbares ATM-Protein.

(a)



(b)

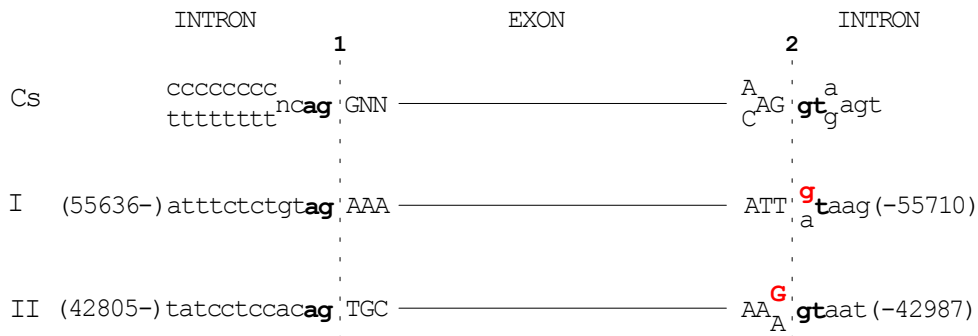


Abb. 8: a) Schematische Darstellung von cDNA und genomischer Struktur im Bereich der Intron-Insertionen in den AT-Linien 3 und 17. Die Pfeile zeigen die Positionen der Intron/Exon- bzw. Exon/Intron-Grenzen an. P, Pseudoexon. b) DNA-Sequenzen an den Intron/Exon- bzw. Exon/Intron-Grenzen. Exon- und Pseudoexon-Sequenzen sind in Großbuchstaben, Intron-Sequenzen in Kleinbuchstaben angegeben. Cs, Spleiß-Konsensussequenzen; I und II, Darstellung der Mutationen in den AT-Linien 3 und 17, die kryptische Spleißstellen aktivieren und in der Insertion von 58 bzw. 166 Nukleotiden resultieren.

4.2 Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS): Suche nach neuen Genen bei Patienten mit NBS- und NBS-ähnlichem Phänotyp

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) wird in über 90 % aller Fälle durch Mutationen im *NBS1*-Gen ausgelöst. Die meisten NBS-Patienten sind homozygot für die sogenannte Gründermutation (657del5). Neben Patienten mit klassischem NBS-Phänotyp gibt es verschiedene NBS-ähnliche Varianten, die teilweise auch mit dem AT-Phänotyp überlappen. Zur Identifizierung weiterer Gene, deren Defekt einen NBS-verwandten Phänotyp auslöst, standen im Rahmen dieser Arbeit insgesamt Zelllinien von fünf Patienten (Linien NBS01 - NBS05) zur Verfügung, bei denen Mutationen im *NBS1*-Gen bereits ausgeschlossen waren oder zumindest keine Gründermutation vorlag. Die fünf Patienten waren aufgrund ihres klinischen und zellulären Phänotyp als NBS- oder NBS-“like” eingestuft worden.

In einer der fünf Zelllinien (NBS04) wurde eine neue Mutation im *NBS1*-Gen identifiziert (Tab. 10). Die übrigen vier Zelllinien ohne Mutationen im *NBS1*-Gen wurden weiterhin nach Defekten in den Genen *MRE11* und *RAD50* sowie in Genen des NHEJ-Weges, *DNA-Ligase IV* und *XRCC4* durchsucht. Die Ergebnisse für die vier Linien/Patienten NBS01/GAA, NBS02/FHL, NBS03/ZLV, und NBS04/HNAF sind im nachfolgenden Kapitel aufgeführt.

In der NBS05-Linie wurde im Rahmen einer parallel durchgeführten, unabhängigen Mutationssuche in der Arbeitsgruppe von Dr. Thilo Dörk (Medizinische Hochschule Hannover) ein Defekt im *RAD50*-Gen identifiziert. Die Auswirkung dieser *RAD50*-Defizienz auf zellulärer Ebene im Hinblick auf die Lokalisierung und IR-induzierte Focibildung der beiden *RAD50*-Komplexparker *MRE11* und *NBS1* wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die Ergebnisse für die Linie NBS05 sind daher separat in Kapitel 4.2.2 zusammengefaßt.

4.2.1 Mutationsuche und Western Blot-Analyse in Zelllinien von vier Patienten mit NBS-ähnlichem Phänotyp

Zur Untersuchung der Kandidaten *NBS1*, *MRE11*, *RAD50*, *DNA-Ligase IV* und *XRCC4* wurden entweder direkte cDNA-Sequenzierungen, Western Blot-Analysen oder beide Verfahren durchgeführt. Da nicht alle Zelllinien von Anfang an zur Verfügung standen, wurde das Mutationsscreening für einige Kandidatengene nicht in allen Linien durchgeführt. Besonders intensiv wurde die NBS01-Linie untersucht, da die Eltern des Patienten blutsverwandt sind, und im betroffenen Gen Homozygotie zu erwarten ist, d.h. es liegt auf beiden Allelen mit hoher Wahrscheinlichkeit dieselbe Mutation vor. Dies kann bei der Identifizierung solcher Mutationen von Vorteil sein, die nicht obligat pathogen sein müssen, wie etwa Aminosäuresubstitutionen oder Mutationen an weniger konservierten Positionen innerhalb der Spleiß-Konsensussequenzen. Für die Linie NBS01 wurden zusätzlich Sequenzierungen der Gene *KU70* und *KU80* durchgeführt, deren Translationsprodukte ebenfalls in den NHEJ-

Reparaturweg involviert sind. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western Blots und cDNA-Sequenzierungen sind für die NBS-Linien NBS01-NBS04 in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tab. 10: Übersicht über die untersuchten Gene und/oder Proteine bei vier Zelllinien von NBS- und NBS-like Patienten.

Gen/Protein	level	NBS01	NBS02	NBS03	NBS04
NBS1	prot	100 %	100 %	100 %	0 %
	cDNA	ok	ok	ok	400del25 (hom)
MRE11	prot	100 %	100 %	100 %	--
	cDNA	ok	ok	ok	--
RAD50	prot	--	100 %	100 %	--
	cDNA	ok	--	--	--
DNA ligase IV	cDNA	ok	ok	ok	--
XRCC4	cDNA	ok	ok	ok	--
KU70	cDNA	ok	--	--	--
KU80	cDNA	ok	--	--	--

Eine fehlende NBS1-Proteinbande in Proteinextrakten der Linie NBS04 und die sich anschließende Sequenzierung der NBS1-cDNA identifizierte eine homozygote Deletion von 25 nt in Exon 8, 400del25, die bereits auf genomischer Linie vorliegt. (Dr. R. Varon, Charitee Berlin). Die gleiche Mutation wurde mittlerweile in einem zweiten Patienten gefunden und näher charakterisiert (MARASCHIO et al. 2001). Für die NBS-Linien NBS01, NBS02 und NBS03 konnten keinerlei Defekte in den untersuchten Genen bzw. Proteinen nachgewiesen werden (Tab. 10).

4.2.2 Die IR-induzierte Focibildung von MRE11 und NBS1 ist defekt in RAD50-defizienten Fibroblasten

Die lymphoblastoide Zelllinie NBS05 entstammt einer Patientin, deren Phänotyp NBS-ähnlich ist, aber einige Abweichungen vom klassischen Erscheinungsbild aufweist: Die Diagnose NBS wurde aufgrund von Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, chromosomaler Instabilität und zellulärer Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung gestellt (BARBI et al. 1991). Im Gegensatz zu klassischen NBS-Patienten hat die Patientin jedoch gegenwärtig im Alter von 15 Jahren nur moderate psycho- und sensomotorische Störungen. Im Blutserum sind keinerlei Defizienzen der IgA- und IgE-Subkategorien nachweisbar, und bisher wurden keinerlei wiederkehrende Infektionen registriert. In der Fibroblasten-Zelllinie NBS05, die bemerkenswerterweise auch einen Aminosäureaustausch im *NBS1*-Gen trägt, wurden parallel zu dieser Arbeit an der Medizinischen Hochschule in Hannover zwei Mutationen im *RAD50*-Gen identifiziert (BENDIX et al. in Vorbereitung).

Der Basenaustausch 3295C→T stellt eine Nonsense-Mutation dar, die in einer Trunkierung des Proteins resultiert (R1099X). Die zweite Mutation, 3957A→T ändert die dritte Basenposition des natürlichen Stopkodons in ein Tyrosinkodon. Die 3'-UTR des RAD50-Gens besitzt zwei alternative Polyadenylierungssignale und ermöglicht daher zwei unterschiedlich lange Primärtranskripte. Die längere, seltenere Transkriptvariante ermöglicht die Verwendung eines alternativen Stopkodons, was in einer Verlängerung der translatierten Sequenz um 66 Aminosäuren resultiert.

Die in Hannover durchgeführten Western Blot-Analysen zeigten für RAD50 eine sehr schwache Doppelbande, die untere von normaler Größe, die obere von etwa 5-10 kDa höherem Molekulargewicht, was den zusätzlichen 66 AS entsprechen könnte (Dr. Thilo Dörk, persönliche Mitteilung). Die Wildtyp-Bande wäre durch das Überlesen der Nonsense-Mutation mit Hilfe einer Suppressor-tRNA erklärbar; alternativ könnte die Mutation, die die „wobble“-Position des natürlichen Stopcodons zerstört, möglicherweise nicht vollständig penetrant sein, so daß mit Hilfe des häufiger verwendeten Polyadenylierungssignals dennoch zu einem geringen Prozentsatz normales RAD50-Protein translatiert werden kann.

In gesunden Zellen liegen die drei DNA-Reparaturproteine NBS1/MRE11/RAD50 als Komplex im Zellkern vor und kolokalisieren nach DNA-Schädigung in nukleäre Foci, während in klassischen NBS-Patienten keine Focibildung für eines der drei Proteine beobachtet werden kann (MASER et al. 1998). Um in den RAD50-defizienten Fibroblasten der Zelllinie NBS05 die Lokalisierung der MRE11- und NBS1- Proteine vor und nach DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung zu überprüfen, wurden daher im Rahmen dieser Arbeit Immunfluoreszenzstudien mit NBS05-Fibroblasten durchgeführt. Unbehandelte bzw. mit 10 Gy bestrahlte Fibroblasten wurden nach 14 h präpariert und mit Antikörpern gegen NBS1, MRE11 und RAD50 inkubiert (Abb. 9)(3.4.7). In gesunden Kontrollzellen waren die NBS1-, MRE11- und RAD50-Färbungen primär auf den Nukleus beschränkt; nach Bestrahlung wanderten alle drei Proteine in nukleäre Foci, der prozentuale Anteil focihaltiger Kerne lag 14 h nach Bestrahlung bei etwa 75 %. Die Zellen der NBS05-Linie zeigten keinerlei RAD50-Färbung, was vermutlich auf die extrem niedrige Konzentration des RAD50-Proteins zurückzuführen ist. Die Lokalisierung des NBS1 war in unbehandelten wie in bestrahlten Fibroblasten hauptsächlich auf den Kern beschränkt, obwohl in manchen Zellen das Färbungsverhältnis von Kern zu Zytoplasma nur bei etwa 60:40 lag. MRE11 hingegen war nur zu maximal 50 % im Kern lokalisiert und in einigen Zellen sogar fast ausschließlich zytoplasmatisch. Beide Proteine, NBS1 und MRE11, änderten nach Bestrahlung ihre zelluläre Verteilung nicht und zeigten keine Konzentration in nukleäre Foci. (Abb. 9). Sowohl die Kernlokalisierung des MRE11 als auch die Fähigkeit der NBS1- und MRE11-Proteine zur Focibildung scheint daher von einem funktionellen RAD50-Protein abhängig zu sein.

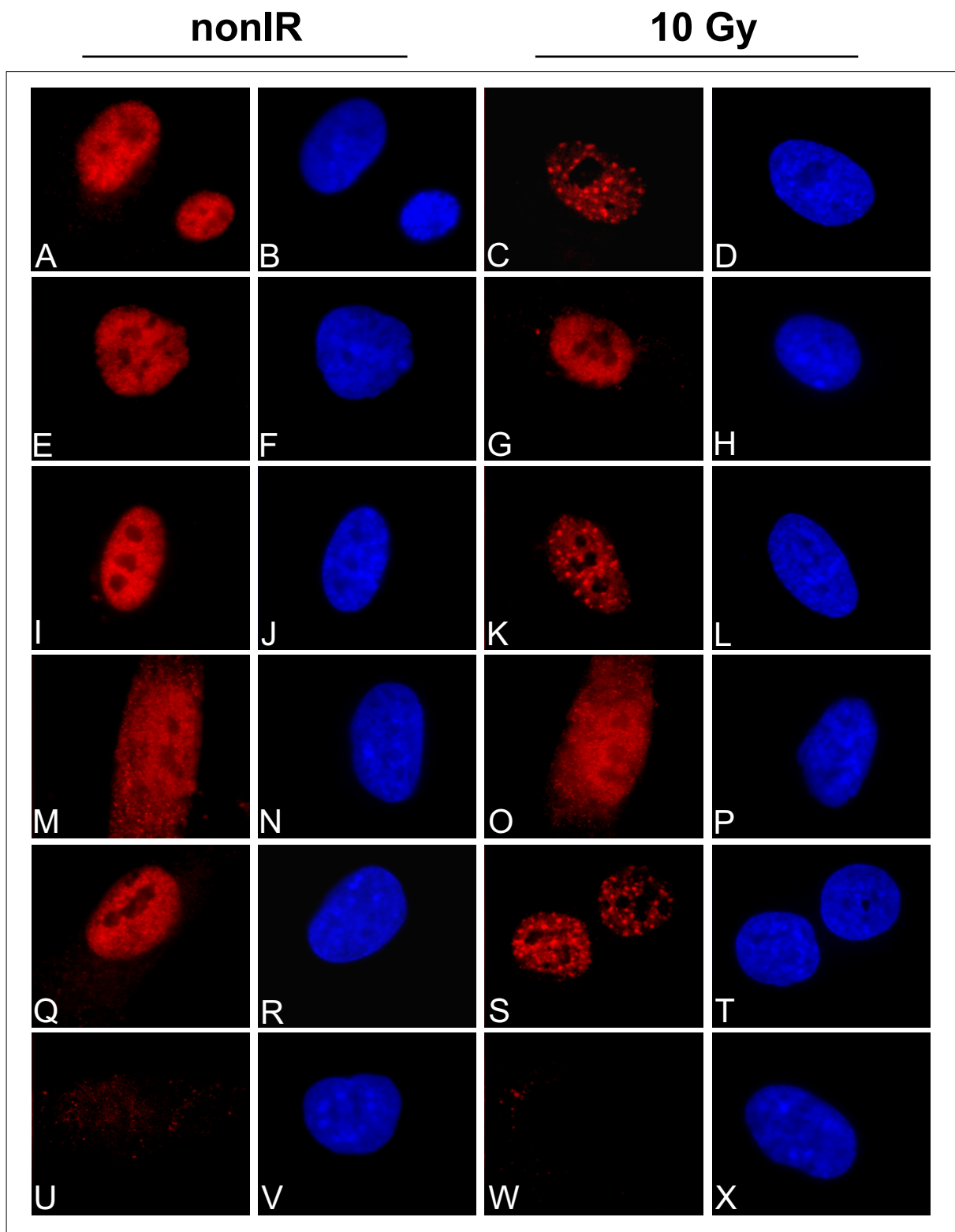


Abb. 9: Immunfluoreszenzfärbung von NBS1, MRE11 und RAD50 in unbehandelten bzw. mit 10 Gy bestrahlten NBS05-Fibroblasten und Kontrollzellen. A-D, I-L und Q-T zeigen gesunde Kontrollzellen, in denen NBS1, MRE11 und RAD50 nach Bestrahlung in nukleäre Foci wandern. E-H, M-P und U-X zeigen Fibroblasten der RAD50-defizienten Zelllinie NBS05, die keine RAD50-Färbung aufweist und keine Focibildung für NBS1 und MRE11 zeigt. Antikörper: A, C, E und G, anti-NBS1-Antiserum; B, D, F und H sind die entsprechenden DAPI-Färbungen. I, K, M und O, anti-MRE11-Antiserum; J, L, N und P sind die entsprechenden DAPI-Färbungen. Q, S, U und W, anti-RAD50-Antikörper; R, T, V und X sind die entsprechenden DAPI-Färbungen.

4.3 Fanconi Anämie: Suche nach einer funktionellen Verknüpfung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie

4.3.1 Verwendung des „Interaction Trap“

Um eine mögliche physiologische Verbindung zwischen den FA-Proteinen FANCA, FANCC, FANCG und den Mitgliedern der RAD51-Proteinfamilie RAD51A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 zu untersuchen, wurde ein „Interaction Trap“ im „Yeast Two Hybrid“-System durchgeführt. Die cDNAs der *FA*-Gene und der *RAD51*-Genfamilie wurden in N-terminaler Fusion mit der DNA-bindenden Domäne LexA (Köderposition) oder mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne B42 (Beuteposition) exprimiert. Als Köder- bzw. Beuteplasmid wurden die Vektoren pEG202 und pJG4-5 (MATCHMAKER LexA Two-Hybrid System, Clontech) verwendet.

Die Interaktion zwischen einem LexA- und einem B42-Fusionsprotein wurde über die Aktivierung zweier Reportersysteme nachgewiesen:

- (a) Wachstum auf Leucin-defizienten Platten erfordert die Transkription des endogen vorliegenden LEU2-Gens.
- (b) Blaufärbung der Hefezellen auf X-Gal-haltigen Platten wird durch die Aktivierung des episomal vorliegenden lacZ-Reportergens erreicht.

Besonders stringent wird der „Interaction Trap“ durch eine Doppelselektion auf die gleichzeitige Aktivierung des LEU2- und des lacZ-Reportersystems, hier werden nur besonders starke Interaktion detektiert. Für die Durchführung des „Interaction Trap“ wurden zunächst die *RAD51*-Familienmitglieder in beide Hefevektoren, pEG202 und pJG4-5 kloniert. Die Fanconi Anämie-Vektoren *FANCA*/pEG202, *FANCA*/pJG4-5, *FANCC*/pEG202, *FANCC*/pJG4-5 und *FANCG*/pJG4-5 wurden mir freundlicherweise von Dr. Tanja Reuter zur Verfügung gestellt.

4.3.1.1 Klonierung der *RAD51*-Familie in die Hefevektoren pEG202 und pJG4-5

Die Hefevektoren pEG202 und pJG4-5 erlauben die Proteinexpression mit N-terminalem Fusionspartner, LexA oder B42. Die Klonierung der cDNAs in die beiden Hefepasmide erfolgte über die sogenannte multiple cloning site (MCS). Dabei können die von der MCS kodierte Aminosäuren, die zwischen der LexA-Domäne und dem jeweiligen Fusionspartner liegen, unerwünschte transkriptionsaktivierende Eigenschaften aufweisen. Auch zwischen der B42-Domäne und ihrem Fusionsprotein sollten möglichst wenig Aminosäuren liegen. Zur Klonierung der cDNAs wurde daher

diejenige Restriktionsschnittstelle in der MCS gewählt, die am nächsten zur Fusionsdomäne LexA/B42 liegt.

pEG202: 5'-GAA TTC CCG GGG ATC CGT CGA CCA TGG CGG CCG CTC GAG TCG-3'

pJG4-5: 5'-GAA TTC GGC CGA CTC GAG AAG CTT-3'

Für die Klonierung der *RAD51A*-cDNA wurden die Vektoren pEG202* und pJG4-5* mit veränderter multiple cloning site verwendet:

pEG202*: 5'-GAA TTC CTC GAG CCA TGG GTC GAG TCG ACC TGC AGC -3'

pJG4-5*: 5'-GAA TTC CTC GAG CCA TGG GTC GAG AAG CTT-3'

Die Verwendung der NcoI-Schnittstelle des pEG202* reduziert die Zahl potentiell transkriptionsaktivierender AS, die Verwendung der NcoI-Schnittstelle des pJG4-5* ermöglicht die „sticky end“-Ligation von *RAD51A*.

Zur anschließenden Klonierung der *RAD51*-Familien-cDNAs wurde zunächst Gesamt-RNA aus einer gesunden lymphoblastoiden B-Zelllinie präpariert (3.1.4) und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (3.2.6). Die cDNAs der Gene *RAD51A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* und *XRCC3* wurden mit geeigneten Primern durch PCR (3.2.7) amplifiziert (siehe auch Tab.11).

Tab. 11: Länge der *RAD51*-cDNAs sowie Grösse der Translationsprodukte

	<i>cDNA</i>	Protein	
	(bp)	AS	kDa
RAD51A	1020	339	37,0
RAD51B	1053	350	38,2
RAD51C	1131	376	42,2
RAD51D	987	328	35,0
XRCC2	843	280	32,0
XRCC3	1041	346	37,8

Um eine „sticky end“-Klonierung der PCR-Produkte in beide Hefevektoren pEG202 und pJG4-5 zu ermöglichen, wurden Forward- und Reverse-Primer mit entsprechend geeigneten Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen konstruiert. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (3.1.3) und nach der Restriktionshydrolyse in die Hefevektoren ligiert. Die verwendeten Schnittstellen sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Die korrekte Sequenz der einklonierten cDNAs wurde mit Hilfe des ABI 310 Sequencers verifiziert.

Tab. 12: Übersicht der verwendeten 5'- und 3'- Schnittstellen zur Klonierung der cDNA-Sequenzen der *RAD51*-Familie.

Vektor	<i>RAD51A</i>	<i>RAD51B</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51D</i>	<i>XRCC2</i>	<i>XRCC3</i>
pEG202 und pJG4-5	NcoI-NcoI	EcoRI-XhoI	EcoRI-XhoI	EcoRI-EcoRI	EcoRI-EcoRI	EcoRI-XhoI

4.3.1.2 Test auf Selbstaktivierung der LexA-Fusionskonstrukte

Um falsch-positive Aktivierung der Reportersysteme im „Interaction Trap“ zu vermeiden, wurden die LexA-Fusionsproteine der *RAD51*-Genfamilie vorher auf eigenständige transkriptionsaktivierende Eigenschaften getestet. Die Köderplasmide wurden dabei zusammen mit dem lacZ-Reporterplasmid in Hefezellen transformiert (3.5.2) und die Zellen zum Erhalt der Plasmide auf GluHU-Platten ausgestrichen. Für den Test auf Selbstaktivierung wurden jeweils 3-5 Hefe-Kolonien von einer Platte gekratzt und in drei verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:20 und 1:400) auf GluHU-, GluHUL- und GluHUX-Platten getropft (Abb.10). Die GluHU-Platte wird dabei als Kontrolle zur gleichmäßigen Zelldichte/Tropfen verwendet. Wachstum auf GluHUL- oder Blaufärbung auf GluHUX-Platten läßt sich auf transkriptionsaktivierende Eigenschaften des LexA-Fusionsproteins zurückführen, da die Expression des B42-Beutekonstruktes auf Glucose reprimiert wird.

Transkriptionsaktivierende Eigenschaften weist nur das LexA-RAD51D Fusionsprotein auf. Es ermöglicht den Hefezellen ein Wachstum auf der Leucin-defizienten Platte, das mit dem der Gal4-transformierten Zellen (Positivkontrolle) vergleichbar ist, während die Intensität der Blaufärbung auf der GluHUX-Platte dagegen nur mäßig ausfällt. Die Durchführung des „Interaction Trap“ war daher für das Köderprotein LexA-RAD51D nur unter Verwendung des lacZ-Reporters möglich. Die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften der FA-Proteine FANCA, FANCC und FANCG wurden bereits von Dr. Tanja Reuter (Dissertation 2000, REUTER et al. 2000) ausführlich beschrieben:

LexA-FANCA: leicht transkriptionsaktivierend

LexA-FANCC: nicht transkriptionsaktivierend

LexA-FANCG: stark transkriptionsaktivierend

Aufgrund seiner intrinsischen transkriptionsaktivierenden Eigenschaften wurde FANCG nur als Beutekonstrukt in Fusion mit der B42-Domäne in den „Interaction Trap“ eingesetzt.

4.3.1.3 Test der Funktionalität der RAD51-Fusionsproteine

Um zu testen, ob die RAD51-Fusionsproteine in den Hefezellen funktionell exprimiert werden, wurden im „Yeast Two Hybrid“-System zunächst einige bereits bestätigte Interaktionen innerhalb der RAD51-Familie getestet. Unter anderem sind bisher in der Literatur Interaktionen zwischen RAD51A und XRCC3, RAD51D und XRCC2, RAD51B und RAD51C sowie RAD51C und XRCC3

beschrieben (DOSANJH et al. 1998, SCHILD et al. 2000). Zur Bestätigung der Funktionalität der RAD51-Familienmitglieder wurden diese vier Kombinationen zwischen Köder- und Beuteplasmid in beiden Orientierungen im „Interaction Trap“ in drei unabhängigen Ansätzen getestet. Darüberhinaus wurden als Negativkontrollen XRCC2 und RAD51A, XRCC2 und RAD51C sowie RAD51B und RAD51D kombiniert, für die nach dem Komplexmodell von Schild et al. (2000) keine Interaktion zu erwarten war. Pro Kombination wurden 3-5 Hefekolonien in drei Verdünnungen (1:1, 1:20, und 1:400) auf GluHUT-, GluHUTL-/GalHUTL- und GluHUTX-/GalHUTX-Platten getropft (Abb. 11). Mit Ausnahme der Kombination LexA-RAD51A und B42-XRCC3 wurde in allen Fällen, für die zuvor positive Interaktionen beschrieben worden waren, in beiden Orientierungen eine sehr starke Aktivierung der lacZ- und LEU2-Reporter erreicht. LexA-RAD51A und B42-XRCC3 interagierten nur in einem von drei Experimenten; die Interaktion konnte hier allerdings ebenfalls über beide Reportersysteme demonstriert werden. Bei den als Negativkontrolle verwendeten Kombinationen aus XRCC2 mit RAD51C und RAD51B mit RAD51D war nur in einem Fall, der Konstellation LexA-RAD51B mit B42-RAD51D, eine mittelstarke Aktivierung des lacZ-Reporters zu beobachten, was möglicherweise auf die DNA-bindende Eigenschaft des RAD51D-Proteins zurückzuführen ist (5.3).

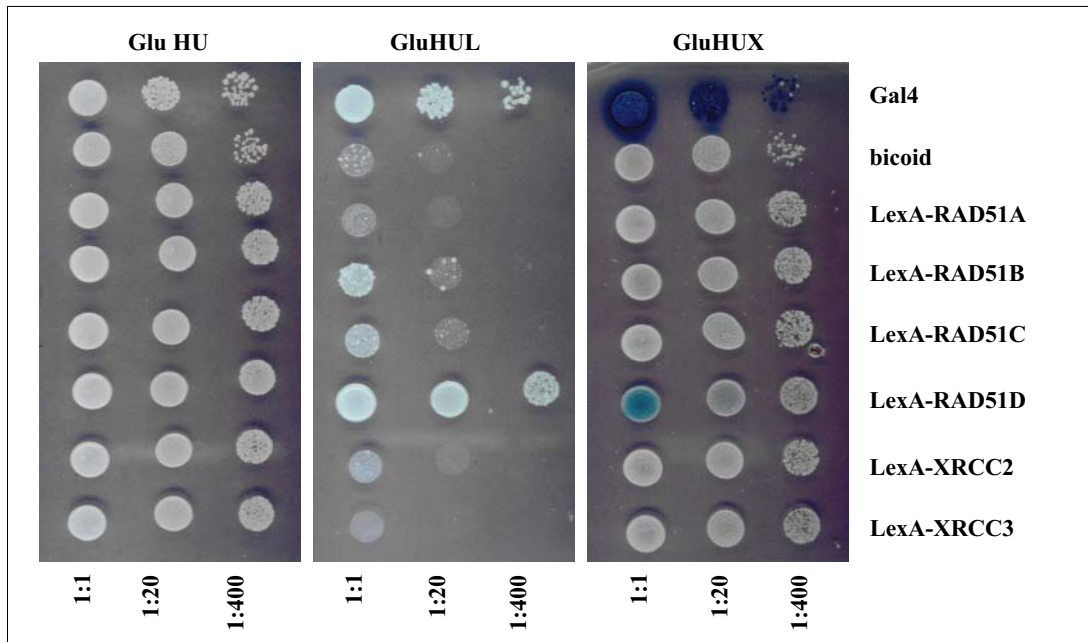


Abb. 10: Test auf Selbstaktivierung der LexA-Fusionsproteine RAD51A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3. HU: Kontrollplatte zum Erhalt der Plasmide, HUL: Test auf eigenständige Aktivierung des LEU2-Reporters, HUX: Test auf eigenständige Aktivierung des lacZ-Reporters. Verdünnungen: 1:1, 1:20, 1:400.

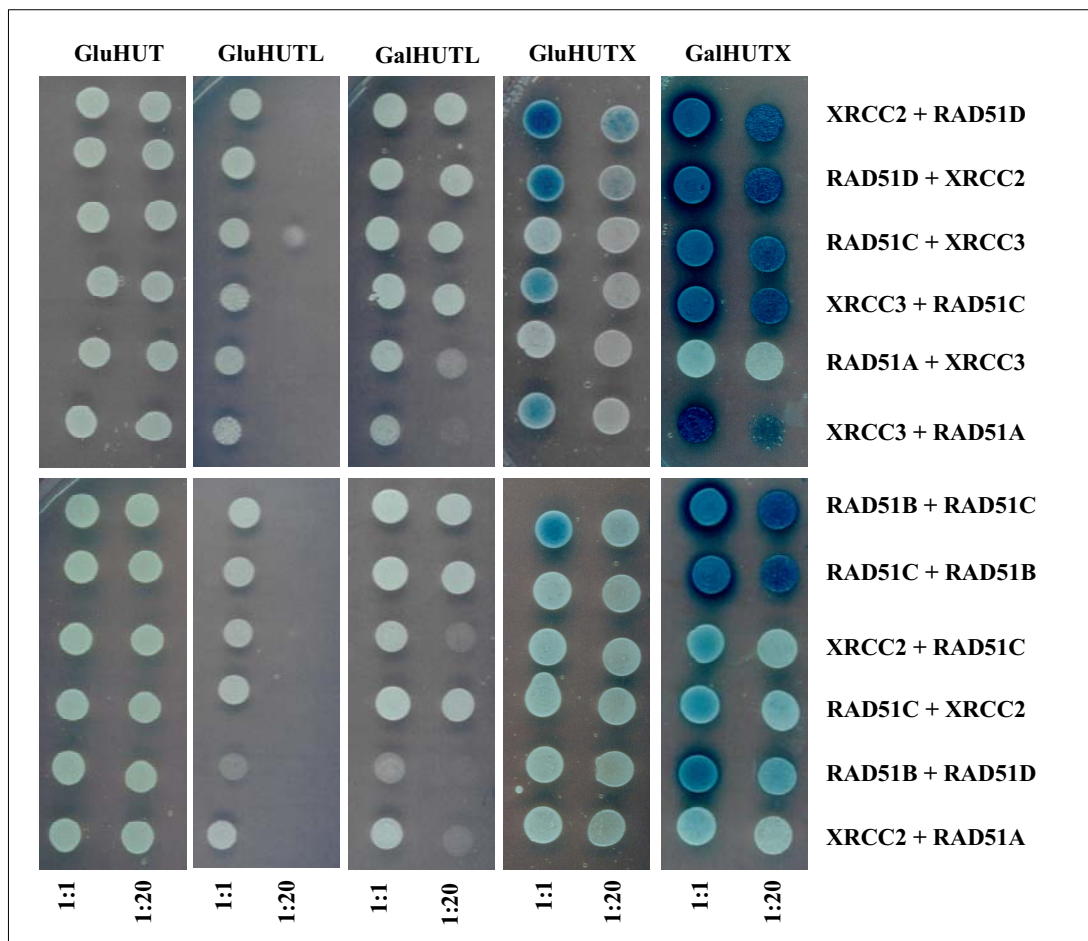


Abb. 11: Test auf Funktionalität der RAD51-Proteinfamilie. Erstgenannte Proteine wurden in LexA-Fusion, zweitgenannte Proteine in B42-Fusion exprimiert. GluHUT: Kontrollplatte; GluHUTL und GalHUTL: Test auf Aktivierung des LEU2-Reporters; GluHUTX und GalHUTX: Test auf Aktivierung des lacZ-Reporters. Verdünnungen: 1:1 und 1:20.

