

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

**Konservierte transkriptionelle
Regulationsmechanismen der
Fanconi Anämie *core complex* Gene**

vorgelegt von

DANIEL MEIER

geboren in Koblenz



Würzburg

2011

Meiner Familie gewidmet

Tout vient à point à qui sait attendre

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Th. Dandekar

1. Gutachter: Prof. Dr. D. Schindler

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Dandekar

Tag der Promotionskolloquiums:

Erklärung

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999.

1. Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.
2. Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
3. Ich erkläre des Weiteren, dass ich außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegenen Graden keine anderen akademischen Grade erworben habe oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Daniel Meier

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Kurzfassung | 9 |
| Abstract | 10 |
| 1 Einleitung | 11 |
| 1.1 DNA Reparatursysteme | 11 |
| 1.1.1 DNA Reparatur | 11 |
| 1.1.2 Basenexzisionsreparatur (<i>Base Excision Repair-BER</i>) | 13 |
| 1.1.3 Nukleotidexzisionsreparatur (<i>Nucleotide Excision Repair-NER</i>) | 13 |
| 1.1.4 Basenfehlpaarungsreparatur (<i>Mismatch Repair-MMR</i>) | 15 |
| 1.1.5 Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) | 16 |
| 1.1.5.1 Non-homologous end joining (NHEJ) | 16 |
| 1.1.5.2 Homologe Rekombination (HR) | 17 |
| 1.1.6 Interstrand cross link repair (ICL) | 17 |
| 1.2 Fanconi Anämie (FA) | 21 |
| 1.2.1 Definition | 21 |
| 1.2.2 Klinische Beschreibung | 21 |
| 1.2.3 Inzidenz | 22 |
| 1.2.4 Differentialdiagnose | 22 |
| 1.2.5 Ätiologie | 23 |
| 1.2.6 Behandlung | 26 |
| 1.3 Transkriptionelle Regulation | 27 |
| 1.3.1 Transkriptionsinitiierung | 27 |
| 1.3.2 Transkriptionsinitiation bei Promotoren ohne TATA Box (<i>TATA less</i>) | 29 |
| 1.4 Fragestellung | 30 |
| 2 Materialien | 32 |
| 2.1 Zelllinien | 32 |
| 2.1.1 Kompetente Bakterienstämme | 32 |
| 2.1.2 Langzeitzellkulturen | 32 |
| 2.2 Enzyme | 33 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3 | Antikörper | 33 |
| 2.3.1 | Primäre Antikörper | 33 |
| 2.3.2 | Sekundäre Antikörper | 34 |
| 2.4 | Plasmide | 34 |
| 2.5 | Primer | 34 |
| 2.6 | Längenstandards | 34 |
| 2.7 | Chemikalien und Reagenzien | 34 |
| 2.8 | Puffer und andere Lösungen | 35 |
| 2.9 | Kit-Systeme | 36 |
| 2.10 | Sonstige Verbrauchsmaterialien | 36 |
| 2.11 | Geräte | 37 |
| 2.12 | Software und Internetprogramme | 38 |
| 2.13 | Datenbanken | 38 |
| 3 | Methoden | 39 |
| 3.1 | Zellkultur | 39 |
| 3.1.1 | Suspensions-Zellen | 39 |
| 3.1.2 | Adhärente Zellen | 39 |
| 3.1.3 | Kryokonservierung von Zellen | 40 |
| 3.1.4 | Bestimmung der Zellzahl | 40 |
| 3.2 | Gentransfer | 41 |
| 3.2.1 | Transfektion | 41 |
| 3.3 | Durchflusszytometrie | 41 |
| 3.4 | Molekulargenetische Methoden | 42 |
| 3.4.1 | Präparation genomischer DNA | 42 |
| 3.4.2 | Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien | 42 |
| 3.4.3 | Quantifizierung von DNA | 42 |
| 3.4.4 | Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten | 43 |
| 3.4.5 | Extraktion von DNA aus Agarosegelen | 43 |
| 3.4.6 | Polymerase-Kettenreaktion, PCR | 43 |
| 3.4.7 | Quantitative PCR | 43 |
| 3.4.8 | DNA-Sequenzierung | 44 |
| 3.4.9 | RNA-Isolierung | 44 |
| 3.4.10 | DNase I-Verdau | 44 |
| 3.4.11 | cDNA-Synthese | 45 |
| 3.4.12 | Molekulare Klonierung | 45 |
| 3.4.12.1 | Restriktionsverdau | 45 |
| 3.4.12.2 | Dephosphorylierung | 45 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.4.12.3 | Ligation | 46 |
| 3.4.12.4 | Transformation | 46 |
| 3.4.12.5 | Selektion und Screening | 46 |
| 3.4.13 | Electrophoretic Mobility Shift Assay | 47 |
| 3.5 | Proteinanalytische Methoden | 48 |
| 3.5.1 | Proteinextraktion | 48 |
| 3.5.2 | Konzentrationsbestimmung von Proteinen | 48 |
| 3.5.3 | SDS-Gelelektrophorese | 48 |
| 3.5.4 | Proteintransfer | 49 |
| 3.5.5 | Immunologische Detektion | 49 |
| 3.5.6 | “Strippen” von PVDF-Membranen | 49 |
| 3.6 | Dual-Luciferase Reporter Assay | 51 |
| 3.7 | Expressionsstudien | 52 |
| 3.7.1 | Transfektion mit siRNA | 52 |
| 4 | Ergebnisse | 53 |
| 4.1 | Identifikation der Promotorregionen | 53 |
| 4.1.1 | Bestimmung der <i>Transkription start sites (TSSs)</i> | 53 |
| 4.1.2 | Daten der Promotorregion | 54 |
| 4.1.2.1 | Bestimmung der relativen Promotorausdehnung | 54 |
| 4.1.2.2 | Sequenzcharakteristika der Promotoren | 55 |
| 4.1.3 | Unterschiedliche Aktivität innerhalb der <i>core complex</i> Promotoren | 56 |
| 4.1.3.1 | Aktivität der L1, L2 und L3 Fragmente | 56 |
| 4.1.3.2 | Monodirektionalität und inhibitorische Regionen | 58 |
| 4.1.4 | Der FAAP100 Promotor | 60 |
| 4.2 | Bestimmung der Transkriptionsfaktorbindestellen (TBS) | 61 |
| 4.2.1 | Identifikation mittels <i>in silico</i> Ansätzen | 61 |
| 4.2.2 | Überprüfung mittels <i>electrophoretic mobility shift assay (EMSA)</i> | 62 |
| 4.3 | Konservierte Sequenzabschnitte innerhalb der FA Promotorregionen | 65 |
| 4.3.1 | Untersuchungen mit sequenzbasierten Analysemethoden | 65 |
| 4.3.2 | Analyse von Sequenzlogos (<i>sequence logos</i>) | 67 |
| 4.4 | <i>STAT</i> und <i>SMAD knockdown</i> mit siRNA | 69 |
| 4.4.1 | <i>STAT1 knockdown</i> | 69 |
| 4.4.2 | <i>STAT4 knockdown</i> | 70 |
| 4.4.3 | <i>SMAD1 knockdown</i> | 71 |
| 4.4.4 | <i>SMAD4 knockdown</i> | 72 |
| 4.4.5 | <i>FANCA</i> Expression bei <i>SMAD/STAT knockdown</i> im Vergleich mit <i>FANCA</i> Mutationen in primären Fibroblasten | 73 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.5 | Expressionsänderungen im TGF- β und JAK / STAT Signalweg | 76 |
| 4.5.1 | Transkriptanalyse von TGF- β Mitgliedern in FA-A Patientenzellen . | 76 |
| 4.5.2 | Transkriptanalyse von JAK / STAT Mitgliedern in FA-A Patientenzellen | 78 |
| 4.6 | Zellulärer Phänotyp nach STAT und SMAD <i>knockdown</i> | 81 |
| 4.6.1 | Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen | 81 |
| 4.7 | Auswirkungen einer <i>IRF1</i> Defizienz auf die <i>FANCA</i> Expression | 86 |
| 4.7.1 | Reduzierte <i>FANCA</i> Expression nach <i>IRF1 knockdown</i> | 86 |
| 4.7.2 | Auswirkungen eines <i>IRF1 knockdown</i> auf die FANCD2 Monoubi- quitinierung | 87 |
| 4.7.3 | Untersuchungen des zellulären Phänotyps nach <i>IRF1 knockdown</i> . . | 88 |
| 4.8 | Halbwertszeiten der FA <i>core complex</i> Proteine | 89 |
| 4.8.1 | Bestimmung und Vergleich der Halbwertszeiten | 90 |
| 4.9 | Kodongebrauch (<i>codon usage</i>) | 91 |
| 5 | Diskussion | 94 |
| 5.1 | Charakteristika der Promotorbereiche | 95 |
| 5.2 | Transkriptionelle Verknüpfung mit anderen Signalwegen | 96 |
| 5.3 | Posttranslationale Regulation der FA <i>core complex</i> Gene | 102 |
| | Literaturverzeichnis | 107 |
| | Anhang I | 120 |
| | Abkürzungen | 120 |
| | Primersequenzen | 123 |
| | Klonierungsstrategien und Vektorkarten | 126 |
| | Anhang II | 128 |
| | Eigene Publikationen | 128 |
| | Lebenslauf | 130 |
| | Danksagung | 131 |

Kurzfassung

FANCONI ANÄMIE (FA) ist eine autosomal rezessive, im Falle der Untergruppe FA-B X-chromosomale Erbkrankheit, die mit chromosomaler und genomischer Instabilität verbunden ist und sich durch große phänotypische und genetische Heterogenität auszeichnet. Symptomatisch sind Knochenmarksversagen, eine Vielfalt angeborener Fehlbildungen, die weit überdurchschnittliche Disposition für akute myeloische Leukämie (AML), Plattenepithelkarzinome (SCC) sowie eine zelluläre Hypersensitivität gegenüber DNA Doppelstrang-vernetzenden Substanzen. FA wird kompliziert durch ein progressives Knochenmarksversagen. Die FA Proteine sind essentiell für die *interstrand crosslink (ICL) repair* sowie an anderen DNA Reparatursystemen, beteiligt. Bisher wurden hauptsächlich Regulationsmechanismen untersucht, die die FA Proteine betreffen. Die Regulation der Transkripte war bisher nahezu unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation der sogenannten FA *core complex* Gene untersucht. Dabei handelt es sich um acht Gene, deren Produkte im Falle eines DNA Schadens den ersten Proteinkomplex des FA / BRCA Signalweges bilden. Für diese acht Gene wurden in dieser Arbeit die Promotoren identifiziert und ihr Aktivierungspotential charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass diese ein starkes Potential für die Transkriptionsinitiierung besitzen. Des Weiteren zeigten sich Gemeinsamkeiten in Form von Sequenzmotiven sowie Transkriptionsfaktorbindestellen, die in allen *core complex* Genen nahezu identisch waren. Durch diese Analysen ergaben sich Hinweise, dass die untersuchten Gene durch Mitglieder des JAK / STAT (STAT1/4) sowie des TGF- β Signalwegs (SMAD1/4) reguliert werden. Funktionelle Untersuchungen mittels siRNA sowie Fibroblastenzelllinien, die biallelische FANCA Mutationen trugen, bestätigten diese Verbindungen. So hatte der *knockdown* der entsprechenden Transkriptionsfaktoren einen reduzierenden Einfluss auf die Transkriptmenge der *core complex* Gene. *FANCA*-mutierte Zelllinien weisen reduzierte mRNAs von STAT und SMAD auf. Darüber hinaus fanden sich signifikante Änderungen der Transkriptmenge in 112 verschiedenen Mitgliedern dieser Signalwege in den FA-A Zelllinien. Eines dieser Mitglieder, IRF1, zeigte fast identische Ergebnisse wie sie bei STAT1/4 sowie SMAD1/4 beobachtet werden konnten. Die vorliegende Arbeit trägt dazu bei, die transkriptionelle Regulation der *core complex* Gene besser zu verstehen. Die auffälligen Gemeinsamkeiten ihrer Regulation liefern neue Argumente für eine Koevolution dieser Gene.

Abstract

FANCONI ANEMIA (FA) is an autosomal recessive, in the case of subgroup B X-linked, disease that is characterized by chromosomal and genomic instability. FA reveals remarkable phenotypic and genetic heterogeneity. Clinical symptoms include the variable presence of typical congenital malformations, progressive bone marrow failure, and a pronounced predisposition for the occurrence of malignancies such as acute myelogenous leukemia (AML) and squamous cell carcinoma (SCC). The FA proteins are essential for the repair of DNA-interstrand crosslinks and are members of the DNA damage response network. This is why FA cells are hypersensitive to agents inducing doublestrand lesions. In the past, a major topic of research was the interaction of the FA proteins. In this thesis work, transcriptional regulation of the FA *core complex* genes was investigated. These genes include eight members that form, in response to DNA damage, the first protein complex acting in the FA / BRCA pathway. As part of this thesis, the promoters of the FA *core complex* genes were identified, and their potential for transcriptional activation was studied. All of them revealed strong power for transcriptional activation. There were marked similarities among them including the presence of two shared sequence motifs, of transcription factor binding sites and in the presence of repressor elements defining them as bipartite in their nature. These analyses provided clues that these genes are regulated, in part, by components of the JAK / STAT (STAT1/4) and the TGF- β signaling pathways. Functional studies including knockdown experiments or using fibroblast lines with biallelic mutations in *FANCA* confirmed these connections. Down-regulation of the designated transcription factors decreased the transcript levels of the FA *core complex* genes. Likewise, *FANCA*-mutant cell lines showed reduced amounts of mRNA of *STAT* and *SMAD*. Moreover, there were significant changes in the expression of 112 members of the corresponding signaling pathways in FA-A cell lines. The present work contributes to a better overall understanding of the transcriptional regulation of the FA *core complex* genes. Shared similarities provide arguments in favor of a co-evolution of these genes.