4.3.1.4 Durchführung des „Interaction Trap“

Im „Interaction Trap“ wurden - soweit möglich - alle Interaktionen zwischen zwei Fusionsproteinen in beiden Orientierungen getestet. FANCA und FANCC wurden als LexA- und B42-Fusionskonstrukte eingesetzt. Da LexA-FANCG sehr starke selbstaktivierende Eigenschaften aufweist, war es nur als Beutefusionsprotein einsetzbar. Alle Mitglieder der RAD51-Familie wurden in beiden Orientierungen getestet; dabei konnte, wie oben beschrieben, RAD51D in der Köderposition (LexA-RAD51D) nur auf Aktivierung des lacZ-Reporters getestet werden. Nach Kotransfektion der Hefezellen mit dem jeweiligen Köder-, Beute- und lacZ-Reporter-Plasmid wurden mit 3-5 Kolonien je Platte drei Verdünnungen (1:1, 1:20 und 1:400) auf GluHUT-, GluHUTX-/GalHUTX-, GluHUTL-/GalHUTL-, und GluHUTLX-/GalHUTLX-Platten aufgetropft. Da die Expression des Beuteplasmids durch Glukose reprimiert wird, zeigt Wachstum oder Blaufärbung der Hefezellen auf Galaktose-, nicht aber auf Glukose-haltigen Platten eine Interaktion zwischen Köder- und Beuteplasmid an.

4.3.1.4.1 Test auf Aktivierung des lacZ-Reporters

Im ersten Test wurde die Fähigkeit zur Aktivierung des lacZ-Reporters getestet, die als Blaufärbung der Hefezellen auf X-Gal-haltigen Platten sichtbar wird (GluHUTX und GalHUTX). Alle Transformationen wurden unabhängig voneinander mindestens fünfmal wiederholt.

Die Expression von FANCA in der Köderposition zusammen mit RAD51A, RAD51B und RAD51D resultierte in einer starken Aktivierung des lacZ-Reporters. In umgekehrter Orientierung mit FANCA als Beutekonstrukt zeigten auch RAD51A und RAD51D starke Interaktion mit B42-FANCA, während RAD51B nur schwach mit FANCA in der Beuteposition interagiert. Eine schwächere Aktivierung des lacZ-Reporters konnte auch in der jeweiligen Kombination LexA-RAD51C und LexA-XRCC3 mit B42-FANCA gezeigt werden, allerdings war diese Aktivierung in entgegengesetzter Orientierung nicht zu bestätigen. Die Kombination aus FANCA und XRCC2 resultierte unabhängig von der Orientierung in keinerlei Aktivierung des lacZ-Reporters. Der Interaction Trap mit FANCC in der Köderposition zeigte im ersten Experiment eine sehr prominente Interaktion zwischen FANCC als Köder und RAD51A als Beuteprotein (Abb. 12). Diese Interaktion konnte jedoch in keinem der vier folgenden unabhängigen Experimente bestätigt werden. Ebenso war in umgekehrter Orientierung keine Interaktion zwischen LexA-RAD51A und B42-FANCC zu beobachten, so daß die einmalige Aktivierung des Reportersystems möglicherweise als Artefakt angesehen werden muß. Eine sehr schwache Interaktion zwischen FANCC und RAD51D war in beiden Orientierungen in drei von fünf unabhängigen Experimenten erkennbar, allerdings erschwerte die selbstaktivierende Eigenschaft von RAD51D insbesondere während des Wachstums auf galaktosehaltigen X-Gal-Platten eine gesicherte Auswertung (siehe Abb. 12, LexA-RAD51D). FANCG wurde nur in der Beuteposition in den Interaction Trap eingesetzt. Als B42-Fusionsprotein interagiert es stark mit den LexA-Fusionskonstrukten RAD51B, RAD51C, RAD51D und XRCC3. Eine schwächere Aktivierung des

lacZ-Reportergens war in der Kombination von B42-FANCG mit RAD51A und eine sehr schwache mit XRCC2 als Köderproteine zu beobachten.

4.3.1.4.2 Test auf Aktivierung des LEU2-Reporters und auf Doppelaktivierung beider Reportersysteme

Im zweiten verwendeten Reportersystem, dem Test auf Aktivierung des LEU2-Reporters (Abb. 13), wurde die Wachstumsfähigkeit der transformierten Hefezellen auf Leucin-defizienten Platten getestet. Zusätzlich wurde auch eine Doppelsektion auf gleichzeitige Aktivierung beider Reportersysteme (lacZ und LEU2) durchgeführt. Die gleichen Verdünnungen wie unter 4.3.1.4.1 beschrieben wurden zusätzlich auf GluHUTL-/GalHUTL- und GluHUTLX-/GalHUTLX-Platten aufgetropft. FANCA in der Köderposition interagierte - mit Ausnahme von B42-RAD51C - mit allen RAD51-Familienmitgliedern. Besonders stark waren dabei die Interaktionen mit RAD51B und XRCC2, mittelstark diejenigen mit RAD51A, RAD51D, und XRCC3. In umgekehrter Orientierung war keine dieser Interaktionen zwischen den RAD51-Familienmitgliedern und B42-FANCA zu beobachten. FANCC im Test mit der RAD51-Genfamilie zeigte keinerlei Aktivierung des LEU2-Reporters, unabhängig von der jeweiligen Orientierung der LexA- und B42-Fusionen. FANCG als B42-Fusionsprotein hingegen zeigte schwache bis mittelstarke Interaktionen mit den LexA-Fusionskonstrukten RAD51A, RAD51B und RAD51C. In der Doppelsektion auf gleichzeitige Aktivierung der LEU2- und lacZ- Reportergene, d.h. Wachstum bei gleichzeitiger Blaufärbung, wurden diejenigen Interaktionen bestätigt, die bereits bei alleiniger Aktivierung des lacZ-Reporters durch sehr intensive Blaufärbung der Hefezellen aufgefallen waren. Alle Ergebnisse des „Interaction Trap“ sind nochmals zur Übersicht in den Tabellen 13 a-c im Anschluß an die Abbildungen 12 und 13 zusammengefaßt.

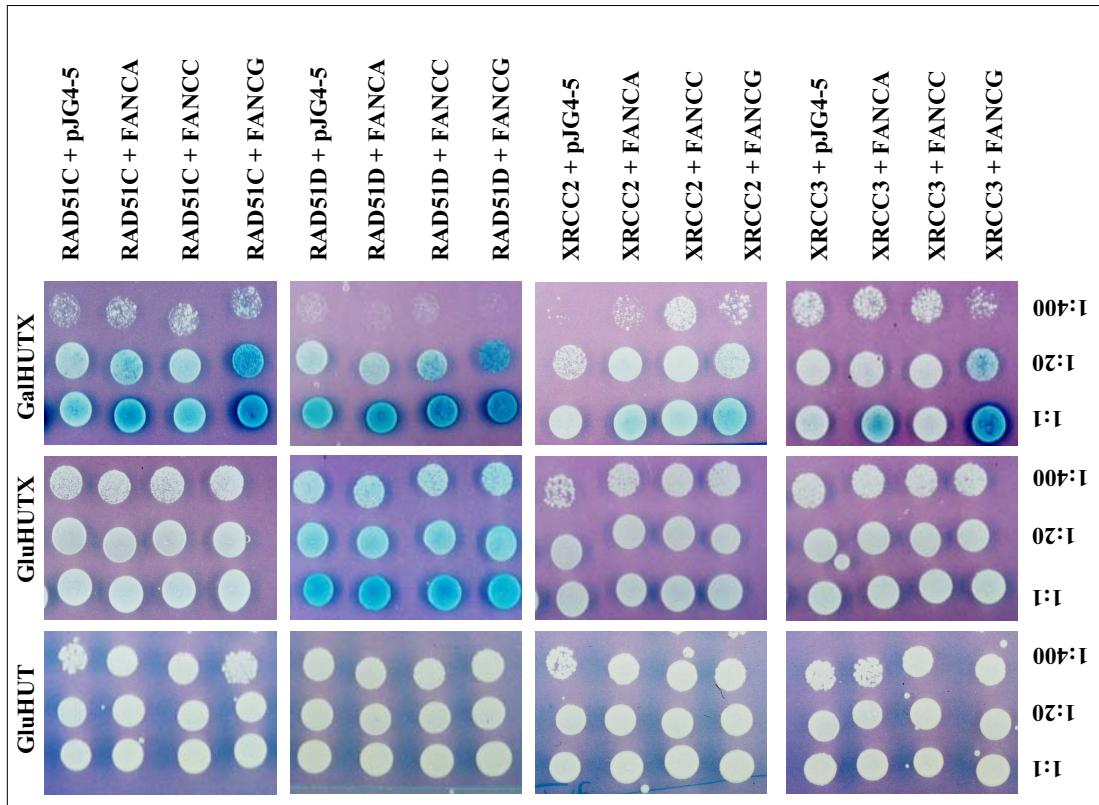
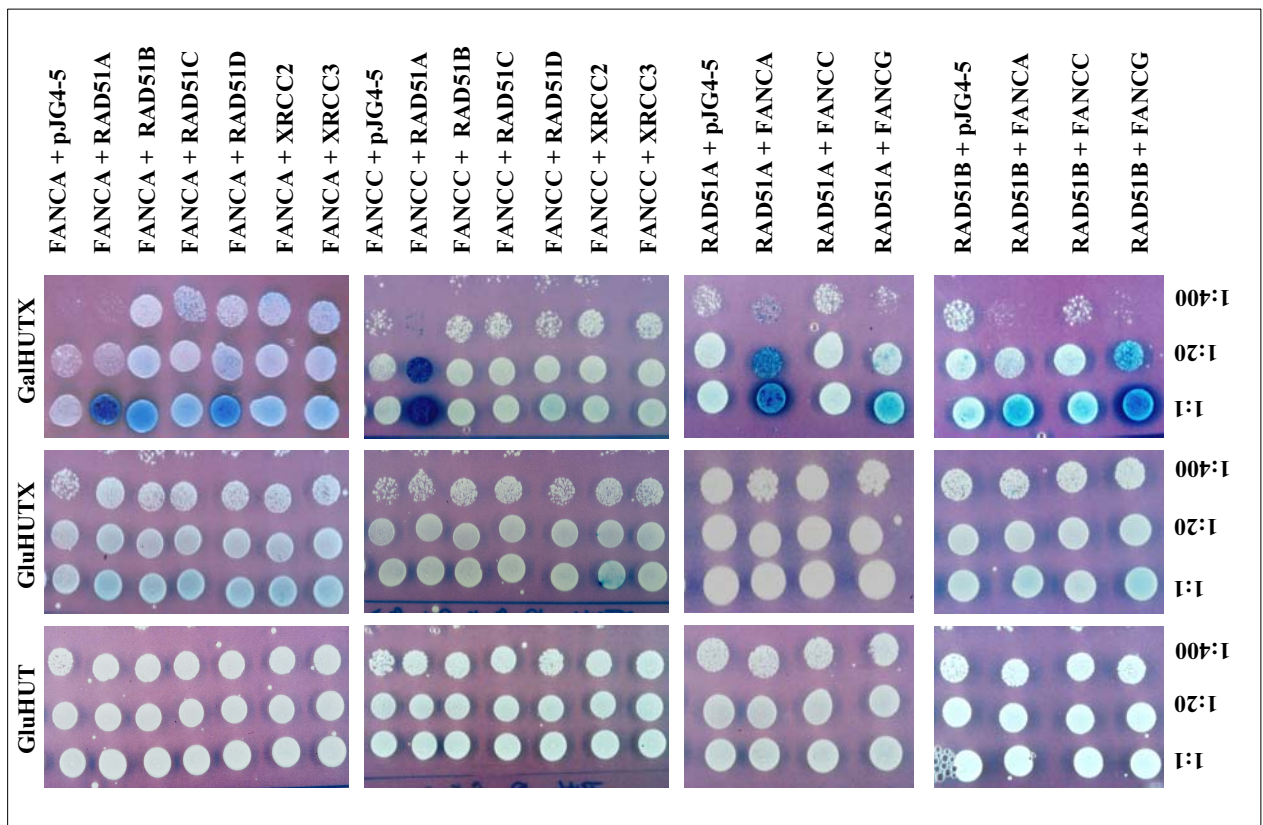


Abb. 12. „Interaction Trap“ zwischen den FA-Proteinen und den Proteinen der RAD51-Familie durch Test auf Aktivierung des lacZ-Reporters. Das jeweils ersigennante Protein wurde in LexA-Fusion, das jeweils letztgenannte Protein in B42-Fusion exprimiert. GluHUT: Kontrollplatte, GluHUTX und GalHUTX: Test auf Blaufärbung der Hefen. Verdünnungen: 1:1, 1:20, 1:400.



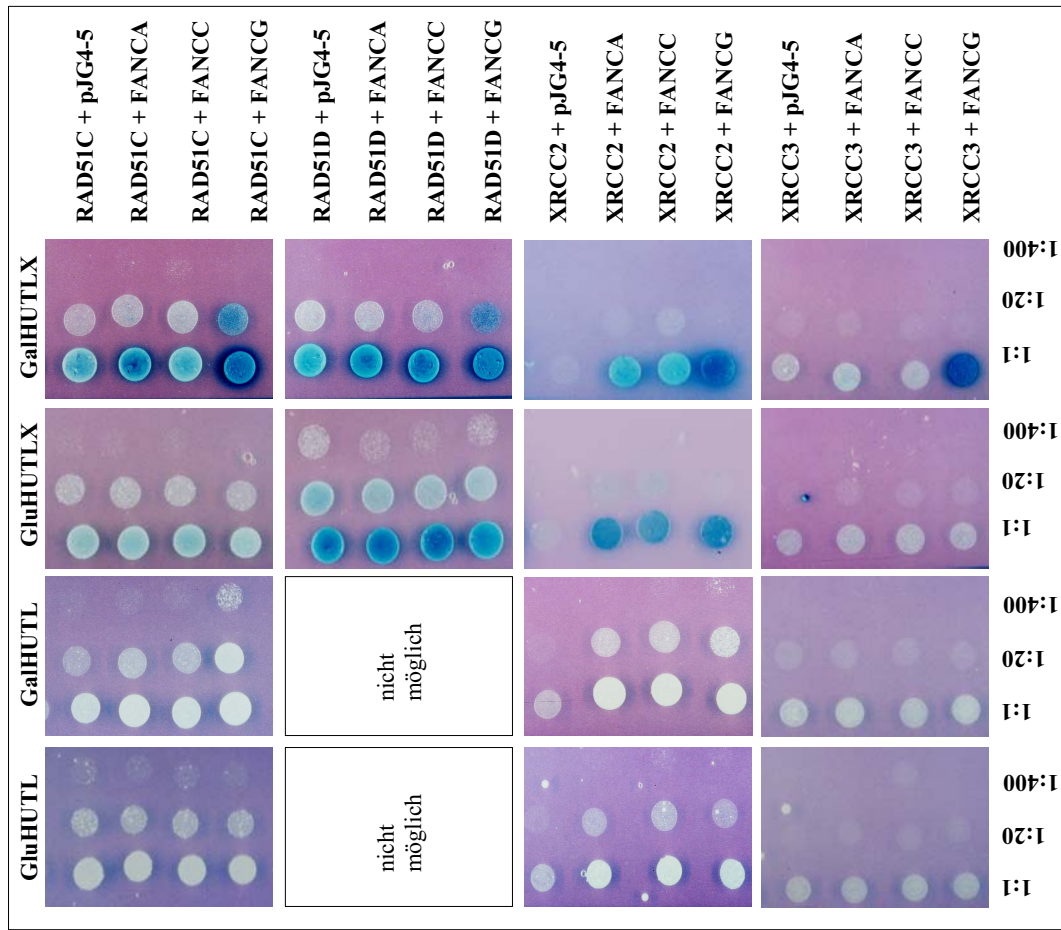
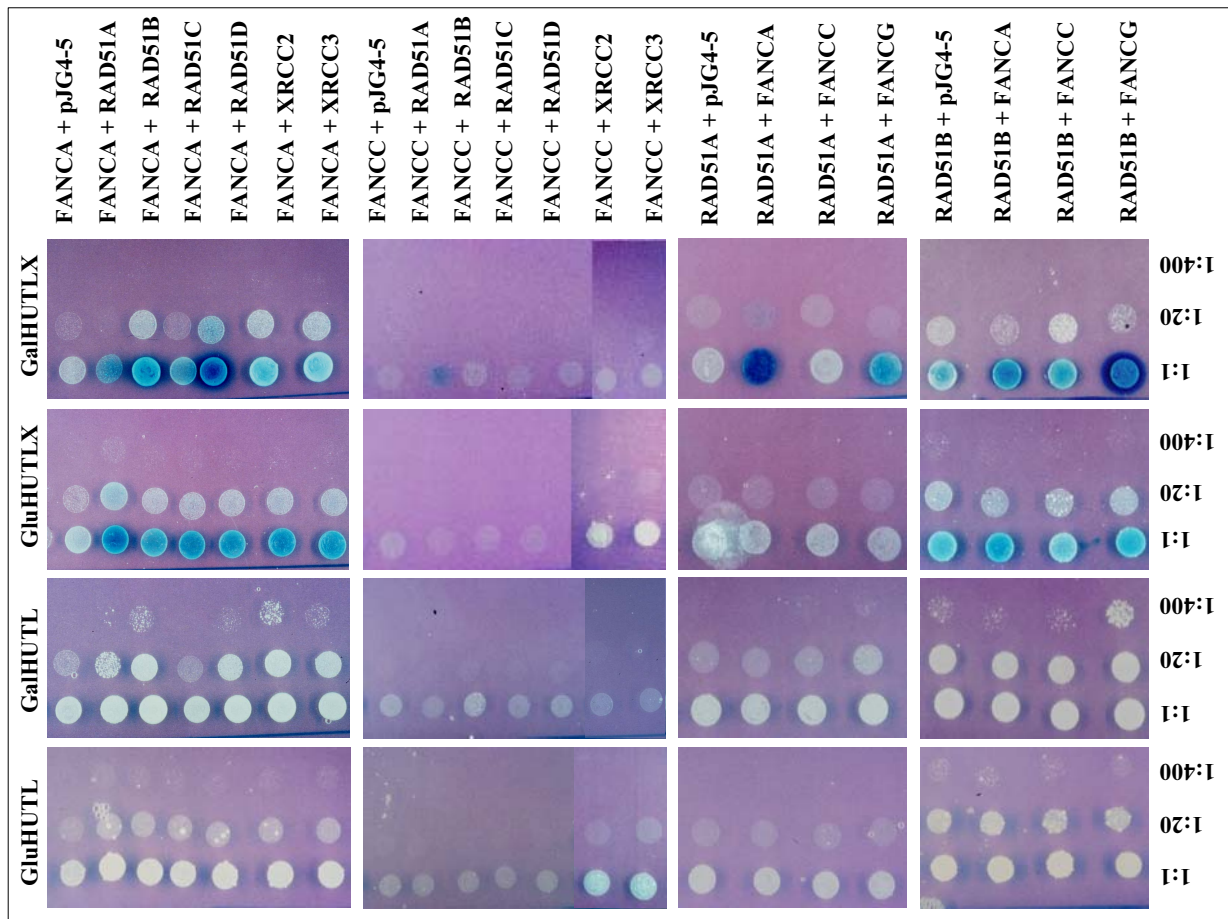


Abb. 13: „Interaction Trap“ zwischen den FA-Proteinen und den Proteinen der RAD51-Familie durch Test auf Aktivierung des LEU2-Reporters (jeweils linke rechte Spalten) bzw. Aktivierung beider Reportersysteme, LEU2 und lacZ (jeweils rechte beide Spalten). Das jeweils erstgenannte Protein wurde in LexA-Fusion, das jeweils zweitgenannte Protein in B42-Fusion exprimiert. GluHUTL und GalHUTL: Test auf Wachstum der Hefen; GluHUTLX und GalHUTLX: Test auf Wachstum und gleichzeitige Blaufärbung der Hefen. *siehe Kapitel 4.3.1.2.



Tab. 13 a: Ergebnisse des „Interaction Trap“ bei Selektion auf Aktivierung des lacZ-Reporters.

BAIT	PREY	ACTIVATION	BAIT	PREY	ACTIVATION
FANCA	RAD51A	+++	RAD51A	FANCA	+++
FANCA	RAD51B	++	RAD51B	FANCA	+
FANCA	RAD51C	-	RAD51C	FANCA	+
FANCA	RAD51D	+++	RAD51D	FANCA	+
FANCA	XRCC2	-	XRCC2	FANCA	-/-
FANCA	XRCC3	-	XRCC3	FANCA	+/-
FANCC	RAD51A	+++	RAD51A	FANCC	-
FANCC	RAD51B	-	RAD51B	FANCC	-
FANCC	RAD51C	-	RAD51C	FANCC	-
FANCC	RAD51D	-	RAD51D	FANCC	+
FANCC	XRCC2	-	XRCC2	FANCC	-
FANCC	XRCC3	-	XRCC3	FANCC	-
			RAD51A	FANCG	+
			RAD51B	FANCG	+++
			RAD51C	FANCG	+++
			RAD51D	FANCG	++
			XRCC2	FANCG	+/-
			XRCC3	FANCG	+++

Tab. 13 b: Ergebnisse des „Interaction Trap“ bei Selektion auf Aktivierung des LEU2-Reporters.

BAIT	PREY	ACTIVATION	BAIT	PREY	ACTIVATION
FANCA	RAD51A	+	RAD51A	FANCA	-
FANCA	RAD51B	++	RAD51B	FANCA	-
FANCA	RAD51C	-	RAD51C	FANCA	-
FANCA	RAD51D	+	RAD51D	FANCA	ND
FANCA	XRCC2	++	XRCC2	FANCA	-
FANCA	XRCC3	++	XRCC3	FANCA	-
FANCC	RAD51A	-	RAD51A	FANCC	-
FANCC	RAD51B	-	RAD51B	FANCC	-
FANCC	RAD51C	-	RAD51C	FANCC	-
FANCC	RAD51D	-	RAD51D	FANCC	ND
FANCC	XRCC2	-	XRCC2	FANCC	-
FANCC	XRCC3	-	XRCC3	FANCC	-
			RAD51A	FANCG	-
			RAD51B	FANCG	++
			RAD51C	FANCG	+
			RAD51D	FANCG	ND
			XRCC2	FANCG	-
			XRCC3	FANCG	-

Tab. 13 c: Ergebnisse des „Interaction Trap bei Selektion auf Aktivierung beider Reportersysteme (lacZ/LEU2).

BAIT	PREY	ACTIVATION	BAIT	PREY	ACTIVATION
FANCA	RAD51A	+/-	RAD51A	FANCA	++
FANCA	RAD51B	+	RAD51B	FANCA	+
FANCA	RAD51C	-	RAD51C	FANCA	+
FANCA	RAD51D	++	RAD51D	FANCA	+/-
FANCA	XRCC2	-	XRCC2	FANCA	-
FANCA	XRCC3	-	XRCC3	FANCA	-
FANCC	RAD51A	+/-	RAD51A	FANCC	-
FANCC	RAD51B	-	RAD51B	FANCC	-
FANCC	RAD51C	-	RAD51C	FANCC	-
FANCC	RAD51D	-	RAD51D	FANCC	+/-
FANCC	XRCC2	-	XRCC2	FANCC	-
FANCC	XRCC3	-	XRCC3	FANCC	-
			RAD51A	FANCG	+/-
			RAD51B	FANCG	++
			RAD51C	FANCG	++
			RAD51D	FANCG	+
			XRCC2	FANCG	+
			XRCC3	FANCG	++

Die Resultate des „Interaction Trap“ dokumentieren vielfältige Interaktionen zwischen FA-Proteinen und den Mitgliedern der RAD51-Familie im „Yeast Two Hybrid“-System. Die Interaktionen fielen jedoch je nach Reportersystem (lacZ oder LEU2) und Orientierung der Fusionsproteine (LexA- oder B42-Fusion) vielfach unterschiedlich aus. Zur Bestätigung der beobachteten Interaktionen im Hefesystem wurde im nächsten Schritt eine Überexpression der FA- und RAD51-Proteine in humanen HEK293-Zellen angestrebt.

4.3.2 Überexpression der FA-Proteine und der RAD51-Familie in Säugerzellen

Zum direkten Nachweis eines zelleigenen Proteins durch Western Blot oder Immunfluoreszenzfärbung müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein:

- (1) das Protein liegt in ausreichend hoher Kopienzahl vor, um mit den verfügbaren Nachweismethoden erfaßt werden zu können.
- (2) es stehen spezifische Antikörper für den Nachweis zur Verfügung; hierbei muß ein Antikörper, der etwa zum Western Blotting geeignet ist, nicht automatisch auch in der Immunfluoreszenzfärbung spezifisch sein und umgekehrt.

Fällt eine dieser Voraussetzungen weg, muß das entsprechende Protein in der Zelle überexprimiert werden. Zum Nachweis überexprimierter Proteine werden Vektorsysteme eingesetzt, welche die Proteinexpression in N- oder C-terminaler Fusion mit einem sogenannten Tag ermöglichen. Ein Tag ist ein kurzes Oligopeptid aus 8-12 Aminosäuren, das durch spezifische, kommerziell erwerbbar

Antikörper gebunden wird. Die Expression von Tag-Proteinen erlaubt den Nachweis durch beide Systeme, Western Blot und Immunfluoreszenz. Die Überexpression der FA-Proteine FANCA, FANCC und FANCG war von Vorteil, da diese Proteine in der Zelle in sehr geringer Kopienzahl vorliegen und durch die direkten Nachweismethoden nur schwer oder gar nicht erfaßt werden können. Für vier Mitglieder der RAD51-Familie, RAD51A, RAD51D, XRCC2 und XRCC3, existieren zum gegenwärtigen Zeitpunkt kommerziell erhältliche Antikörper. Unter ihnen sind jedoch nur die Antikörper gegen das RAD51A-Protein spezifisch; die drei Antikörper der Firma ABCAM gegen RAD51D, XRCC2 und XRCC3 binden unspezifisch an Membranproteine der Zellen (eigene Ergebnisse). Zum Nachweis einer Interaktion mußten daher die RAD51-Familienproteine RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 überexprimiert werden; um vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten, wurde das RAD51A-Protein sowohl endogen, als auch in Überexpression nachgewiesen. Zum Nachweis der überexprimierten Proteine wurden die sogenannten „Mammalian Expression Vectors“ der Firma Stratagene, pCMV-Tag 2 und pCMV-Tag 3, verwendet.

4.3.2.1 Klonierung der FA-cDNAs *FANCA*, *FANCC*, *FANCG* und der *RAD51*-Genfamilie in pCMV-Vektoren

Die FA-cDNAs *FANCA*, *FANCC* und *FANCG* wurden in den pCMV2-Vektor kloniert; er erlaubt eine Expression der Proteine in Fusion mit N-terminalem FLAG-Tag (DYKDDDDK). In den pCMV3-Vektor wurden alle cDNAs der *RAD51*-Familie, *RAD51A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* und *XRCC3* sowie das *FANCG*-Gen kloniert. Der pCMV-Vektor ermöglicht die Expression mit N-terminal fusioniertem c-myc-Tag (EQKLISEEDL). Die Klonierung der *FA*- und der *RAD51*-Familie-cDNAs erfolgte über die in Tabelle 14 angegebenen Restriktionsschnittstellen.

Tab. 14: Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der *FA*- und *RAD51*-cDNAs.

	pCMV3		pCMV2
<i>RAD51A</i>	Sall-SalI	<i>FANCA</i>	EcoRI-EcoRI
<i>RAD51B</i>	EcoRI-XhoI	<i>FANCC</i>	BamHI-XhoI
<i>RAD51C</i>	EcoRI-XhoI	<i>FANCG</i>	EcoRI-EcoRI
<i>RAD51D</i>	EcoRI-EcoRI		
<i>XRCC2</i>	EcoRI-EcoRI		
<i>XRCC3</i>	EcoRI-XhoI		
<i>FANCG</i>	EcoRI-EcoRI		

4.3.2.2 Nachweis der Überexpression der FA-Proteine und der RAD51-Familie durch Immunfluoreszenzfärbung

Zur Überexpression von FANCA, FANCC, FANCG sowie der RAD51-Familie wurden zunächst Test-Transfektionen in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die Zellen wurden in 12-well-Platten auf Deckelgläschen (\varnothing 1cm) ausgesät und nach etwa 16 h mit je 1 μ g Plasmid/3 μ l FuGENE/well transfiziert. Die Präparation der Zellen erfolgte 24 h nach der Transfektion (3.4.7). Zur Detektion der FLAG- und c-myc-Fusionsproteine wurden primäre anti-FLAG-Antikörper (aus Maus) und anti-c-myc-Antikörper (aus Kaninchen) in einer Verdünnung von 0,2 μ g/ml verwendet. Zur Detektion der FLAG- bzw. c-myc-Antikörper wurden sekundäre fluoreszenzgekoppelte Alexa Fluor-Antikörper (aus Ziege) mit Emissionsmaxima von 488 nm (grün) oder 594 nm (rot) verwendet. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI, das blaues Licht der Wellenlänge 461 nm emittiert. Die Fluoreszenzfärbung wurde mit Hilfe verschiedener Lichtfiltersysteme an einem Zeiss Axiophot Mikroskop detektiert. Die Daten konnten anschließend mit der EasyFish (Version 1.2) Software direkt am Computer ausgewertet werden.

4.3.2.2.1 Transfektionsraten verschiedener Zelllinien

Um die optimale Zelllinie für die Transfektionsversuche einsetzen zu können, wurden zunächst drei verschiedene Zelltypen, HEK293, COS-7 und primäre humane Fibroblasten zur Plasmidtransfektion verwendet. Dabei wiesen HEK293- (human embryonic kidney) und COS-7- (*Cercopithecus aethiops*, grüne Meerkatze) Zellen vergleichbare Transfektionsraten auf, während mit primären humanen Fibroblasten extrem niedrige Raten erreicht wurden (Tab. 15).

Tab. 15: Transfektionsraten verschiedener FLAG- und c-myc-Plasmidkonstrukte für HEK293-, COS-7- und primäre Fibroblasten-Zellen; ---, nicht getestet.

	HEK293 (in %)	COS-7 (in %)	humane primäre Fibroblasten (in %)
FLAG-FANCA	30	31	2
FLAG-FANCC	20	19	1
FLAG-FANCG	35	38	1
c-myc-FANCG	36	35	0.8
c-myc-RAD51A	40	34	---
c-myc-RAD51B	25	29	---
c-myc-RAD51C	4	6	---
c-myc-RAD51D	22	24	---
c-myc-XRCC2	2	3	---
c-myc-XRCC3	19	21	---
GFP-Vektor	50	54	2

Für alle weiteren Versuche wurden aufgrund ihres humanen Ursprungs HEK293-Zellen verwendet. Zur Optimierung der Transfektionsrate wurden die Zellen mit 1, 2 oder 3 µg Plasmid-DNA/well und einer Ratio von Plasmid (µg) zu FuGENE (µl) von 1:2 und 1:3 transfiziert und nach 24, 48 oder 72 h für die Immunfluoreszenzfärbung präpariert. Dabei wurde mit höheren Plasmidmengen/well keine Steigerung der Transfektionsrate erreicht. Auch der prozentuale Anteil der transfizierten Zellen variierte über den getesteten Zeitraum von 24-72 h nicht. Als optimales Verhältnis zwischen Plasmidmenge und Transfektionsagens ergab sich eine Ratio von 1µg Plasmid : 3 µl FuGENE.

4.3.2.2 Lokalisation der FA- und RAD51- Proteine

In der Überexpression war für alle drei FA-Proteine häufig eine nukleäre Lokalisation zu beobachten, wobei die Verteilung zwischen Zytoplasma und Kern von Zelle zu Zelle stark schwanken kann. In einigen Zellen war eine ausschließlich nukleäre Lokalisation zu erkennen, während andere einen zytoplasmatischen Anteil von 90 % aufwiesen. Ein höherer zytoplasmatischer Anteil an FANCC im Vergleich zu den beiden anderen FA-Proteinen war nicht zu beobachten (Abb. 14 b).

RAD51A war hauptsächlich im Nukleus lokalisiert, allerdings wurde eine homogene Färbung des Kerns nur in etwa 20 % der überexprimierenden Zellen gesehen. Die Zellkerne weisen häufig eine „gestrichelte“ Färbung auf (Abb. 14 a), was vermutlich auf eine Di- und Polymerbindung der RAD51A-Proteine zurückzuführen ist (Thomas Haaf, persönliche Mitteilung). Da die Überexpression von RAD51A hier zu einer unnatürlichen Polymerbildung unter den in sehr hoher Kopienzahl vorliegenden RAD51A-Proteinen führte, wurde in den Koloaliationsexperimenten auf eine Überexpression von RAD51A verzichtet und stattdessen der endogene Nachweis des RAD51A-Proteins geführt. Die übrigen Proteine der RAD51-Familie zeigten eine überwiegend nukleäre Lokalisation, dabei war im Mittel der zytoplasmatische Anteil der Proteine RAD51B und RAD51D höher als bei den anderen Familienmitgliedern, RAD51C, XRCC2 und XRCC3 (Abb. 14 a).

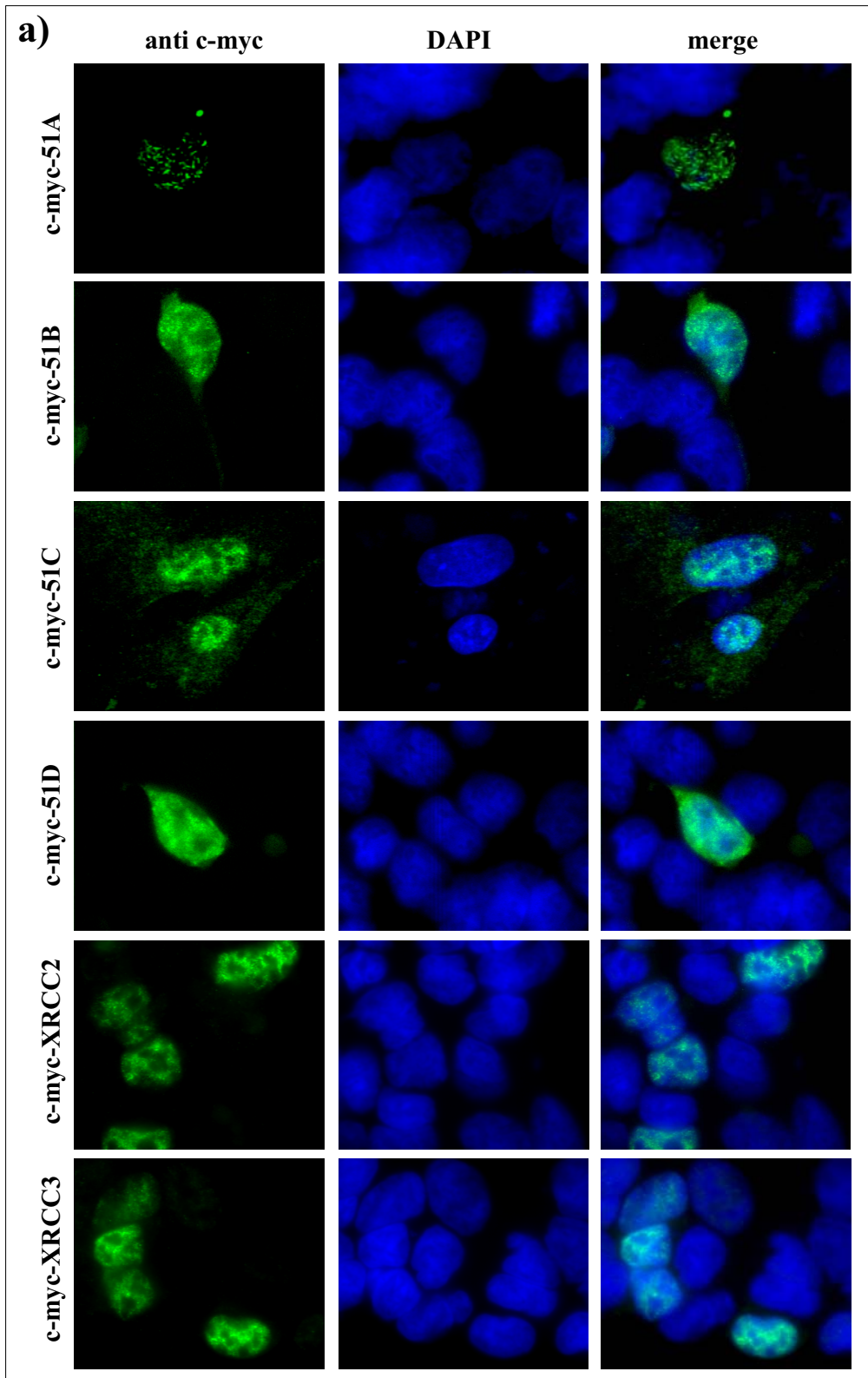


Abb. 14a (siehe nächste Seite)

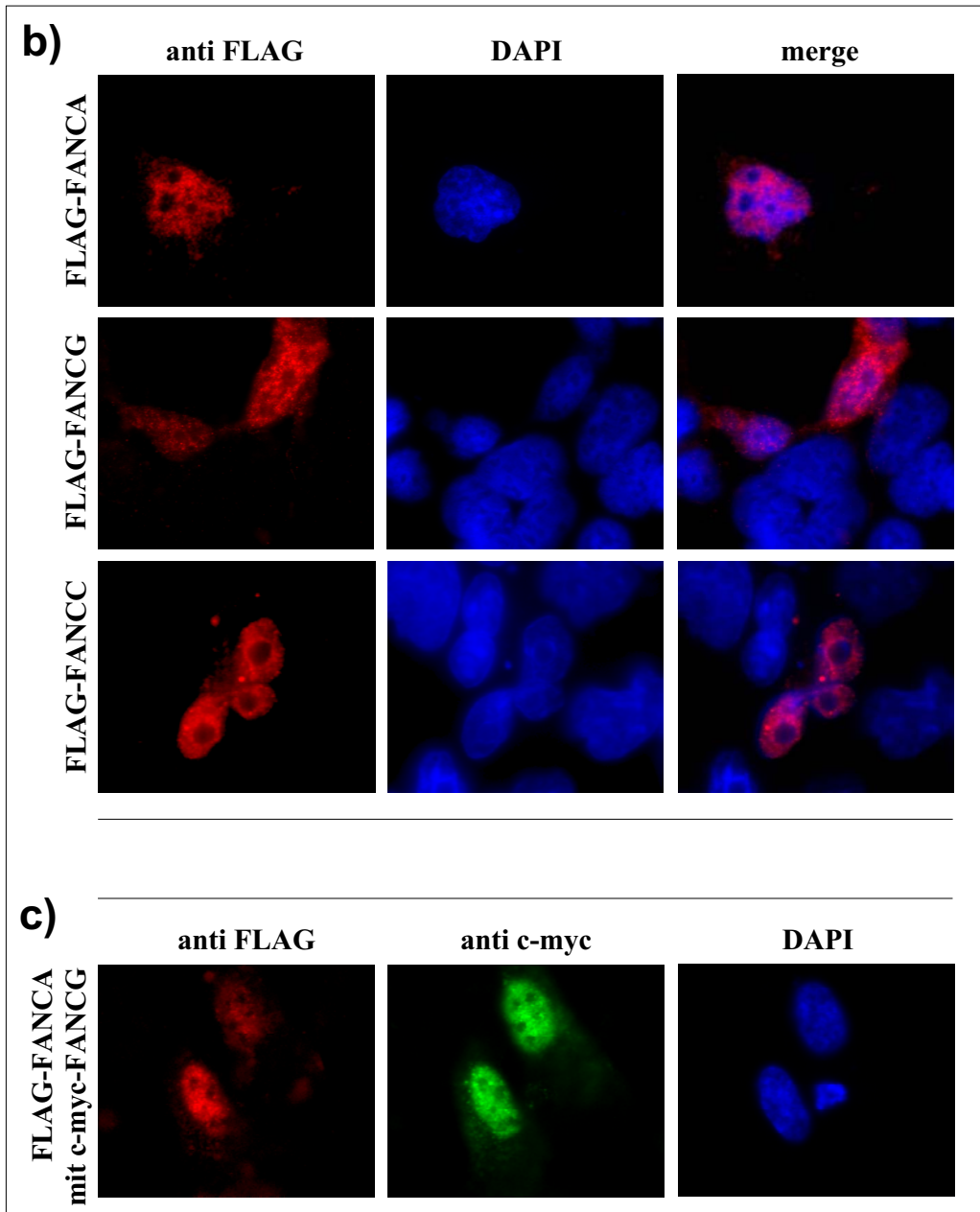


Abb. 14: Intrazelluläre Lokalisation der Proteine der RAD51-Familie und der FA-Proteine in HEK293-Zellen. **a)** Überexpression der RAD51-Proteinfamilie in Fusion mit c-myc-Tag. 1.Ak: anti c-myc, 2. Ak: Alex Fluor 488. **b)** Überexpression der FA-Proteine in Fusion mit FLAG-Tag. 1. Ak: anti FLAG, 2. Ak: AlexaFluor 594. **c)** Ko-Überexpression von FLAG-FANCA und c-myc- FANCG. Alle Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

4.3.2.2.3 Versuch der Induktion nukleärer FA- Foci durch MMC-Behandlung

Eine Reihe von DNA-Reparaturproteinen verändern ihre homogene nukleäre Verteilung nach der Induktion von DNA-Schäden durch genotoxische Agentien wie MMC oder IR.

Unter den Fanconi Anämie Proteinen wurde für zwei der bisher sechs identifizierten Proteine eine Konzentrierung in subnukleäre Bereiche beschrieben: HOATLIN et al. (1999) zeigten, daß FANCC mit einem seiner interagierenden Partner, FAZF in sogenannte „nuclear bodies“ lokalisiert, dies allerdings auch ohne die Induktion von DNA-Schäden. Das einzige hochkonservierte FA-Protein, FANCD2, kolokalisiert mit dem DNA-Reparaturprotein BRCA1 in nukleäre Foci nach Bestrahlung oder MMC-Behandlung (GARCIA-HIGUERA et al. 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden HEK293- Zellen mit einem der FA-pCMV-Vektoren transfiziert und nach 24 h mit 500 ng/ml MMC behandelt. Das MMC-haltige Medium wurde nach 1 h durch frisches, MMC-freies MEM-Medium ersetzt. Die Präparation der Zellen erfolgte im Anschluß an die MMC- Behandlung nach 12 h. Pro Deckelgläschen wurden in jeder Versuchsanordnung 200 – 500 Zellkerne ausgezählt.

Die FA-Proteine FLAG-FANCA, FLAG-FANCC und FLAG-FANCG zeigten nach MMC-Behandlung zu stark schwankenden Anteilen eine Lokalisation in subnukleäre Strukturen (Abb. 15). Der beobachtete minimale bzw. maximale prozentuale Anteil Foci-haltiger Kerne in den überexprimierenden Zellen ist in Tabelle 16 zusammengefaßt:

Tab. 16: Variationsbreite FA-Foci-haltiger HEK293-Zellkerne nach Behandlung mit 500 ng/ml MMC für 1 h. Die Zellen wurden 12-24 h nach MMC-Behandlung präpariert.

	FANCA	FANCC	FANCG
ohne MMC-Behandlung	0-8 %	0-2 %	1-15 %
500MMC, 12 h	1-24 %	0-8 %	1-32 %
500 MMC, 24 h	1-20 %	0-5 %	1-30 %

Die FA-Foci wiesen dabei eine hohe Variabilität in Bezug auf Häufigkeit (siehe Tab. 16) und Erscheinungsbild auf. Die starke Variabilität der FA-Foci in Bezug auf Häufigkeit und Erscheinungsbild unterscheidet sich signifikant von den Resultaten, die mit anderen DNA-Reparaturproteinen nach DNA-Schädigung erhalten werden. Der Phänotyp der besonders häufigen großflächigen Focibildung unter den FA-Proteinen läßt eher eine andere oder zusätzliche Funktion der FA-Proteine bei der Erhaltung der genetischen Stabilität vermuten.

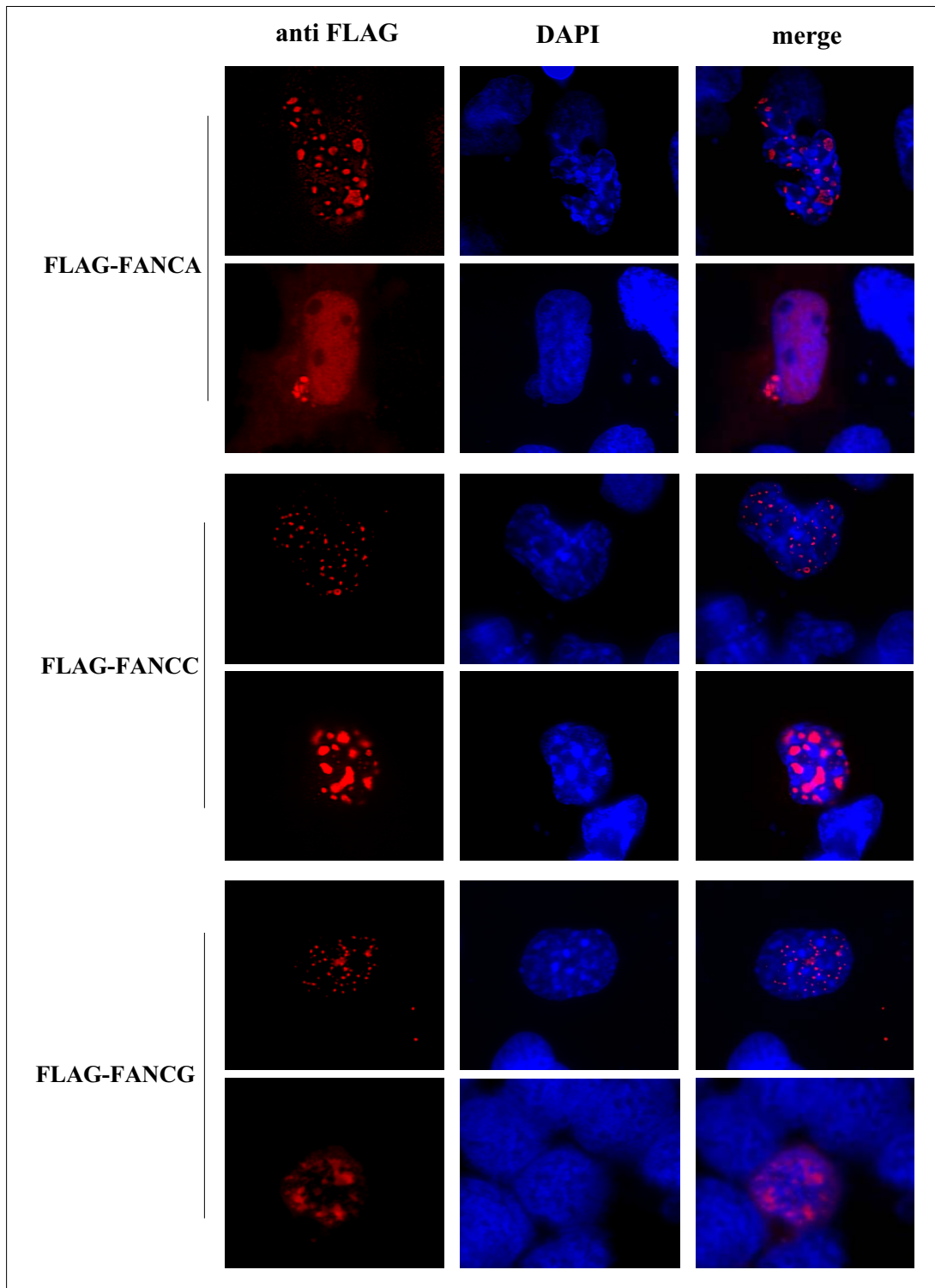


Abb. 15: Variable Focibildung überexprimierter FA-Proteine in HEK293-Zellen. Alle Zellen wurden mit 500 ng/ml MMC für 1 h behandelt und nach 12-24 h präpariert. 1. Ak: anti-FLAG, 2. Ak: AlexaFluor594.

4.3.2.2.4 Versuch der Induktion nukleärer Foci bei den RAD51-Homologen

Von den sechs bekannten Mitgliedern der RAD51-Familie ist RAD51A das einzige Protein, dessen Konzentration in nukleären Foci nach MMC, MMS oder IR bisher beschrieben wurde. Dabei kolokalisiert es mit mehreren anderen Proteinen, die in homologe Rekombinations-Reparatur involviert sind, wie etwa BRCA1, RPA oder RAD54. Über eine etwaige subnukleäre Lokalisation der anderen RAD51-Familienmitglieder ist bisher in der Literatur nichts beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK293-Zellen mit den jeweiligen pCMV-Klonen transfiziert, wie unter 3.7.2 beschrieben. Die Zellen wurden für 1 h mit 500 ng/ml MMC behandelt und nach 12 h präpariert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Formierung nukleärer RAD51A-Foci nach MMC-Behandlung sowohl durch den endogenen Nachweis mit Hilfe eines spezifischen RAD51A-Antikörpers (Kaninchen α RAD51, Santa Cruz) als auch in Überexpression des RAD51A-Proteins nachgewiesen (Abb. 16). Der Anteil der Zellkerne mit RAD51-Foci lag für HEK293-Zellen stets bei 35-40 %.

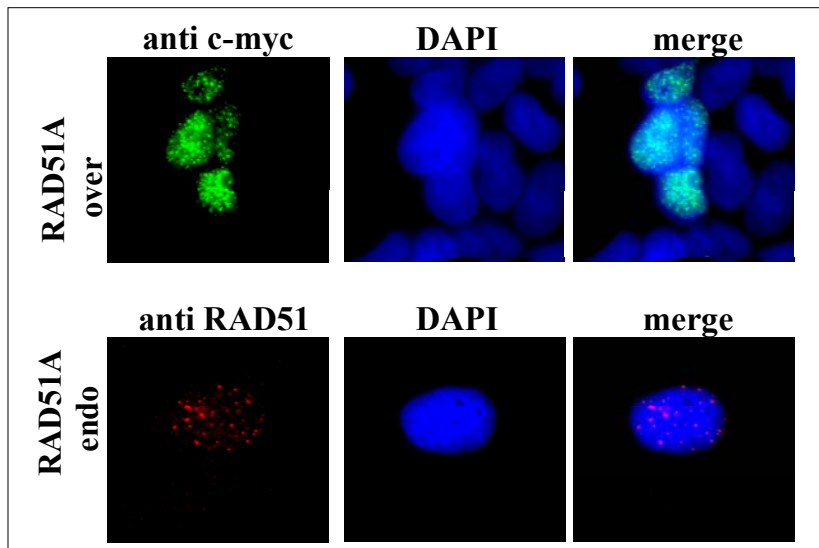


Abb.16: RAD51A-Fociformierung in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden mit 500 ng/ml MMC für 1 h behandelt und nach 12 h präpariert. Obere Reihe, Focibildung in Zellen mit RAD51A-Überexpression (c-myc-Fusionsprotein), 1. Ak: anti c-myc-Tag; 2. Ak: AlexaFluor488. Untere Reihe, Focibildung durch endogenes RAD51A-Protein; 1. Ak: anti RAD51; 2. Ak: AlexaFluor594.

Ein Nachweis der übrigen RAD51-Familienmitglieder erfolgte mit Hilfe eines c-myc-Antikörpers, der spezifisch das c-myc-Tag des überexprimierten Proteins erkennt (rabbit α c-myc, Santa Cruz). Die RAD51-Familienmitglieder RAD51C, XRCC2 und XRCC3 zeigten keinen Unterschied in der nukleären Verteilung vor und nach der MMC-Behandlung. Eine Lokalisation in subnukleäre Bereiche nach MMC-Behandlung war in sehr seltenen Fällen für die Proteine RAD51B und RAD51D zu beobachten, der Anteil der Kerne mit RAD51B- oder RAD51D-Foci in überexprimierenden Zellen lag allerdings stets unter 5 %. Dieser sehr geringe Anteil an Foci-haltigen Nuklei schließt die Möglichkeit einer Artefaktfärbung, die der echten Focibildung täuschend ähnelt, nicht aus.

Um eine mögliche Kollokalisierung zwischen den FA-Proteinen und den drei RAD51-Familienmitgliedern, RAD51A, RAD51B und RAD51D zu untersuchen, wurden daher im nächsten Schritt HEK293-Zellen mit jeweils zwei Expressionsvektoren kotransfiziert.

4.3.2.2.5 Keine Kollokalisierung zwischen FA-Proteinen und RAD51-Familienmitgliedern

Zum Nachweis einer Kollokalisierung in nukleären Foci zwischen den Fanconi Anämie-Proteinen FLAG-FANCA, FLAG-FANCC, FLAG-FANCG und den Fusionskonstrukten c-myc-FANCG, c-myc-RAD51A, c-myc-RAD51B und c-myc-RAD51D wurden HEK293-Zellen mit jeweils zwei Expressionsvektoren kotransfiziert. Zusätzlich wurde in einfach transfizierten Zellen, die eines der FA-Proteine überexprimierten, der endogene RAD51A-Nachweis geführt. Die verwendeten Kombinationen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Zur Kotransfektion wurde jeweils 1 µg FLAG-Plasmid-DNA mit 1 µg c-myc-Plasmid-DNA vermischt und in das doppelte Volumen MEM-Medium (194 µl) mit 6 µl FuGENE pipettiert. Das Gemisch wurde vor der Transfektion der HEK293-Zellen mindestens 20 min bei RT inkubiert. Die Kotransfektionsraten für jede Kombination aus FLAG- und c-myc-Fusionsprotein wurden durch das Auszählen von jeweils mindestens 100 transfizierten Zellen bestimmt.

Tab. 17: Transfektionsraten für alle verwendeten Tag-Konstrukte, sowie Kotransfektionsraten für alle verwendeten FLAG- und c-myc-Plasmidkombinationen.

<i>PLASMID-KOMBINATION</i>		<i>Transfektionsrate FLAG- Fusionsprotein (in %)</i>	<i>Transfektionsrate c-myc- Fusionsprotein (in %)</i>	<i>Kotransfektionsrate von FLAG- und c- myc-Fusions- protein (in %)</i>
FLAG-FANCA :	c-myc-FANCG	26	20	6
FLAG-FANCA :	c-myc-RAD51A	23	40	5
FLAG-FANCA :	c-myc-RAD51B	22	25	8
FLAG-FANCA :	c-myc-RAD51D	28	18	2
FLAG-FANCC :	c-myc-FANCG	17	22	2
FLAG-FANCC :	c-myc-RAD51A	15	38	8
FLAG-FANCC :	c-myc-RAD51B	17	20	7
FLAG-FANCC :	c-myc-RAD51D	18	19	4
FLAG-FANCG :	c-myc-RAD51A	30	35	8
FLAG-FANCG :	c-myc-RAD51B	33	26	7
FLAG-FANCG :	c-myc-RAD51D	34	19	3

Aufgrund der sehr geringen Kotransfektionsraten wurde eine Optimierung des Kotransfektionsprotokolls durch den Einsatz unterschiedlich hoher Plasmidmengen (0,5µg, 2µg) pro Transfektion angestrebt, der Einsatz verschiedener Plasmidkonzentrationen erbrachte jedoch keinerlei Verbesserung der Kotransfektionsrate. Zur Induktion von „DNA-interstrand crosslinks“ wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit 500 ng/ml MMC für 1 h behandelt und nach weiteren 12 h präpariert.

Da eine Koexpression zweier Proteine in maximal 8 von 100 transfizierten Zellen stattfand und die Anzahl der nukleären FA-Foci bei höchstens 30 % (FLAG-FANCG), die Zahl der nukleären RAD51A-Foci bei 35-40 % und die Zahl der RAD51B- bzw. RAD51D-Foci unter 5% aller transfizierten Zellen lag, war eine signifikante Aussage über eine mögliche Kollokalisierung zweier Proteine generell nicht möglich. Die folgenden Beobachtungen können daher nur als rein tendenzielle Aussagen betrachtet werden: (1) Es wurde keine Kollokalisierung in nukleäre Foci unter den FA-Proteinen FANCA, FANCC und FANCG beobachtet, die subnukleäre Lokalisation eines FA-Proteins in Foci wurde nur in Zellen beobachtet, die nicht mit dem jeweils zweiten Plasmid kotransfiziert waren. (2) Es wurde keine Kollokalisierung in Foci zwischen den FA-Proteinen und RAD51A gefunden, weder mit endogenem RAD51A noch mit überexprimierten c-myc-RAD51A. Auffällig war allerdings eine häufig verringerte RAD51A-Foci-Bildung in allen FANCA-, FANCC- oder FANCG-überexprimierenden Zellen, wobei auch die Intensität der RAD51A-Färbung in Zellkernen *ohne* Foci in FA-transfizierten Zellen häufig schwächer war. (3) In einzelnen Fällen konnten Kollokalisierungen zwischen den Proteinen FLAG-FANCA bzw. FLAG-FANCC und c-myc-RAD51B beobachtet werden (ungezeigte Daten), die Überlappung der FA- mit den RAD51B-Foci betrug dabei in jedem Fall fast 100 %. Die extreme Seltenheit dieser Kollokalisierungen läßt jedoch eher auf ein Artefakt schließen.

4.3.2.2.6 Reduzierte Formierung von RAD51A-Foci in primären Fibroblasten mit konstitutiver FANCA-, FANCC- oder FANCG-Überexpression

Die transiente Überexpression der FA-Proteine FANCA, FANCC und FANCG resultierte in einer scheinbar verminderten RAD51A-Focibildung in den transfizierten Zellen. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, daß eine Überexpression der FA-Proteine, die normalerweise in sehr geringer Konzentration in der Zelle vorliegen, teilweise zu einer Inhibition der RAD51A-Focibildung führen könnte. Um diese Hemmung in einem unabhängigen Zellsystem zu bestätigen, wurden primäre, viral transfizierte Fibroblastenzellen, die eines der Fanconi Anämie-Proteine FANCA, FANCC oder FANCG konstitutiv überexprimieren, auf ihre Fähigkeit zur RAD51A-Focibildung getestet. Die FA-Proteine wurden hier über die Verwendung einer sogenannten „IRES-site“ gleichzeitig mit dem Green Fluorescent Protein (GFP) exprimiert, so daß eine FA-Überexpression indirekt anhand der Grünfärbung einer Zelle nachgewiesen werden konnte.

Tab. 18: Prozentualer Anteil stabil überexprimierender primärer Fibroblastenzellen für FANCA (LFAPEG), FANCC (LFCPEG) und FANCG (LFGPEG).

Zelllinie	überexprimiertes Protein	Anteil stabil transfizierter Zellen
LFAPEG	FANCA	40 %
LFCPEG	FANCC	45 %
LFGPEG	FANCG	45 %

Die Zellen wurden, wie unter 3.4.7 beschrieben, auf Deckgläschen in 12-well-Platten ausgesät und mit 500 ng/ml MMC für 3 h behandelt, die Präparation erfolgte nach 12 h. Zur Auswertung wurden pro Versuchsansatz mindestens 300 grün fluoreszierende Zellen gezählt.

Als positiv für RAD51A-Foci wurde eine Zelle ab mindestens 4 Foci eingestuft. Der durchschnittliche Anteil an grün fluoreszierenden, RAD51A-Foci-positiven Zellen für die Linien LFA-, LFC- und LFGPEG lag um $\sim 1/3$ niedriger als bei untransfizierten Kontrollzellen (Tab. 19). In transients Überexpression der FA-Proteine lag der Anteil an Zellen mit mehr als 4 RAD51A-Foci pro Kern noch niedriger (etwa 15 %). Die Intensität der RAD51A-Färbung erschien in den LFA-, LFC- und LFGPEG Zellen jedoch nicht geringer als in der untransfizierten Kontrolle. Diese Resultate deuten auf eine inhibitorische Wirkung der FA-Protein-Überexpression auf die RAD51A-Focibildung hin.

Tab. 19: Prozentuale RAD51A-Focibildung in nicht-transfizierten HEK293-Zellen versus die stabil exprimierenden Zelllinien LFA-, LFC- und LFGPEG.