1 Kapitel 1

Einleitung

1.1 DNA Reparatursysteme

1.1.1 DNA Reparatur

DNA-Schäden durch exogene Faktoren als auch durch metabolische Prozesse sind nicht selten und ereignen sich bis zu 1 Million mal als molekulare Läsion pro Zelle und Tag. Normalerweise bleiben diese Schäden ohne Auswirkungen, da ein funktionierendes Reparatursystem diese behebt. In der Regel unterscheidet man zwischen verschiedenen DNA Schäden [1].

DNA Schäden durch endogene, zelluläre Prozesse:

- Oxidation von Basen, z.B. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG)
- Alkylierung von Basen, meist durch eine Methylierung z.B. 7-Methylguanin, 1-Methyladenin oder 6-O-Methylguanin
- Hydrolyse und Verlust von Basen, Beispiele hier: Desaminierung, sperrige Basenveränderungen, Depurinierung sowie Depyrimidierung
- Fehlpaarungen von Basen z.B. durch Fehler in der Replikation

Exogene Faktoren können sehr vielfältig sein:

- UV-B und UV-C Strahlung führt charakteristischerweise zu Verbindungen zwischen benachbarten Pyrimidinbasen z.B. Cyclobutandimere (CPDs), Pyrimidindimere (6-4 Photoprodukte). Diese entstehen als direkte DNA - Schäden.
- UV-A Strahlung erzeugt freie Radikale. Dadurch entstehen indirekte DNA - Schäden.
- Ionisierende Strahlung als radioaktive oder kosmische Strahlung kann zu Strangbrüchen in der DNA führen. Diese können nur begrenzt repariert werden und die

verbleibenden Läsionen können zu frühzeitigem Altern und der Entstehung von Krebs führen.

Aufgrund der Vielzahl der Möglichkeiten, die einen DNA Schaden verursachen, muss die Zelle in der Lage sein, diese Schäden zu beheben, um ihre Aufgaben zu gewährleisten. Dafür gibt es verschiedene Reparatursysteme, welche explizit auf die verschiedenen Typen von Schäden spezialisiert sind. Ist ein Reparatursystem, zum Beispiel durch Mutationen, defekt, kann dies weitreichende Folgen haben. Verschiedene Krankheiten, welche später genannt werden, stehen in direktem Zusammenhang mit Reparatursystemen, welche ihre Aufgaben nicht mehr komplett erfüllen können. Nach einem DNA Schaden, der mit der Zellteilung interferieren würde, werden die Zellzyklus-*checkpoints* aktiviert. Diese sind während der Zellteilung dafür verantwortlich, dass die für die Zellteilung verantwortlichen Schritte chronologisch korrekt ablaufen. Wird ein *checkpoint* aktiviert, führt dies zu einem Pausieren des Zellzyklusses und ermöglicht der Zelle, so den DNA Schaden zu reparieren, bevor sich die Zelle teilt. DNA Schaden-*checkpoints* treten jeweils an der Grenze der G1 / S Phase, S / G2 sowie an der G2 / M Phase auf. Zusätzlich gibt es noch einen intra-S Phasen und einen Mitose *checkpoint*. Die Aktivierung der *checkpoints* wird durch zwei sogenannte Masterkinasen zentral kontrolliert, ATM und ATR. Beide gehören zu den Sensor-Proteinkinasen der PIKK-Familie (*PI-3-kinase-like kinase*). Während ATM Doppelstrangbrüche und Störungen in der Chromatinstruktur signalisiert, reagiert ATR hauptsächlich auf blockierte Replikationsgabeln. Die beschriebenen Kinasen phosphorylieren Zielmoleküle *downstream* in der Signalkaskade, welche dazu führen können, dass der Zellzyklus stoppt. Für das *Downstream-Signaling* von ATM ist der MNR-Komplex von entscheidender Bedeutung, der aus den Genprodukten von *MRE11*, *NBS1* sowie *RAD50* besteht. Die Funktion von ATR wird durch ATRIP und weitere Sensor-Proteine unterstützt, die Bestandteile der RAD17- und 9-1-1-Komplexe sind. Durch direkte Phosphorylierung oder über die Mediatoren wie MDC1, TP53BP1, BRCA1 oder TopBP1 werden die Kinasen CHK1 und CHK2 aktiviert, die das Signal zu Effektoren weiterleiten. Bei diesen Effektoren der Zellzykluskontrolle handelt es sich um die Komponenten der Zellzyklus-Maschinerie und DNA-Replikationsfaktoren wie die CDC25-Phosphatase. Bei größeren Schäden, welche nicht durch die beschriebenen Mechanismen behoben werden können, kommt es zur Aktivierung der p53 Signalkaskade. P53 ist ein zentrales *downstream* Ziel von ATM und ATR, um die Apoptose nach DNA Schäden zu induzieren. Am G1 / S *checkpoint* deaktiviert p53 den CDK / cyclin E Komplex während p21 durch Deaktivierung des CDK1 / cyclin B Komplex den G2 / M *checkpoint* vermittelt [2].

1.1.2 Basenexzisionsreparatur (*Base Excision Repair - BER*)

Bei der Basenexzisionsreparatur (BER) (Abb. 1.1) werden Helix-verformende Basenveränderungen korrigiert. Dies geschieht ca. 20000 x/Tag und ist demnach einer der häufigsten Reparaturvorgänge in der Zelle. Basenveränderungen die dazu führen, dass die Helixstruktur der DNA von der Norm abweicht, werden durch eine Glykosylase erkannt und herausgeschnitten werden. Insgesamt gibt es 8 verschiedene Gene, welche für die entsprechenden Glykosylasen kodieren. Eine Endonuklease und eine Phosphodiesterase entfernen das Desoxyribose-5-Phosphat. Die neue Base wird mit Hilfe der DNA Polymerase β eingeführt und die Lücke durch eine Ligase unter ATP Verbrauch geschlossen. Die Glykosylase MYH steht in Verdacht die Entstehung von Darmkrebs zu begünstigen [3].

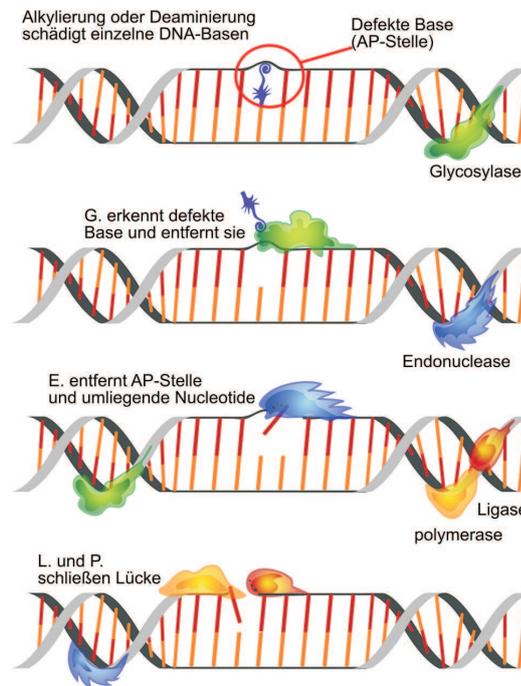


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Basenexzisionsreparatur (BER). Hier wird nur ein Basenpaar herausgeschnitten. (AP) AP-Endonuklease, (G) Glykosylase, (E) Endonuklease, (L) Ligase und (P) Polymerase (Quelle: Mariana Ruiz Villarreal)

1.1.3 Nukleotidexzisionsreparatur (*Nucleotide Excision Repair - NER*)

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) unterscheidet sich von der BER einerseits durch die Verwendung unterschiedlicher Enzyme, die den Reparaturvorgang katalysieren, andererseits durch die Anzahl der herausgetrennten Basenpaare (Abbildung 1.2a und 1.2b). Selbst wenn nur eine Base betroffen ist, werden mehrere Basen herausgeschnitten. Die Schadenserkenkung erfolgt in der Regel durch drei Proteine, DDB1, XPE sowie HR23B, welche sich an die Schadensstelle anlagern. Bei der sogenannten *Transcription Coupled Repair (TCR)*, welche Schäden an der aktuell zu transkribierenden DNA behebt, bildet sich ein XPE-DDB1 Dimer, während bei der *Global Genome Repair (GGR)* XPE und HR23B zusammenarbeiten. Bei der TCR ist es von Bedeutung, dass die, durch die Schädigung blockierte RNA Polymerase II, entfernt wird, um dadurch den TCR-Proteinen Zugriff zur DNA-Schädigung zu ermöglichen. Dieses Entfernen der RNA Polymerase II wird durch

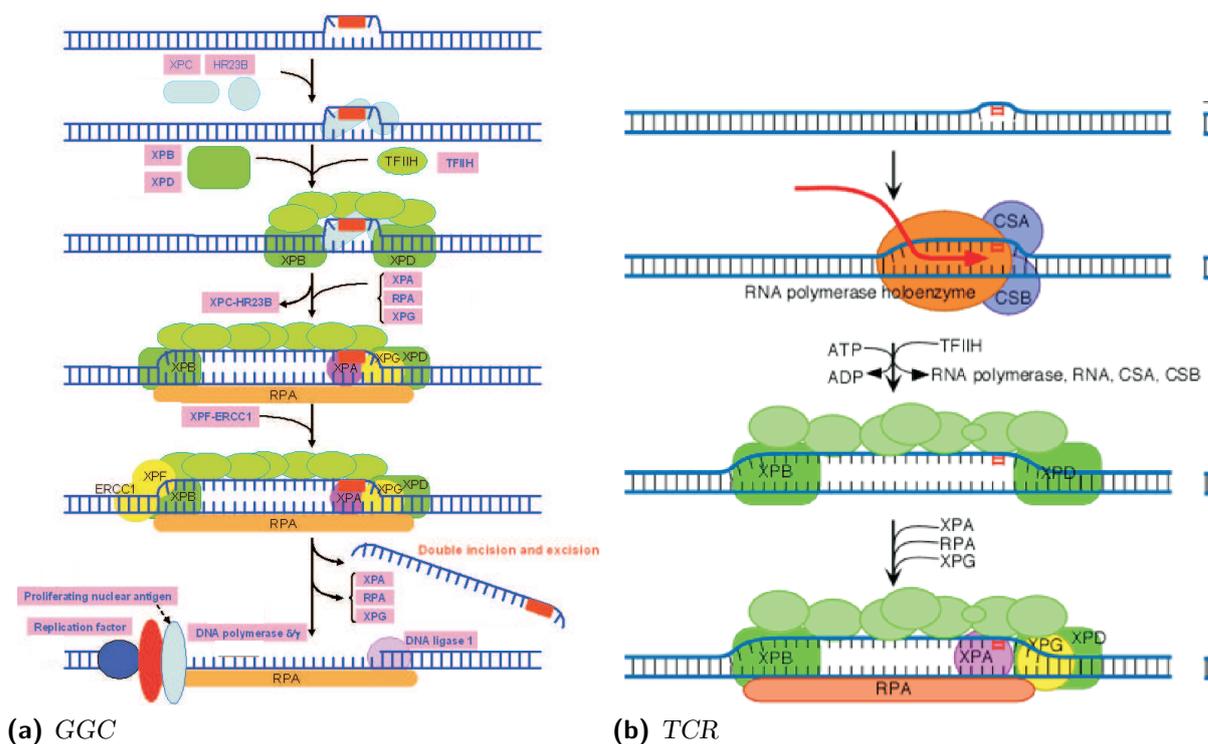


Abbildung 1.2 Nukleotidexzisionsreparatur: (a) GGR - NER, XPC / HHR23B erkennt die Schadensstelle und rekrutiert XPB und XPD um die DNA an der Läsion zu entwenden. XPG und XPF / ERCC1 schneiden die beschädigte Stelle vom 3' zum 5' Ende heraus. Die Neusynthese erfolgt durch die Polymerasen δ und ϵ . Ligation mit DNA-Ligase I. (b) TCR - NER wie sie in transkriptionell aktiven Genen vorzufinden ist. Hier wird die Auflösung des RNA-Polymerase-Holoenzym durch CSA und CSB gewährleistet. Die weiteren Schritte sind mit der GGR identisch. (Weitere Einzelheiten, siehe Text). Abbildung modifiziert nach Huberman, Roswell Park Cancer Institute

CSA und CSB ermöglicht. Die weiteren Schritte sind bei beiden Reparaturwegen identisch. XPA und RPA dienen der weiteren DNA-Schadenserkennung und dirigieren die Helikasen XPB und XPD zur Läsion, welche die DNA unmittelbar in der Nähe der Schädigung in Kombination mit TFIIH und Topoisomerasen öffnen, das *bubble building*. Die Endonukleasen XPG und XPF/ERCC1 schneiden den DNA-Strang mit der Schädigung in 3' und 5' Richtung, so dass ein ca. 30 Basen umfassendes Oligonukleotid freigesetzt wird, welches die Schädigung enthält. Nun folgt die Polymerisation des fehlenden DNA-Abschnitts durch die DNA Polymerase δ und ϵ sowie weitere Faktoren. Als letztes erfolgt die Ligation des synthetisierten Abschnitts durch die DNA-Ligase I [4]. Mutationen in Genen, deren Genprodukte an der NER beteiligt sind, können zu schwerwiegenden Krankheiten führen. Ein prominentes Beispiel ist *Xeroderma pigmentosum (XP)*, eine rezessiv vererbte Krankheit, welche sich durch eine schwere Lichtempfindlichkeit und Pigmentierungsstörungen der Haut darstellt. Neben neurologischen Defekten haben Patienten ein sehr hohes Risiko an verschiedenen Formen von Hautkrebs (Basaliom, Keratoakanthom, malignes Melanom

oder spinozelluläres Karzinom) zu erkranken. Für die Krankheit werden Mutationen in *XPA*, *XPB*, *XPD*, *XPF* oder *XPG* verantwortlich gemacht. Eine weiterer Defekt in Genen der Nukleotidexzisionsreparatur führt zum *Cockayne's syndrome*. Hierbei handelt es sich konkret um eine Störung der TCR-NER, die ebenfalls wie *XP* mit einer erhöhten Lichtempfindlichkeit einhergeht. Zusätzlich können Fehlbildungen der Extremitäten und Minderwuchs beobachtet werden. Aufgrund von neurologischen Defekten versterben Patienten relativ früh aufgrund von neuronaler Degeneration. Verantwortlich gemacht werden für diese Erkrankung Mutatinen in den Genen *CSA* und *CSB*.