Zelllinie	Zellen mit FA-Überexpression und RAD51A-Foci (in %)
HEK293 (untransfiziert)	36
LFAPEG	22
LFCPEG	20
LFGPEG	26

4.3.2.2.7 Versuch der Ko-Immunpräzipitation der FA- und RAD51-Proteine

Um die im „Interaction Trap“ beobachteten komplexen und vielfältigen Interaktionen der FA-Proteine mit der RAD51-Proteinfamilie in humanen Zellen zu bestätigen, wurden Koimmunpräzipitationen (Ko-IPs) durchgeführt. Das Prinzip der Ko-IP beruht darauf, aus einem Zellysat ein bestimmtes Protein mit einem spezifischen Antikörper an eine feste Matrix zu binden. Der Rest der zellulären Proteine wird aus dem Lysat ausgewaschen. Liegt dieses Protein im Komplex mit einem zweiten Protein vor, wird dieses während des Reinigungsschrittes nicht aus dem Lysat entfernt, sondern bleibt an das erste gebunden. Nach der Trennung des gereinigten Lysats über ein Proteingel und anschließendem Blotting der Proteine auf eine PVDF-Membran kann man beide Proteine durch spezifische Antikörper im Western Blot nachweisen.

Für die Immunpräzipitationsexperimente wurden kotransfizierte, transient überexprimierende HEK293- Zellen verwendet. Um zunächst festzustellen, ob die FA- und RAD51-Fusionsproteine mit den anti-FLAG- und anti-c-myc-Antikörpern (Santa Cruz) im Western Blot nachweisbar waren, wurden Zellen mit den jeweiligen Expressionsvektoren transfiziert. Nach 24-48 h wurden aus den transfizierten Zellen Gesamt-Proteinextrakte gewonnen. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Western Blot mit Hilfe der FLAG- und c-myc-Antikörper. Die FA-Fusionsproteine FLAG-FANCA, FLAG-FANCC, FLAG-FANCG und c-myc-FANCG waren im Western Blot deutlich nachweisbar (Abb. 17).

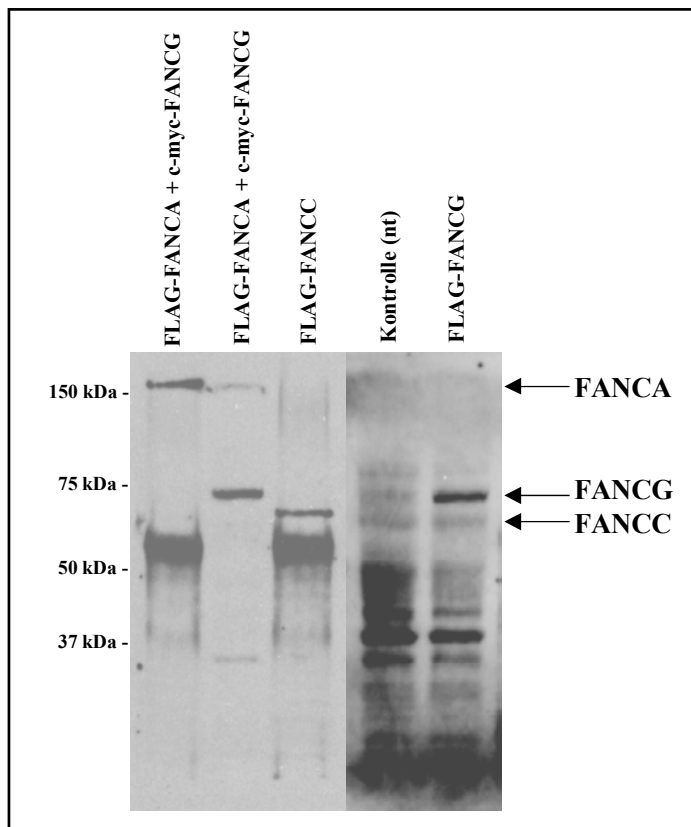


Abb. 17: Nachweis der FA-Fusionsproteine nach Kotransfektion der HEK293-Zellen. Die Abbildung repräsentiert zwei deckungsgleich übereinandergelegte Western Blot-Röntgenfilme. Auf der geblotteten Membran wurde zunächst FLAG-FANCA mit dem anti-FLAG-Ak detektiert (Film 1). Die zweite Inkubation erfolgte mit dem anti-c-myc-Ak zur Detektion von c-myc-FANCG (Film 2). Alle Proteine waren reproduzierbar und gut aus überexprimierenden HEK293-Zellen nachweisbar. Spuren 1+2: Kotransfektion FLAG-FANCA und c-myc-FANCG; Spur 1: Nachweis von FLAG-FANCA nach spezifischer Isolation durch anti-FLAG-Ak durch IP, Spur 2: Nachweis von c-myc-FANCG direkt aus HEK293-Zellysat mit anti-c-myc-Ak. Spur 3: Nachweis von FLAG-FANCC nach spezifischem Fischen mit anti-FLAG-Ak durch IP. Spur 4: Untransfizierte Kontrolle, Immundetektion mit anti-FLAG-Ak. Spur 5: Nachweis von FLAG-FANCG direkt aus HEK293-Zellysat mit anti-FLAG-Ak.

Unter den RAD51-Fusionsproteinen waren, wie nach den Immunfluoreszenzexperimenten zu erwarten, nur RAD51A, RAD51B, RAD51D und XRCC3 nachweisbar. Die Expression der beiden c-myc-Fusionsproteine RAD51C und XRCC2 war zu gering (siehe Tabelle 15) für einen Nachweis durch Western Blotting (Abb. 19). Auf eine Überexpression von RAD51A wurde aufgrund der starken Neigung zur Polymerisierung (siehe Abb. 14) bei der Immunpräzipitation verzichtet.

Da das FANCA-Protein im „Interaction Trap“ - je nach Art der Selektion und Orientierung der Fusionsproteine - unterschiedlich starke Interaktion mit jedem Mitglied der RAD51-Familie zeigte, wurden Immunpräzipitationsversuche zwischen FLAG-FANCA und allen exprimierten c-myc-RAD51 Fusionsproteinen durchgeführt. Da die Interaktion zwischen FANCA und FANCG bereits von mehreren Labors bestätigt wurde, diente die Ko-IP zwischen FLAG-FANCA und c-myc-FANCG bei allen Experimenten als Positivkontrolle.

Tab. 20: Auflistung aller zur anschließenden Immunpräzipitation verwendeter Plasmidkombinationen aus FLAG- und c-myc-Fusionskonstrukten. RAD51A wurde zur Immunpräzipitation nicht überexprimiert („RAD51A endogen“).

FLAG	c-myc
FLAG-FANCA	RAD51A (endogen)
	c-myc-FANCG
	c-myc-RAD51B
	c-myc-RAD51D
	c-myc-XRCC2
FLAG-FANCC	RAD51A (endogen)
FLAG-FANCG	RAD51A (endogen)
	c-myc-RAD51B
	c-myc-RAD51D

Zur Immunpräzipitation wurden HEK293-Zellen mit je 1µg FLAG- bzw. c-myc-Fusionsprotein transfiziert. Die Präparation des Gesamtproteinextrakts erfolgte 24-48 h nach der Transfektion. Zur Ko-Immunpräzipitation von Proteinen mit FANCA, FANCC oder FANCG wurden die FA-Proteine aus dem IP-Lysat mit dem FLAG-Antikörper gefischt. Zur Detektion einer physikalischen Interaktion mit einem der RAD51-Familienmitglieder wurde der anschließende Western Blot mit dem c-myc-Antikörper durchgeführt.

Während die als Positivkontrolle verwendete IP zwischen FLAG-FANCA und c-myc-FANCG in den meisten Experimenten nachweisbar war (Abb. 18), konnte keine IP zwischen den in Tabelle 20 aufgeführten ko-überexprimierten Fusionsproteinen gezeigt werden (Abb. 19 und ungezeigte Daten.).

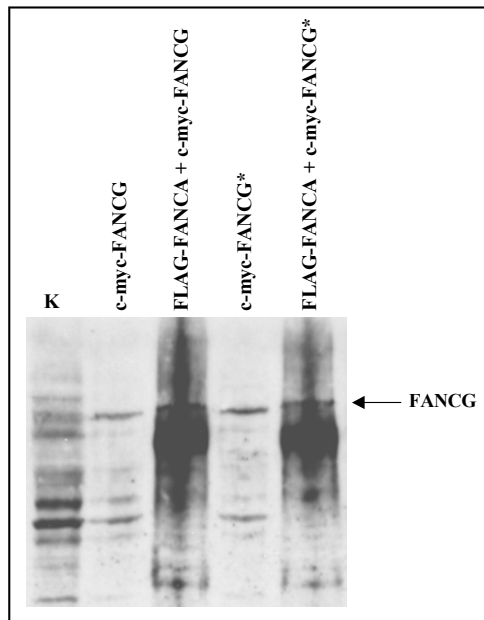


Abb. 18: Koimmunpräzipitation von FLAG-FANCA und c-myc-FANCG aus kotransfizierten HEK293-Zellen. Das Isolieren des FANCA/FANCG-Komplexes erfolgte mit dem anti FLAG-Ak, der immunologische Nachweis von FANCG auf dem Western Blot mit dem anti c-myc-Ak. Spuren 2 + 3: IP aus unbehandelten HEK293-Zellen; Spuren 4 + 5 (*): IP aus MMC-behandelten HEK293-Zellen. K: untransfizierte Kontrolle.

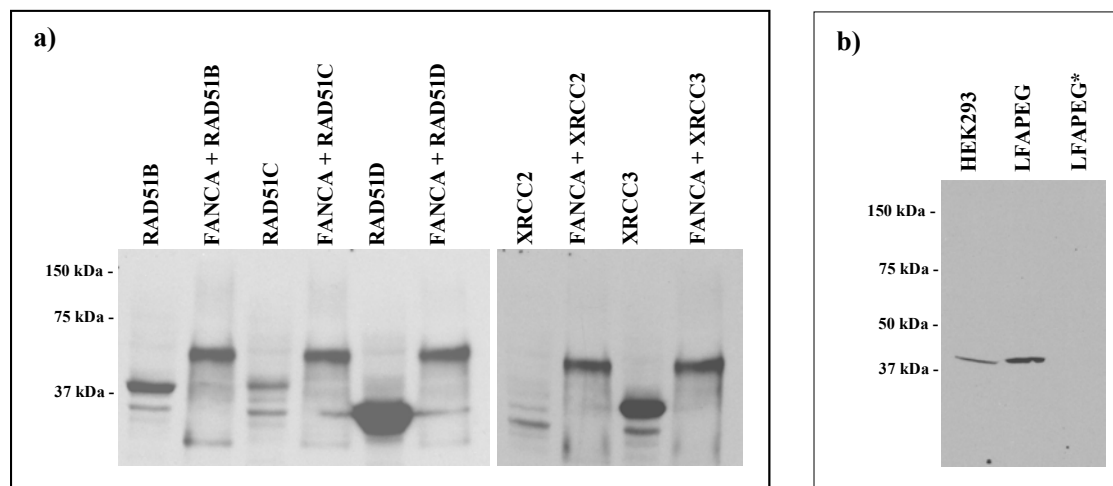


Abb. 19: a) Western Blotting und Immunpräzipitation der RAD51-Homologe als c-myc-Fusionsproteine mit FLAG-FANCA. Lysate von doppelt transfizierten Zellen wurden entweder direkt auf das Gel aufgetragen oder mit anti-FLAG-Antikörpern inkubiert. Direkt-Lysate zeigen die Expression von RAD51B, RAD51D und XRCC3. Die Expression von RAD51C und XRCC2 ist dagegen nicht nachweisbar. Eine Koimmunpräzipitation von FLAG-FANCA mit einem der RAD51-Homologe ist nicht zu sehen (Spuren 2, 4, 6, 8, 10). b) Endogene Expression von RAD51A in HEK293-Zellen und FANCA-überexprimierenden Zellen (Zelllinie LFAPEG). * In konfluenten LFAPEG-Zellen ist RAD51A nicht nachweisbar, da die RAD51A-Expression in ruhenden Zellen reprimiert wird (CHEN et al. 1997).

Um auszuschließen, daß die Expression des endogenen RAD51A durch eine Überexpression der FA-Proteine tatsächlich herunterreguliert wird (4.3.2.2.6), wurden Proteinextrakte aus LFA-, LFC- und LFGPEG-Zellen präpariert. Im anschließenden Western Blot waren normale Konzentrationen an endogenem RAD51A-Protein in allen drei Zelllinien nachweisbar (Abb. 20).

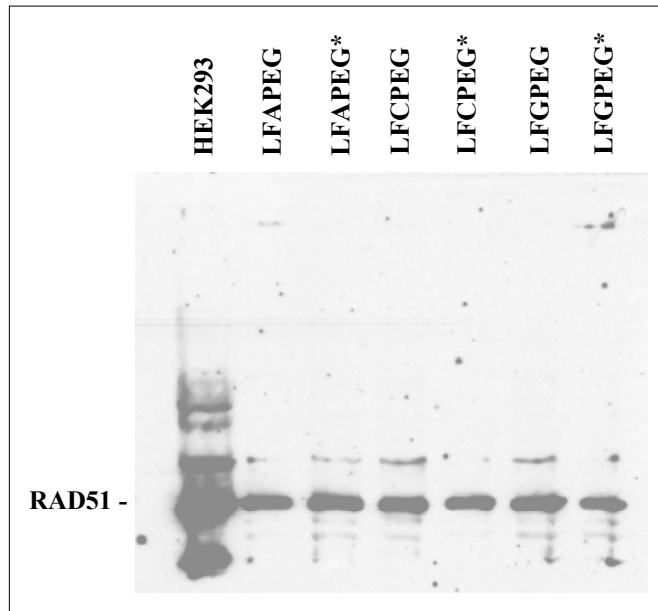


Abb. 20: Normale RAD51A-Expression in LFA-, LFC- und LFGPEG-Linien. (*), Lysate aus 12 h zuvor mit 500 ng/ml MMC behandelten Zellen. Das RAD51A-Expressionsmuster ändert sich nicht nach MMC-Behandlung der Zellen (Spuren 3, 5 und 7). HEK293-Zellen (Spur 1) zeigen deutlich eine erhöhte endogene RAD51A-Expression, wie sie für immortalisierte Zelllinien beschrieben ist (XIA et al. 1997).

Auch eine Variation der Pufferzusammensetzung (siehe Tab. 4), der Transfektionsprotokolle sowie eine MMC-Behandlung der transfizierten Zellen (500 MMC, 1 h) 12 h vor der Präparation der Proteinextrakte erbrachte keine nachweisbare physikalische Interaktion zwischen den FA-Proteinen und den RAD51-Familienmitgliedern.

5. Diskussion

5.1 Identifizierung und Charakterisierung außergewöhnlicher Spleißmutationen im *ATM*-Gen

Das bei Ataxia Telangiectasia betroffene Gen, *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated), wurde 1995 identifiziert und näher charakterisiert (SAVITZKY et al 1995a, 1995b; UZIEL et al. 1996). Es liegt auf Chromosom 11q21-22 und erstreckt sich über einen Bereich von 140 000 bp. Das *ATM*-Gen enthält 66 Exons, von denen 62 für einen offenen Leserahmen von 9168 nt kodieren. Das *ATM*-Protein besteht aus 3056 Aminosäuren und wird aufgrund seiner Sequenzhomologie zur Familie der Phosphatidylinositol-3-(PI-3)- Kinasen gezählt.

Seit der Identifizierung des *ATM*-Gens wurden über 300 verschiedene Mutationen beschrieben (*ATM* Mutation Database, www.vmrsearch.org/atm.htm). Viele dieser Mutationen sind auf einen oder wenige Patienten beschränkt, und das Mutationsspektrum erstreckt sich ohne erkennbare Häufungen über das gesamte *ATM*-Gen. Die meisten AT-Patienten sind sogenannte „Compound Heterozygote“, bei denen auf beiden *ATM*-Allelen jeweils unterschiedliche Mutationen vorliegen. Eine Ausnahme stellen die sogenannten Gründermutationen dar, die in manchen Ländern (Polen, Großbritannien, Norwegen, Holland, Japan) oder in Bevölkerungsgruppen mit bestimmtem religiösen Hintergrund (Mennoniten, Ashkenazi-Juden, Amish, Utah Mormonen) vermehrt auftreten.

Der überwiegende Anteil der *ATM*-Mutationen (etwa 60 – 70 %) führt zu einer Trunkierung des Translationsproduktes. Zu den trunkierenden Mutationen zählen Nonsense-Mutationen sowie Insertionen, Deletionen und Spleißmutationen, die eine Leserahmenverschiebung in der kodierenden Region zur Folge haben. Anhand der Einträge der *ATM*-Mutations-Datenbank wird ersichtlich, daß ein hoher Anteil der Aberrationen auf cDNA-Ebene Exondeletionen bzw. kleinere Deletionen oder Insertionen direkt an den Exongrenzen darstellen. Obwohl die zugrundeliegenden Mutationen auf genomischer Ebene häufig nicht identifiziert wurden, läßt die Art der Aberrationen vermuten, daß es sich in vielen Fällen um Spleißmutationen handelt. Unter dieser Annahme wäre der Anteil der Spleißmutationen im *ATM*-Gen mit 30 – 35 % außergewöhnlich hoch. Bei betroffenen Genen anderer menschlicher Erbkrankheiten liegt der durchschnittliche Anteil der Spleißmutationen bei nur 15 % (KRAWCZAK et al. 1992).

Es stellt sich die Frage, ob das *ATM*-Gen allein aufgrund seiner Größe und der Zahl seiner Exons so oft von Spleißmutationen betroffen ist. Eine weitere mögliche Erklärung läge in einer besonderen Labilität des *ATM*-Primärtranskriptes gegenüber Spleißmutationen, insbesondere Veränderungen an den weniger konservierten Positionen innerhalb der Spleiß-Konsensussequenzen. Die Konsensusstrukturen (cs, „consensus sequence“) an der 5'-Spleißstelle (Exon/Intron-Grenze) bzw. der 3'-Spleißstelle (Intron/Exon-Grenze) umfassen die hochkonservierten intronischen Dinukleotid-

Sequenzen **gt** bzw. **ag** sowie deren direkte Umgebung (5'-cs: A G **g t** (a/g) a g t sowie 3'-cs: 8 x (c/t) n c **a g G**) (SHAPIRO und SENAPATHY 1987). Mutationen an einer der vier hochkonservierten Dinukleotidpositionen führen stets zu aberrantem Spleißverhalten und meistens zu einer Deletion des jeweiligen Exons auf mRNA-Ebene. In einigen Fällen kann eine nahegelegene alternative Konsensussequenz als Spleißstelle erkannt werden, dies führt – je nach Position der alternativen Sequenz - zu einer Insertion oder Deletion einiger Nukleotide in der kodierenden Region des Gens.

Mutationen, die nicht eines der vier hochkonservierten Nukleotide betreffen, sich aber innerhalb der umliegenden Konsensusbereiche befinden, können je nach der Konservierung der veränderten Nukleotidposition ebenfalls aberrantes Spleißen auslösen. Betrifft eine Mutation eine weniger konservierte Stelle, besitzt sie möglicherweise keine vollständige Penetranz und ermöglicht teilweise noch eine Erkennung der Konsensusregion durch die Spleißmaschinerie. Dieses Phänomen wird als „leaky splicing“ bezeichnet und resultiert in der Translation eines voll funktionsfähigen Proteins mit Wildtypsequenz. Im Rahmen der in dieser Doktorarbeit durchgeführten Mutationsanalyse sollte anhand der identifizierten Mutationen untersucht werden, ob aberrantes Spleißen im *ATM*-Gen nicht nur durch Mutationen an den Dinukleotidpositionen **gt** und **ag**, sondern in besonderem Ausmaß auch durch Veränderungen innerhalb der weniger konservierten Positionen ausgelöst wird.

Zur möglichst umfassenden Erfassung der Spleißmutationen in Zellen von 20 AT-Patienten wurde zunächst eine Mutationsanalyse mit Hilfe des „Protein Truncation Test“ durchgeführt, dessen Eignung zur Mutationssuche im *ATM*-Gen bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben wurde (LAAKE et al. 1998, 2000; BROEKS et al., 1998; McCONVILLE et al., 1996). Mit Hilfe des PTT wurden 25 trunkierende Mutationen in insgesamt 40 Allelen der 20 AT-Patienten identifiziert. Dies entspricht einer Detektionsrate von 62 % und ist mit Ergebnissen anderer Studien vergleichbar (BROEKS et al. 1998, 76 %; TELATAR et al. 1998, 66 %; TERAOKA et al. 1999, 48 %).

Unter den detektierten trunkierenden Mutationen befanden sich insgesamt 8 Nonsense-Mutationen, 5 kleinere Deletionen und 12 Spleißmutationen (siehe Tab. 6).

Von den 8 Nonsense-Mutationen wurden zwei (Exon 29, heterozygot und Exon 57, homozygot) in nur jeweils einem Patienten identifiziert, eine Mutation lag in drei Patienten heterozygot vor (Exon 42), und eine weitere Mutation (Exon 61) wurde bei einem Geschwisterpaar heterozygot gefunden. Unter den Deletionen befanden sich bei einem Patienten eine heterozygote 1 bp –Deletion (Exon 28), bei zwei Patienten eine 10 bp –Deletion (Exon 59) und bei einem weiteren Patienten mit blutsverwandten Eltern eine homozygote 2 bp –Deletion (Exon 35).

Von den 12 identifizierten Spleißmutationen lag die bereits bekannte Mutation IVS53-2 A→C in drei verschiedenen Patienten jeweils heterozygot vor, so daß insgesamt 10 verschiedene Spleißmutationen identifiziert wurden, von denen 7 zuvor noch nicht beschrieben worden waren. Für alle neu identifizierten Spleißmutationen wurden zunächst die Spleißstellenwertungen mit Hilfe des „splice scoring“-Systems berechnet. Die Penetranz der jeweiligen Mutation bzw. die Wahrscheinlichkeit eines „leaky splicing“ wurde anschließend durch quantitative PCR aus cDNA der entsprechenden AT-

Zelllinien evaluiert. Die Auswirkung der vorliegenden Mutationen auf das resultierende Translationsprodukt wurde durch Western Blotting mit Gesamt-Proteinextrakten überprüft.

Unter den 7 neuen Spleißmutationen betreffen 3 die hochkonservierten Dinukleotidsequenzen, eine weitere genomische Deletion von 18 Nukleotiden zerstört die 5'-Spleißstelle des Exons völlig. Eine Punktmutation verändert die letzte Position des Exons und zwei andere Mutationen liegen weit entfernt von den Spleißstellen der regulären Exon/Intron-Grenzen und resultieren im Spleißen eines zusätzlichen Exons in die kodierende Sequenz des *ATM*-Transkripts.

Alle Spleißmutationen an hochkonservierten Positionen resultierten in aberrantem Spleißen, obwohl nur in einem Fall, IVS53+1G→A ein komplettes Skippen des Exons stattfand. Die Mutation **IVS53+1G→A** lag bei einem Patienten heterozygot vor, die Mutation des zweiten Allels wurde ebenfalls identifiziert: 3802delG. Quantitative PCR zeigte deutlich weniger Transkripte des Allels mit der 1 bp-Deletion, da diese Mutation offenbar bereits auf mRNA-Ebene zu einer starken Destabilisierung des *ATM*-Transkripts führt. Unerwarteterweise war im Western Blot noch etwa 5 % residuales ATM-Protein detektierbar. Da ein Fehlen des Exon 53 den Leserahmen erhält und 38 Aminosäuren im ATM-Protein deletiert, ist dies möglicherweise ein Hinweis darauf, daß Exon 53 nicht unabdingbar für die Faltung des Proteins ist und sein Fehlen das verkürzte Protein nicht völlig destabilisiert. Deletionen, die noch Restprotein zulassen, sind im *ATM*-Gen sehr selten, bisher wurden in diesem Zusammenhang nur zwei Deletion von jeweils 6 und 9 Nukleotiden beschrieben (STANCOVIC et al. 1998), die interessanterweise in den Exons 51 und 54 liegen. Möglicherweise haben Aminosäuredeletionen in diesem Bereich eine weniger fatale Auswirkung auf die Faltung und Stabilität des ATM-Proteins.

Im Rahmen dieser Spekulation sei hier eine weitere Spleißmutation in Exon 54 erwähnt: in Zellen eines Patienten, der homozygot für die Mutation 7788G→A (letzte Position in Exon 54) ist, wurde trotz voller Penetranz der Mutation noch 15 – 20 % residuales ATM-Protein nachgewiesen (Dr. Thilo Dörk, persönliche Mitteilung), so daß davon ausgegangen werden kann, daß eine Deletion von Exon 54 ebenfalls mildere Auswirkungen auf die Proteinstabilität hat. Interessanterweise sind Zellen dieses Patienten nicht in der Lage, als Antwort auf ionisierende Strahlen p53 zu phosphorylieren, was einen Defekt der Kinaseaktivität nahelegt.

Die beiden anderen klassischen Spleißmutationen **IVS16-1G→C** und **IVS23-2A→G** aktivierten ausschließlich alternative Spleißstellen, deren Verwendung in der Deletion der ersten 19 Nukleotide von Exon 17 bzw. in der Insertion 14 intronischer Nukleotide zwischen die Exons 23 und 24 resultierte und eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge hatet. In beiden Fällen wies die alternativ verwendete Spleißstelle keinen wesentlich niedrigeren Wert auf, als die in gesunden Zellen genutzte: die Wertungen von Wildtyp-SS/alternativer SS betragen 74.7/73.8 bzw. 88.2/81.6, respektive. Ein Wertungsunterschied von 0,9 Punkten im Fall der Mutation IVS16-1G→C erscheint

extrem gering und würde die Vermutung nahelegen, daß dieses Exon häufiger von alternativem Spleißen betroffen ist. Tatsächlich wurden von TERAOKA et al. (1999) im *ATM*-Gen gesunder Kontrollzellen ganze oder partielle Deletionen einiger Exons ohne zugrundeliegende Mutation beschrieben, darunter auch die Deletion der ersten 19 Nukleotide des Exons 17.

Eine völlige Deletion der 5'-Spleißstelle auf genomischer Ebene lag bei der Mutation **23526-223547 del 18 nt** an der Grenze von Exon7 / Intron 7 vor. Da für die 5'-Spleißstelle von Exon 7 offenbar keine alternative Spleißstelle zur Verfügung steht und die Mutation volle Penetranz besitzt, resultiert sie in der vollständigen Deletion von Exon 7. Obwohl diese Mutation das ATM-Protein lediglich um 55 Aminosäuren trunkieren würde, war im Western Blot keine ATM-Bande erkennbar. Im Gegensatz zu einer Deletion im Bereich der Exons 51 - 54 mag das Fehlen von Aminosäuren im N-terminalen ATM-Bereich schwerwiegendere Auswirkungen auf die Stabilität des Proteins haben.

Die einzige Spleißmutation, die sich nicht an einer hochkonservierten Position innerhalb der Konsensussequenzen befand, betrifft die letzte Nukleotidposition im Exon 44: **6198G→C** und läßt keinerlei „leaky splicing“ zu. Obwohl diese Position nicht so hochkonserviert ist, wie die beiden Dinukleotidsequenzen, wird sie im Scoring System von Sharpiro und Senapathy mit immerhin 78 von 100 Punkten bewertet und hat somit – nach Position +5 (G) mit 84 von 100 Punkten – innerhalb der 5'-Spleißstelle den zweithöchsten Rang unter den weniger konservierten Positionen. Die Erniedrigung des 5'-Spleißstellenwertes ist entsprechend gravierend und läßt für Mutationen an der letzten Exonposition generell eine hohe Penetranz vermuten. Gestützt wird dieser These auch durch die Ergebnisse von TERAOKA et al. (1999). Sie konnten für die Mutation 3576G→A (Exon 26) an Zellen eines homozygot betroffenen AT-Patienten zeigen, daß alle mRNA-Transkripte die Exondeletion tragen und keinerlei „leaky splicing“ auftritt. Obwohl die Deletion von Exon 26 das Leseraster erhält und das Translationsprodukt um 58 Aminosäuren verkürzt, konnte in deren Arbeit kein ATM-Protein im Western Blot nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Mutation 6198 G→C in Exon 44 erzielt, dessen Deletion allerdings eine Leserasterverschiebung zur Folge hat und entsprechend kein residuales ATM-Protein zuläßt.

Die beiden ungewöhnlichsten Spleißmutationen betrafen Positionen, die weit von den Spleißstellen der regulären Exons entfernt liegen: **IVS15-913A→G** und **IVS19-384A→G**. Es handelt sich hierbei um Punktmutationen, die kryptische 5'-Spleißstellen aktivieren und zur Insertion intronischer Sequenz als zusätzliches „Pseudo“-Exon in die kodierende Sequenz des *ATM*-Transkriptes führen. Die Position IVS15-913 G wird dabei zur letzten Nukleotidposition des Pseudoexons 15*, während Position IVS19-384 G auf cDNA-Ebene der Position Exon19* +1 entspricht.

Zur Aktivierung solcher kryptischer 5'-Spleißstellen muß zwangsläufig bereits eine relativ hochwertige 3'-Spleiß-Konsensussequenz innerhalb des Introns vorliegen, um die irrtümliche Erkennung der „Pseudo“-Exonsequenz zu ermöglichen. Entsprechend waren die Werte der 3'-Konsensussequenzen für beide Pseudoexons mit 95.5 und 86.1 überdurchschnittlich hoch.

In Hinblick auf die Spleißstellenwertungen der beiden Mutationen war das Ergebnis der quantitativen PCR und der Western Blot-Analyse allerdings unerwartet: für die Mutation IVS15-913A→G, für die höhere Spleißstellenwertungen errechnet wurden, wurde über quantitative PCR des entsprechenden cDNA-Fragments eine verringerte Konzentration des Transkripts mit inseriertem Pseudoexon nachgewiesen, was als Hinweis auf ein „leaky splicing“ des Pseudoexons 15* gedeutet werden kann. Unterstützt wurde diese Schlußfolgerung durch den Nachweis residualen ATM-Proteins (etwa 15 %) im Western Blot. Im Gegensatz hierzu wurde für die zweite Mutation, IVS19-384A→G, kein Hinweis auf unvollständiges Spleißen nach quantitativer PCR gefunden und im Western Blot war entsprechend kein residuales ATM-Protein detektierbar. Dieser Widerspruch zur errechneten Spleißstellenwertung zeigt deutlich, dass das „splice scoring“-System zwar tendenziell zur Evaluierung der Penetranz einer Spleißmutation geeignet ist, jedoch wichtige Faktoren, die auf das Spleißverhalten Einfluß haben, nicht einbezieht.

Eine Vielzahl unterschiedlicher Nukleotidfolgen wie etwa Purin- und AC-reiche Sequenzen innerhalb eines Introns oder Exons fungieren als sogenannte „Spleiß-Enhancer“, die das Spleißen eines Exons unterstützen (HASTINGS et al. 2001, BRUCE und PETERSON 2001). Im umgekehrten Fall können „Spleiß-Silencer“ das Spleißen eines Exons vollständig unterdrücken (LYNCH und WEISS 2001, CHEW et al. 2000). Diese regulatorischen Elemente interagieren mit Teilen des Spleißosoms und haben teilweise ebensoviel Einfluß auf das Spleißverhalten wie die hochkonservierten Nukleotide direkt an den Exon-Grenzen. Auch Mutationen, die keine Enhancer- oder Silencer-Sequenzen betreffen, können Einfluß auf das Spleißverhalten nehmen, indem sie die Sekundärstruktur der mRNA derart verzerren, daß die Formation des Spleißosoms gestört wird. Scheinbare Widersprüche zwischen den errechneten Spleißstellenwerten im *ATM*-Gen und der tatsächlichen Penetranz der jeweiligen Mutationen lassen sich sicherlich auf derartige Einflüsse zurückführen.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit in Zellen von 20 untersuchten AT-Patienten keine Spleißmutationen an schwach konservierten Positionen innerhalb der Spleiß-Konsensussequenzen gefunden. Dennoch erscheinen Spleißmutationen im *ATM*-Gen überdurchschnittlich häufig, obwohl ein Vergleich zwischen verschiedenen Genen problematisch ist. Die Größe des Gens, die Anzahl der Exons sowie die Länge von Exons und Introns haben Einfluß auf die Häufigkeit, mit der Gene von Spleißmutationen betroffen sind. Darüberhinaus spiegeln sowohl die Zahl der bereits identifizierten Mutationen in einem Gen sowie die Methodik, die zur Mutationsanalyse eingesetzt wurde, stets nur einen Teil des gesamten Mutationsspektrums wider. Im *ATM*-Gen wurden bereits über 300 verschiedene Mutationen identifiziert, andere gut charakterisierte Gene sind z.B. *BRCA1* (24 Exons, 5592 nt), *BRCA2* (27 Exons, 10257 nt), *FANCA* (44 Exons, 4364 nt) und das Dystrophin-Gen *DMD* (79 Exons, 11058 nt). Der Anteil der Spleißmutationen in diesen Genen beträgt 8 % bei *BRCA1* (25/306 Mutationen), 3,6 % bei *BRCA2* (5/136 Mutationen), 17 % bei *FANCA* (15/115 Mutationen) und 16 % bei *DMD* (30/185 Mutationen).

Im Rahmen einer Kooperation mit der Medizinischen Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Dr. Thilo Dörk) wurden dort in Zellen mehrerer AT-Patienten verschiedene Spleißmutationen außerhalb der Dinukleotidsequenzen gefunden, darunter IVS21+3A→T, IVS 7+5G→A, IVS10-6G→T sowie IVS7-18del6 und 58164del4 (Dr. Thilo Dörk, persönliche Mitteilung und SOBECK et al., in Vorbereitung). Außer den beiden letztgenannten Läsionen resultieren diese Mutationen mit vollständiger Penetranz in einer Deletion des jeweiligen Exons. Die Mutation IVS7-18del6 betrifft teilweise den Pyrimidintrakt der 3'-Spleißstelle und führt zur Deletion der ersten 22 Nukleotide in Exon 8. Auch diese Deletion wurde von TERAOKA et al. (1999) ohne zugrundeliegende Mutation in Kontrollzellen identifiziert. Die Deletion 58164del4 liegt weit von der Exongrenze entfernt und resultiert in der Insertion intronischer Sequenz zwischen die Exons 20 und 21. Möglicherweise wird durch die Deletion ein intronisches Silencerelement ausgeschaltet, so daß die Erkennung der Pseudo-Exonsequenz nicht mehr unterdrückt werden kann.

Diese Daten entwerfen ein anderes Bild der Labilität des *ATM*-Transkriptes gegenüber weniger konservierten Spleißmutationen und stehen eher im Einklang mit den Ergebnissen, die innerhalb der letzten drei Jahre publiziert wurden (TERAOKA et al. 1999, McCONVILLE et al. 1996, BROEKS et al. 1998). Auch hier wurden überdurchschnittlich viele Spleißmutationen identifiziert, von denen über 50 % nicht die konservierten Dinukleotidsequenzen betreffen und dennoch in den meisten Fällen zu vollständig aberrantem Spleißen führen.

Faßt man alle Daten zusammen, resultieren Veränderungen innerhalb der Spleiß-Konsensussequenzen im *ATM*-Gen, die in anderen Genen möglicherweise toleriert würden, tatsächlich auffallend häufig in aberrantem Spleißen des *ATM*-Transkriptes und in der Folge in einer völligen Destabilisierung des Proteins. In Hinblick auf die zentrale Rolle der ATM-Kinase bei der Erhaltung der genomischen Stabilität einer Zelle mag eine besonders strikte Aussonderung mutierter Proteinmoleküle durchaus sinnvoll erscheinen.

5.2 Suche nach Genen, deren Defekt einen NBS-artigen Phänotyp auslöst

Der zelluläre Phänotyp des Nijmegen Breakage Syndroms ist von dem der Ataxia telangiectasia kaum zu unterscheiden, dennoch sind verschiedene Gene für beide Krankheiten verantwortlich. Ataxia telangiectasia wird durch Mutationen im *ATM*-Gen ausgelöst, dessen Translationsprodukt, die ATM-Kinase, eine übergeordnete Rolle bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur spielt. Im Nijmegen Breakage Syndrom hingegen ist bei über 90 % aller Patienten das *NBS1*-Gen betroffen, dessen Translationsprodukt, NBS1/p95/Nibrin im Komplex mit zwei weiteren Proteinen, MRE11 und RAD50, an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Nach einer DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlen wandern die drei Proteine im Komplex in nukleäre Foci, die als Orte

aktiver DNA-Reparatur interpretiert werden (NELMS et al. 1998). Die Funktionalität des N/M/R-Komplexes ist dabei von einer Phosphorylierung des NBS1-Proteins durch die ATM-Kinase abhängig. Neben klassischen AT- und NBS- Patienten gibt es andere, deren Phänotyp aufgrund geringfügiger Abweichungen vom jeweils typischen klinischen und/oder zellulären Erscheinungsbild als AT- oder NBS-ähnlich bezeichnet wird. Die Identifizierung von Mutationen im *MRE11*-Gen bei Patienten mit AT-ähnlichem Phänotyp (ATLD, AT-like disorder) (STEWART et al. 1999) bestätigt dabei erneut die enge Verbindung zwischen ATM und dem N/M/R-Komplex und legt die Vermutung nahe, daß NBS-ähnliche Syndrome ebenfalls durch Mutationen in solchen Genen ausgelöst werden, deren Proteine in funktionellem Zusammenhang mit dem N/M/R-Komplex stehen.

Der N/M/R-Komplex ist wahrscheinlich in alle bisher bekannten DNA-DSB-Reparatursysteme, „Non-Homologous End-Joining“ (NHEJ) (MOORE und HABER 1996, LEWIS et al. 1999), homologe Rekombination (HR) (BRESSAN et al. 1999), und „Single Strand Annealing“ (SSA) (KARRAN 2000, DE JAGER et al. 2001) involviert. Folglich sind Proteine - bzw. deren Gene - aus allen drei Reparatursystemen potentielle Kandidaten, deren Defekt ein NBS-artiges Syndrom auslösen könnte. Am HR- und SSA-Reparaturweg sind hauptsächlich die Angehörigen der RAD52 Epistasis-Gruppe beteiligt, während NHEJ von den drei Untereinheiten der DNA-abhängigen Proteinkinase, KU70, KU80 und DNA-PKcs sowie dem XRCC4/DNA-Ligase IV-Heterodimer durchgeführt wird. Die Identifizierung von Mutationen im *DNA-Ligase IV*-Gen in zwei Patienten mit NBS-ähnlichem Phänotyp (Dr. Pat Concannon, persönliche Mitteilung) rückt die Proteine des NHEJ-Reparatursystems in den Mittelpunkt des Interesses. Die fünf NBS-ähnlichen Zelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung standen, wurden daher alle auf Defekte in den Genen *NBS1*, *MRE11*, *RAD50*, *DNA-Ligase IV* und *XRCC4* durch direkte Sequenzierung bzw. in den jeweiligen Proteinen durch Western Blotting untersucht. Weitere Mutationsanalysen wurden in Fibroblasten eines Patienten mit verwandten Eltern (Cousins 3. Grades) durchgeführt (Zelllinie NBS05), da hier für das mutierte Gen Homozygotie erwartet werden kann, was bei der Verifizierung „echter“ Mutationen, etwa im Falle einer Aminosäuresubstitution, von Vorteil ist. Die Zelllinie NBS05 wurde daher zusätzlich auf Mutationen in den Genen *KU70* und *KU80* untersucht.

Zusammengefaßt wurde in einer der fünf untersuchten Zelllinien eine homozygote Mutation im *NBS1*-Gen identifiziert. Bei den übrigen vier Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Mutationen in einem der untersuchten Kandidatengene gefunden; allerdings konnten an der Medizinischen Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Dr. Thilo Dörk) in einer unabhängig durchgeführten Mutationsanalyse in der Linie NBS05 Mutationen im *RAD50*-Gen identifiziert werden (siehe unten).

In der Linie NBS04 war im Western Blot kein *NBS1*-Protein nachweisbar, und eine Sequenzierung der *NBS1*-cDNA ergab eine homozygote Deletion von 25 nt in Exon 8, die auch auf genomischer vorliegt. Diese Mutation wurde kurze Zeit später bei einem anderen Patienten identifiziert und näher charakterisiert (MARASCHIO et al. 2001). Im Hinblick auf die Identifizierung alternativer

Translationsmechanismen bei *NBS1*-Transkripten mit der Gründermutation 657del5 wäre eine Analyse dieser Mutation, die ebenfalls homozygot in beiden Patienten vorliegt, bezüglich der potentiellen Verwendung eines alternativen Leserahmens sicherlich besonders interessant.

In den NBS-Linien NBS01, NBS02 und NBS03 wurden in keinem der sequenzierten Kandidatengene Mutationen gefunden. Auch die mit Gesamt-Proteinextrakten durchgeführten Western Blots ergaben normale Konzentrationen der entsprechenden Proteine. Dennoch bleiben die Gene *MRE11*, *RAD50*, *DNA-LigaseIV*, *XRCC4*, *KU70* und *KU80* sicherlich für weitere NBS- oder NBS-ähnliche Zelllinien als Kandidaten interessant. Aufgrund der Tatsache, daß über 90 % der NBS-Patienten Mutationen im *NBS1*-Gen tragen, wurde ursprünglich angenommen, daß die übrigen Patienten allesamt Mutationen in einem zweiten NBS-Gen tragen. Mittlerweile zeichnet sich jedoch ein weiter gefaßtes Spektrum verantwortlicher Gene ab: bei drei NBS-Patienten wurden mittlerweile Mutationen im *DNA-LigaseIV*-Gen identifiziert (Dr. Concannon und Dr. Schindler, pers. Mitteilung) im *RAD50*-Gen wurden bisher Mutationen in nur einer Patientin mit NBS-ähnlichem Phänotyp gefunden (siehe unten und Dr. Thilo Dörk, pers. Mitteilung). Da allein die drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten NBS-Linien NBS01, NBS02 und NBS03 in keinem dieser beiden Gene betroffen sind, besteht durchaus die Möglichkeit, daß mehrere weitere Gene bei einzelnen Patienten für die Ausprägung eines NBS-artigen Phänotyps verantwortlich sind.

In der Linie NBS02 wurden in der Gruppe von Dr. Thilo Dörk zwei Mutationen im *RAD50*-Gen identifiziert (BENDIX et al., in Vorbereitung). Es handelt sich dabei um eine Nonsense-Mutation und einen Basenaustausch, der das natürliche Stopkodon des Gens zerstört. Die 3'-UTR des *RAD50*-Gens besitzt zwei alternative Polyadenylierungssignale und ermöglicht daher zwei unterschiedlich lange Primärtranskripte. Die längere, seltenere Transkriptvariante enthält ein alternatives Stopkodon, was bei der NBS05-Linie in einer Verlängerung der translatierten Sequenz um 66 Aminosäuren resultiert. Aus Western Blot-Analysen geht außerdem hervor, daß die Zellen zusätzlich noch RAD50-Proteine normaler Länge aufweisen. Verantwortlich hierfür könnte die Unterdrückung der Nonsense-Mutation durch eine zelleigene Suppressor-tRNA sein; alternativ besitzt die Mutation des eigentlichen Stopcodons möglicherweise keine völlige Penetranz und erlaubt mit Hilfe des eigentlichen Polyadenylierungssignals in geringem Maße noch eine korrekte Termination der Translation (Dr. Thilo Dörk, pers. Mitteilung).

Da Knockout-Mäuse mit *NBS1*-, *MRE11*- oder *RAD50*- Defizienz nicht lebensfähig sind und bereits im frühen Embryonalstadium absterben, ist eine bestimmte Mindestkonzentration an residualem *RAD50*-Protein vermutlich auch beim Menschen lebensnotwendig. In diesem Zusammenhang war für die NBS05-Zelllinie das Verhalten der anderen beiden Komplexpartner des *RAD50*-Proteins, *NBS1* und *MRE11* in Bezug auf ihre Lokalisierung und Fähigkeit zur Focibildung von besonderem Interesse. In Zellen klassischer NBS-Patienten, in denen durch Western Blot oder Immunfluoreszenz kein *NBS1*-Protein mehr nachgewiesen werden konnte, wurde für *MRE11* und *RAD50* zunächst eine

ausschließlich zytoplasmatische Lokalisierung ohne induzierbare Focibildung beschrieben (MASER et al. 1997, CARNEY et al. 1998). Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, daß die sogenannte Gründermutation im *NBS1*-Gen, 657del5, die in über 90 % aller NBS-Patienten homozygot vorliegt, die Expression einer varianten Form des NBS1-Proteins erlaubt (MASER et al. 2001): Die 5 bp-Deletion resultiert dabei in einer Leserahmenverschiebung, welche die Nutzung eines alternativen Startkodons ermöglicht, so daß folglich zwei kleinere Fragmente des NBS1-Proteins translatiert werden. Das kürzere Fragment, NBS1p26, entspricht der kodierenden *NBS1*-Sequenz vor der Deletionsstelle, während das längere Fragment, NBS1p70, der Sequenz nach der Deletionsstelle entspricht und einen veränderten N-Terminus trägt.

Die Autoren beschreiben ferner für NBS-Zellen mit Gründermutation eine hauptsächlich nukleäre Lokalisierung des NBS1p70-Fragmentes sowie eine partiell nukleäre Lokalisierung des MRE11-Proteins (ca 50 %), während in Zellen von NBS-Patienten mit anderen Mutationen im *NBS1*-Gen keinerlei NBS1-Färbung sowie ausschließlich zytoplasmatische MRE11- und RAD50-Lokalisationen beobachtet werden (wobei sich aufgrund der Häufigkeit der 657del5-Mutation die Frage aufdrängt, mit welchen Zellen wohl die Immunfluoreszenzfärbungen von MRE11 und RAD50 für die Veröffentlichung 1998 durchgeführt wurden...?).

Aufgrund der Lethalität einer NBS1-Defizienz bei Mausembryonen wären allerdings für die anderen *NBS1*-Mutationen ebenfalls Mechanismen zu erwarten, die eine partielle Restfunktion des trunkierten Translationsproduktes zulassen. Derart hypomorphe Effekte wurden auch im Falle der *MRE11*-Mutationen in zwei Familien mit ATLD-Syndrom (STEWART et al. 1999) beobachtet, wobei die zelluläre Verteilung von MRE11 und NBS1 wiederum als diffus und größtenteils zytoplasmatisch beschrieben wird. Auch in Zellen von ATLD-Patienten wird keine Focibildung nach DNA-Schädigung beobachtet.

In der RAD50-defizienten NBS05-Zelllinie konnte – wie nach dem Western Blot erwartet - durch Immunfluoreszenzfärbung kein RAD50-Protein detektiert werden. Die Lokalisierung des NBS1-Proteins war überwiegend nukleär, während sich MRE11 zu etwa gleichen Anteilen in Zytoplasma und Kern befand. Beide Proteine waren nicht mehr zur Focibildung nach DNA-Schädigung imstande.

Die Verteilung der drei Proteine in Zellen mit NBS-, RAD50- oder MRE11-Defizienz deutet auf eine partielle gegenseitige Abhängigkeit in Bezug auf ihre Lokalisierung hin: MRE11 ist notwendig für die Kernlokalisierung von NBS1, RAD50 hingegen nicht. MRE11 braucht seine beiden Komplexpartner, um vollständig in den Kern zu gelangen, fehlt eines der beiden anderen Proteine, liegt die nukleäre Lokalisierung von MRE11 bei nur 50 %. In Bezug auf die zelluläre RAD50-Lokalisierung wurden mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzfärbungen stark erniedrigte RAD50-Konzentrationen in NBS-Linien ermittelt, allerdings wurden hierfür stets Zellen mit der Gründermutation 657del5 verwendet, so daß die Resultate scheinbar nicht mit den Ergebnissen von CARNEY et al. (1998) verglichen werden können. STEWART et al. (1999) zeigten, daß in Zellen eines ATLD-Patienten mit ausschließlich trunkiert vorliegendem MRE11 ebenfalls kein RAD50-

Protein mehr nachweisbar ist, so daß die Stabilität von RAD50 möglicherweise durch die Bindung an MRE11 und/oder NBS1 deutlich erhöht wird.

Die Identifizierung von Defekten in allen drei Proteinen des N/M/R-Komplexes führt gleichzeitig die enge Kopplung der beiden Krankheiten AT und NBS vor Augen, macht allerdings auch klar, daß die einzelnen Proteine durchaus unterschiedliche Aufgaben innerhalb der Zellen erfüllen müssen. Mutationen in *ATM* und *MRE11* resultieren in einem AT- oder AT-ähnlichen Phänotyp, während Mutationen in *NBS1* oder *RAD50* für NBS bzw. ein NBS-ähnliches Syndrom verantwortlich sind, was für NBS1 und RAD50 etwa eine von MRE11 und ATM verschiedene Aufgabe während der neuronalen Entwicklung widerspiegelt.

Mutationen in einem der drei Gene *NBS1*, *MRE11* oder *RAD50* dürfen dabei vermutlich nicht zu einer völligen Destabilisierung des Proteins führen, um nicht bereits im Mutterleib lethale Auswirkungen auf die Entwicklung des Embryos zu haben.

Die unerwartete Tatsache, daß bei drei wichtigen Angehörigen der DNA-Reparaturmaschinerie hypomorphe Effekte einen anderweitig fatalen Gendefekt derart abschwächen können, zeigt die Notwendigkeit, auch solche Gene in die Liste der Kandidaten aufzunehmen, deren Störung sich im Knockout-Tiermodell als lethal erwiesen hat.

5.3 Besteht eine Verbindung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie?

FA-Zellen zeichnen sich insbesondere durch hohe chromosomale Bruchraten und Hypersensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien wie MMC oder Cisplatin aus, die Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen („interstrand cross links“, ICLs) induzieren. Zur Behebung von ICLs stehen einer Zelle mehrere Reparatursysteme wie NER (Nucleotide excision repair) oder HRR (Reparatur via homologe Rekombination) zur Verfügung (McHUGH et al. 2000, DRONKERT und KANAAR 2001). Dem gegenwärtigen Modell zufolge verläuft die ICL-Reparatur über die Induktion eines DNA-Doppelstrangbruches im Bereich der Quervernetzung, woran möglicherweise die ERCC1/XPF-Endonuklease des NER-Weges beteiligt ist. An der Reparatur von DSBs sind in humanen Zellen Homologe der Rad52-Epistasisgruppe aus *S. cerevisiae*, RAD51 und RAD52 sowie RPA, BRCA1 und BRCA2 aktiv beteiligt. Nach einer Generierung überhängender DNA-Einzelstränge zu beiden Seiten der Bruchstelle wird das RAD51-Protein von RAD52 an die ssDNA rekrutiert und vermittelt anschließend zusammen mit RPA die Invasion des homologen Schwesterchromatids zur Initiation der DNA-Neusynthese.

Eine Reihe von Proteinen weist schwache Homologien (~ 30 %) zu RAD51 auf und wird daher der sogenannten RAD51-Familie zugeordnet. Bisher konnten in menschlichen Zellen fünf RAD51-ähnliche Proteine, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 identifiziert werden. Verschiedene Studien in *S. cerevisiae* und humanen Zellen konnten zeigen, daß die Proteine der

RAD51-Familie direkt miteinander interagieren und vermutlich als Komplex in homologe Rekombinationsmechanismen während der Meiose und der Reparatur von DNA-DSBs involviert sind (DOSANJH et al. 1998, SCHILD et al. 2000, BRAYBROOKE et al. 2000, MASSON et al. 2001). Ähnlich FA-Zellen zeigen Knockout-Hühnerzellen aller RAD51-Homologe hohe chromosomale Bruchraten und sind extrem sensitiv gegenüber ICL-induzierenden Agenzien wie MMC oder DEB, während die IR-Sensitivität nur mäßig ausgeprägt ist. Ferner ist die Focibildung des RAD51-Proteins nach DNA-Schädigung in Knockout-Zellen stark oder völlig reduziert (TAKATA et al. 2001).

Die Gemeinsamkeit des zellulären Phänotyps wirft die Frage auf, ob der Reparaturweg der FA-Proteine möglicherweise in funktionellem Zusammenhang mit dem der homologen Rekombinations-Reparatur steht. Um potentielle Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und den RAD51-Homologen zu untersuchen, wurde daher ein „Interaction Trap“ mit den FA-Proteinen FANCA, FANCC und FANCG sowie den Angehörigen der RAD51-Familie, RAD51(A), RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 mit Hilfe des „Yeast Two Hybrid“-Systems (Y2H) durchgeführt.

Das Y2H-System basiert im Prinzip auf der Expression zweier Proteine als Fusionskonstrukte mit verschiedenen Domänen in derselben Hefezelle. Die Fusionspartner sind dabei eine DNA-bindende Domäne, LexA (Köderprotein) und eine transkriptionsaktivierende Domäne, B42 (Beuteprotein). Falls in der Hefezelle eine Interaktion zwischen zwei Proteinen stattfindet, kommen die fusionierten Domänen in engen räumlichen Kontakt zueinander und ermöglichen gemeinsam die Transkription sogenannter Reportergene, deren Expression anhand des Wachstums der Hefen auf bestimmten Mangelmedien oder anhand der Färbung des jeweiligen Hefestammes nachgewiesen werden kann.

Um die Stärke möglicher Interaktionen besonders gut dokumentieren zu können, wurden die FA-Proteine und die RAD51-Familie sowohl als Köder in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne LexA als auch als Beute in Fusion mit der transkriptionsaktivierenden Domäne B42 eingesetzt. Darüberhinaus wurden zur Selektion im „Interaction Trap“ zwei verschiedene Reportergene, LEU2 (Wachstumsselektion) und lacZ (Selektion auf Blaufärbung) sowie die gleichzeitige Kombination beider Systemen verwendet. Alle verwendeten FA-Plasmide wurden dabei freundlicherweise von Dr. Tanja Reuter zur Verfügung gestellt.

Vor dem eigentlichen „Interaction Trap“ müssen LexA-Fusionskonstrukte auf ihre Fähigkeit zur eigenständigen Transkriptionsaktivierung („Selbstaktivierung“) getestet werden. Besitzt ein LexA-Fusionsprotein derartige Eigenschaften, kann es auch ohne Interaktionspartner die Transkription der Reportergene induzieren und ist als Köder nicht für den „Interaction Trap“ geeignet. Eine Transkriptionsaktivierung kann auch aufgrund gehäufte Ladungen und amphipatischer Strukturen eines Proteins erfolgen (FINLEY und BRENT 1996). Der Selbstaktivierungstest wurde nur für die RAD51-Familienmitglieder durchgeführt, da die Ergebnisse für die FA-Fusionsproteine LexA-FANCA, LexA-FANCC und LexA-FANCG bereits aus der Dissertationsarbeit von Tanja Reuter vorlagen (REUTER 2000).

Im Selbstaktivierungstest (4.3.1.2) zeigten die LexA-Fusionskonstrukte mit RAD51A, RAD51B und RAD51C sowie XRCC2 und XRCC3 keinerlei transaktivierenden Eigenschaften und sind daher als Köderproteine für den „Interaction Trap“ geeignet. RAD51D war dagegen in der Lage, beide Reportersysteme zu induzieren, die Expression des LEU2-Gens sehr stark, die Expression des lacZ-Reporters wesentlich schwächer. BRAYBROOKE et al. (2000) zeigten, dass RAD51D an einzelsträngige DNA bindet (siehe unten) und eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität besitzt, die bereits mehrfach bei Proteinen mit transkriptionsaktivierender Eigenschaft, wie etwa den Angehörigen der SNF/SWI-Familie, die als globale Transkriptionsaktivatoren bekannt sind, nachgewiesen werden konnte. RAD51D ist daher möglicherweise in die transkriptionelle Regulierung anderer Gene involviert. In Bezug auf den „Interaction Trap“ konnte LexA-RAD51D aufgrund seiner transaktivierenden Eigenschaft nicht auf eine Aktivierung des LEU2-Reporters und nur bedingt auf Induktion der lacZ-Expression getestet werden.

Um vor dem „Interaction Trap“ die Expression und Funktionalität der RAD51-Homologe in den Hefezellen zu überprüfen, wurden verschiedene Kombinationen von Köder- und Beuteproteinen der RAD51-Familie in jeweils beiden Orientierungen auf Aktivierung des lacZ-Reporters getestet. In Anlehnung an die bisher bekannten Interaktionen sowie das Modell zur Komplexbildung der RAD51-Familie (DOSANJH et al. 1998, BRAYBROOKE et al. 2000, SCHILD et al. 2000) wurden die Kombinationen XRCC2 und RAD51D, XRCC3 und RAD51C, XRCC3 und RAD51A sowie RAD51B und RAD51C auf Interaktionen getestet. Darüberhinaus wurden als Negativkontrollen XRCC2 und RAD51C sowie RAD51B und RAD51D kombiniert, für die nach dem Komplexmodell keine Interaktion zu erwarten war.

Bis auf eine Ausnahme zeigten alle Positivkontrollen reproduzierbar eine sehr deutliche Aktivierung des lacZ-Reporters. Die Kombination aus LexA-Rad51A und B42-XRCC3 resultierte dagegen nur in einem von drei Experimenten in einer Blaufärbung der Hefezellen, während in umgekehrter Orientierung mit LexA-XRCC3 und B42-RAD51A stets eine starke Interaktion nachweisbar war. SCHILD et al. (2000) beschreiben das gleiche Phänomen für die Kombination aus RAD51A und XRCC3 sowie RAD51C und XRCC3 als „asymmetrische Interaktion“ und führen diese auf sterische Wechselwirkungen des jeweiligen LexA-Fusionsproteins mit der DNA-Bindedomäne zurück.

Unter den als Negativkontrollen verwendeten Kombinationen zeigten XRCC2 und RAD51C wie erwartet keinerlei Interaktion, während die Ko-Transformation von LexA-RAD51B und B42-RAD51D in einer mittelstarken Aktivierung des lacZ-Reporters resultierte. Auf der Kontrollplatte, GluHUTX war keine Blaufärbung der Hefekolonien erkennbar, so daß die Interaktion zunächst scheinbar als echt positiv eingestuft werden konnte. Allerdings kann sich das humane RAD51D-Protein im Gegensatz zu den übrigen RAD51-Familienmitgliedern ohne weiteren Bindungspartner an einzelsträngige DNA anlagern (BRAYBROOKE et al. 2000), so daß es möglicherweise auch in Fusion mit der transkriptionsaktivierenden Domäne B42 zur eigenständigen Aktivierung der Reportergene imstande ist. Dies würde auch die fehlende Blaufärbung der Hefen auf glucosehaltigem

Medium (GluHUTX) erklären, da die Expression des B42-Beuteplasmids erst auf galaktosehaltigem Medium (GalHUTX) induziert wird.

Der „Interaction Trap“ wurde mit den FA-Proteinen FANCA und FANCC als LexA- und B42-Fusionskonstrukte durchgeführt, FANCG konnte aufgrund seiner stark transaktivierenden Eigenschaft nur als B42-Fusionsprotein eingesetzt werden. Aus der humanen RAD51-Familie wurden alle sechs Mitglieder, RAD51A-D, XRCC2 und XRCC3 als LexA- und B42-Fusionskonstrukte verwendet.

FANCA in der Köderposition zeigte Interaktionen mit den Beuteproteinen RAD51A, RAD51B und RAD51D in allen drei Testsystemen: Aktivierung des LEU2- und des lacZ-Reporters sowie gleichzeitige Aktivierung beider Systeme. Diese Ergebnisse waren in jeweils fünf unabhängig durchgeführten Experimenten überwiegend konsistent. Es sei an dieser Stelle allerdings erwähnt, daß in einem von fünf unabhängig durchgeführten Experimenten die Kombination LexA-RAD51A und B42-FANCA keine Aktivierung des Reportergens erbrachte. Da RAD51A in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne auch in anderen „Yeast Two Hybrid“-Systemen mangelnde Konsistenz zeigt (SCHILD et al. 2000), kann dieses einmalige Ergebnis als „falsch-negativ“ eingestuft werden.

In umgekehrter Orientierung der Fusionsproteine mit FANCA in der Beuteposition ließen sich die Interaktionen mit RAD51A, RAD51B und RAD51D nur anhand der Aktivierung der lacZ-Expression nachweisen, der LEU2-Reporter wurde nicht aktiviert.

Darüberhinaus wurden weitere Interaktionen zwischen FANCA und XRCC2 bzw. FANCA und XRCC3 mit Hilfe des LEU2-Reporters detektiert, die allerdings ebenfalls asymmetrisch waren, d.h. nur mit FANCA in der Köderposition beobachtet werden konnten.

LexA-FANCC zeigte nur in einem von jeweils fünf „Interaction Trap“-Experimenten in der Kombination mit B42-RAD51A eine sehr starke Aktivierung des lacZ-Reporters. Diese Interaktion konnte jedoch nur in einem von fünf unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden und war in umgekehrter Orientierung mit RAD51A als Köderprotein nicht zu bestätigen. Ebenso konnte unter Verwendung des LEU2-Reportersystems keine Interaktion zwischen FANCC und RAD51A detektiert werden.

FANCG, das aufgrund seiner transaktivierenden Eigenschaften nur als Beuteprotein verwendet wurde, interagierte im „Interaction Trap“ unter Verwendung des lacZ-Reporters schwach bis sehr stark mit allen Mitgliedern der RAD51-Familie. Besonders starke Interaktionen wurden dabei in der Kombination aus FANCG mit RAD51B, RAD51C und XRCC3 beobachtet, während die Interaktionen mit den übrigen Familienmitgliedern RAD51A, RAD51D und XRCC2 schwächer ausfielen. Die im lacZ-System stärksten Interaktionen ließen sich mit Hilfe des LEU2-Reporters bestätigen: ein Wachstum der Hefezellen war nur mit den Kombinationen aus FANCG mit RAD51B und RAD51C zu beobachten.