1.1.4 Basenfehlpaarungsreparatur (*Mismatch Repair - MMR*)

Bei dieser Art der Strang spezifischen Reparatur werden fehlgepaarte Basen korrigiert, wie sie zum Beispiel bei der Replikation eingebaut werden können. Allerdings betrifft dies nur Fehler in der normalen Watson-Crick Basenpaarung, also keine methylierten oder umgewandelten Basen. Normalerweise kontrolliert die Polymerase noch während der Synthese des DNA Stranges auf diese Fehler, das sogenannte Korrekturlesen (*proofreading*). Findet dies nicht statt oder ist es fehlerhaft, kommt es zu einem starken Anstieg von Mutationen in der DNA. Die beteiligten Proteine, MutS, MutL und MutH wurden zuerst bei *E. coli* beschrieben und deren Funktion dort aufgeklärt. In Eukaryoten orientiert sich die Nomenklatur an *E. coli*. So steht MSH für **MutS** homolog. Beim Menschen kennen wir die MutS Homologen *MSH2*, *MSH3* und *MSH6*, wobei die Proteine von MSH2 / MSH3 und MSH2 / MSH6 Heterodimere bilden. Die MutL Homologen bestehen aus *MLH1*, *MLH3*, *PMS1* und *PMS3*. MLH1 und die anderen drei MutL Homologen bilden in dieser Gruppe ebenfalls Heterodimere. Diese Proteinkomplexe sind einerseits

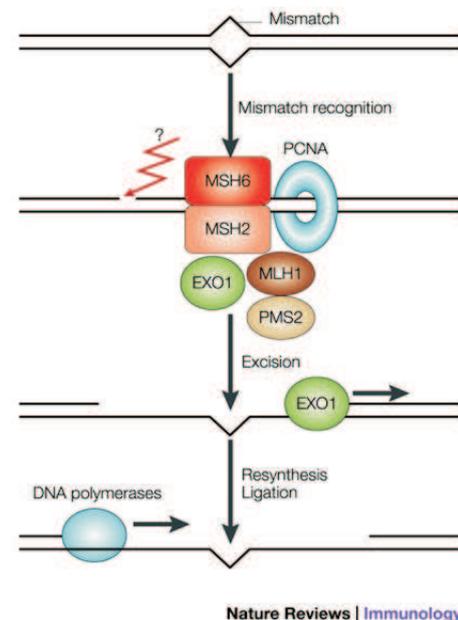


Abbildung 1.3 Vereinfachtes Modell der Fehlpaarungsreparatur. Gezeigt sind die wichtigsten Proteinkomplexe die bei Fehlpaarungen in der Replikation die DNA Schädigung erkennen und reparieren. MSH6 und MSH2 sind mit dem proliferating-cell-nuclear-antigen (PCNA) die Hauptfaktoren für die Erkennung der Fehlpaarung und die Unterstützung der Polymerase γ während der Replikation der betroffenen Sequenzen. EXO1 schneidet die Fehlbasis heraus. Abbildung aus [5]

für die Erkennung der Fehlpaarung verantwortlich, andererseits wird das Herausschneiden mittels einer Exonuklease vermittelt. Die Erkennung der Lücke sowie deren Auffüllung wird durch die Polymerase γ sowie die Proteine PCNA und RFC vermittelt (Abbildung 1.3). Mutationen in den menschlichen Homologen der Mut Proteine wirkt sich auf die genomische Stabilität aus und kann zu einer *Microsatelliten Instabilität (MSI)* führen, wie man sie häufig in menschlichen Tumoren findet. Insbesondere eine Form des Kolonkarzinoms, die erbliche nicht polypöse Form (HNPCC), ist direkt mit Mutationen in den Genen, die für MSH2 und MLH1 kodieren assoziiert. Wie die übrigen DNA-Reparaturgene können auch diese beiden als Tumorsuppressorgene klassifiziert werden. Ein Subtyp von HNPCC ist auch als Muir-Torre Syndrome (MTS) bekannt und zusätzlich mit Tumoren der Haut assoziiert.

1.1.5 Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB)

Doppelstrangbrüche, bei der beide Stränge der Doppelhelix betroffen sind, können schwerwiegende Konsequenzen haben, da dies zu genomischen Rearrangements führen kann. Um Doppelstrangbrüche zu reparieren, bedient sich der menschliche Organismus zweier Mechanismen. So gibt es das *non-homologous end joining (NHEJ)* sowie die homologe Rekombination (HR) (Abb. 1.4) [6].

1.1.5.1 Non-homologous end joining (NHEJ)

Um die Reparatur von Doppelstrangbrüchen zu gewährleisten, bedient sich das NHEJ kurzer homologer DNA Sequenzen, die Mikrohomologien (*microhomologies*) genannt werden. Mikrohomologien entstehen durch Einzelstrangüberhänge an den Enden der Doppelstrangbrüche. Wenn diese Überhänge perfekt kompatibel sind, wird der Schaden akkurat behoben. Im Falle eines DSBs bindet ein Heterodimer aus Ku70 und Ku80 an den Bruchpunkten und rekrutiert die DNA-PK_{CS} an die Juxtaposition. Im Anschluss schneidet eine Nuklease (ARTEMIS) die fehlerhafte Stelle heraus und die von XRCC4 rekrutierte Ligase (Ligase IV) verbindet den durch die Pol λ und Pol μ synthetisierten Strang (Abb. 1.4). Ein weiterer Komplex ist sehr früh am NHEJ beteiligt, namentlich der MRN Komplex, der aus den Komponenten MRE11, RAD50

Tabelle 1.1 *Beteiligte Gene und Proteine beim non-homologous end joining (NHEJ)*

| Gen | Protein |
|---------|-----------------------------------|
| Lig. 4 | DNA-Ligase IV |
| XRCC4 | XRCC4 |
| XRCC5 | Ku80 |
| XRCC6 | Ku70 |
| XRCC7 | DNA-PK _{CS} ¹ |
| ARTEMIS | Nuklease |

¹PKcs= proteinkinase catalytic subunit

und NBS1 besteht. Beim NHEJ bindet er als eine Art Brückenkopf direkt an den Enden des gebrochenen Strangs. Während der Meiose ist der MRN Komplex essentiell für die Einfügung und Reparatur von programmierten Doppelstrangbrüchen, welche die meiotische Rekombination einleiten. Aus humangenetischer Sicht ist dieser Proteinkomplex von Interesse, da dieser mit zwei genetischen Erkrankungen assoziiert ist. Mutationen im *NBN* Gen führen zum Nijmegen-breakage-syndrome (NBS). Im Normalfall ko-lokalisieren MRE11, RAD50, und NBS1 in Kernfoci nach der Einfügung von Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung. Bei NBS Patienten mit *NBN* Mutationen findet diese Ko-lokalisierung nicht statt weil das Genprodukt Nibrin defekt ist. NBS1 und RAD50 sind ebenfalls Mitglieder des ATM Signalwegs, welcher, bei Mutationen im *ATM* Gen, zu ataxia telangiectasia (AT) führt. Ebenfalls, wie NBS ist AT, eine Krankheit mit u.a. erhöhter Chromosomenbrüchigkeit. Weitere Krankheiten mit Chromosomenbrüchigkeit sind das Werner Syndrom sowie das Bloom Syndrom [7, 8].

1.1.5.2 Homologe Rekombination (HR)

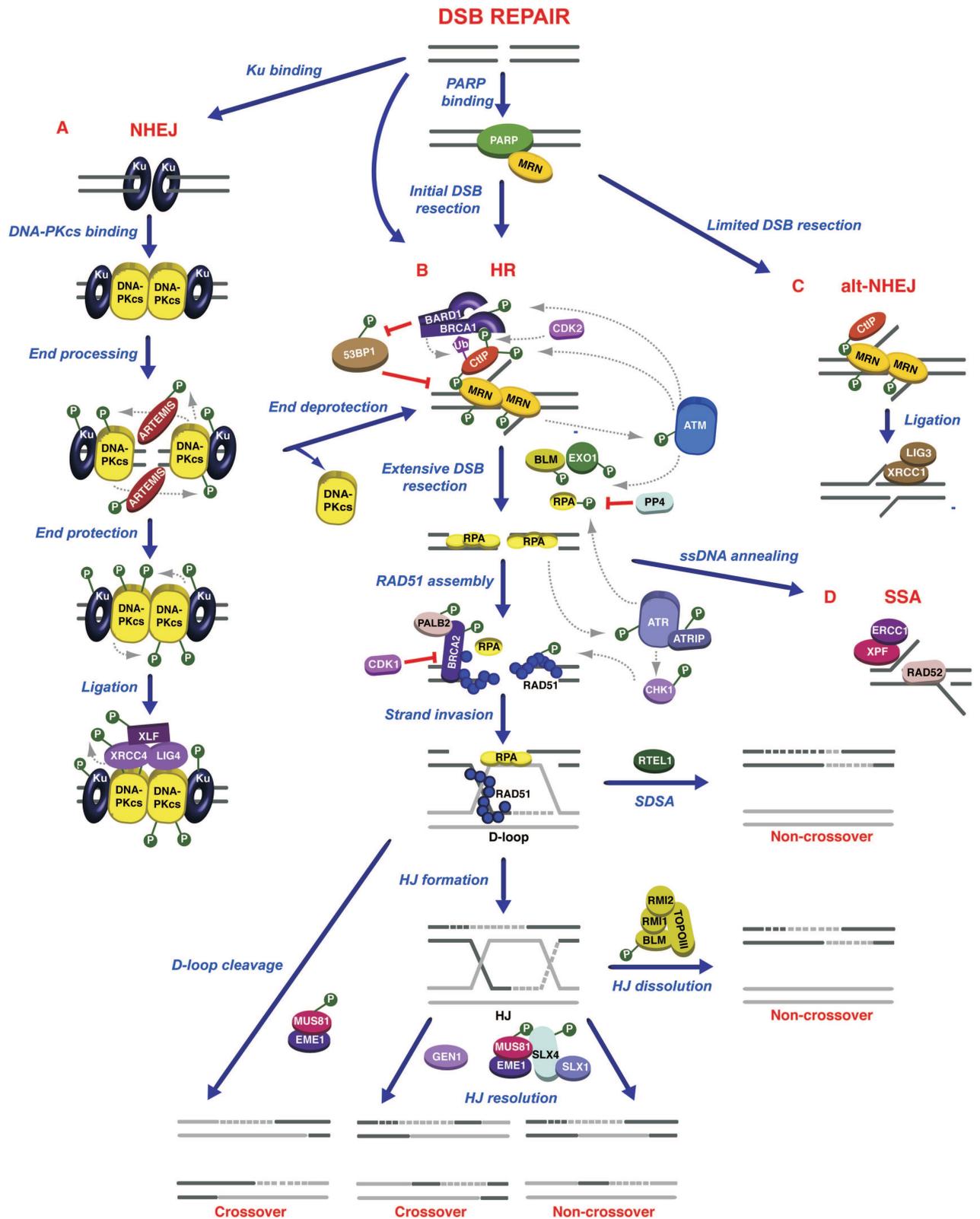
Homologe Rekombination ist kein einheitlicher Prozess; das heißt, es gibt mehrere verschiedene Modelle, die je nach Situation Anwendung finden. So kennt man das Modell DSBR (*double strand break repair*), SDSA (*synthesis dependent strand annealing*), SSA (*single strand annealing*) sowie BIR (*break induced replication*). Man unterscheidet bei DSBR und SDSA zwischen der Bildung von *crossover* (DSBR) und keinen *crossover* (SDSA). SSA findet häufig bei Sequenzwiederholungen statt und BIR ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Homologe Rekombination repariert DNA bevor die Zelle in die Mitose eintritt (M-Phase), also in der S- und G2-Phase des Zellzyklusses. DSBR und SDSA haben beide die Bildung sogenannter *Holliday junctions* gemein. Dies beschreibt die Entstehung eines Kreuzungspunktes von vier DNA Strängen während des *crossingover*. Dadurch entsteht Heteroduplex DNA. Das Modell der SDSA benötigt einzelsträngige DNA, welche ein komplementäres Gegenstück im doppelsträngigen DNA Molekül findet. Wichtige beteiligte Gene sind: *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57* und *RAD59*. Beim *single strand annealing* reichen zwei einzelsträngige DNA Abschnitte, die komplementär zueinander sind. Beteiligte Gene: *RAD52* und *RAD59* (Abb. 1.4).