Zusammengefaßt wurden im „Interaction Trap“ vielfältige Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und den Mitgliedern der RAD51-Familie nachgewiesen, allerdings konnte eine Aktivierung der

Reportersysteme häufig nach wechselseitigem Austausch der Fusionsdomänen in der umgekehrten Orientierung nicht bestätigt werden. Besonders auffällig war die Tatsache, daß die Stärke der Interaktionen in den seltensten Fällen von einem Reportersystem auf das andere übertragbar war, häufig wurden Interaktionen in nur einem der beiden Reportersysteme, LEU2 oder lacZ identifiziert. Im Allgemeinen wird dem LEU2-Reportersystem eine höhere Sensitivität zugeschrieben, als dem des lacZ-Reporters (BRENT und FINLEY, 1997). Das in dieser Arbeit verwendete lacZ-Plasmid pSH18-34 besitzt zur Expression des β -Galaktosidasegens allerdings acht Operatorkopien, während dem endogen exprimierten LEU2-Reportergen nur sechs Operatorkopien vorangestellt sind (Manual Matchmaker von CLONTECH), so daß allein aufgrund der Zahl der Operatorsequenzen eine höhere Sensitivität des lacZ-Reporters zu erwarten wäre. In Übereinstimmung hiermit wurden im Rahmen dieser Arbeit wesentlich mehr Interaktionen mit Hilfe des lacZ-Reportersystems identifiziert (vgl. Tabellen 13a und 13b).

Die Tatsache, daß Interaktionen nur mit Hilfe eines der verwendeten Reportersysteme gefunden werden, oder daß die Stärke einer Interaktion zwischen beiden Systemen nicht zwingend übertragbar sein muß, ist generell einer der Schwachpunkte der RAD51-Familie im „Yeast Two Hybrid“-System (DOSANJH et al. 1998, SCHILD et al. 2000), wobei asymmetrische Interaktionen auf störende Wechselwirkungen zwischen der DNA-bindenden Domäne und dem jeweiligen Fusionspartner zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den FA-Proteinen, die – abgesehen von FANCD2 – keine Ähnlichkeiten zu Proteinen in der Hefe haben, ist das humane RAD51A mit 70 % Identität zum Rad51-Protein der Hefe relativ hoch konserviert. Die übrigen RAD51-Familienmitglieder sind bisher nur aus Säugerzellen bekannt und besitzen zu RAD51A eine durchschnittliche Ähnlichkeit von etwa 30 %. Die RAD51-Homologe in der Hefe, Rad55, Rad57, Rad52 und Rad54 besitzen ihrerseits ebenfalls Ähnlichkeit zu ihren funktionellen Homologen in humanen Zellen. Unter diesen Voraussetzungen ist eine störende Interferenz Hefe-eigener Verwandter der RAD51-Familie im „Interaction Trap“ zwischen FA-Proteinen und humanen RAD51-Homologen durchaus denkbar. Im Test auf transaktivierende Eigenschaften unter den Mitgliedern der RAD51-Familie wurde nur für RAD51D die Fähigkeit zur Selbstaktivierung beobachtet. Dagegen zeigte sich im Funktionalitätstest der RAD51-Familie auch bei LexA-RAD51B, LexA-XRCC2 und LexA-XRCC3 eine Aktivierung der Reportergene auf glucosehaltigen Medien, obwohl die Expression des Beuteplasmids durch Glucose reprimiert wird. In den nachfolgenden „Interaction Trap“-Experimenten mit den LexA-Fusionen von RAD51B, XRCC2 und XRCC3 wurden derart transaktivierende Eigenschaften jedoch nie gesehen, so daß entweder die Expression des Beuteplasmids auf glucosehaltigem Medium nicht völlig reprimiert war, oder – rein spekulativ – eine gegenseitige Expressionskontrolle der humanen RAD51-Familienmitglieder nicht ausgeschlossen werden kann.

Trotz widersprüchlicher Ergebnisse deutet die Fülle der verschiedenen Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie im „Yeast Two Hybrid“-System auf eine tatsächlich

existierende Verbindung zwischen beiden Gruppen hin. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde daher versucht, direkte physikalische und/oder funktionelle Verbindungen durch Ko-Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenzanalysen nachzuweisen.

Da weder für die FA-Proteine FANCA, FANCC und FANCG noch für die RAD51-Familienmitglieder RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 Antikörper zur Verfügung standen, wurden die entsprechenden cDNAs in sogenannte „Mammalian Tag Expression Vectors“ (pCMV2 und pCMV3, STRATAGENE) umklontiert, die eine Überexpression der Gene in N-terminaler Fusion mit einem c-myc- oder FLAG-Tag in Säugerzellen ermöglichen. Als humane Zelllinie wurden HEK293- (Human Embryonic Kidney) Zellen verwendet, in denen die Expressionsrate der pCMV-Plasmide zusammen mit der von COS-7 Zellen (*Cercopithecus aethiops*) am höchsten ausfiel. Testtransfektionen mit einem GFP-Vektor (GFP, Green Fluorescent Protein) ergaben eine Expressionsrate von 50 %. Da GFP keine Toxizität gegenüber HEK293 Zellen aufweist, kann hier die Transfektionsrate der Expressionsrate gleichgesetzt werden. Unter den übrigen transfizierten Plasmiden war die Expressionsrate sehr unterschiedlich, sie reichte bei den FA-Proteinen von 20 % - 35 %.

Für die FA-Proteine FANCA, FANCC und FANCG liegen keine Daten über mögliche toxische Auswirkungen einer Überexpression vor, allerdings hängt die zelluläre Lokalisation von FANCA-Fusionskonstrukten von Position und Typ des Fusionspartners ab. Während KRUYT und YOUSSEFFIAN (1998) für FANCA-GFP eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisierung zeigten, wurde in dieser Arbeit das Fusionskonstrukt FLAG-FANCA überwiegend im Kern nachgewiesen, was sowohl den Resultaten aus Studien mit GFP-FANCA Konstrukten (WALSH et al. 1999) entspricht als auch durch direkten Nachweis mit FANCA-spezifischen Antikörpern beschrieben ist (NAF et al. 1998, LIGHTFOOT et al. 1999). Die Lokalisation von FANCC wurde lange widersprüchlich diskutiert; einige Arbeitsgruppen beschrieben FANCC als ausschließlich oder mindestens zu 50 % zytoplasmatisch (YOUSSEFFIAN 1994, YOUSSEFFIAN 1996, HOATLIN et al. 1998, 1999; KRUYT et al. 1998), während andere eine überwiegend nukleäre Lokalisation postulierten (NAF et al. 1998, GARCIA-HIGUERA und D'ANDREA 1999). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Fusionskonstrukt FLAG-FANCC zeigte ein breites Spektrum zellulärer Verteilung, von fast ausschließlich zytoplasmatischer bis hin zu völlig nukleärer Lokalisierung. Dabei lag das Verhältnis von Kern- zu Zytoplasmafärbung am häufigsten bei etwa 70 % zu 30 %. In Übereinstimmung mit der Literatur (KUANG et al. 2000, Garcia Higuera 1999) zeigte FANCG - unabhängig von der Art des N-terminalen Fusionspartners, FLAG oder c-myc - zumeist eine vorwiegend intranukleäre Verteilung.

Die Expressionsraten der RAD51-Fusionsproteine reichten von 2 % (XRCC2) bzw. 4 % (RAD51C) bis etwa 40 % (RAD51A). Auch für die Mitglieder der RAD51-Familie liegen keine Aussagen über eventuelle Toxizität durch eine erhöhte Expression vor; Studien an Hühnerzelllinien (DT40)

zufolge, bei denen die Gene für RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 oder XRCC3 ausgeschaltet worden waren, können entsprechende „Knockout“-Zellen durch Überexpression der jeweiligen cDNA komplementiert werden (TAKATA et al. 2000, TAKATA et al. 2001). Die Überexpression von RAD51A resultiert zwar aufgrund dessen Fähigkeit zur Selbstassoziation in einer inhomogenen Verteilung innerhalb des Nukleus, visualisiert als „strichelförmige“ Verteilung, hat aber dennoch keine toxischen Auswirkungen auf die Zelle (Dr. Thomas Haaf, persönliche Mitteilung).

Für den extrem niedrigen Prozentsatz an HEK293-Zellen, die nachweisbar c-myc-XRCC2 oder c-myc-RAD51C exprimierten (2-4 %), könnte dennoch die Toxizität hoher XRCC2- und RAD51C-verantwortlich sein, da in gesunden Zellen eine Überexpression der cDNAs die Proteinkonzentration innerhalb der Zelle noch stärker erhöht. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die N-terminale Fusion des c-myc-Tag in beiden Fällen eine korrekte Faltung der Aminosäurekette verhinderte und somit zur Destabilisierung des Fusionsproteins beitrug.

Unter den Mitgliedern der RAD51-Familie ist die zelluläre Lokalisation gegenwärtig nur bei RAD51A (HAAF et al. 1995, LI et al. 1997, TASHIRO et al. 2000) und XRCC2 (O'REGAN, 2001) beschrieben: beide sind ausschließlich auf den Zellkern beschränkt, dabei ist RAD51A in manchen Zellen in sogenannte nukleäre Foci konzentriert (je nach Zelltyp zwischen 1 und 23 %), deren Anzahl nach DNA-Schädigung deutlich ansteigt (HAAF et al. 1995, RADERSCHELL et al. 1999). Interessanterweise wurde die Lokalisation des XRCC2 durch Überexpression in C-terminaler Fusion mit GFP nachgewiesen, was als Hinweis auf Expressionsschwierigkeiten in N-terminaler Fusion gedeutet werden könnte (siehe oben). Auch die übrigen RAD51-Familienmitglieder wiesen eine primär nukleäre Verteilung auf, wobei der prozentuale Anteil der Kernfärbungen für RAD51B und RAD51D stets etwas niedriger lag, als bei den übrigen RAD51-Homologen.

Das humane RAD51A-Protein wandert – wie viele Angehörige des HR oder SSA Reparaturweges, z.B. RAD52, RAD54, etc. – nach DNA-Schädigung durch IR oder MMC in nukleäre Foci (HAAF et al. 1995, RADERSCHELL et al. 1999, TASHIRO et al. 2000), die gegenwärtig als Orte aktiver DNA-Reparatur interpretiert werden (TOMILIN et al. 2001, NELMS et al. 1998). Um die FA-Proteine und die RAD51-Proteine auf ihre Fähigkeit zur Focibildung zu testen, wurden transfizierte HEK293-Zellen für 1 h mit 500 ng/ml MMC behandelt und nach weiteren 12 – 16 Stunden präpariert. Etwa 35 – 40 % der HEK293-Zellen zeigten RAD51A-Focibildung nach MMC-Behandlung, unabhängig davon, ob RAD51A endogen oder in Überexpression nachgewiesen wurde. Interessanterweise kann man in überexprimierenden Zellen neben einer homogenen nukleären Verteilung von RAD51A auch häufig eine strichelförmige Kernfärbung beobachten. Da RAD51A zur Selbstassoziation imstande ist, kann man die gestrichelte Strukturierung im Kern auf eine Polymerisierung der in hoher Konzentration vorliegenden RAD51A-Proteine zurückführen (DONOVAN et al. 1994; Thomas Haaf, persönliche Mitteilung), die sich nach DNA-Schädigung in solchen Zellen mit Focibildung überwiegend auflöst.

Die übrigen Mitglieder der RAD51-Familie, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 zeigten unabhängig von DNA-Schädigung keine signifikante Foci-Bildung. RAD51B und RAD51D waren in einigen Zellkernen unabhängig von einer vorherigen DNA-Schädigung in fociartige Regionen konzentriert, allerdings lag der Anteil solcher Kerne stets unter 5 %. Da bei Immunfluoreszenzfärbungen im Verlauf der Zellpräparation auch bei Proteinen, die obligat keine Focibildner sind, artifizielle Strukturen entstehen können, die echten Foci täuschend ähneln, muß im Fall der RAD51B- und RAD51D-Foci die Möglichkeit der Artefaktfärbung in Betracht gezogen werden, obwohl bei parallel durchgeführten Färbungen stets nur in Zellen mit RAD51B- oder Rad51D-Expression Foci sichtbar waren. Sicherlich besteht bei jedweder Überexpression stets das Risiko, daß sich das jeweilige Protein bezüglich seiner Lokalisierung und Verteilung innerhalb der Zelle untypisch verhält, insbesondere wenn seine Expression unter natürlichen Umständen einer strengen Regulation unterworfen sein sollte.

Die FA-Proteine FANCA, FANCC und FANCG zeigten in manchen Experimenten nach DNA-Schädigung eine Konzentration in subnukleäre Regionen. Der prozentuale Anteil focihaltiger Zellen schwankte dabei zwischen 1 und 32 %. Auch die Struktur der Fanconi-Foci zeigte eine sehr hohe Variabilität zwischen einzelnen Experimenten, sie variierte von klein und punktuert über mittelgroß und fleckig bis hin zu groß und flächig, wobei letztere besonders häufig auftrat.

In seltenen Fällen war eine Abschnürung focihaltiger Mikronuklei vom Zellkern sichtbar, die auch von HAAF et al. (1999) für RAD51A-Foci beobachtet wurde. Die Autoren beschreiben in ihrer Veröffentlichung das graduelle Verschmelzen der primär entstandenen RAD51A-Foci und interpretieren die Abschnürung der Mikronuklei als Ausschluß irreversibel vernetzter DNA-RAD51A-Komplexe aus der Kernregion.

Die Inkonsistenz der FA-Focibildung läßt einen Zusammenhang mit einer vorangegangenen DNA-Schädigung zunächst unwahrscheinlich erscheinen, da klassische Focibildner wie etwa RAD51A, RAD50, MRE11 oder NBS1 nach DNA-Schädigung ausnahmslos in nukleäre Foci rekrutiert werden. Eine Umverteilung der FA-Proteine in fociartige Regionen wurde allerdings ohne MMC-Behandlung nicht oder nur in 1 % aller transfizierten Zellen beobachtet, so daß ein Zusammenhang zwischen DNA-Schädigung und FA-Focibildung nicht ausgeschlossen werden kann. Da für die Reparatur von Interstrangvernetzungen postuliert wurde, daß eine Erkennung des vorliegenden DNA-Schadens erst während der Replikationsphase der Chromosomen erfolgt (AKKARI et al. 2000), wäre bei einer Beteiligung der FA-Proteine an der DNA-Reparatur der prozentuale Anteil FA-focihaltiger Zellen in jedem unabhängigen Experiment auch in hohem Maße von der Zellzyklus-Verteilung der jeweiligen Zellpopulation abhängig. Da diese wiederum durch eine Vielzahl von Faktoren, wie Alter, Teilungsrate oder Konfluenz der Zellen beeinflusst wird, könnte dies teilweise als Erklärung der schwankenden Anzahl focihaltiger Kerne dienen.

QIAO et al. (2001) beschreiben eine durch MMC induzierbare, enge Assoziation der FA-Proteine mit zellulärem Chromatin und der nukleären Matrix, die während der Mitose der Zelle vorübergehend aufgehoben wird. Eine Störung der Chromatinstruktur als Folge genotoxischer Agenzien wäre eine mögliche Erklärung für die Aufhebung der homogenen Verteilung der FA-Proteine innerhalb der Kernregion. Auffällig war hier, daß FA-Foci zumeist in Zellkernen mit unregelmäßiger, „fleckiger“ DAPI-Färbung sichtbar wurden. In solchen Kernen mit Regionen starker und schwacher DAPI-Färbung waren die FA-Speckles häufig auf Bereiche besonders schwacher DAPI-Färbung beschränkt. Die Intensität der DAPI-Färbung steht in indirekt proportionalem Verhältnis zur Dichte des zellulären Chromatins, d.h. je lockerer die Chromatinstruktur, desto intensiver die DAPI-Färbung (MASCETTI et al. 2001). Eine Chromatinauflockerung als unmittelbare Reaktion auf ionisierende Bestrahlung wurde von BELYAEV et al. (2001) beschrieben. Sollte nach einer MMC-Behandlung in besonders schwer geschädigten Zellen eine übermäßige Auflockerung des Chromatins zu einem Herauslösen der FA-Proteine führen, würde dies einen weiteren Hinweis auf eine Rolle der FA-Proteine im sogenannten „Chromatin Modelling“ darstellen. Ein Zusammenhang der FA-Proteine mit Chromatin und nukleärer Matrix wurde bereits mehrfach postuliert (HOATLIN et al. 1999, QIAO et al. 2001), dabei könnte ein Herauslösen der FA-Proteine aus der Chromatinmatrix weiterführend auch mit apoptotischen Vorgängen in Zusammenhang gebracht werden. Die stark schwankende Zahl FA-focihaltiger Kerne nach MMC-Behandlung ist so allerdings nicht erklärbar, da bei derart hohen MMC-Konzentrationen vermutlich fast alle Zellen eine Lockerung des Chromatins erfahren und im späterem Stadium apoptotisch werden.

Eine Überlappung von Foci in doppelt transformierten Zellen wurde nur in einzelnen Fällen detektiert. Zwischen den FA-Proteinen FANCA und FANCG wurde niemals eine Kolokalisation in Foci beobachtet, allerdings waren die Ko-Transfektionsraten extrem niedrig: von 100 Zellen exprimierten maximal 6 % beide Proteine, so daß selbst bei einer Focibildungsrate von 30 % nur 2 von 100 Zellen derartige Strukturen aufzuweisen hätten. Da in doppelt transfizierten Zellen niemals Foci für nur eines der beiden Proteine gefunden wurden, kann über die Kolokalisation der beiden FA-Proteine FANCA und FANCG keine definitive Aussage getroffen werden. Zwischen den FA-Proteinen und den RAD51-Familienmitgliedern wurde nach DNA-Schädigung durch IR oder MMC lediglich in wenigen Einzelfällen eine Kolokalisation beobachtet, darunter zwischen FANCC und RAD51B und FANCA und RAD51B, wobei die Überlappung der Foci in jedem Fall fast vollständig war. Die Seltenheit der Kolokalisationen wirft allerdings erneut die Frage der Artefaktwahrscheinlichkeit auf.

Immunfluoreszenzfärbungen liefern Hinweise auf funktionelle Gemeinsamkeiten verschiedener Proteine, sie geben allerdings keinen Aufschluß über etwaige direkte physikalische Bindungen zwischen zwei Proteinen. Obwohl eine Kolokalisation in nukleäre Foci bei den bisher bekannten DNA-Reparaturproteinen häufig mit einer direkten Interaktion zwischen beiden Proteinen einhergeht,

ist dies offensichtlich keine zwingende Voraussetzung: während alle bisher identifizierten Interaktionspartner von RAD51A, wie RAD52, RAD54, RPA, BRCA1, etc., ebenfalls nukleäre Focibildung nach DNA-Schädigung zeigen (Liu und MAIZELS 2000, TAN et al. 1999, GOLUB et al. 1998, BHATTACHARYYA et al. 2000, SCULLY und LIVINGSTON 2000), ist dies für die Mitglieder der humanen RAD51-Familie nicht der Fall (siehe oben), obwohl deren vielfältige Wechselwirkungen ausführlich beschrieben wurden (SCHILD et al. 2000, DOSANJH et al. 1998).

Zur Identifizierung möglicher Interaktionen zwischen den FA-Proteinen FANCA, FANCC, FANCG und der RAD51-Familie, RAD51A, B, C, D, XRCC2 und XRCC3, wurden HEK293-Zellen mit je zwei Expressionsvektoren transfiziert. Nach 48 Stunden wurden Proteinextrakte gewonnen und einem Ko-Immunpräzipitationsverfahren (Ko-IP) unterzogen. Da die Interaktion zwischen FANCA und FANCG als besonders stark beschrieben ist (REUTER et al. 2000, HUBER et al. 2000), wurde die Ko-IP zwischen FLAG-FANCA und c-myc-FANCG als Positivkontrolle verwendet.

Im Western Blot waren zunächst die Proteine FANCA, FANCC, FANCG, RAD51A, RAD51B, Rad51D und XRCC3 deutlich nachweisbar, während – wie aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenzstudie bereits erwartet – die RAD51C- und XRCC2-Expression unterhalb der Nachweisgrenze lag. Aufgrund der „Yeast Two Hybrid“-Ergebnisse wurden Ko-IP-Versuche für folgende Kombinationen durchgeführt: FANCA mit allen Angehörigen der RAD51-Familie, FANCC mit RAD51A und FANCG mit RAD51B und RAD51D; dabei wurde in Bezug auf RAD51A stets der Nachweis endogen exprimierter Proteine verfolgt, um die Artefaktanfälligkeit zu senken.

Für keine der aufgeführten Kombinationen konnte eine Interaktion zwischen einem der FA-Proteine und einem Mitglied der RAD51-Familie nachgewiesen werden, trotz Verwendung mehrerer Strategien zum Isolieren der Proteinkomplexe, wie etwa die Verwendung verschiedener Zellaufschluß- und Puffersysteme sowie eine Behandlung der Zellen mit MMC. Die Interaktion zwischen FLAG-FANCA und c-myc-FANCG war dagegen zumeist deutlich dokumentierbar.

Letztere Tatsache schließt die Möglichkeit aus, daß eine Ko-IP an einer zu geringen Menge doppelt transfizierter HEK293-Zellen scheitern konnte, da die Ko-Transfektionsraten der FANCA- und FANCG-Konstrukte mit denen anderer Plasmid-Kombinationen vergleichbar waren (Tabelle 17).

In unabhängig durchgeführten Experimenten, bei denen mit Hilfe spezifischer Antikörper ausschließlich endogene Konzentrationen der FA-Proteine nachgewiesen wurden, konnte ebenfalls keine Interaktion zwischen RAD51A und einem der FA-Proteine FANCA, FANCC, FANCG oder FANCF identifiziert werden (eigene Daten und Tanja Reuter, persönliche Mitteilung). Die Überexpression der FA-Proteine sollte sich ohnehin nicht als störender Faktor erweisen, da bereits mehrere Interaktoren der FA-Proteine durch Überexpression beider Partner identifiziert wurden (KRUYT et al. 1998, OTSUKI et al. 1999, HOATLIN et al. 1999). Offen bleibt die Möglichkeit, daß Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und den RAD51-Familienmitgliedern zu schwach oder zu empfindlich sind, um durch die angewandten Ko-IP-Strategien nachgewiesen zu werden.

Zusammengenommen muß die Frage nach einer möglichen Verbindung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie offen bleiben. Obwohl viele reproduzierbare Interaktionen der FA-Proteine mit Mitgliedern der RAD51-Familie mit Hilfe des „Yeast TwoHybrid“-Systems identifiziert werden konnten, war die Art der Interaktion häufig asymmetrisch und/oder in nur einem der beiden Hefe-Reportersysteme sichtbar. Darüberhinaus konnte eine direkte physikalische Verbindung zwischen den im „Interaction Trap“ identifizierten Interaktionspartnern (siehe Tabellen 13a, b, und c) in humanen HEK293-Zellen durch Immunpräzipitation nicht bestätigt werden.

Auch eine Induktion nukleärer Foci nach DNA-Schädigung, wie sie von RAD51A her bekannt ist, war weder für die übrigen Angehörigen der RAD51-Familie, noch für die drei FA-Proteine möglich, dagegen zeigten FANCA, FANCC und FANCG nach MMC-Behandlung eine andere Art von Focibildung, die sich strukturell deutlich von der RAD51A-Fociformierung unterscheidet. Die Beschränkung der FA-Foci auf Regionen besonders kondensierten Chromatins erinnert an die These der Beteiligung der FA-Proteine am sogenannten „Chromatin Remodelling“, über die Bedeutung der in dieser Arbeit beschriebenen FA-Foci kann aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekuliert werden (siehe oben).

Obwohl die Interaktion zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Familie vorläufig auf das „Yeast Two Hybrid“-System beschränkt bleibt, erscheint es nicht sinnvoll, die beobachteten Interaktionen insgesamt als falsch positiv einzustufen, zumal sowohl die FA-Proteine, als auch die RAD51-Familienmitglieder von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich im „Yeast Two Hybrid“-System eingesetzt wurden und hier keinerlei Hinweise auf falsch positive Resultate berichtet werden.

Zusätzlich erscheint seit der Identifizierung des FANCD2-Proteins (TIMMERS et al. 2001, GARCIA-HIGUERA et al. 2001) aufgrund dessen spezieller Eigenschaften eine Verbindung zwischen den FA-Proteinen und RAD51A verlockend plausibel: Das FANCD2-Protein wird nach DNA-Schädigung durch Monoubiquitinierung aktiviert, diese Aktivierung ist abhängig von einem funktionellen Komplex der übrigen bisher identifizierten FA-Proteine (A, C, E, F, G). Das aktivierte FANCD2-Protein wandert anschließend in nukleäre Foci, in denen bisher auch das BRCA1-Protein nachgewiesen werden konnte. BRCA1 wiederum interagiert und kolokalisiert mit verschiedenen weiteren DNA-Reparaturproteinen, darunter seltener mit RAD50 und besonders häufig mit RAD51, die beide unterschiedlichen Reparaturwegen (SSA und HR, respektive) zugeordnet werden und niemals gemeinsam in denselben Foci zu finden sind. Aufgrund dieser außergewöhnlichen Involvierung in verschiedene DNA-Reparaturwege wird BRCA1 zusammen mit BRCA2 eine besonders pleiotrope Funktion innerhalb des DNA-Reparaturnetzwerks in Säugerzellen zugeschrieben.

Die Tatsache, daß BRCA-Foci hauptsächlich mit RAD51A-Foci überlappen, läßt eine Kolokalisation von FANCD2 und RAD51A erwarten, die zum momentanen Zeitpunkt noch nicht beschrieben ist. Sollte FANCD2 tatsächlich mit RAD51A kolokalisieren, sind generell zwei Modelle vorstellbar: (1) Der FA-Proteinkomplex ist ausschließlich zur Aktivierung des FANCD2 zuständig, welches anschließend vollkommen autark mit weiteren Proteinen interagiert, die selbst aber niemals mit den

übrigen FA-Proteinen in Berührung kommen. (2) Die FA-Proteine A, C, E, F, und G aktivieren als Komplex FANCD2, haben aber – im Komplex und/oder auch einzeln - darüberhinaus weitere Funktionen, die auch eine Interaktion mit anderen DNA-Reparaturproteinen einbeziehen können.

Obwohl über diese Frage zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekuliert werden kann, läßt der pleiotrope zelluläre Phänotyp der Fanconi Anämie, der nicht zuletzt aufgrund der bisher identifizierten Interaktionspartner der FA-Proteine Defekte in „Chromatin remodelling“ (HOATLIN et al. 1999, QIAO et al. 2001), Regulierung des zellulären Redoxzustandes (CUMMING et al. 2001, HADJUR et al. 2001) und apoptotischer Vorgänge (PANG et al. 2001, CUMMING et al. 1996, WANG et al. 1998), Transkriptionsaktivierung (PANG et al. 2001; FAGERLIE et al. 2001) und weiteren DNA-Reparatur-assoziierten Signaltransduktionswegen nahelegt, ein breites Funktionsspektrum für die Proteine des FA-Komplexes vermuten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die sogenannten Caretaker-Gene haben wichtige Funktionen bei der Erhaltung genomischer Integrität. Defekte in diesen Genen sind Auslöser der Caretaker-Gen-Syndrome, die sich insbesondere durch eine hohe Prädisposition für Krebs auszeichnen und daher auch Modellcharakter für die Mechanismen der Karzinogenese besitzen. Obwohl für jedes Syndrom Mutationen in verschiedenen Genen verantwortlich sind, existieren zwischen den einzelnen zellulären Phänotypen auffällige Ähnlichkeiten, zu denen diverse Defekte in DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Regulation der Apoptose zählen. Diese Gemeinsamkeiten resultieren aus der funktionellen Verknüpfung der komplex regulierten Signalwege, in die die Caretaker-Proteine involviert sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Studien an drei verwandten Syndromen, Ataxia Telangiectasia (AT), Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) und Fanconi Anämie (FA) durchgeführt.

6.1 Identifizierung und Charakterisierung nicht-konservativer Spleißmutationen und deren Auswirkungen im *ATM*-Gen

Bei AT-Patienten wurden bisher über 300 verschiedene Mutationen im *ATM*-Gen gefunden, von denen die meisten in einer Trunkierung und völligen Destabilisierung des ATM-Proteins resultieren. Unter den Einträgen der *ATM*-Mutationsdatenbank finden sich auf cDNA-Ebene besonders häufig Exondeletionen und kleinere Deletionen bzw. Insertionen direkt an den Exongrenzen. Obwohl die zugrundeliegenden Mutationen auf genomischer Ebene vielfach nicht identifiziert wurden, liegt die Vermutung nahe, daß es sich in den meisten Fällen um Spleißmutationen handelt. Damit läge der Anteil der Spleißmutationen im *ATM*-Gen mit 30 – 35 % signifikant höher, als der anderer betroffener Gene (15 %). Um der Frage nachzugehen, ob die Häufigkeit der Spleißmutationen im *ATM*-Gen möglicherweise auf eine erhöhte Anfälligkeit des *ATM*-Primärtranskriptes für Mutationen an weniger konservierten Positionen innerhalb der sogenannten Spleiß-Konsensussequenzen zurückzuführen ist, wurde in Zellen von 20 AT-Patienten nach derartigen Mutationen gesucht, um ihre Auswirkungen auf das Spleißverhalten des *ATM*-Transkriptes nachfolgend genauer zu charakterisieren. Mit Hilfe des „Protein Truncation Test“ (PTT) wurden in 20 AT-Zelllinien insgesamt 25 Mutationen identifiziert, was mit einer Detektionsrate von 62 % dem üblichen Mittel entspricht. Unter den 25 Aberrationen befanden sich insgesamt 10 verschiedene Spleißmutationen, von denen 7 noch nicht in der *ATM*-Mutationsdatenbank eingetragen waren und daher zur weiteren Charakterisierung herangezogen wurden. Mit Hilfe des „splice scoring“-Systems von SHAPIRO und SENAPATHY (1987) wurde für jede der 7 Mutationen der Abfall der Spleißstellenwertungen bestimmt, um den Schweregrad der jeweiligen Mutation abschätzen zu können. Zusätzlich wurde bei den 7 entsprechenden AT-Linien durch semiquantitative PCR aus cDNA das Verhältnis der mRNA-Transkripte beider Allele

zueinander bestimmt, um etwaiges "leaky splicing" nachzuweisen. Die Auswirkung der Mutationen auf das ATM-Protein wurde durch Western Blotting ermittelt.

Unter den sieben Spleißmutationen betrafen vier die klassischen Spleiß-Konsensussequenzen und lösten ausschließlich aberrantes Spleißen aus, wobei zwei Mutationen nicht in der Deletion des ganzen Exons, sondern in der Nutzung alternativer Spleißstellen resultierten, was in einem Fall zu einer Deletion von Exonnukleotiden, im anderen zu einer Insertion intronischer Nukleotide auf cDNA-Ebene führte. Auch die Mutation der letzten Nukleotidposition eines Exons, die nach den klassischen Konsensuspositionen die dritthöchste Konservierung aufweist, resultierte in völlig aberrantem Spleißen, was übereinstimmend auch bei anderen ATM-Studien berichtet wird (MC CONVILLE et al. 1996, TERAOKA et al. 1999). Zwei ungewöhnliche Punktmutationen aktivierten kryptische Spleißstellen inmitten des jeweiligen Introns und führten zum zusätzlichen Spleißen eines Pseudoexons in die kodierende Sequenz; aufgrund ihrer Positionierung außerhalb der Konsensussequenzen waren sie für die eigentliche Fragestellung allerdings nicht geeignet.

Insgesamt betraf keine der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Spleißmutationen eine wirklich schwach konservierte Position innerhalb der Konsensussequenzen. In den letzten Jahren mehren sich jedoch Berichte, denenzufolge sich fast die Hälfte aller Spleißmutationen außerhalb der hochkonservierten Dinukleotidpositionen befindet und dennoch häufig in vollkommen aberrantem Spleißen resultiert (BROEKS et al. 1998, TERAOKA et al. 1999, Thilo Dörk, pers. Mitteilung und SOBECK et al., in Vorbereitung). Die Identifizierung weiterer Mutationen dürfte daher letztendlich die These bestätigen, daß das *ATM*-Transkript eine besondere Labilität gegenüber Mutationen an weniger konservierten Positionen der Spleiß-Konsensussequenzen besitzt.

6.2 Suche nach Gendefekten, die einen NBS-ähnlichen Phänotyp auslösen

Über 90 % aller NBS-Patienten tragen Mutationen im *NBS1*-Gen, wobei in den meisten Fällen Homozygotie für die sogenannte Gründermutation, 657del5, vorliegt. Neben dem klassischen NBS-Phänotyp existieren mehrere Varianten, die sich durch leichte Abweichungen des klinischen Erscheinungsbildes auszeichnen. Für die Suche nach Gendefekten, die für einen NBS- oder NBS-ähnlichen Phänotyp verantwortlich sein könnten, ist es sinnvoll, solche Kandidaten auszuwählen, deren Translationsprodukte in funktionellem Zusammenhang mit dem des *NBS1*-Gens stehen. Das *NBS1*-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur (DNA-DSB-Reparatur) und wandert nach DNA-Schädigung im Komplex mit zwei weiteren Proteinen, *MRE11* und *RAD50*, in sogenannte nukleäre Foci, die als Orte aktiver DNA-Reparatur interpretiert werden. Mutationen im *MRE11*-Gen wurden bereits bei ATLD-Patienten (ATLD, „AT-like disorder“) identifiziert und zeigen die enge Verbindung zwischen den beiden Syndromen AT und NBS. Der *NBS1*/*MRE11*/*RAD50*-Komplex ist in alle drei bekannten Wege der DNA-DSB-Reparatur, das „non-

homologous end-joining“ (NHEJ), die homologe Rekombinations-Reparatur (HRR) und das „single strand annealing“ (SSA) involviert. Da kürzlich im Gen der DNA-Ligase IV, die im NHEJ-Weg zusammen mit XRCC4 den finalen Ligationsschritt katalysiert, Mutationen bei NBS-Patienten identifiziert wurden (Dr. Concannon, pers. Mitteilung), sind neben dem NBS/MRE11/RAD50-Komplex auch die übrigen Angehörigen des NHEJ-Weges als Kandidatengene für NBS-ähnliche Syndrome von besonderem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher in Zelllinien von fünf NBS-Patienten ohne Gründermutation eine Suche nach Defekten in *NBS1*, *MRE11*, *RAD50* sowie den beiden Angehörigen des NHEJ-Weges *DNA-Ligase IV* und *XRCC4* und in einem Fall auch in den Genen *KU70* und *KU80* durchgeführt. In einer der fünf Linien konnte im *NBS1*-Gen eine neue, homozygot vorliegende Mutation, 900del25 (Exon 8), identifiziert werden, die in einer Trunkierung des NBS1-Proteins resultiert. Die selbe Mutation wurde mittlerweile ebenfalls homozygot bei einem weiteren Patienten gefunden und näher charakterisiert (MARASCHIO et al. 2001).

In einer der verbleibenden NBS-Linien wurden an der Medizinischen Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Dr. Thilo Dörk) in einer unabhängigen Mutationssuche zwei Mutationen im *RAD50*-Gen identifiziert (BENDIX et al., in Vorbereitung). Zur Charakterisierung des zellulären Phänotyps der RAD50-defizienten Fibroblasten wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Immunfluoreszenzstudien die Lokalisierung der beiden RAD50-Komplexparker MRE11 und NBS1 vor und nach DNA-Schädigung untersucht. Im Gegensatz zu gesunden Zellen waren die RAD50-defizienten Zellen nicht in der Lage, nach Bestrahlung MRE11- oder NBS1-Foci zu bilden. Während NBS1 noch eine überwiegend nukleäre Lokalisation aufwies, war das MRE11-Protein zu etwa gleichen Anteilen in Kern und Zytoplasma lokalisiert. Da in Zellen von ATLD-Patienten keine nukleäre Lokalisation des NBS1-Proteins beobachtet wird (STEWART et al. 1999), deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß das NBS1-Protein zum Transport in den Zellkern von MRE11, nicht aber von RAD50 abhängig ist.

In den drei verbleibenden NBS-Linien konnten keine Defekte in einem der untersuchten Gene/Proteine nachgewiesen werden. Gerade aus diesem Grund bleiben diese Gene jedoch für weitere Zelllinien von „NBS-like“-Patienten als Kandidaten interessant, da ein NBS-ähnlicher Phänotyp offensichtlich durch Defekte in anderen als den drei bisher identifizierten Genen ausgelöst werden kann.

6.3 Untersuchung einer möglichen Verbindung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie

Fanconi Anämie wird durch Defekte in mindestens acht verschiedenen Genen ausgelöst. FA-Zellen aller Komplementationsgruppen zeichnen sich besonders durch eine Hypersensitivität für DNA-Quervernetzungen („interstrand crosslinks“, ICL) aus. Zur Behebung von ICLs werden von einer Zelle verschiedene Reparatursysteme eingesetzt, darunter die homologe Rekombinations-Reparatur (HR-Reparatur), bei der das RAD51-Protein eine zentrale Rolle spielt. Aufgrund schwacher Homologien

wird eine Reihe von Proteinen (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) in die Gruppe der sogenannten RAD51-Familie eingeordnet, für die im Komplex mit RAD51 selbst eine wichtige Rolle bei der HR-Reparatur postuliert wird. Interessanterweise sind Hühner-„Knockout“-Zellen mit Defekten in einem der fünf Gene aus der *RAD51*-Familie ähnlich FA-Zellen extrem sensitiv gegenüber ICL-induzierenden Agenzien wie MMC oder DEB. Aufgrund dieser zellulären Ähnlichkeit wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage gestellt, ob möglicherweise eine funktionelle Verbindung zwischen dem Reparaturweg der FA-Proteine und dem der RAD51-Familie besteht.

Zur Identifizierung potentieller Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und den RAD51-Homologen wurde daher zunächst ein „Interaction Trap“ mit den FA-Proteinen FANCA, FANCC und FANCG sowie den Angehörigen der RAD51-Familie im “Yeast Two Hybrid“-System unter Verwendung von zwei verschiedenen Reportersystemen, LEU2 und lacZ, durchgeführt. Deutliche Interaktionen wurden für folgende Kombinationen bei Aktivierung beider Reportersysteme detektiert:

- FANCA mit RAD51A, RAD51B und RAD51D
- FANCG mit RAD51B und RAD51C

Die übrigen beobachteten Interaktionen konnten entweder nur unter Verwendung eines der beiden Reportersysteme oder in nur einer Orientierung beobachtet werden und wurden daher als schwache Interaktionen eingestuft. Zu den schwachen Interaktionen zählten:

- FANCA mit XRCC2 und XRCC3
- FANCC mit RAD51A
- FANCG mit RAD51A, RAD51D, XRCC2 und XRCC3

Die Vielfältigkeit der Interaktionen sowie die Tatsache, daß viele Interaktionen nach Orientierungswechsel oder Verwendung des jeweils anderen Reportersystems nicht zu bestätigen waren, ließ Zweifel an der Eignung des „Yeast Two Hybrid“-Systems für diese spezielle Kombination untersuchter Proteine aufkommen. Daher wurden die FA-Proteine und die RAD51-Homologe im nächsten Schritt zur Überexpression in humanen HEK293-Zellen in geeignete Expressionsvektoren kloniert. Eine Überexpression von FANCA, FANCC, FANCG sowie RAD51A, RAD51B, RAD51D und XRCC3 wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt. RAD51C und XRCC2 konnten allerdings in diesem System nicht überexprimiert werden.

Da viele DNA-Reparaturproteine einschließlich des RAD51A-Proteins nach DNA-Schädigung in nukleäre Foci lokalisieren, wurde zunächst versucht, eine MMC-induzierte Fociformierung der FA-Proteine und der RAD51-Homologe nachzuweisen. Außer für RAD51A selbst war bei den RAD51-Familienmitgliedern keine Focibildung zu beobachten. Die FA-Proteine hingegen lokalisierten nach MMC-Behandlung in einigen Experimenten in fociartige subnukleäre Strukturen, die sich allerdings deutlich von denen klassischer Focibildner im Hinblick auf Größe und Homogenität unterschieden. Auffälligerweise war eine Focibildung durch die FA-Proteine besonders häufig in Zellen mit unregelmäßiger, „fleckiger“ Kernfärbung zu beobachten, wobei die FA-Foci oft auf Bereiche schwächerer Kernfärbung beschränkt waren. Da umgekehrt Bereiche besonders intensiver

Kernfärbung Regionen mit aufgelockerter Chromatinstruktur – etwa als Folge DNA-schädigender Agenzien - darstellen, werden die FA-Proteine möglicherweise nach DNA-Schädigung aus übermäßig aufgelockertem Chromatin herausgelöst. Eine alternierende Assoziation mit und Dissoziation von Chromatin und nukleärer Matrix wurde kürzlich erstmals für die FA-Proteine beschrieben (QIAO et al. 2001).

Der Versuch einer gleichzeitigen Überexpression von zwei Proteinen in HEK293-Zellen resultierte in extrem geringen Kotransfektionsraten von maximal 8 %. In keinem der durchgeführten Experimente war in HEK293-Zellen, die jeweils beide Proteine überexprimierten, unabhängig von einer vorherigen MMC-Behandlung der Zellen eine Kollokalisierung zwischen einem FA-Protein und einem RAD51-Homolog zu beobachten. Da für die Kombination von FANCA und FANCG in doppelt überexprimierenden Zellen nie eine FA-Focibildung beobachtet wurde, kann über eine Kollokalisierung dieser beiden FA-Proteine keine Aussage gemacht werden.

Trotz der niedrigen Kotransfektionsraten wurde der Versuch unternommen, eine physikalische Interaktion zwischen den FA-Proteinen und den vielversprechendsten Interaktoren aus dem „Interaction Trap“ mit Hilfe von Ko-Immunpräzipitationen nachzuweisen. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit FANCA- und FANCG-Expressionsvektoren kotransformiert, da die Interaktion zwischen diesen beiden FA-Proteinen bereits mehrfach beschrieben wurde. Tatsächlich war eine Ko-IP zwischen FANCA und FANCG in den meisten Experimenten problemlos nachweisbar. Eine Immunpräzipitation zwischen einem der FA-Proteine und einem Mitglied der RAD51-Familie konnte allerdings für keine der untersuchten Kombinationen beobachtet werden. Auch Versuche mit endogenem RAD51A-Protein und nur einfacher Überexpression eines der FA-Proteine konnte keine Interaktion zwischen FANCA, FANCC oder FANCG mit RAD51A zeigen.

Insgesamt bleibt die Frage nach einer möglichen Verbindung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Familie offen. Obwohl sich der Nachweis der Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und den RAD51-Homologen vorerst auf das „Yeast Two Hybrid“-System beschränkt, ist es nicht sinnvoll, die im „Interaction Trap“ identifizierten Interaktionen als gänzlich falsch-positiv einzustufen, zumal Proteine beider Gruppen bereits mehrfach erfolgreich im „Yeast Two Hybrid“-System eingesetzt wurden. Darüberhinaus erscheint eine Verbindung des FA-Reparaturweges zu dem des RAD51A-Proteins seit der Identifizierung von FANCD2 besonders plausibel, da das FANCD2-Protein nach DNA-Schädigung in Foci mit BRCA1 kollokalisiert, das selbst in enger funktioneller Verbindung zu RAD51 steht. Vor diesem Hintergrund werden sicherlich in naher Zukunft weitere intensive Studien zur Klärung einer möglichen Verknüpfung der FA-Proteine mit evolutionär konservierten DNA-Reparaturwegen wie dem der HRR erfolgen.

6.4 SUMMARY

Caretaker genes play a central role in the maintenance of genomic integrity. Syndromes that are associated with a defect in any of these genes are characterized by a strong predisposition to cancer and therefore provide important insights into the mechanisms of cancer susceptibility. Although a different gene is affected in each syndrome, cells from all show common features concerning defects in DNA-repair, cell cycle control, and regulation of apoptotic pathways. These similarities result from the close connection between the complex signal transduction pathways, in which the caretaker proteins are known to be involved. The present dissertation focuses on three related caretaker gene-syndromes, Ataxia telangiectasia (AT), Nijmegen breakage syndrome (NBS), and Fanconi anemia (FA).

6.4.1 Identification of mutations at non-conserved splice site positions within the *ATM* gene

Since the identification of *ATM*, more than 300 different mutations have been reported, most of which are predicted to result in protein truncation. Western blot analyses of AT cells indicate that these truncating mutations are associated with an absence of the ATM protein. Examination of the ATM mutation database reveals an unusual high frequency of exon deletions or smaller deletions/insertions at the exon boundaries. Although in many studies only the observed aberrations in cDNA were reported, without identification of the underlying genomic defect, they presumably represent splice mutations. If such mutations can be identified in the majority of cases, then the rate of splicing mutations in the *ATM* gene would be substantially higher (30-35 %) than that reported for other human genetic disorders, in which 15% of point mutations are found to affect mRNA splicing (Krawczak et al. 1992). In order to investigate this phenomenon, we have asked the question whether the high frequency of splice mutations in the *ATM* gene might be caused by an increased liability of the *ATM* transcript towards mutations at less conserved positions within the splice site consensus sequences. Cell lines of 20 AT patients were screened for alterations at the cDNA level using the protein truncation test. 25 out of 40 mutations were found corresponding to a detection rate of 62 %, which is in good agreement with rates reported by other groups. 10 of these aberrations represented splice mutations, 7 of which had not been reported previously. A splice scoring system (SHAPIRO and SENAPATHY, 1987) was used to estimate the penetrance of these 7 mutations via the decrease of splice site scores at mutated sites. Semiquantitative PCR from cDNA was carried out to evaluate the possibility of leaky splicing by comparison of *ATM* transcript levels from both alleles. To investigate possible

implications that the different splicing defects have for ATM expression, all cell lines were tested for the production of residual ATM protein by western blotting.

Four of the seven splice mutations were positioned at the highly conserved consensus dinucleotides, therefore resulting in completely aberrant splicing. However, two point mutations did not simply result in a loss of the corresponding exons. Rather, they induced the usage of alternative splice sites leading to the insertion of a short intronic sequence / the deletion of exon nucleotides on the cDNA level. Another point mutation affected the last nucleotide of an exon, which is, except from the consensus dinucleotides, the most conserved position within the 5'-splice site. In accordance with other reports, the alteration of the last exon nucleotide also resulted in complete aberrant splicing (McCONVILLE et al. 1996, TERAOKA et al. 1999).

The two remaining mutations represented base substitutions in introns far away from the splice boundaries and led to the misinterpretation of an intronic sequence as an additional exon by the splicing machinery.

Taken together, none of the identified splice mutations affected less conserved positions within the splice site sequences. Nevertheless, there is accumulating evidence from other studies, that more than 50 % of the splice mutations in the *ATM* gene affect positions outside the highly conserved dinucleotides sequences yet resulting in completely aberrant splicing (BROEKS et al. 1998, TERAOKA et al. 1999; Dr. Thilo Dörk, pers. communication and SOBECK et al., in preparation). Therefore, further studies will presumably support the theory that the *ATM* transcript is labile and unusually prone to alterations at less conserved splice site positions.

6.4.2 Search for genetic defects resulting in an NBS- or NBS-like phenotype

More than 90 % of all NBS patients carry alterations in the *NBS1* gene with a prevalence of the founder mutation 657del5. Among the remaining 10 %, some patients show variations of the classical NBS phenotype and are referred to as NBS-like patients. There is suggestive evidence that products of other genes responsible for an NBS- or NBS-like phenotype share a common pathway with the NBS1 protein. NBS1 plays a central role in DNA double strand break repair (DNA-DSB repair) mechanisms and works in concert with two other DNA repair proteins, MRE11 and RAD50. After DNA damage, these three proteins colocalize in nuclear foci that have been recognized as sites of active DNA repair. The identification of mutations in the *MRE11* gene in cells of ATLD-patients (ATLD, AT-like disorder) illustrates the tight connection between the two syndromes, AT and NBS. The NBS1/MRE11/RAD50 complex is involved in all known DNA-DSB repair pathways, i.e. non-homologous end-joining (NHEJ),

homologous recombination repair (HRR), and single strand annealing (SSA). Recently, mutations have been identified in the gene for DNA ligase IV (Dr. Pat Concannon, pers. communication) that, together with XRCC4, is known to catalyze the final ligation step in the NHEJ repair pathway. Therefore, the remaining components of the NHEJ pathway, including the *MRE11* and *RAD50* genes, seem to represent particularly interesting candidates, defects of which might lead to an NBS- or NBS-like phenotype.

In this work, cell lines of five patients diagnosed as NBS without carrying the founder mutation were screened by direct sequencing or western blotting for defects in *NBS1*, *MRE11*, *RAD50*, *DNA-ligase IV* and *XRCC4*. In one case, mutational screening was extended to the *KU70* and *KU80* genes.

One cell line carried a new homozygous *NBS1* mutation, 900del25 (exon 8), predicted to result in protein truncation. The mutation was initially identified in cDNA and was proven to exist likewise at the genomic level. The same aberration, also at a homozygous status, has very recently been identified and further characterized in a second patient with an NBS-like phenotype (MARASCHIO et al. 2001).

In another cell line, an independently performed mutational screening at the Medizinische Hochschule Hannover (group of Dr. Thilo Dörk) detected two mutations within the *RAD50* gene of the corresponding NBS-like patient. In this work, further characterization of the cellular RAD50-deficient phenotype was carried out with regard to the localization of the two RAD50-complex partners, NBS1 and MRE11, before and after DNA-damage. In contrast to normal controls, the RAD50-deficient cells were not able to form IR-induced foci. Localization of NBS1 was still predominantly nuclear, whereas MRE11 was distributed equally between nucleus and cytoplasm. In contrast, ATLD-cells do not show much nuclear localization for NBS1, suggesting that the nuclear localization of NBS1 depends on functional MRE11, but not on RAD50.

In the three remaining NBS cell lines no defects could be identified in any of the analyzed genes/proteins including NBS1, DNA-LIGASE IV, and RAD50. Obviously, an NBS-like phenotype can be induced by mutations in other than the three genes identified so far. Therefore, the genes of the NHEJ pathway continue to be of interest for other cell lines from NBS- or NBS-like patients.

6.4.3 Are the FA proteins linked to DNA double strand break repair via the RAD51 protein family?

Fanconi anemia (FA) results from defects in at least eight different genes. FA-cells of all complementation groups are hypersensitive towards DNA interstrand cross-links (ICLs). Removal of ICLs includes the generation of a DNA double strand break (DNA-DSB) as an early intermediate. Repair of the DNA-DSB is then presumably carried out by the homologous recombination (HR) repair pathway. An essential component of the HR-repair system is the RAD51 protein that binds to DNA-DSBs and mediates strand invasion of the sister chromatid. Due to weak homologies with RAD51(A), a couple of other proteins have been assigned to the so-called RAD51-family, including RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, and XRCC3. The six proteins presumably act together in one complex and have all been implicated in HR-pathways. Strikingly, knockout mutants of the five RAD51-paralogs show spontaneous chromosomal aberrations and high sensitivity to DNA cross-linking agents, similar to FA cells.

In order to investigate a possible link between the FA pathway and the RAD51 family proteins, three FA proteins, FANCA, FANCC and FANCG were tested for interactions with the RAD51 paralogs using the yeast two-hybrid system. Positive interaction was documented by the expression of the chromosomal leucine reporter, LEU2, or the episomal β -galactosidase reporter, lacZ. Intermediate to strong interactions were observed for the following combinations:

- FANCA with RAD51A, RAD51B, and RAD51D
- FANCG with RAD51B, and RAD51C

The remaining interactions were evaluated less reliable, due to activation of only one of the two reporter systems, or asymmetric interactions. The following combinations were classified as weak interactions:

- FANCA with XRCC2, and XRCC3
- FANCC with RAD51A
- FANCG with RAD51A, RAD51D, XRCC2, and XRCC3

The high variability of observed interactions as well as the frequency with which asymmetric interactions occurred made it difficult to draw definite conclusions from the yeast two-hybrid results. Therefore, a mammalian expression system was chosen to investigate a direct link between the FA proteins and the RAD51 paralogs by immunofluorescence studies and by immunoprecipitation. With exception of RAD51C and XRCC2, all remaining genes (FANCA, FANCC, FANCG, RAD51, RAD51B, RAD51D, and XRCC3) could be overexpressed in HEK293 cells and showed a primarily nuclear localization.

Since the RAD51 protein, together with many proteins known to be involved in DNA repair mechanisms, localizes into nuclear foci following DNA damage, the remainder of the RAD51 family, as well as the FA proteins were tested for their ability to form DNA damage-induced foci. None of the RAD51 paralogs showed alterations in nuclear distribution after MMC or X-ray. In contrast, for some experiments the FA proteins responded to DNA damage with a wide variation of speckle-like subnuclear localization patterns being mostly distinct from „classical” foci concerning size and homogeneity. Notably, such patterns were mostly seen in cells with irregular DAPI staining, with the FA proteins being restricted to sites of less intensive nuclear staining. Such regions have been associated with sites of tightly packed chromatin, whereas brightly stained areas are referred to as DNA damage-induced relaxed chromatin being more accessible to DAPI. Very speculatively, the FA proteins might be removed from sites of excessively relaxed chromatin after lethal DNA damage in the progress of cellular apoptosis. Association of the FA proteins with chromatin and nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner has been shown very recently by QIAO et al. (2001). Parallel overexpression of an FA protein together with a RAD51 family member revealed no colocalization between any the two groups. Likewise, co-overexpression of two FA proteins did not show common subnuclear staining patterns. It must be mentioned, however, that speckle-like structures were never observed in cells overexpressing both FA proteins at the same time.

To identify any physical interaction between FA proteins and the RAD51 family, immunoprecipitation studies were carried out, again by using the mammalian expression system. Whereas the well-known interaction between FANCA and FANCG could repeatedly be shown by immunoprecipitation, no such interaction was identified for any combination of an FA protein with a member of the RAD51 family.

Afterall, whether there is a connection of the FA pathway with HR repair mechanisms via the RAD51 protein family, remains an open question. So far, interactions between the two groups could only be observed in the yeast two-hybrid system. However, since the yeast interaction trap has been used very successfully to identify interactors of both, FA proteins as well as RAD51 family members, it seems unlikely that the observed interactions should altogether be rated “false-positive”.

In addition, since the identification of FANCD2 (TIMMERS et al. 2001) a link between the FA proteins and RAD51 seems all the more plausible: after DNA-damage, FANCD2 is activated by the FA complex and colocalizes with BRCA1 in nuclear foci. BRCA1 itself is closely linked to RAD51, with which it interacts and also localizes into foci following DNA damage. Therefore, further studies will be necessary in order to unravel the way by which the FA proteins might be linked to conserved DNA repair mechanisms like the HR pathway.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15: 2177-96
- Akkari YM, Bateman RL, Reifsteck CA, Olson SB, Grompe M (2000) DNA replication is required To elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links. *Mol Cell Biol* 20: 8283-9
- Antoccia A, Stumm M, Saar K, Ricordy R, Maraschio P, Tanzarella C. (1999) Impaired p53-mediated DNA damage response, cell-cycle disturbance and chromosome aberrations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int J Radiat Biol* 75: 583-91
- Aprelikova O, Pace AJ, Fang B, Koller BH, Liu ET (2001) BRCA1 is a selective co-activator of 14-3-3 sigma gene transcription in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 276: 25647-50
- Archer SY, Johnson JJ, Kim HJ, Hodin RA (2001) p21 gene regulation during enterocyte differentiation *J Surg Res* 98: 4-8
- Athma P, Rappaport R, Swift M (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 92: 130-4
- Barbi G, Scheres JM, Schindler D, Taalman RD, Rodens K, Mehnert K, Muller M, Seyschab H. (1991) Chromosome instability and X-ray hypersensitivity in a microcephalic and growth-retarded child. *Am J Med Genet* 40: 44-50
- Batty, D. P. & Wood, R. D (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241: 193-204
- Baumann P, West SC (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci* 23: 247-51
- Beamish H, Lavin MF (1994) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay. *Int J Radiat Biol* 65: 175-84
- Belyaev IY, Czene S, Harms-Ringdahl M (2001) Changes in chromatin conformation during radiation-induced apoptosis in human lymphocytes. *Radiat Res* 156: 355-64

- Berger R, Le Coniat M, Gendron MC (1993) Fanconi anemia. Chromosome breakage and cell cycle studies. *Cancer Genet Cytogenet.* 69: 13-6
- Bhattacharyya A, Ear US, Koller BH, Weichselbaum RR, Bishop DK (2000) The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J Biol Chem* 275: 23899-903
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* 11: 68-76
- Braybrooke JP, Spink KG, Thacker J, Hickson ID (2000) The RAD51 family member, RAD51L3, is a DNA-stimulated ATPase that forms a complex with XRCC2. *J Biol Chem* 275: 29100-6
- Brent R and Finley RL (1997) Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. *Annu Rev Genet* 31: 663-705
- Brent R and Ptashne M (1984) A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. *Nature* 312: 612-615
- Brent R, Ptashne M (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43: 729-36
- Bressan DA, Baxter BK, Petrini JH (1999) The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 7681-7
- Broeks A, de Klein A, Floore AN, Muijtjens M, Kleijer WJ, Jaspers NG, van't Veer LJ (1998) ATM germline mutations in classical ataxia-telangiectasia patients in the Dutch population *Hum Mutat* 12: 330-7
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. (1994) Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368: 258-61
- Bruce SR, Peterson ML. (2001) Multiple features contribute to efficient constitutive splicing of an unusually large exon. *Nucleic Acids Res* 29: 2292-302

- Buscemi G, Savio C, Zannini L, Micciche F, Masnada D, Nakanishi M, Tauchi H, Komatsu K, Mizutani S, Khanna K, Chen P, Concannon P, Chessa L, Delia D (2001) Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. *Mol Cell Biol* 21: 5214-22
- Carlomagno F, Chang-Claude J, Dunning AM, Ponder BA (1999) Determination of the frequency of the common 657Del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 393-5
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH (1998) The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93: 477-86
- Cassinat B, Guardiola P, Chevret S, Schlageter MH, Toubert ME, Rain JD, Gluckman E (2000) Constitutive elevation of serum alpha-fetoprotein in Fanconi anemia. *Blood* 96: 859-63
- Centurion SA, Kuo HR, Lambert WC (2000) Damage-resistant DNA synthesis in Fanconi anemia cells treated with a DNA cross-linking agent. *Exp Cell Res* 260: 216-21
- Chen F, Nastasi A, Shen Z, Brenneman M, Crissman H, Chen DJ (1997) Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat Res* 384: 205-11
- Chen G, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff SP, Wu Y, Arlinghaus R, Baltimore D, Gasser PJ, Park MS, Sung P, Lee EY (1999) Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem* 274: 12748-52
- Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R (1999) BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res* 59: 1752s-1756s
- Chew SL, Baginsky L, Eperon IC (2000) An exonic splicing silencer in the testes-specific DNA ligase III beta exon. *Nucleic Acids Res* 28: 402-10
- Cho JW, Jeong YW, Kim KS, Oh JY, Park JC, Lee JC, Baek WK, Suh SI, Suh MH (2001) p21WAF1 is associated with CDK2 and CDK4 protein during HL-60 cell differentiation by TPA treatment. *Cell Prolif* 34: 267-74

Christianson TA, Bagby GC (2000) FANCA protein binds FANCG proteins in an intracellular complex. *Blood* 95: 725-6

Chrzanowska KH, Kleijer WJ, Krajewska-Walasek M, Bialecka M, Gutkowska A, Goryluk-Kozakiewicz B, Michalkiewicz J, Stachowski J, Gregorek H, Lyson-Wojciechowska G, et al. (1995) Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* 57: 462-71

Chu G (1997) Double strand break repair. *J Biol Chem* 272: 24097-100

Chu G, Mayne L (1996) Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy: do the genes explain the diseases? *Trends Genet* 12: 187-92

Clark AB, Cook ME, Tran HT, Gordenin DA, Resnick MA, Kunkel TA (1999) Functional analysis of human MutS α and MutS β complexes in yeast. *Nucleic Acids Res* 27: 736-42

Clarke AA, Philpott NJ, Gordon-Smith EC, Rutherford TR (1997) The sensitivity of Fanconi anaemia group C cells to apoptosis induced by mitomycin C is due to oxygen radical generation, not DNA crosslinking. *Br J Haematol* 96: 240-7

Cleaver JE (1968) Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218: 652-6

Concannon P, Gatti RA (1997) Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat* 10: 100-7

Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ (1999) Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286: 1162-6

Coultas L, Strasser A (2000) The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* 5: 491-507

Cui X, Brenneman M, Meyne J, Oshimura M, Goodwin EH, Chen DJ (1999) The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells. *Mutat Res* 434: 75-88

Cumming RC, Lightfoot J, Beard K, Youssoufian H, O'Brien PJ, Buchwald M (2001) Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat Med* 7: 814-20

Cumming RC, Liu JM, Youssoufian H, Buchwald M (1996) Suppression of apoptosis in hematopoietic factor-dependent progenitor cell lines by expression of the FAC gene. *Blood* 88: 4558-67