1.1.6 Interstrand cross link repair (ICL)

Die ICL Reparatur (Abb. 1.5) beschreibt einen äußerst komplexen Vorgang, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Hierbei handelt es sich um kovalente Quervernetzungen zwischen den DNA Strängen, welche durch Chemikalien, respektive Chemotherapeutika

wie Cisplatin oder Mitomycin C (MMC), aber auch durch andere endo- und exogene quervernetzende Substanzen entstehen. Durch diese Quervernetzung kommt es zu einer Blockierung von Transkription und Replikation. Die Replikationsgabel kann nicht weiter fortschreiten. Bei der ICL Reparatur kommen die verschiedenen Reparaturmechanismen wie sie oben beschrieben wurden zusammen. So muss zwischen der Reparatur von cross-links in der S-Phase wie auch der G1-Phase unterschieden werden, da bedingt durch die unterschiedlichen Phasen auch andere Proteine und Mechanismen zur Anwendung kommen. Am Ende eines Reparaturvorgangs kann die entstandene Lücke wiederum durch DSB Mechanismen oder durch NER geschlossen werden. Eine essentielle Gruppe von Proteinen, die die ICL gewährleisten, sind die Proteine des Fanconi Anämie (FA) Signalweges. ICL blockierte Replikationsgabeln aktivieren den FA Signalweg. Der FANCM-Remodeling-Komplex assoziiert an die blockierte Replikationsgabel bis der *core complex*, die Monoubiquitinierung des FANCD2 / FANCI (ID) Komplex vorantreibt. Durch die Phosphorylierung von FANCI und FANCD2 durch ATR wird die Ubiquitinierung des ID Komplexes reguliert, ebenso wie die anschließende Relokalisierung an der blockierten Replikationsgabel. Möglicherweise durch die Interaktion mit FAN1 reguliert der monoubiquitinierte ID Komplex ein Öffnen der DNA (FANCI) und ein Schneiden der Stränge am ICL (FANCP). Eine möglicherweise FAN1 anhängige Doppelstrangbruch Resektion hinterlässt eine

Abbildung 1.4 (nächste Seite) DNA Reparatur Signalwege die in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind. (A) Eine schnelle Bindung von Ku an DSBs befördert das NHEJ durch die Rekrutierung von DNA-PK_{CS}. Sequentielle Phosphorylierung mehrerer DNA-PK_{CS} Aminosäurecluster befördert die Prozessierung von DNA Enden durch ARTEMIS, gefolgt von einer DNA-PK_{CS}-abhängigen Protektion der DNA Enden, welche für die Ligation benötigt werden. (B) HR-Reparatur als Alternative zu NHEJ; MRN, welches von PARP in Konkurrenz zu Ku an die DSBs rekrutiert wird, ermöglicht die primäre Resektion der DSB zusammen mit CtIP und BRCA1. Dies befördert die homologe Rekombination in der S und G2 Phase. TP53BP1 besitzt hier eine inhibitorische Rolle und wird negativ von BRCA1 reguliert. Der MRN/CtIP/BRCA1 Komplex kann eine Resektion von DSB übernehmen, falls bei einem fehlgeschlagenen NHEJ ungeschützte DNA Enden vorhanden sind. Eine extensive Entfernung von DSBs und die Bildung von RPA-verpackter 3' ssDNA Enden wird durch EXO1 und BLM gewährleistet. Der Austausch von RPA an den 3' ssDNA Enden und der Zusammenschluss von RAD51 Filamenten wird von BRCA2 vermittelt und führt zu einer Invasion der DNA Stränge zu einer homologen DNA Sequenz. Die Rekrutierung von RAD51 an die ssDNA Enden wird durch den ATR Signalweg reguliert. Die entstehende D loop Struktur kann während der SDSA entweder durch MUS81/EME1 geschnitten, oder durch RTEL1 ersetzt werden, um entweder crossover oder non-crossover Ereignisse zu generieren. Non-crossovers können ebenfalls durch die Auflösung von Holliday junctions (HJs) durch den BLM/TOPOIII Komplex generiert werden, wohingegen die Auflösung von HJs durch die GEN1 Nuklease beziehungsweise SLX1/SLX4, in crossover sowie non-crossover Ereignisse münden kann. (C) Eine begrenzte Resektion der DSBs durch CtIP und MRN in der G1 Phase führt zu einem alternativen NHEJ. (D) Nach dem Auflösen des DSB können 3' ssDNA Enden mit homologen Sequenzen direkt an RAD52 gebunden werden. Modifiziert nach [9]



Lücke, die u.a. mittels Translesion-Synthesis (TLS) geschlossen wird. Stranginvasion des zweiten Allels sorgen für den Einsatz des authentischen Nukleotids an der betreffenden Position [10, 11].

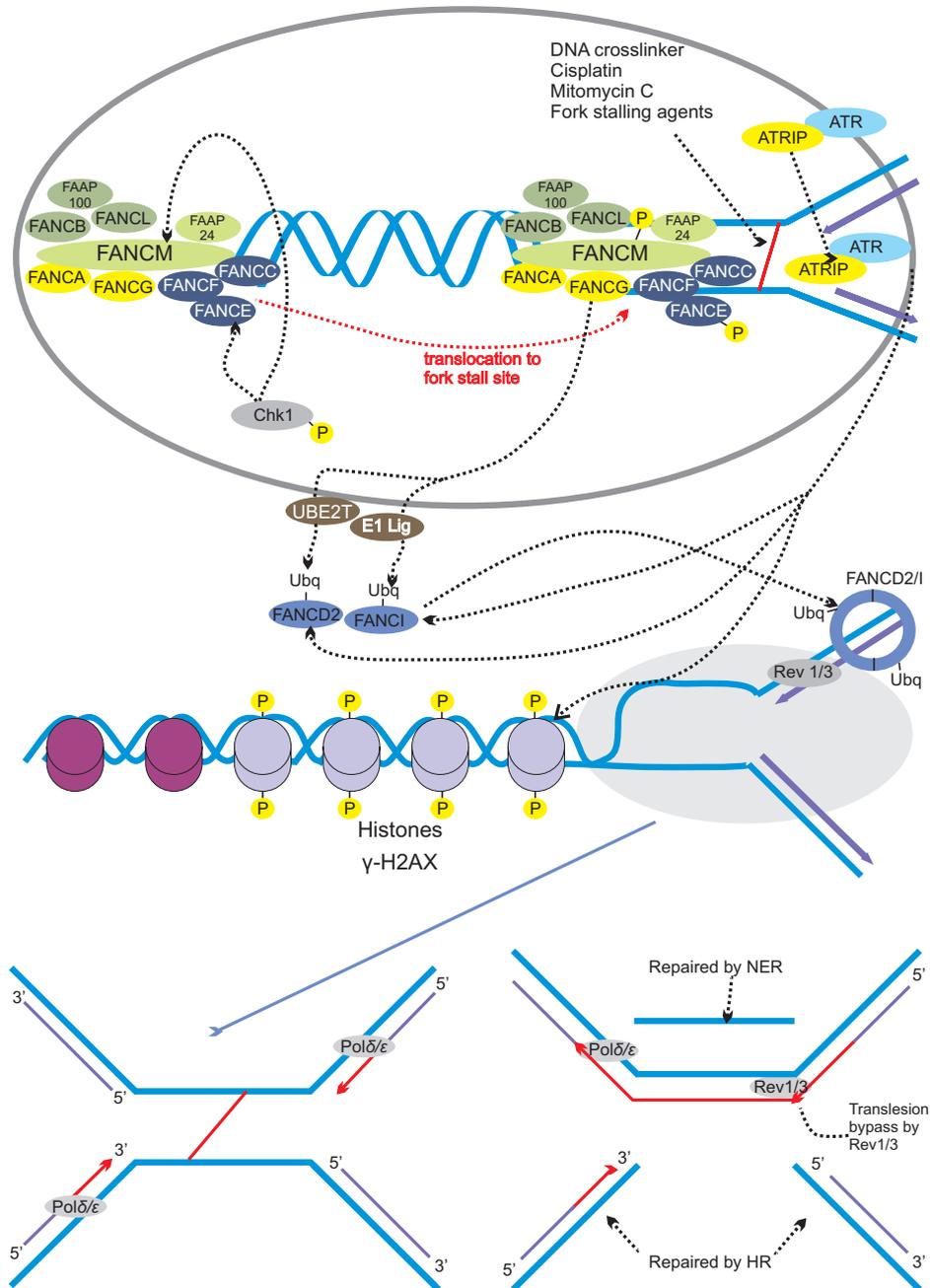


Abbildung 1.5 Darstellung der *interstrand cross link repair* (ICL) mit den beteiligten Proteinen. Der Fanconi Anämie core complex bildet dabei den größten Proteinkomplex der sich direkt bei Verlinkung der beiden Stränge anlagert und die Auflösung initiiert. Die ICL ist kein isolierter Mechanismus sondern wird durch die Nukleotidexzisionsreparatur sowie die homologe Rekombination ergänzt. Modifiziert nach Abcam[®].

1.2 Fanconi Anämie (FA)

1.2.1 Definition

Fanconi Anämie (FA, OMIM #227650) ist eine autosomal-rezessive beziehungsweise, im Falle des Subtyps FA-B, X-chromosomale Erkrankung die mit chromosomaler Instabilität verbunden ist und sich durch eine große phänotypische und genetische Heterogenität auszeichnet. Symptomatisch sind Knochenmarksversagen, eine Vielfalt angeborener Fehlbildungen wie zum Beispiel eine Radialstrahlanomalie, eine weit überdurchschnittlich erhöhte Gefahr der Entwicklung von akuter myeloischer Leukämie (AML), Plattenepithelkarzinome (SCC) sowie eine zelluläre Hypersensitivität gegenüber DNA strangvernetzenden Substanzen. FA manifestiert sich durch einen progressiven Ausfall des hämatopoetischen Systems.

1.2.2 Klinische Beschreibung

1927 beschrieb GUIDO FANCONI, ein Schweizer Kinderarzt, eine Familie mit drei Jungen, welche diverse angeborene Fehlbildungen besaßen und zwischen fünf und sieben Jahren eine schwere Panzytopenie entwickelten [12]. Später wurde eine Reihe von FA Fällen beschrieben, die nicht durch Fehlbildungen auffielen (ungefähr 30 %), aber immer mit hämatologischen Defekten. Ebenfalls konnte eine inter- und intrafamiliäre Heterogenität beobachtet werden [13, 14]. FA wird klinisch charakterisiert durch Panzytopenie, progressive aplastische Anämie, diverse angeborene Fehlbildungen und zusätzlich eine signifikant erhöhte Gefahr bestimmte Malignome zu entwickeln (AML, SCC). Die angeborenen Anomalien beinhalten Skelettmalformationen, Hyperpigmentierung, urogenital, renale sowie kardiale Anomalien (Vergl. Abb. 1.7) [15]. Die hämatologischen Auffälligkeiten resultieren aus verschiedenen Dysfunktionen des Knochenmarks (Thrombozytopenie, progressive Panzytopenie), die häufig um ein mittleres Alter von sieben Jahren, aber gelegentlich schon kurz nach der Geburt, oder selten auch, im fortgeschrittenen Alter

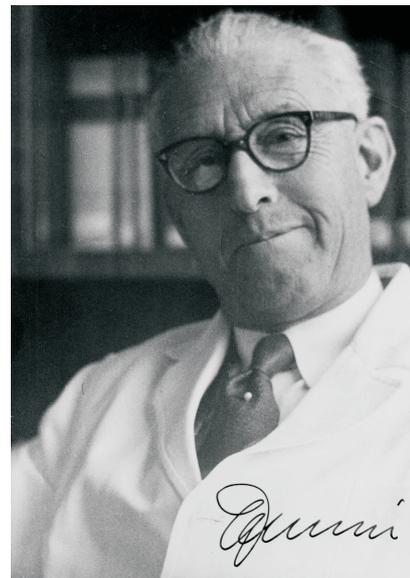


Abbildung 1.6 Der schweizer Kinderarzt GUIDO FANCONI um 1929. Nach ihm, dem Entdecker, wurde die Krankheit Fanconi Anämie benannt. (Quelle: www.scientificamerican.com)

auftauchen. Zeichen, die schon vor den hämatologischen Auffälligkeiten auf FA hinweisen können, sind prä- und postnatale Wachstumsverzögerung, diverse Skelettfehlbildungen (inklusive eines sporadisch, asymmetrisch unterentwickelten Daumens, Microphthalmie und Mikrozephalie) und / oder Hypogonadismus. Die Inzidenz für AML variiert von 19 % bis 37 % in Abhängigkeit der Komplementationgruppe. Träger einer *FANCG* Mutation haben das höchste AML Risiko [16]. Andere Tumore, die sich in FA Patienten entwickeln, sind prinzipiell hepatozelluläre Karzinome sowie insbesondere *squamous cell carcinomas (SCC)* [17, 18].

1.2.3 Inzidenz

FA kann in allen ethnischen Gruppen beobachtet werden und betrifft in etwa 1 aus 350 000 Geburten, neuere Zahlen gehen von 1 Geburt aus 1 000 000-5 000 000 aus [19, 20]. Die Trägerfrequenz (*carrier frequency*) liegt bei etwa 1:300. Neuere, noch nicht publizierte Arbeiten sprechen jedoch von etwas höheren Frequenzen, so wird für die Trägerfrequenz ein Wert von 1:187 angegeben. Einige ethnische Gruppen weisen nach heutigem Kenntnisstand, bedingt auch durch Blutsverwandschaft, eine höhere Frequenz auf: Die Aschkenasim, die Afrikaans Bevölkerung in Südafrika sowie spanische Gitanos. Die Inzidenz für die homozygote Form beträgt hier ungefähr 1:22000 und somit eine Allelfrequenz von 1:67 bzw. 1:77 (1:300 in der übrigen Bevölkerung) [21, 22].