Curry CJ, O'Laigue P, Tsai J, Hutchison HT, Jaspers NG, Wara D, Gatti RA, Hutchinson HT (1989) ATFresno: a phenotype linking ataxia-telangiectasia with the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Hum Genet* 45: 270-5

de Jager M, Dronkert ML, Modesti M, Beerens CE, Kanaar R, van Gent DC (2001) DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* 29: 1317-25

de Laat, W. L., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13: 768-785

De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH, Hartley JA (2000) Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 20: 7980-90

de Winter JP, Leveille F, van Berkel CG, Rooimans MA, van Der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H (2000) Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet* 67: 1306-8

de Winter JP, Rooimans MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ, Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H (2000) The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet* 24: 15-6

de Winter JP, van der Weel L, de Groot J, Stone S, Waisfisz Q, Arwert F, Scheper RJ, Kruyt FA, Hoatlin ME, Joenje H (2000) The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. *Hum Mol Genet* 9: 2665-74

de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H (1998) The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet* 20: 281-3

- Desai-Mehta A, Cerosaletti KM, Concannon P (2001) Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol* 21: 2184-91
- Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, Stidley CA, Bocklage TJ, Cook DL, Belinsky SA (2001) The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat Res* 461: 273-8
- Dolganov GM, Maser RS, Novikov A, Tosto L, Chong S, Bressan DA, Petrini JH (1996) Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* 16: 4832-41
- Dong Z, Zhong Q, Chen PL (1999) The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *J Biol Chem* 274: 19513-6
- Donovan JW, Milne GT, Weaver DT (1994) Homotypic and heterotypic protein associations control Rad51 function in double-strand break repair. *Genes Dev* 8: 2552-62
- Dosanji MK, Collins DW, Fan W, Lennon GG, Albala JS, Shen Z, Schild D (1998) Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acids Res* 26: 1179-84
- Dronkert ML, Kanaar R (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* 486: 217-47
- Durocher D, Henckel J, Fersht AR, Jackson SP (1999) The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell* 4: 387-94
- Fagerlie SR, Diaz J, Christianson TA, McCartan K, Keeble W, Faulkner GR, Bagby GC (2001) Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood* 97 : 3017-24
- Feig DI, Loeb LA (1993) Mechanisms of mutation by oxidative DNA damage: reduced fidelity of mammalian DNA polymerase beta. *Biochemistry* 32: 4466-73
- Finley RL, Brent R (1996) Interaction Trap Cloning with yeast. *DNA Cloning-Expression Systems: A Practical Approach*. Glover D and Hames BD (eds.), Oxford University Press Oxford, England, 168-203
- Floyd RA (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11: 1447-50

- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, Sobol RW, Wilson SH, Dogliotti E (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 37: 3575-80
- Friedberg, E. C., Walker, G. C. & Siede, W (1995) DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington DC
- Furukawa Y, Iwase S, Kikuchi J, Terui Y, Nakamura M, Yamada H, Kano Y, Matsuda M (2000) Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDC2 kinase during G2/M phases and its role in cell cycle regulation. *J Biol Chem* 275: 21661-7
- Garcia-Higuera I, D'Andrea AD (1999) Nuclear localization of the Fanconi anemia protein FANCC is required for functional activity. *Blood* 93: 4025-6
- Garcia-Higuera I, Kuang Y, Denham J, D'Andrea AD (2000) The fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex. *Blood* 96: 3224-30
- Garcia-Higuera I, Kuang Y, Naf D, Wasik J, D'Andrea AD (1999) Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex. *Mol Cell Biol* 19: 4866-73
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7: 249-62
- Gary R, Kim K, Cornelius HL, Park MS, Matsumoto Y (1999) Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J Biol Chem* 274: 4354-63
- Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK (2000) Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res* 60: 3299-304
- Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K (2000) ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 25: 115-9
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355-60

Gilad S, Chessa L, Khosravi R, Russell P, Galanty Y, Piane M, Gatti RA, Jorgensen TJ, Shiloh Y, Bar-Shira A (1998) Genotype-phenotype relationships in ataxia-telangiectasia and variants. *Am J Hum Genet* 62: 551-61

Gilad S, Khosravi R, Shkedy D, Uziel T, Ziv Y, Savitsky K, Rotman G, Smith S, Chessa L, Jorgensen TJ, Harnik R, Frydman M, Sanal O, Portnoi S, Goldwicz Z, Jaspers NG, Gatti RA, Lenoir G, Lavin MF, Tatsumi K, Wegner RD, Shiloh Y, Bar-Shira A (1996) Predominance of null mutations in ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* 5: 433-9

Golub EI, Gupta RC, Haaf T, Wold MS, Radding CM (1998) Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res* 26: 5388-93

Grenon M, Gilbert C, Lowndes NF (2001) Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell Biol* 3: 844-7

Grompe M, D'Andrea A (2001) Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet* 10: 2253-9

Guillouf C, Vit JP, Rosselli F (2000) Loss of the Fanconi anemia group C protein activity results in an inability to activate caspase-3 after ionizing radiation. *Biochimie* 82: 51-8

Guillouf C, Wang TS, Liu J, Walsh CE, Poirier GG, Moustacchi E, Rosselli F (1999) Fanconi anemia C protein acts at a switch between apoptosis and necrosis in mitomycin C-induced cell death. *Exp Cell Res* 246: 384-94

Guo Z, Kumagai A, Wang SX, Dunphy WG (2000) Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 14: 2745-56

Gupta RC, Lutz WK (1999) Background DNA damage for endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence? *Mutat Res* 424: 1-8

Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2298-302

- Haaf T, Raderschall E, Reddy G, Ward DC, Radding CM, Golub EI (1999) Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *J Cell Biol* 144: 11-20
- Hadjur S, Ung K, Wadsworth L, Dimmick J, Rajcan-Separovic E, Scott RW, Buchwald M, Jirik FR (2001) Defective hematopoiesis and hepatic steatosis in mice with combined deficiencies of the genes encoding Fancc and Cu/Zn superoxide dismutase. *Blood* 98: 1003-11
- Hama S, Matsuura S, Tauchi H, Sawada J, Kato C, Yamasaki F, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K, Kamada N, Heike Y, Komatsu K (2000) Absence of mutations in the NBS1 gene in B-cell malignant lymphoma patients. *Anticancer Res* 20: 1897-900
- Harfe, B. D. & Jinks-Robertson, S (2000) DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* 34: 359-399
- Harfst E, Cooper S, Neubauer S, Distel L, Grawunder U (2000) Normal V(D)J recombination in cells from patients with Nijmegen breakage syndrome. *Mol Immunol* 37: 915-29
- Hastings ML, Wilson CM, Munroe SH (2001) A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA. *RNA* 7: 859-74
- Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ, Silvey KV, Bakke AC, Keeble WW, Zhi Y, Reifsteck CA, Grompe M, Brown MG, Magenis RE, Olson SB, Bagby GC (1998) DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood* 91: 275-87
- Heinrich MC, Silvey KV, Stone S, Zigler AJ, Griffith DJ, Montalto M, Chai L, Zhi Y, Hoatlin ME (2000) Posttranscriptional cell cycle-dependent regulation of human FANCC expression. *Blood* 95: 3970-7
- Hoatlin ME, Christianson TA, Keeble WW, Hammond AT, Zhi Y, Heinrich MC, Tower PA, Bagby GC Jr (1998) The Fanconi anemia group C gene product is located in both the nucleus and cytoplasm of human cells. *Blood* 91: 1418-25
- Hoatlin ME, Zhi Y, Ball H, Silvey K, Melnick A, Stone S, Arai S, Hawe N, Owen G, Zelent A, Licht JD (1999) A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood* 94: 3737-47

- Hofmann K, Bucher P (1995) The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 20: 347-9
- Huber PA, Medhurst AL, Youssoufian H, Mathew CG (2000) Investigation of Fanconi anemia protein interactions by yeast two-hybrid analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 73-7
- Ivanov EL, Sugawara N, Fishman-Lobell J, Haber JE (1996) Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142: 693-704
- Jeggo PA (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 150: 80-91
- Jiricny, J (1998) Replication errors: cha(lle)nging the genome. *EMBO J* 17: 6427-6436
- Joenje H, Patel KJ (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2: 446-57
- Johnstone P, Reifsteck C, Kohler S, Worland P, Olson S, Moses RE (1997) Fanconi anemia group A and D cell lines respond normally to inhibitors of cell cycle regulation. *Somat Cell Mol Genet* 23: 371-7
- Jongmans W, Vuillaume M, Chrzanowska K, Smeets D, Sperling K, Hall J (1997) Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 17: 5016-22
- Karran P (2000) DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 10: 144-50
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71: 587-97
- Keegan L, Gill G, Ptashne M (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231 : 699-704

- Khan MM, Nomura T, Kim H, Kaul SC, Wadhwa R, Shinagawa T, Ichikawa-Iwata E, Zhong S, Pandolfi PP, Ishii S (2001) Role of PML and PML-RARalpha in Mad-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* 7: 1233-43
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27: 247-54
- Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF (1998) ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* 20: 398-400
- Kharbanda S, Yuan ZM, Weichselbaum R, Kufe D (1998) Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene* 17: 3309-18
- Kim GD, Choi YH, Dimtchev A, Jeong SJ, Dritschilo A, Jung M (1999) Sensing of ionizing radiation-induced DNA damage by ATM through interaction with histone deacetylase. *J Biol Chem* 274 : 31127-30
- Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* 7: 437-43
- Kim YB, Ki SW, Yoshida M, Horinouchi S (2000) Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J Antibiot (Tokyo)* 53: 1191-200
- Koh PS, Hughes GC, Faulkner GR, Keeble WW, Bagby GC (1999) The Fanconi anemia group C gene product modulates apoptotic responses to tumor necrosis factor-alpha and Fas ligand but does not suppress expression of receptors of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Exp Hematol* 27: 1-8
- Kojis TL, Gatti RA, Sparkes RS (1991) The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet* 56: 143-56
- Kolodner, R. D. & Marsischky, G. T (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 9: 89-96

Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90: 41-54

Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476: 73-7

Kruyt FA, Dijkmans LM, Arwert F, Joenje H (1997) Involvement of the Fanconi's anemia protein FAC in a pathway that signals to the cyclin B/cdc2 kinase. *Cancer Res* 57: 2244-51

Kruyt FA, Dijkmans LM, van den Berg TK, Joenje H (1996) Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 87: 938-48

Kruyt FA, Youssoufian H (1998) The Fanconi anemia proteins FAA and FAC function in different cellular compartments to protect against cross-linking agent cytotoxicity. *Blood* 92: 2229-36

Kruyt FA, Youssoufian H (2000) Do Fanconi anemia genes control cell response to cross-linking agents by modulating cytochrome P-450 reductase activity? *Drug Resist Updat* 3: 211-215

Kuang Y, Garcia-Higuera I, Moran A, Mondoux M, Digweed M, D'Andrea AD (2000) Carboxy terminal region of the Fanconi anemia protein, FANCG/XRCC9, is required for functional activity. *Blood* 96: 1625-32

Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS (1985) Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet* 37: 1022-30

Kupfer GM, Yamashita T, Naf D, Suliman A, Asano S, D'Andrea AD (1997) The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinase, cdc2. *Blood* 90: 1047-54

Laake K, Jansen L, Hahnemann JM, Brondum-Nielsen K, Lonqvist T, Kaariainen H, Sankila R, Lahdesmaki A, Hammarstrom L, Yuen J, Tretli S, Heiberg A, Olsen JH, Tucker M, Kleinerman R, Borresen-Dale AL (2000) Characterization of ATM mutations in 41 Nordic families with ataxia telangiectasia. *Hum Mutat* 16: 232-46

- Laake K, Telatar M, Geitvik GA, Hansen RO, Heiberg A, Andresen AM, Gatti R, Borresen-Dale AL (1998) Identical mutation in 55% of the ATM alleles in 11 Norwegian AT families: evidence for a founder effect. *Eur J Hum Genet* 6: 235-44
- Lämmli UK, Molbert E, Showe M, Kellenberger E (1970) Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 49: 99-113
- Lavin M (1998) Role of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) in breast cancer. A-T heterozygotes seem to have an increased risk but its size is unknown. *BMJ* 317: 486-7
- Lewis LK, Westmoreland JW, Resnick MA (1999) Repair of endonuclease-induced double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*: essential role for genes associated with nonhomologous end-joining. *Genetics* 152: 1513-29
- Li MJ, Maizels N (1997) Nuclear Rad51 foci induced by DNA damage are distinct from Rad51 foci associated with B cell activation and recombination. *Exp Cell Res* 237: 93-100
- Lightfoot J, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Buchwald M (1999) Characterization of regions functional in the nuclear localization of the Fanconi anemia group A protein. *Hum Mol Genet* 8: 1007-15
- Lim DS, Kirsch DG, Canman CE, Ahn JH, Ziv Y, Newman LS, Darnell RB, Shiloh Y, Kastan MB (1998) ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10146-51
- Lindahl T, Nyberg B (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11: 3610-8
- Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopolous N, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, et al. (1995) Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 9: 48-55
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14: 1448-59
- Liu Y, Maizels N (2000) Coordinated response of mammalian Rad51 and Rad52 to DNA damage. *EMBO Rep* 1: 85-90

- Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DF, Savoia A, Cheng NC, van Berkel CG, Strunk MH, Gille JJ, Pals G, Kruyt FA, Pronk JC, Arwert F, Buchwald M, Joenje H (1996) Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet* 14: 320-3
- Loeb LA, Preston BD (1986) Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet* 20: 201-30
- Lynch KW, Weiss A.A (2001) CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer. *J Biol Chem* 276: 24341-7
- Ma J, Ptashne M (1987) A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51: 113-9
- Maraschio P, Danesino C, Antoccia A, Ricordy R, Tanzarella C, Varon R, Reis A, Besana D, Guala A, Tiepolo L (2001) A novel mutation and novel features in Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet* 38: 113-7
- Mascetti G, Carrara S, Vergani L (2001) Relationship between chromatin compactness and dye uptake for in situ chromatin stained with DAPI. *Cytometry* 44: 113-9
- Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH (1997) hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 17: 6087-96
- Maser RS, Zinkel R, Petrini JH (2001) An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* 27: 417-21
- Masson JY, Stasiak AZ, Stasiak A, Benson FE, West SC (2001) Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8440-6
- McConville CM, Stankovic T, Byrd PJ, McGuire GM, Yao QY, Lennox GG, Taylor MR (1996) Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia. *Am J Hum Genet* 59: 320-30
- McHugh PJ, Sones WR, Hartley JA (2000) Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20: 3425-33
- Medhurst AL, Huber PA, Waisfisz Q, de Winter JP, Mathew CG (2001) Direct interactions of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway. *Hum Mol Genet* 10: 423-9

- Mol CD, Parikh SS, Putnam CD, Lo TP, Tainer JA (1999) DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28: 101-28
- Moore JK, Haber JE (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 2164-73
- Morgan SE, Lovly C, Pandita TK, Shiloh Y, Kastan MB (1997) Fragments of ATM which have dominant-negative or complementing activity. *Mol Cell Biol* 17: 2020-9
- Morrison C, Sonoda E, Takao N, Shinohara A, Yamamoto K, Takeda S (2000) The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J* 19: 463-71
- Naf D, Kupfer GM, Suliman A, Lambert K, D'Andrea AD (1998) Functional activity of the fanconi anemia protein FAA requires FAC binding and nuclear localization. *Mol Cell Biol* 18: 5952-60
- Nelms BE, Maser RS, MacKay JF, Lagally MG, Petrini JH (1998) In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 280: 590-2
- Nouspikel T, Lalle P, Leadon SA, Cooper PK, Clarkson SG (1997) A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for a second XPG function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3116-21
- Olsen JH, Hahnemann JM, Borresen-Dale AL, Brondum-Nielsen K, Hammarstrom L, Kleinerman R, Kaariainen H, Lonnqvist T, Sankila R, Seersholm N, Tretli S, Yuen J, Boice JD Jr, Tucker M (2001) Cancer in patients with ataxia-telangiectasia and in their relatives in the nordic countries. *J Natl Cancer Inst* 93: 121-7
- O'Regan P, Wilson C, Townsend S, Thacker J (2001) XRCC2 is a nuclear RAD51-like protein required for damage-dependent RAD51 focus formation without the need for ATP binding. *J Biol Chem* 276: 22148-53
- Otsuki T, Kajigaya S, Ozawa K, Liu JM (1999) SNX5, a new member of the sorting nexin family, binds to the Fanconi anemia complementation group A protein. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 630-5

- Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Diaz J, Faulkner GR, Reifsteck C, Olson S, Bagby GC (2001) The Fanconi anemia complementation group C gene product: structural evidence of multifunctionality. *Blood* 98: 1392-401
- Pang Q, Fagerlie S, Christianson TA, Keeble W, Faulkner G, Diaz J, Rathbun RK, Bagby GC (2000) The Fanconi anemia protein FANCC binds to and facilitates the activation of STAT1 by gamma interferon and hematopoietic growth factors. *Mol Cell Biol* 20: 4724-35
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. (1994) Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263: 1625-9
- Pastink A, Eeken JC, Lohman PH (2001) Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutat Res* 480-481: 37-50
- Paull TT, Gellert M (2000) A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6409-14
- Petrini JH (1999) The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. *Am J Hum Genet* 64: 1264-9
- Platzer M, Rotman G, Bauer D, Uziel T, Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Shiloh Y, Rosenthal A (1997) Ataxia-telangiectasia locus: sequence analysis of 184 kb of human genomic DNA containing the entire ATM gene. *Genome Res* 7: 592-605
- Plug AW, Peters AH, Xu Y, Keegan KS, Hoekstra MF, Baltimore D, de Boer P, Ashley T (1997) ATM and RPA in meiotic chromosome synapsis and recombination. *Nat Genet* 17: 457-61
- Qiao F, Moss A, Kupfer GM (2001) Fanconi anemia proteins localize to chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. *J Biol Chem* 276: 23391-6
- Raderschall E, Golub EI, Haaf T (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1921-6

Rathbun RK, Christianson TA, Faulkner GR, Jones G, Keeble W, O'Dwyer M, Bagby GC (2000) Interferon-gamma-induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve caspase 8-dependent activation of caspase 3 family members. *Blood* 96: 4204-11

Reuter T, Herterich S, Bernhard O, Hoehn H, Gross HJ (2000) Strong FANCA/FANCG but weak FANCA/FANCC interaction in the yeast 2-hybrid system. *Blood* 95: 719-20

Ridet A, Guillouf C, Duchaud E, Cundari E, Fiore M, Moustacchi E, Rosselli F (1997) Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. *Cancer Res* 57: 1722-30

Rischewski JR, Clausen H, Leber V, Niemeyer C, Ritter J, Schindler D, Schneppenheim R. (2000) A heterozygous frameshift mutation in the Fanconi anemia C gene in familial T-ALL and secondary malignancy. *Klin Padiatr* 212: 174-6

Rosselli F, Ridet A, Soussi T, Duchaud E, Alapetite C, Moustacchi E (1995) p53-dependent pathway of radio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia. *Oncogene* 10: 9-17

Ruppitsch W, Meisslitzer C, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M (1998) Overexpression of thioredoxin in Fanconi anemia fibroblasts prevents the cytotoxic and DNA damaging effect of mitomycin C and diepoxybutane. *FEBS Lett* 422: 99-102

Sabatier L, Dutrillaux B (1988) Effect of caffeine in Fanconi anemia. I. Restoration of a normal duration of G2 phase. *Hum Genet* 79: 242-4

Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, Laquerbe A, Moustacchi E, Papadopoulou D (2000) Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Exp Cell Res* 260: 208-15

Sambrook J, Gething MJ (1989) Protein Structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342: 224-225

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, et al. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268: 1749-53

Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G (1995) The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 4: 2025-32

Schild D, Lio Yc, Collins DW, Tsomondo T, Chen DJ (2000) Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J Biol Chem* 275: 16443-9

Scott D, Spreadborough AR, Roberts SA (1994) Radiation-induced G2 delay and spontaneous chromosome aberrations in ataxia-telangiectasia homozygotes and heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 66: 157-63

Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM (1997) Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 90: 425-35

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88: 265-75

Scully R, Livingston DM (2000) In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 408: 429-32

Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, Hentze S, Schroeder-Kurth T (1995) Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 85: 2233-7

Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin MF (1997) Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* 387: 520-3

Shapiro MB, Senapathy P (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 15: 7155-74

Sharan SK, Bradley A (1998) Functional characterization of BRCA1 and BRCA2: clues from their interacting proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3: 413-21

Shinohara A, Ogawa T (1998) Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature* 391: 404-7

Sonoda E, Takata M, Yamashita YM, Morrison C, Takeda S (2001) Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8388-94

Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG, Haites N, Byrd PJ, Taylor AM (1998) ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet* 62: 334-45

Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99: 577-87

Stiegler P, De Luca A, Bagella L, Giordano A (1998) The COOH-terminal region of pRb2/p130 binds to histone deacetylase 1 (HDAC1), enhancing transcriptional repression of the E2F-dependent cyclin A promoter. *Cancer Res* 58: 5049-52

Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M (1992) Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 356: 763-7

Strike P, Jones NJ (1999) Mechanisms of genome maintenance and rearrangement: current research and recent advances in DNA repair and recombination. *Mutat Res* 435: 163-9

Stumm M, von Ruskowsky A, Siebert R, Harder S, Varon R, Wieacker P, Schlegelberger B (2001) No evidence for deletions of the NBS1 gene in lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet* 126: 60-2

Sugasawa K, Okamoto T, Shimizu Y, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F (2001) A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* 15: 507-21

Sugiyama T, New JH, Kowalczykowski SC (1998) DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6049-54

Swift M, Su Y (1999) Link between breast cancer and ATM gene is strong. *BMJ* 318: 400

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Fukushima T, Morrison C, Albala JS, Swagemakers SM, Kanaar R, Thompson LH, Takeda S (2000) The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* 20: 6476-82

Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, Sonoda E, Schild D, Thompson LH, Takeda S (2001) Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* 21: 2858-66

Tan TL, Essers J, Citterio E, Swagemakers SM, de Wit J, Benson FE, Hoeijmakers JH, Kanaar R (1999) Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr Biol* 9: 325-8

Tanaka K, Hiramoto T, Fukuda T, Miyagawa K (2000) A novel human rad54 homologue, Rad54B, associates with Rad51. *J Biol Chem* 275: 26316-21

Tashiro S, Walter J, Shinohara A, Kamada N, Cremer T (2000) Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *J Cell Biol* 150: 283-91

Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, Matsuura S, Nakamura A, Shiraishi T, Ito E, Masnada D, Delia D, Komatsu K (2001) The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50: hMRE11: NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem* 276: 12-5

Taylor WR, Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20: 1803-15

Telatar M, Teraoka S, Wang Z, Chun HH, Liang T, Castellvi-Bel S, Udar N, Borresen-Dale AL, Chessa L, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Porras O, Watanabe M, Junker A, Concannon P, Gatti RA (1998) Ataxia-telangiectasia: identification and detection of founder-effect mutations in the ATM gene in ethnic populations. *Am J Hum Genet* 62: 86-97

Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengut S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA, Concannon P (1999) Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* 64: 1617-31

The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group (2000) Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 82: 400-6

Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, Moses R, Grompe M (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 7: 241-8

- Tomilin NV, Solovjeva LV, Svetlova MP, Pleskach NM, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM (2001) Visualization of focal nuclear sites of DNA repair synthesis induced by bleomycin in human cells. *Radiat Res* 156: 347-54
- Tong X, Drapkin R, Reinberg D, Kieff E (1995) The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3259-63
- Tornaletti, S. & Hanawalt, P. C (1999) Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* 81: 139-148
- Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P (1998) Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* 273: 21447-50
- Tupler R, Marseglia GL, Stefanini M, Prosperi E, Chessa L, Nardo T, Marchi A, Maraschio P (1997) A variant of the Nijmegen breakage syndrome with unusual cytogenetic features and intermediate cellular radiosensitivity. *J Med Genet* 34: 196-202
- Uziel T, Savitsky K, Platzer M, Ziv Y, Helbitz T, Nehls M, Boehm T, Rosenthal A, Shiloh Y, Rotman G (1996) Genomic Organization of the ATM gene. *Genomics* 33: 317-20
- Varon R, Reis A, Henze G, von Einsiedel HG, Sperling K, Seeger K (2001) Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* 61: 3570-2
- Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93: 467-76
- Vermeulen W, Rademakers S, Jaspers NG, Appeldoorn E, Raams A, Klein B, Kleijer WJ, Hansen LK, Hoeijmakers JH (2001) A temperature-sensitive disorder in basal transcription and DNA repair in humans. *Nat Genet* 27: 299-303
- Vit JP, Guillouf C, Rosselli F (2001) Futile caspase-8 activation during the apoptotic cell death induced by DNA damaging agents in human B-lymphoblasts. *Exp Cell Res* 269: 2-12

- Waldmann TA, McIntire KR (1972) Serum-alpha-fetoprotein levels in patients with ataxia telangiectasia. *Lancet* 2: 1112-5
- Walsh CE, Yountz MR, Simpson DA (1999) Intracellular localization of the Fanconi anemia complementation group A protein. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 594-9
- Wang J, Otsuki T, Youssoufian H, Foe JL, Kim S, Devetten M, Yu J, Li Y, Dunn D, Liu JM (1998) Overexpression of the fanconi anemia group C gene (FAC) protects hematopoietic progenitors from death induced by Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res* 58: 3538-41
- Wang X, Peterson CA, Zheng H, Nairn RS, Legerski RJ, Li L (2001) Involvement of nucleotide excision repair in a recombination-independent and error-prone pathway of DNA interstrand cross-link repair. *Mol Cell Biol* 21: 713-20
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14: 927-39
- Wu GS, Burns TF, McDonald ER 3rd, Meng RD, Kao G, Muschel R, Yen T, el-Deiry WS (1999) Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 18: 6411-8
- Xia SJ, Shamma MA, Shmookler Reis RJ (1997) Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase. *Mol Cell Biol* 17: 7151-8
- Xie Y, de Winter JP, Waisfisz Q, Nieuwint AW, Scheper RJ, Arwert F, Hoatlin ME, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ, Joenje H (2000) Aberrant Fanconi anaemia protein profiles in acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol* 111: 1057-64
- Xu B, Kim St, Kastan MB (2001) Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 21: 3445-50
- Yamashita T, Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Joenje H, Asano S, D'Andrea AD (1998) The fanconi anemia pathway requires FAA phosphorylation and FAA/FAC nuclear accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13085-90

Yamazaki V, Wegner RD, Kirchgessner CU (1998) Characterization of cell cycle checkpoint responses after ionizing radiation in Nijmegen breakage syndrome cells. *Cancer Res* 58: 2316-22

Yeo TC, Xia D, Hassouneh S, Yang XO, Sabath DE, Sperling K, Gatti RA, Concannon P, Willerford DM (2000) V(D)J rearrangement in Nijmegen breakage syndrome. *Mol Immunol* 37: 1131-9

Yousoufian H (1994) Localization of Fanconi anemia C protein to the cytoplasm of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7975-9

Yousoufian H (1996) Cytoplasmic localization of FAC is essential for the correction of a prerepair defect in Fanconi anemia group C cells. *J Clin Invest* 97: 2003-10

Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC, Lin SC, Gerbino E, Song MH, Zdzienicka MZ, Gatti RA, Shay JW, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY (2000) Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 405: 473-7

Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, Lange T (2000) Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 25: 347-52

Danksagung :))

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. H. Höhn für die interessante Themenstellung meiner Doktorarbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft sowie sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. H.J. Gross danke ich ganz besonders für die finanzielle Unterstützung während der finalen Phase meiner Dissertation und die aufrichtige Teilnahme am Verlauf aller Experimente.

Herrn PD Dr. Schindler danke ich insbesondere für seine rege Teilnahme am Fortgang jedweder Forschung, seine stets präsente Gesprächsbereitschaft und natürlich auch für alle HappyHippo-Packungen!

Herrn Prof. Dr. Flentje danke ich für die Zwischenfinanzierung im ersten Jahr meiner Doktorarbeit, sowie für die Möglichkeit, Bestrahlungen am Kobaltgerät der Klinik für Strahlentherapie durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Schmid danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, das Fluoreszenzmikroskop benutzen zu können.

All den Menschen, die mir während meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich sehr herzlich danken, insbesondere Klaus Steinlein, Indrajit Nanda, Sabine Herterich und Tanja Reuter.

An meine Laborkollegen aus B107 (und externe), Michaela, Sonja, Doro, Reinhard, Heike, Gabi, Gitta, Richard, Mathew, Annette, Fränzi, die Alde (middaach!), etc. geht ein riesiges Dankeschön für die tolle Zeit, die wir miteinander verbracht haben, dabei ganz besonders an:

Michaela – danke für die Hochs und Tiefs, die wir zusammen durchgestanden haben, für alle Gespräche durch Dick und Dünn, alle lustigen und sarkastischen Momente, ohne Dich wäre es nicht halb so schön gewesen!!!

Flow Gitta – (alpha Weibchen) – danke für den Spass bei der Arbeit und Deine Geduld mit uns Chaoten und die wunderschönen Sulzfeld-Ausflüge, die Grillparties, die Eulen, den Beamer, etc., ich wünsche Dir viel Spass mit der FIRMA!

Richi – (Silberrücken) – für die nicht wiedergebbaren Montagskalauer, die unzerstörbare Ruhe, die Tour de France homepages und all die rückenstärkenden Sprüche zu sämtlichen Lebenssituationen, ich werd's echt vermissen!

Dr. W. (SPD) – ja, wo soll ich da anfangen, ich danke Dir für all die Zeiten, die wir uns gemeinsam an der Uni um die Ohren geschlagen haben, und natürlich besonders für die unzähligen (hoffnungsvollen, betrübt, enthusiastischen, verzweifelten, sinnlosen und sinnvollen) Abende im Cafe Journal und sonstwo, als wir BERÜHMT werden wollten – mille grazie per tutto!!!

Last but not least möchte ich nochmals ganz unkonventionell H.H. danken – für die Rückenstärkung und die aufbauenden Gespräche (...P.A.A.A.).

Ein ganz dickes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiter der Arbeitskreise Gross, Beier, Schön und Grummt!

Das Beste aber zuletzt: liebe Mama, lieber Papa, vielen Dank für die unermüdliche Unterstützung und für überhaupt ALLES (sonst sprengte ich diese Seite), Ihr wart immer für mich da!!!

Lebenslauf

Name: Sobeck Alexandra Theresia
Geburtsdatum: 12. 06. 1972
Geburtsort: Würzburg

Schulbildung:

09/1978-07/1980 Steinbachtalschule Würzburg
09/1980-07/1982 Burkharder Schule Würzburg
09/1982-07/1991 Wirsberg-Gymnasium Würzburg
10.7.1991 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

10/1991-07/1997 Studium der Biology (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/1994 Diplom-Vorprüfung
08/1994-05/1995 Auslandsstudium für zwei Semester and der University of Texas at Austin
07/1996 Diplom-Hauptprüfung
08/1996-06/1997 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel: „Untersuchungen zur *in vivo*-Expression menschlicher tRNA-Pseudogene“ am Institiut für Biochemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität unter Anleitung durch Prof. Dr. H.J. Gross
07/1997-01/1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für molekulare Infektionsbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
seit 01.02.1998 Anfertigung der Dissertation mit dem Titel: „CARETAKER-GEN-SYNDROME: Molekulargenetische und funktionelle Studien“ am Institut für Humangenetik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität unter Anleitung durch Prof. Dr. H. Hoehn

Würzburg, den