Abbildung 1.7 Darstellung des Fanconi Anämie Phänotyps. Gut zu erkennen sind Minderwuchs, Radialstrahlhypoplasie sowie eine Fehlbildung der Daumen. (Quelle: Ralf Dietrich, FA-Hilfe)

1.2.4 Differentialdiagnose

Fanconi Anämie gehört zu einer Gruppe von Krankheiten, die mit chromosomaler und genomischer Instabilität assoziiert sind. Diese genetisch bestimmten Syndrome werden über-

greifend auch als Chromosomenbruch Syndrom oder DNA Reparatur Störungen bezeichnet. Sie sind gekennzeichnet durch eine Anfälligkeit gegenüber diversen Agenzien, welche die DNA schädigen [23]. Eine die FA-definierende Eigenschaft ist die Hypersensivität gegenüber zytotoxischen klastogenen Effekten von DNA Doppelstrang-quervernetzenden Substanzen wie Mitomycin C (MMC), Diepoxybutan (DEB) oder Cisplatin. Diese Eigenschaft ermöglicht einerseits die Erforschung der Ursachen, die dieser Krankheit zu Grunde liegen als auch die klinische Diagnostik [24, 25]. Andere genetische Krankheiten wie *Ataxia telangiectasia (AT)* oder das *Nijmegen breakage syndrome (NBS)*, die, wie FA, eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit aufweisen, sind jedoch nicht überempfindlich gegenüber DNA Doppelstrang-quervernetzenden Substanzen. Diese Eigenschaft kann dafür verwendet werden, einen zellulären Phänotyp bei FA zu definieren. [26, 27]

1.2.5 Ätiologie

ICLs, die zwei DNA Stränge kovalent miteinander verbinden, bilden eine bidirektionale Barriere gegen die Progression der Replikationsgabel und benötigt nicht weniger als vier Schnitte, TLS Polymerasen und Rekombinationsereignisse, um repariert zu werden. Komponenten des FA/BRCA Signalwegs für genomische Stabilität sind 15 Gene, welche bei FA mutiert sind (Tab. 1.2, Abb. 1.9) [28]. Acht der FA Proteine (FANCA, B, C, E, F, G, L and M) bilden den FA core complex, eine E3 ubiquitin Ligase, mit zusätzlichen, assoziierten Faktoren (FAAP24, FAAP100 und das Heterodimer MHF1 / MHF2) [29]. Das *histone-fold* Heterodimer MHF1 / MHF2 stimuliert die FANCM induzierte Umkehr der Replikationsgabel, wohingegen FAAP24 den FANCM Komplex zwischen ssDNA und dsDNA, in der Replikationsgabel hält [30, 31, 32]. FANCM hat eine Bindungsaktivität und führt den *core complex* zur DNA [33]. Mehr noch, es wurde vorgeschlagen, das FANCM mit dem BLM Komplex assoziiert und zusammen mit dem *core complex* als BARD Komplex agiert und mitverantwortlich ist für die Aktivierung des ATR Signalweges an blockierten Replikationsgabeln [34, 35, 37, 36].

Die FANCI-FANCD2 Plattform: Der FANCI-FANCD2 (ID) Komplex liegt "im Herzen" des FA Signalweges und wird von beiden Untereinheiten der FANCL ubiquitin Ligase des *core complex* ubiquitiniert [38]. Einmal ubiquitiniert, akkumuliert der ID Komplex an den DNA-quervernetzten Stellen und kolokalisiert mit weiteren FA Proteinen: BRCA2 / FANCD1, PALB2 / FANCN und FANCI [39]. Die DNA Schadensantwort reguliert den ID Komplex durch eine ATR-abhängige Phosphorylierung von FANCI und D2 sowie weiterer Komponenten des FA *core complexes*, beispielsweise FANCM [39, 40]. Aktuell wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von FANCI eine kritische Rolle im Bezug auf die Monoubiquitinierung von FANCD2 und des eigenen Moleküls spielt und so eine

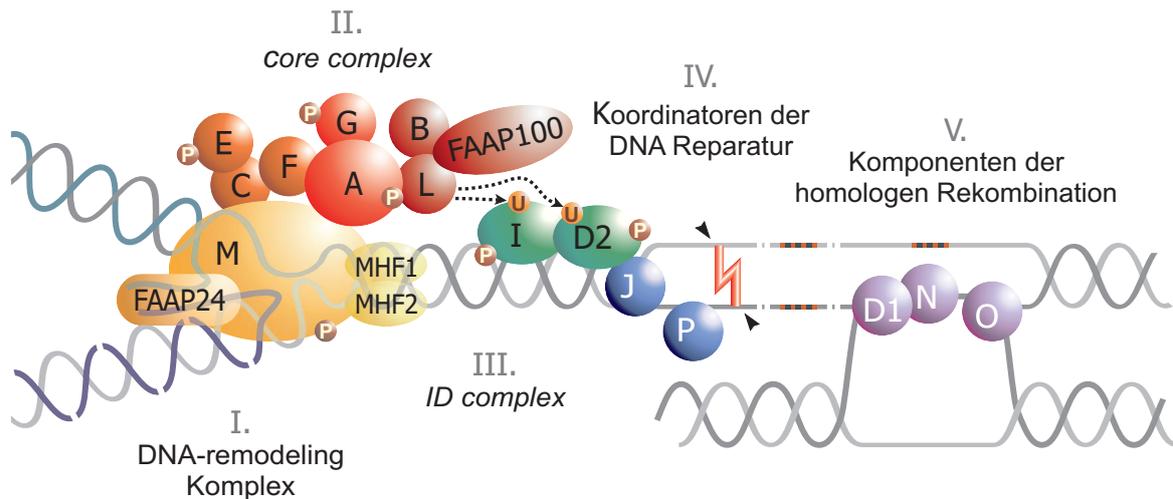


Abbildung 1.8 Übersicht des FA/BRCA Signalwegs mit den verschiedenen Komponenten (I-V). Der core complex ist gut als initialer Komplex erkennbar. Modifiziert nach [73]

Funktion als “molekularer Schalter” im FA Signalweg einnimmt [41]. Möglicherweise fördert die ID Phosphorylierung die Rekrutierung des ID Komplexes zum *core complex* für dessen Monoubiquitinierung. Der monoubiquitinierte ID Komplex ist notwendig für die Schneide- und TLS-Schritte der ICL Reparatur [42]. Ebenfalls fördert der monoubiquitinierte ID Komplex die Rekrutierung anderer *DNA damage response* (DDR) Faktoren, die für die ICL Reparatur notwendig sind. Dies beinhaltet auch die kürzlich identifizierte FAN1 Endo- und Exonuklease, die, so wurde gezeigt, mit dem ID Komplex, aber möglicherweise auch mit den Nucleasen MUS81 / EME1 und XPF / ERCC1 über eine UBZ Domäne interagiert [43, 44, 45, 46]. Der monoubiquitinierte ID Komplex scheint auch für die Bindung der TLS Polymerasen REV1 und Pol ζ verantwortlich zu sein, da sie Ubiquitininteraktionsdomänen besitzen [38]. Weitere Faktoren, die in der homologen Rekombination involviert sind, werden anschließend ebenfalls an die Schadensstelle rekrutiert, um den Doppelstrangbruch zu reparieren. Wenn die Läsion beseitigt wurde, wird der ID Komplex durch das Dimer USP1-UAF1 deubiquitiniert. Dieser Komplex von USP1-UAF1 kann auch auf das monoubiquitinierte PCNA wirken, wenn dieses mit der ELG1 Untereinheit von RFC assoziiert ist [47, 48]. Der FA Signalweg ist daher einer der deutlichsten Beispiele wie die DDR durch eine ATR / ATRIP Lokalisation und Aktivierung an den Stellen mit replikativen Stress die enzymatischen Werkzeuge kontrolliert, um zur richtigen Zeit am richtigen Ort die Reparatur der Wahl durchzuführen.

²*Diese Gene bilden den core complex

Tabelle 1.2 Übersicht über die bekannten FANC-Genloci

| Loci | Gruppe | Gen | kDa | Erstbeschreibung |
|---------|--------|---------------------|-----|---|
| 16q24.3 | FA-A | FANCA* ² | 163 | Lo Ten Foe et al., FA Consortium, 1996 [49, 50] |
| Xp22.2 | FA-B | FANCB* | 95 | Fei et al., 2005 [51] |
| 9q22.3 | FA-C | FANCC* | 63 | Strathdee et al., 1992 [52] |
| 13q12.3 | FA-D1 | FANCD1/BRCA2 | 384 | Howlett et al., 2002 [53] |
| 3p26 | FA-D2 | FANCD2 | 155 | Garcia-Higuera et al., 2001 [54] |
| 6p22p21 | FA-E | FANCE* | 58 | de Winter et al., 2000 [55] |
| 11p15 | FA-F | FANCF* | 42 | de Winter et al., 2000 [56] |
| 9p13 | FA-G | FANCG* | 68 | de Winter et al., 1998 [57] |
| 15q26.1 | FA-I | FANCI | 180 | Sims et al., Dorsman et al., Smorgorzewka et al., 2007 [58, 59, 39] |
| 17q22.2 | FA-J | FANCI/BRIP1 | 140 | Levitus et al., Levrant et al., 2005 [60, 61] |
| 2p16.1 | FA-L | FANCL* | 43 | Meetei et al., 2003 [62] |
| 14q21.2 | FA-M | FANCM* | 230 | Meetei et al., 2005 [63] |
| 16p12.2 | FA-N | FANCN/PALB2 | 131 | Xia et al., Reid et al., 2007 [64, 65] |
| 17q25.1 | FA-O | FANCO/RAD51C | 42 | Vaz et al., 2010[28] |
| 16p13.3 | FA-P | FANCP/SLX4 | 200 | Stoepker et al., Crossan et al., 2011[66, 67] |

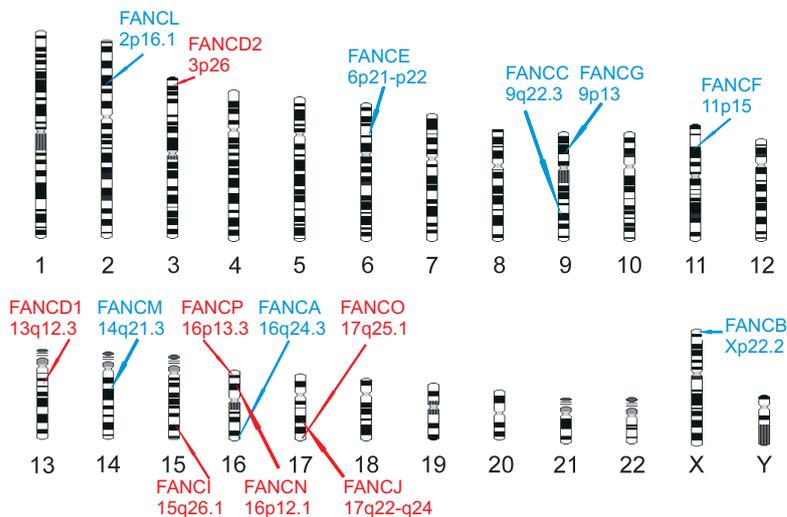


Abbildung 1.9 Lage der FANC Genloci auf den verschiedenen Chromosomen. Auffällig ist eine gewisse Häufung auf den Chromosomen 9, 16 und 17. Die Proteine der blau markierten Gene bilden den FA core complex. (Modifiziert nach Kalb et al.)

1.2.6 Behandlung

Da die Defekte, welche bei der Fanconi Anämie zu beobachten sind, genetisch determiniert sind, ist eine ursächliche Behandlung schwierig. Zur Zeit ist die häufigste Behandlungsmethode die der *hematopoietic stem cell transplantation* (HSCT) [68, 69]. Sie gilt momentan als die effektivste Methode, um den hämatologischen Defekten wie sie bei FA auftreten, entgegenzuwirken. Die Resultate dieser Methode haben sich in den letzten Jahren immer weiter verbessert, da die Protokolle für die notwendige Immunsuppression stetig weiterentwickelt und geändert wurden [70]. Eine weitere Methode ist die Gabe von Androgenabkömmlingen, also Sexualhormonen, welche ebenfalls helfen, die Blutbildung zu stabilisieren. Neben ihrer virilisierenden Wirkung, was besonders für Patientinnen unangenehm ist, bergen sie die Gefahr hepatotoxisch zu wirken und die Bildung von Lebertumoren zu begünstigen. Eine Gentherapie ist möglich, aber bisher noch nicht erfolgreich. Es wurden verschiedene Versuche gestartet, unter anderem mit lentiviralen Viren, allerdings befinden sich diese Ansätze noch im Versuchsstadium [71, 72].

1.3 Transkriptionelle Regulation

1.3.1 Transkriptionsinitiierung

Seit im Jahr 1979 die Transkription durch die RNA Polymerase II in zellfreien Extrakten nachgewiesen wurde, haben sich die Kenntnisse über die biochemischen Mechanismen in proteinkodierenden Genen stetig weiterentwickelt. Promotorstudien zeigten, dass die Transkription von einem Kontrollelement, welches wir als TATA Box kennen, abhängig ist [74]. In Metazoa Genen liegt diese TATA Box in der Regel 25-30 bp *upstream* der *transcription start site* (TSS) und ermöglicht eine exakte Initiation der Transkription durch die Interaktion mit dem TBP Protein (*TATA-binding protein*) [75]. Innerhalb der Zelle ist TBP ein Mitglied des stabilen Multiproteinkomplexes TFIID, der sich aus weiteren Proteinen wie zum Beispiel die TAFs (*TBP-associated factors*) zusammensetzt. In Promotoren mit einer TATA Box findet die Bindung der spezifischen Faktoren wie folgt statt: TFIID / TFIIA, TFIIB, RNA Polymerase II / TFIIF, TFIIE und TFIIH (Abb. 1.10) [76, 77].

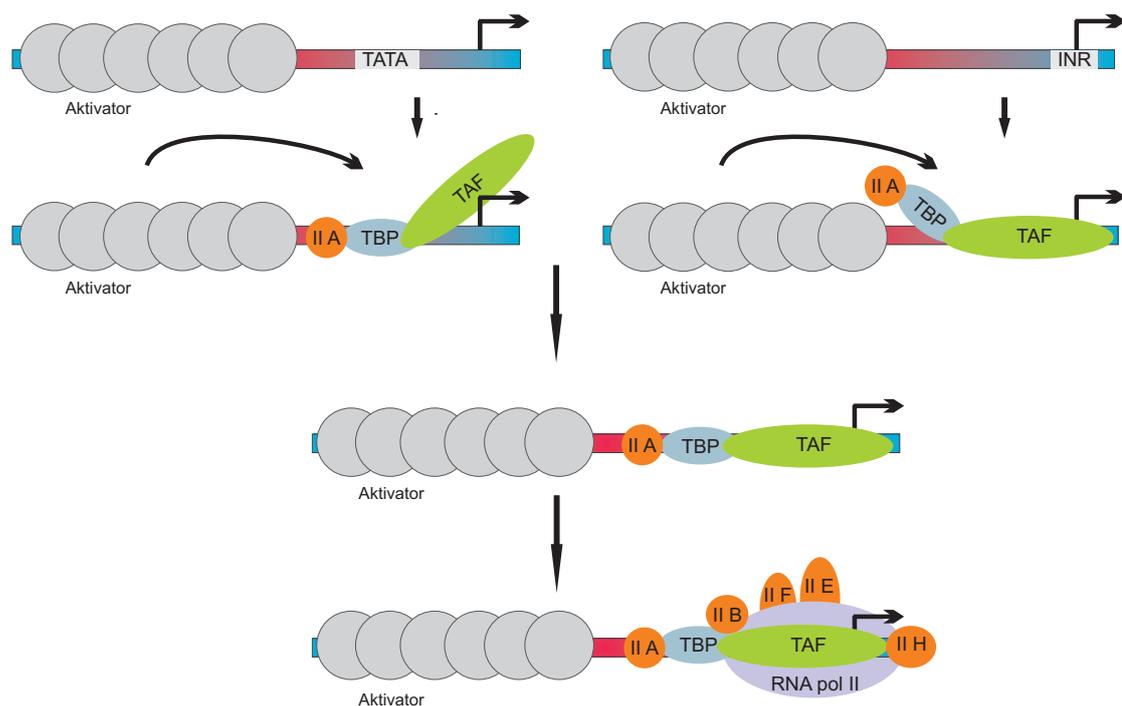


Abbildung 1.10 Idealisiertes Modell der Transkriptionsinitiierung an core Promotoren die entweder eine TATA Box oder ein Inr Element enthalten. Im Falle einer TATA Box bindet das TBP an den Promotor, beim Inr Element der TAF. Die Rekrutierung der weiteren Transkriptionsfaktoren ist in beiden Modellen identisch.

Nach der Bindung des TFIID Komplexes an die TATA Box bildet sich ein sogenannter Präinitiationskomplex, der auch die RNA Polymerase II sowie weitere zusätzliche Fakto-

ren beinhaltet. Viele, wenn nicht sogar die meisten dieser Faktoren, werden zusammen mit der RNA Polymerase in Form eines Polymerase-Holoenzym rekrutiert [78]. Dieser gesamte Proteinkomplex ist von unmittelbarer Bedeutung und essentiell für die Basaltranskription von TATA Box Promotoren *in vitro*. Allerdings ist die TATA Box nicht das einzige transkriptionsinitierende Sequenzmotiv innerhalb des *core promoters* (Der Teil eines Promotors, der nur diejenigen allgemeinen Promotorelemente enthält, welche absolut notwendig für die Transkription sind) (Abb. 1.11).

Ein weiteres Element ist das sogenannte *Initiator element* (Inr), welches funktionell ähnlich einer TATA Box ist und sich in der Regel an einer Position -2 bis +4 bp relativ zur TSS befindet [79]. Das Inr Element wird, so konnten verschiedene Studien zeigen, von TFIID gebunden [80]. Ein Zusammenspiel des Inr Elementes mit einem anderen Promotorelement, das ebenfalls TFIID bindet überrascht daher nicht. Das hoch konservierte *downstream promoter element* (DPE), welches sich an der Position +28 bis +32 rela-

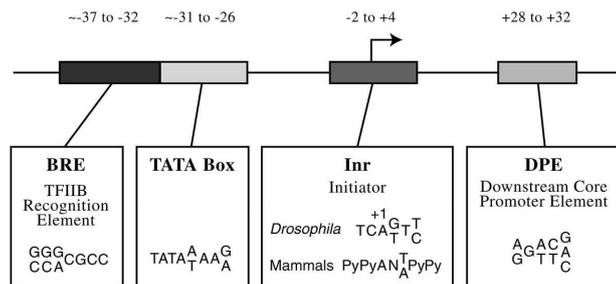


Abbildung 1.11 Core Promotor Motive. Die Abbildung zeigt den typischen Aufbau eines core Promotors. Alle diese Elemente wurden nur in einem Teil der Promotoren gefunden. Ein Promotor kann daher einige, alle oder aber keines der Elemente enthalten. Die TATA Box kann selbst in der Abwesenheit von BRE, Inr oder DPE Motiven funktionieren. Im Gegensatz dazu benötigt das DPE Motiv die Gegenwart eines Inr. Das BRE liegt direkt stromaufwärts der TATA Box. (Abbildung modifiziert nach Smale et al.)

tiv zum A₊₁Nukleotid des Inr Motivs befindet, spielt hier eine herausragende Rolle, da DPE abhängige Promotoren immer ein Inr und DPE enthalten, was im Falle einer Mutation in diesen Elementen zum Verlust der TFIID Bindung und somit zum Versagen der Transkription führt [81, 82]. Die bisher beschriebenen Elemente zeichneten sich vor allem durch ihre Bindungsaffinität mit TFIID aus. Anders verhält es sich hingegen bei einem Element mit der Bezeichnung *TFIIB recognition element* (BRE). Wie der Name verrät, handelt es sich hier um ein gut charakterisiertes Element, welches im *core promoter* von anderen Faktoren als TFIID (oder TRF1 / TRF2 Komplex) erkannt wird [83]. Zuerst wurden die Bindungseigenschaften mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse in Archaeobakterien nachgewiesen. Dort zeigte sich ein Komplex, der aus TBP-TFIIB-TAF bestand. Mittlerweile konnte auch die Existenz eines humanen BRE gezeigt werden, welches eine 7 bp Sequenz bevorzugt: G/C G/C G/A CGCC [84]. Die Sequenzerkennung erfolgt über ein *helix-turn-helix* Motiv am C-terminalen Ende von TFIIB [84, 85]. Trotz der enormen Fortschritte im Bereich der TATA Box-abhängigen Transkriptionsinitiierung zeigte sich,

dass es eine Vielzahl von Genen gibt, die keine TATA Box in ihrer Sequenz aufweisen. Untersuchungen zeigten, dass nur 31% von 1031 potentieller core Promotoren eine TATA Box enthielten [86]. Einige dieser TATA-losen Promotoren haben die Eigenschaft, die Transkription durch spezifische Nukleotide oder durch *multiple start sites* zu gewährleisten. Diese TSSs können aus wenigen, in Cluster angeordneten Nukleotiden bis hin zu Dutzenden über Hundert von Nukleotiden verteilten Startpunkten bestehen.

1.3.2 Transkriptionsinitiation bei Promotoren ohne TATA Box (*TATA less*)

Wie in 1.3.1 bereits erwähnt, haben nur ein Teil der Promotoren eine TATA Box, obwohl dies in der Regel als klassisches Beispiel erwähnt wird. Besonders Haushaltsgene (*housekeeping genes*) werden nicht durch eine TATA Box im Rahmen der Transkriptionsinitiation reguliert. Man kann zwischen zwei Gruppen unterscheiden. Eine Gruppe besitzt ein Inr beziehungsweise zusätzlich ein DPE / DCE (*downstream core element*), die andere Gruppe, hauptsächlich CpG Dinukleotide, sogenannte CpG Inseln (*CpG islands*), dafür aber keine der bisher benannten Promotorelemente [87]. Abbildung 1.12 zeigt wie die Transkriptionsinitiation bei Promotoren ohne TATA Box, aber mit Inr sowie DPE Elementen eingeleitet wird. Für unsere Arbeit waren jedoch die Promotoren von besonderem Interesse, deren Transkriptionsinitiation über die CpG Inseln gesteuert werden. Diese Art der Einleitung der Transkription findet man besonders häufig bei Haushaltsgenen, die eine schwache Konservierung des Promotors zwischen den Spezies aufweisen [88]. Eine besondere Eigenschaft der Promotoren die über CpG Inseln reguliert werden, ist die Akkumulation von Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Sp1, oft ca. 40-80 bp *upstream* der TSS [87]. Die gängige Hypothese geht davon aus, dass für die Bildung des Präinitiationskomplexes die TFIID Untereinheiten innerhalb dieses 40-80 bp breiten Fensters mit der Sequenz interagieren, die am stärksten komplementär zu ihrer eigenen Erkennungssequenz ist. Dies bedeutet, dass die Promotorerkennung bei CpG Inseln auf den gleichen Faktoren und Elementen beruht wie bei den oben genannten Beispielen [89].

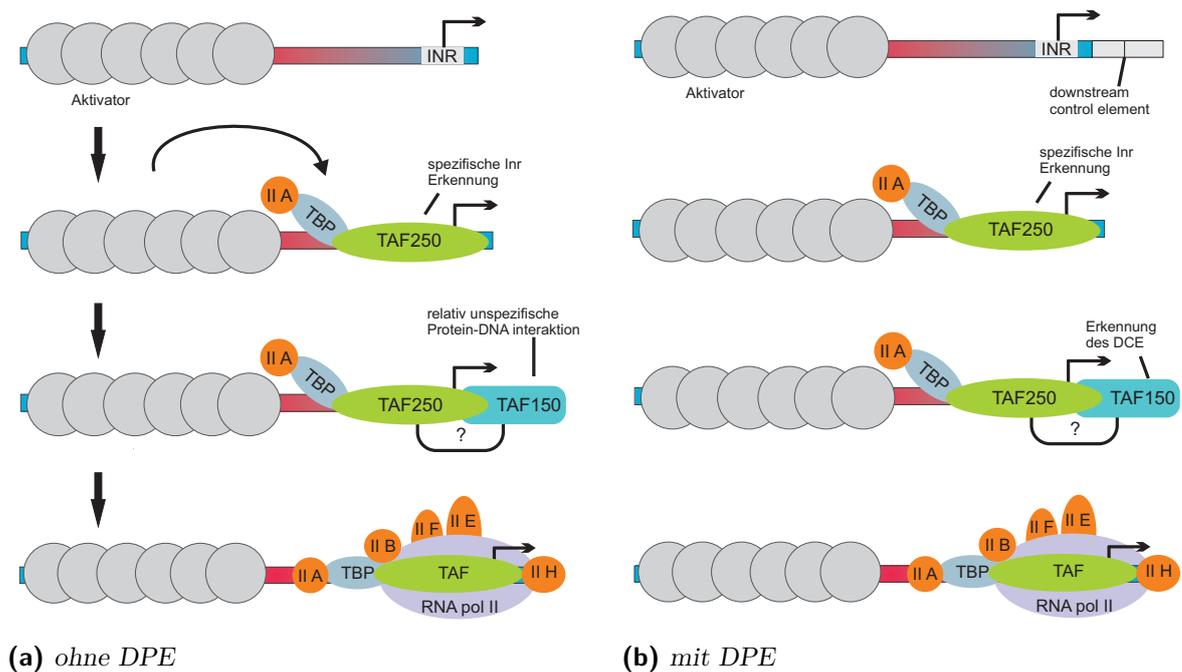


Abbildung 1.12 Arbeitsmodell für eine Inr vermittelte Transkription bei Promotoren ohne TATA Box. (a) Der Promotor besitzt kein DPE und daher ist eine TBP-DNA Interaktion notwendig. TAF150 vermittelt die Inr Aktivität, bindet jedoch nicht in einer sequenzspezifischen Form an den Promotor. Die Erkennung des Inr Elements erfolgt durch TAF250. (b) Der Promotor enthält ein DPE was eine TAF150 stabilisierte Bindung des TFIID Komplexes ermöglicht. Eine TBP-DNA Interaktion ist nicht notwendig.

1.4 Fragestellung

Schon die große Anzahl von Genen, die mit Fanconi Anämie assoziiert sind, legt den Schluss nahe, dass wir es hier mit einem hoch komplexen Signalweg zu tun haben, dessen genauer Ablauf und Regulierung bisher nur in Teilen beleuchtet und verstanden werden konnte. Relativ gut untersucht sind bisher Regulationsmechanismen, welche direkt die Proteine betreffen wie Phosphorylierungen oder Monoubiquitinierungen. Auf dem Gebiet der transkriptionellen Regulation sind allerdings die Mechanismen bisher kaum untersucht worden. Lediglich eine einzige Arbeit hat versucht, kurz nach der Identifizierung des FANCC Gens im Jahre 1992 [52], sich mit der Promotoridentifikation und dessen Charakterisierung zu beschäftigen [90]. Da der FA *core complex* der initiale Komplex ist, der sich in Abhängigkeit von dem FANCM-DNA-Remodeling Komplex bei der FA spezifischen ICL Schadensantwort bildet, interessierte es uns besonders, wie dieser *core complex* auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. In dieser Arbeit sollten daher nicht nur die Promotoren der *core complex* Gene identifiziert, sondern auch auf Gemeinsamkeiten hin untersucht werden. Dazu gehören spezifische Muster von Sequenzmotiven oder redundante

Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Diese Gemeinsamkeiten könnten möglicherweise Hinweise auf eine Koevolution der *core complex* Gene bedeuten. Außerdem stellte sich die Frage, ob es weitere prominente Signalwege gibt, die mit dem FA *core complex* interagieren oder eine regulatorische Funktion auf ihn ausüben.

2 Kapitel 2

Materialien

2.1 Zelllinien

2.1.1 Kompetente Bakterienstämme

| Bezeichnung | Quelle |
|--|------------|
| One Shot [®] TOP10 Chemically Competent E. coli | Invitrogen |
| Turbo Competent E. coli | NEB |
| XL1-Blue MRF ⁺ Supercompetent Cells | Stratagene |

2.1.2 Langzeitzellkulturen

| Bezeichnung | Quelle |
|---|---------------|
| HeLa Zervixkarzinom-Epithelzellen | DSMZ |
| HEK-293 Embryonale Nierenzellen | DSMZ |
| RAMOS Burkitt Lymphomzellen | DSMZ |
| JURKAT T-Zell Leukämiezellen | DSMZ |
| SH-SY5Y Neuroblastomzellen | DSMZ |
| MCNA primäre humane Fibroblasten | eigenes Labor |
| MAKE primäre humane Fibroblasten, FANCA negativ | eigenes Labor |
| AITO primäre humane Fibroblasten | eigenes Labor |
| RGFN primäre humane Fibroblasten, FANCA negativ | eigenes Labor |

2.2 Enzyme

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|-----------------------|
| Restriktionsenzyme | NEB, Fermentas, Gibco |
| <i>T4</i> -DNA-Ligase | NEB |
| Alkaline Phosphatase | NEB |
| PfuUltra [®] High-Fidelity DNA Polymerase | Stratagene |
| DNase I recombinant, RNase-free | Roche |
| Phusion [™] High-Fidelity DNA Polymerase | Finnzymes |
| Precisor High-Fidelity DNA Polymerase | Bio Cat |
| Crimson <i>Taq</i> DNA Polymerase | NEB |

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

| Spezifität | Artikel-Nummer | Hersteller |
|---------------|----------------|-------------------------------------|
| FANCA | ab5063 | Abcam |
| FANCB | HPA003124 | Atlas Antibodies |
| FANCC | ab5065 | Abcam |
| | ab54631 | Abcam |
| FANCE | sc-23585 | Santa Cruz Biotech |
| FANCF | ab47624 | Abcam |
| FANCG | G0706-R9070 | Fanconi Anemia Research Fund (FARF) |
| FANCL | ab42639 | Abcam |
| FANCM | M0505-R4811 | FARF |
| STAT1 | sc-346 | Santa Cruz Biotech |
| STAT4 | sc-7959 | Santa Cruz Biotech |
| SMAD1 | ab53745 | Abcam |
| SMAD4 | ab40759 | Abcam |
| IRF6 | ab58915 | Abcam |
| Myostatin | ab55106 | Abcam |
| Nodal | ab55676 | Abcam |
| TNF- α | ab1793 | Abcam |
| TLR7 | ab45371 | Abcam |
| OAS2 | ab90045 | Abcam |
| p84 | ab487 | Abcam |

2.3.2 Sekundäre Antikörper

HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper wurden von GE Healthcare bezogen, bzw von Abcam.

2.4 Plasmide

| Bezeichnung | Vektorlänge in bp | Reportergen | Promotor | Quelle |
|---------------|-------------------|-------------|----------|------------|
| pGL3 basic | 4818 | Luc+ | | Promega |
| pGL3 promoter | 5010 | Luc+ | SV 40 | Promeg |
| pRL null | 3320 | Rluc | | Promega |
| pRL TK | 4045 | Rluc | TK | Promega |
| pUC19 | 2686 | | | Stratagene |
| pGBKT7 | 7300 | | | Clontech |

2.5 Primer

Primer wurden von den Firmen Tib Molbiol sowie PrimerDesign erworben. Die Sequenzen sind im Anhang aufgelistet. Zur Herstellung von Stammlösungen (100 μ M) wurden die lyophilisierten Produkte in ddH₂O gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Primer wurden mit der Hilfe der Software *Multiple primer analyzer* (Finnzymes) entworfen. Das Programm benutzt zum Berechnen der Schmelztemperaturen die *nearest-neighbor*-Methode nach BRESLAUER et al. [91].

2.6 Längenstandards

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|------------|
| 100 bp & 1 kb DNA Ladder | NEB |
| FastRuler™ DNA Ladders, ready-to-use | Fermentas |
| Precision Plus Protein™ Standards, All Blue | BioRad |

2.7 Chemikalien und Reagenzien

Die üblichen, hier nicht aufgelisteten Chemikalien, wurden von den Firmen AppliChem, Merck, Roth sowie Sigma in p.A. Qualität bezogen.

| Bezeichnung | Hersteller |
|-------------------------|-----------------------------|
| Acid phenol:chloroform | Ambion |
| Agarose | Molekular |
| Ampicillin | AppliChem |
| Aqua ad iniectabilia | Braun |
| Bio-Rad Protein Assay | BioRad |
| DMEM + GlutaMAX™-I | Gibco |
| DMSO | AppliChem |
| dNTP Set (100 mM) | Thermo Scientific, Bionline |
| Fötale Kälberserum, FCS | Sigma |
| HiDi™ Formamide | Applied Biosystems |
| Kanamycin | Sigma |
| MEM + GlutaMAX™-I | Gibco |
| PBS (x10) | PAA Laboratories |
| PenStrep | Gibco |
| RPMI 1640 + GlutaMAX™-I | Gibco |
| TrypLE™ Express | Gibco |

2.8 Puffer und andere Lösungen

Aufgelistet sind im Labor hergestellte Lösungen.

Einfriermedium 80 % RPMI-Medium; 10 % FCS; 10 % DMSO

SE-Puffer, pH8,0 75 mM NaCl₂; 25 mM Na₂EDTA

si-RNA-Puffer, 1x Dharmacon 5x siRNA-Puffer, ad dd H₂O auf 1x

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl; 1 mM Na₂EDTA

TBE-Puffer, 10x 890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA

DNA-Probenpuffer, 6x 40 % (w/v) Sucrose; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol

Extraktionspuffer 50 mM Tris; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 25 mM FNa; 0,1 mM Na₃VO₄; 150 mM NaCl; 25 mM β-Glycerophosphat; 0,2 % (v/v) TritonX; 0,3 % (w/v) NP-40; 1 Tabl./10 ml Protease-Inhibitoren *Complete*, Roche

Stripping-Puffer 62,5 mM Tris (pH 6,7); 2 % (w/v) SDS; 100 mM β-mercaptoethanol

PBST 1x PBS; 0,05 % (v/v) Tween®20

2.9 Kit-Systeme

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--------------------|
| DNA Clean & Concentrator™-25/-5 Kit | Zymo Research |
| Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit | Zymo Research |
| Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit | Zymo Research |
| Zyppy™ Plasmid Maxiprep Kit | Zymo Research |
| ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ | Zymo Research |
| High Pure RNA Isolation Kit | Roche |
| TURBO DNA-free™ | Ambion |
| Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit | Roche |
| PerfeCta™SYBR® Green SuperMix for iQ™ | Quanta |
| BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems |
| NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents | Thermo Scientific |
| Luminata™ Crescendo Western HRP Substrat | Millipore |
| ChemiGlow West | Alpha Innotech |
| Effectene® transfection reagent | Qiagen |
| Dual-Luciferase® Reporter Assay System | Promega |
| Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module | Thermo Scientific |
| LightShift™ EMSA Optimisation & Control Kit | Thermo Scientific |

2.10 Sonstige Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|------------------------|
| NuPAGE® Novex® Bis-Tris bzw. Tris-Acetate Gele | Invitrogen |
| Multiwell-Platten | Greiner bio-one / Nunc |
| Zellkulturflaschen | Corning / Nunc |
| Glaspipetten | Brand |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| Petrischalen | Greiner bio-one |

2.11 Geräte

| Bezeichnung | Modell | Hersteller |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Sequenzierer | ABI Prism 310 Genetic Analyser | Applied Biosystems |
| Analysenwaage | MC 1 | Sartorius |
| FACS | BD LSR II | BD Bioscience |
| Inkubatoren | Schüttelinkubator | Infors HAT |
| | Brutschrank | Heraeus |
| Mikroskope | Axiovert 40C | Zeiss |
| | Axiovert 200M | Zeiss |
| Luminometer | Mithras LB940 | Berthold Technologies |
| Elektrophorese | Horizontale Gelelektrophorese | OWL |
| | Compact M | Biometra |
| | XCell SureLock™ | Invitrogen |
| Netzgerät | Model 200/2.0 | BioRad |
| Proteintransfer | XCell II™ Blot Module | Invitrogen |
| | BlueBlot Wet / 100 | Serva |
| Zentrifugen | Megafuge 1.0 | Heraeus |
| | Multifuge 1 L-R | Heraeus |
| | Tischzentrifuge | Hettich |
| | Centrifuge 5415C | Eppendorf |
| Vortex | Genie 2 | Scientific Industries |
| Vakuumkonzentrator | BA-VC-300 H | Bachofer |
| Vakuumpumpe | MZ 2C | ABM |
| Thermocycler | iCycler iQ | BioRad |
| | Mastercycler EP Gradient S | Eppendorf |
| | T3000 | Biometra |
| Geldokumentation | Fluor-Chem® HD2 | Alpha Innotech |
| Magnetrührer | Nuova II | Bioblock Scientific |
| pH-Meter | Digital-pH-Meter 646 | Knick |
| Photometer | BioPhotometer | Eppendorf |
| Taumelschüttler | REAX 3 | Heidolph |
| Wasserbad | Typ B | Lauda |
| Pipettierhilfe | Mikropipetten | Gilson, Rainin |
| | Mehrkanalpipetten | Brand |
| | Pipetboy | Integra Biosciences |

2.12 Software und Internetprogramme

Adobe Photoshop CS4 Adobe Systems

Adobe InDesign CS4 Adobe Systems

AlphaEaseFC Alpha Innotech

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

CorelDRAW Graphics Suite X4 Corel

EndNote X3 Thomson

Excel 2003 Microsoft

Gene2Promoter <http://www.genomatix.de>

Gene Runner v. 3.05 Hastings Software

Global Pattern Recognition (GPR) Data Analysis Tool Lonza

Graphical Codon Usage Analyser <http://gcua.schoedl.de/index.html>

LyX v.1.6.9 freie Software

MPLUS AV Phoenix Flow Systems

Multiple primer analyzer <http://www.finnzymes.fi>

PROMO http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3

Relative Expression Software Tool (REST) <http://www.gene-quantification.de/rest.html>

SigmaPlot v. 11 Systat Software, Inc.

ScionImage Scion Software

2.13 Datenbanken

Ensembl Genome Browser <http://www.ensembl.org/index.html>

Database of Transcription Start Sites <http://dbtss.hgc.jp>

NCBI-GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu>

3 Kapitel 3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Suspensions-Zellen

JURKAT (*human T cell leukemia*) und RAMOS-Zelllinien (*human Burkitt lymphoma*) wurden wahlweise in T75 oder T25-Zellkulturflaschen kultiviert. *RPMI-1640*-Nährmedium wurde mit inaktiviertem FCS (10 % - 20 % Endkonz.) angereichert und je nach Zellwachstum 1 – 2 Mal pro Woche zu 3/4 des Kulturvolumens ausgetauscht. Die Zellen wurden in Begasungsbrutschränken bei 37 °C, 96 – 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert.

3.1.2 Adhärente Zellen

HeLa- oder HEK293-Zellen, sowie primäre humane Fibroblasten (MCNA, MAKE, AITO und RFGN) wurden in *MEM*-Medium kultiviert, welches 10 % FCS und 1 % PenStrep-Lösung enthielt. SH-SY5Y (*Neuroblastoma cell line*) Zellen wurden in *DMEM*-Medium mit 15 % FCS ohne Antibiotika kultiviert. Beide Nährmedien wurde zweimal pro Woche gewechselt. Bei einer Zelldichte von über 90 % wurden die Zellen auf mehrere Flaschen aufgeteilt. Dabei wurde das komplette Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und durch Inkubation mit 5 ml TrypLE-Lösung für 5 min bei 37 °C vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Aliquots von jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden in neue

Zellkulturflaschen überführt und mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt. Die Inkubationsbedingungen waren dieselben wie bei Suspensions-Zellen. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Arbeitsbank durchgeführt.

3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Etwa 2×10^6 suspendierte Zellen wurden durch Zentrifugation (150 g, 5 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1,8 ml vorgekühltem (4°C) Einfriermedium aufgenommen, in ein steriles Kryoröhrchen überführt und in einem Isopropanol-Einfriergefäß für mindestens 12 h bei -75°C in einem Tiefkühlgerät gelagert. Die Röhrchen wurden dann in Lagertanks in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Zur Wiederverwendung wurden Röhrchen mit den gefrorenen Zellaquots in einem Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und in einer T75-Kulturflasche mit 10 ml Zellkulturmedium (37°C) überführt. Nach 24 h wurde das Kulturmedium erneuert, um das im Einfriermedium enthaltene Kryoprotektiv DMSO zu entfernen.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zellzählungen wurden mit Hilfe einer Zählkammer vom Typ Fuchs-Rosenthal durchgeführt. Für die Bestimmung der Zellzahl pro ml wird die Anzahl der Zellen je Großquadrat mit dem Faktor 5000 multipliziert.

3.2 Gentransfer

3.2.1 Transfektion

Zur Bestimmung der transienten Expression der Luziferasegene durch klonierte Sequenzelemente, wurden im Rahmen von Promotorstudien mittels *Dual-Luciferase-Reporter-Assays*, $2,5 \times 10^5$ HEK 293- bzw. HeLa-Zellen pro well einer 12-well Kulturplatte in 2 ml *MEM*-Komplettmedium ausgesät. Am nächsten Tag, bei einer Konfluenz von ca. 80 %, wurden die Zellen mit dem *Effectene Transfection Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Dafür wurden bei der Verwendung von Triplikaten, 600 ng des pGL basic Plasmids mit 300 ng des pRL null Plasmids sowie 600 ng des pGBKT7 Plasmids als “carrier vector” eingesetzt. Dieser “Mastermix” wurde mit 225 μ l *EC-Buffer* und 18 μ l *Enhancer* gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 18 μ l *Effectene*-Reagenz wurde die Transfektionslösung 10 sec mit einem Vortex-Gerät gemischt und dann für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 1200 μ l *MEM*-Medium zugegeben. Jeweils 400 μ l dieser Lösung wurden auf die Zellen eines wells gleichmäßig verteilt, die zuvor mit PBS gewaschen und mit 0,8 ml *MEM*-Medium versetzt worden waren. Nach 24 h wurde das Nährmedium erneuert und weitere 24 h später wurde der Luciferase-Assay durchgeführt (s. Abschnitt 3.6).

3.3 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen wurden an einem analytischen Gerät des Typs *LSR II* (BD) durchgeführt, welches mit einem Argon-Ionenlaser (488 nm), einem Helium-Neon-Gaslaser (633 nm) und einem Helium-Cadmium-Feststofflaser (325 nm) ausgestattet war. Um die Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation zu bestimmen, wurde die DNA der einzelnen Zellen durch stöchiometrische Bindung des Farbstoffes DAPI angefärbt, eine Fluoreszenzmessung durchgeführt und die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten in Histogrammen aufsummiert. Die Messdaten wurden mit dem Computerprogramm *MPLUS AV* ausgewertet.

3.4 Molekulargenetische Methoden

3.4.1 Präparation genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten erfolgte nach einer Aussalzungsmethode. Etwa 5×10^6 Zellen wurden in einem 50 ml-Reaktionsgefäß sedimentiert (150 g, 5 min, 4 °C) und zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,85 ml SE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,15 ml Proteinase-K-Lösung (1 µg/ml) und 0,025 ml 20 % SDS-Lösung wurde die Suspension bei 55 °C für mindestens 3 h inkubiert. Dann wurden 0,4 ml 6 M NaCl-Lösung hinzugegeben und gründlich mit Vortex-Gerät gemischt bis eine milchige Trübung einsetzte. Ausgefallenes Protein und Zellreste wurden durch Zentrifugieren sedimentiert (3500 g, 15 min, RT) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe des zweifachen Volumens an 100 % Ethanol wurde die DNA ausgefällt. Mit Hilfe eines Glashakens wurde der DNA-Faden herausgezogen, zum Waschen kurz in 70 % Ethanol eingetaucht und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA je nach geschätzter Menge in 0,05-0,3 ml TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Plasmidisolierung in analytischem Maßstab wurde eine Übernacht-Kultur des ausgewählten Klons in 3 ml Antibiotika-haltigem LB-Flüssigmedium angesetzt und bei 37 °C geschüttelt. Plasmid-DNA wurde mit dem *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research) nach Angaben des Herstellers isoliert und schließlich mit 30 µl ddH₂O eluiert. Zur Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab wurde der *Zyppy™ Plasmid Maxiprep Kit* (Zymo Research) verwendet. Dazu wurde eine Vorkultur in 5 ml LB-Medium angesetzt und wie beschrieben behandelt. 8 h später wurden 1 ml dieser Vorkultur in 200 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Isolierung des Plasmids erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in ddH₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.4.3 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung wurden photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen und aus dem resultierenden Wert die Konzentration der Nukleinsäure in der Lösung automatisch errechnet. Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm

bestimmt, welches in der Regel zwischen 1,7 und 2,0 lag und indikativ für die reine DNA-Isolierung war.

3.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gel-Elektrophorese wurden, in Abhängigkeit von den Fragmentgrößen, 0,8–1,5 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1x TBE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid (10 ng/ml Endkonz.) versetzt. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die Agarose-Lösung in Gelschlitten mit Taschenformern gegossen und die Gelierung abgewartet. Zur Elektrophorese wurden die Gelschlitten in Laufkammern mit 1x TBE-Lösung als Laufpuffer gesetzt. 5 µl einer jeden DNA-Probe wurden mit 1,5 µl 6x DNA-Probenpuffer versehen und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 Volt. Als Größenmarker dienten DNA-Standards (NEBiolabs, Fermentas). Die DNA-Banden wurden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

3.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes nach der Agarosegel-Elektrophorese wurde die entsprechende Bande aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA unter Verwendung von *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt.

3.4.6 Polymerase-Kettenreaktion, PCR

Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsmischungen und -Reaktionsbedingungen variierten je nach Typ der verwendeten DNA-Polymerase und wurden an die Empfehlungen des jeweiligen Herstellers angepasst. Die Annealing-Temperatur der Primer wurde nach der *nearest-neighbor*-Methode [91] mit dem Computerprogramm *Multiple primer analyzer* ermittelt.

3.4.7 Quantitative PCR

Quantitative PCR wurde mit der vorgefertigten Reaktionsmischung *PerfeCTa™ SYBR® Green SuperMix* (Quanta) im *iQ Real-Time PCR System* (BioRad) durchgeführt. Dazu wurde jeweils 1 µl cDNA als Template und 1 µl von jedem Primer (0,25 µM Endkonz.) verwendet. Die Reaktionen wurden in Doppelansätzen über 48 Zyklen hinweg nach dem

folgenden Schema ausgeführt: 15 sec bei 95 °C, 30 sec bei 60 °C sowie 30 sec bei 72 °C. Die Detektion erfolgte während des letzten Schritts. Im Anschluss daran wurden die Schmelzprofile der Amplifikate ermittelt. Dazu wurden die Proben für 1 min bei 99 °C denaturiert und für 1 min bei 55 °C renaturiert. Dann wurde die Temperatur im 10-sec-Takt um jeweils 0,5 °C erhöht bis 95 °C erreicht waren. Amplifikationen mit *UBC*-, *ACTB*-, *HPRT*- und *GAPDH*-spezifischen Primern wurden als endogene Kontrolle verwendet. Die spezifischen Primersequenzen sind im Anhang angegeben.

3.4.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde mit Hilfe der Didesoxymethode durchgeführt. Ein Sequenzier-Ansatz von 10 µl bestand aus dem DNA-Template (PCR-Produkte 10-100 ng, Plasmide 200-500 ng), 1 µl Primer (1 µM Endkonz.), 2 µl Reaktions-Mix (*BigDye Terminator v1.1*) und 1 µl Sequenzier-Puffer. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Programm: 3 min bei 96 °C, dann 25 Zyklen bestehend aus drei Schritten: 15 sec bei 96 °C, 90 sec bei 60 °C sowie 90 sec bei 50 °C und anschließend 3 min bei 60 °C. Die Reaktionsprodukte wurden durch Ethanolfällung gereinigt. Dazu wurden zum Sequenzieransatz 100 µl 0,3 M NaOAc und 250 µl 100 % Ethanol gegeben. Nach Zentrifugation bei 20 000 g für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in einem Vakuumtrockner eingedampft und in 20 µl *Hi-Di™ Formamide* aufgenommen. Schließlich wurden die Proben in einem Sequenziergerät des Typs *ABI PRISM 310 Genetic Analyser* (ABI) aufgetrennt und vermessen.

3.4.9 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden ca. 5×10^6 suspendierte Zellen einmal in PBS gewaschen. Gesamt-RNA wurde mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die isolierte RNA wurde in 40 µl RNase-freiem ddH₂O gelöst.

3.4.10 DNase I-Verdau

Um eine DNA-Kontamination der RNA zu entfernen, wurde im Anschluss an die RNA-Isolierung eine Behandlung mit dem Enzym DNase I durchgeführt. Dazu wurde der *Turbo DNA-free™ Kit* (Ambion) verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand aus 10 µg RNA, gelöst in 50 µl ddH₂O und 2 U des Enzyms. Sonstige Bestandteile und der Reaktionsablauf entsprachen den Angaben des Herstellers.

3.4.11 cDNA-Synthese

Die Synthese des zur RNA komplementären DNA-Stranges (cDNA) erfolgte mit dem *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) nach dem Protokoll des Herstellers. Pro Ansatz wurde 1 µg an Gesamt-RNA mit polydT-Primer für 1 h bei 50 °C transkribiert. Standardmäßig wurde ein Aliquot von 1–2 µl des Reaktionsprodukts für die darauf folgende PCR eingesetzt. Wenn die cDNA für die quantitative PCR verwendet werden sollte, wurde das Reaktionsprodukt mit Wasser auf 100 µl Volumen verdünnt. Davon wurden jeweils 5 µl pro PCR-Reaktion eingesetzt.

3.4.12 Molekulare Klonierung

3.4.12.1 Restriktionsverdau

Für die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA-Fragmenten wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Die Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern und entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet. Beim Einsatz von mehreren Restriktionsenzymen gleichzeitig wurde ein passender Puffer nach den Tabellen der Hersteller ausgewählt. Waren die Enzyme mit keinem gemeinsamen Puffer kompatibel, so wurde der Restriktionsverdau sequentiell durchgeführt. Der Erfolg eines jeden Restriktionsverdau wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Falls das betreffende DNA-Fragment für eine Ligation verwendet werden sollte, wurde dieses mit Hilfe von *DNA Clean & ConcentratorTM Kit* (Zymo Research) entsalzt und konzentriert.

3.4.12.2 Dephosphorylierung

Um eine unerwünschte Religation eines linearisierten Plasmids in einem Ligationsansatz zu verhindern, wurden die 5'-Termini durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert, da für eine Ligation die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung unentbehrlich ist. Die Reaktion erfolgte im Anschluss des Restriktionsverdau. Dazu wurde 1/10 Volumen des 10x Puffers zum Reaktionsansatz hinzugegeben sowie 5 U (1 µl) des *Antarctic Phosphatase*-Enzyms pro 1–5 µg DNA. Anschließend wird der Ansatz für 15 min bis 1 h bei 37 °C inkubiert. Als letzter Schritt ist eine Hitzeinaktivierung für 5 min bei 65 °C erforderlich. Da das Enzym die Ligation nicht stört, kann auch ohne eine Aufreinigung des Ansatzes fortgefahren werden.

3.4.12.3 Ligation

Für einen Standardligationsansatz von 20 µl wurde zum linearisierten Vektor (50 ng) das DNA-Fragment in 3-fachem molaren Überschuss zugegeben. Nach Zusatz von 2 µl 10x Ligasepuffers und 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U) wurde der Reaktionsansatz 1 h bei RT für 20 min bis 60 min inkubiert. Für die Berechnung des genauen Verhältnisses zwischen Vektor DNA und Insert wurde folgende Formel verwendet: $\frac{ng\ of\ vector * kb\ size\ of\ insert}{kb\ size\ of\ vector}$ molar ratio of $\frac{insert}{vector}$ = ng of insert.

3.4.12.4 Transformation

Chemokompetente Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut. Ein Aliquot von 5 µl des Ligationsansatzes wurde zu der Zellsuspension gegeben. Die Probe wurde mit der Pipettenspitze vorsichtig gemischt und auf dem Eis 20–30 min lang inkubiert. Durch einen Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C erfolgte die Transformation. Nachdem die Zellen auf dem Eis für 5 min abgekühlt waren, wurden 250 µl SOC-Medium zu der Suspension hinzugefügt und die Probe für 1 h im Inkubator bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden dann 200 µl mit einem Trigalski-Spatel auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen, die ein Antibiotikum zur Selektion transformierter Bakterien enthielt. Je nach verwendetem Bakterientyp wurde der Ausstrich noch mit 100 µl sterilem H₂O verdünnt. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.4.12.5 Selektion und Screening

Die Selektion auf positive Klone, d.h. Kolonien mit Bakterien, welche das rekombinante Plasmid aufgenommen hatten, erfolgte je nach Plasmidart durch die Antibiotika Ampicillin oder Kanamycin. Mit Hilfe einer Kolonie-PCR wurde nach Klonen gesucht, die das rekombinante Plasmid enthielten. Dazu wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf eine frische Platte an eine nummerierte Position überimpft. Die Spitze wurde in ein Gefäß mit PCR-Reaktionsmischung eingetaucht. Als Primer wurde je ein Vektor- und ein Insert-spezifisches Oligonukleotid verwendet. Durch gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte konnte festgestellt werden, welche Klone das Plasmid mit dem Insert in der gewünschten Orientierung enthielten. Anschließend wurde Plasmid-DNA aus einer Flüssigkeits-Kultur eines positiven Klons isoliert und daran das Ergebnis der Kolonie-PCR mittels Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung überprüft.

3.4.13 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Diese Methode ermöglicht den Nachweis von DNA-Protein Interaktionen *in vitro*. Das System beruht darauf, dass kurze doppelsträngige Oligonucleotide (20 bp–50 bp) die potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren enthalten, eine stabile Bindung mit Proteinen aus einem Zellkernextrakt eingehen. Dabei liegen diese Oligonukleotide einerseits mit Biotin markiert vor, andererseits unmarkiert in 200-facher Konzentration. Die Bindung eines Proteins an das DNA-Fragment verzögert dessen Wanderungsverhalten im Gel (Gelshift). Die Spezifität wird durch die unmarkierte Probe gewährleistet, da der große Überschuss im Reaktionsansatz die Bindungsstelle im Falle einer spezifischen Bindung vor den markierten Oligonukleotiden besetzt. Die Auftrennung erfolgte auf einem 6% DNA-Retardierungsgel in einem 0,5% TBE Puffer bei 100 V für 50 min. Die Bindungsreaktionen sowie die übrige Versuchsdurchführung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Die Sequenzen der Oligonukleotide finden sich im Anhang.

3.5 Proteinanalytische Methoden

3.5.1 Proteinextraktion

Für die Gesamtproteinextraktion wurden ca. 5×10^6 Zellen zweimal in gekühltem PBS gewaschen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. in einer vorgekühlten (4°C) Zentrifuge durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden in 50 μl Extraktionslösung (s. Abschnitt 2.8) vollständig resuspendiert und für 45 min auf Eis lysiert. Nach anschließender Abzentrifugation (20 000 g, 10 min) der Zellrückstände wurde der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Die Proteinextrakte wurden kurzfristig bei -20°C , langfristig bei -80°C gelagert. Für die Extraktion von zytoplasmatischen bzw. Zellkern-spezifischen Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des *NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers fraktioniert.

3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Zellextrakten wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. Dazu wurden 2 μl des Proteinextrakts mit 1000 μl Bradford-Reagenz gemischt und die Extinktion der Protein-Bradfordlösung bei 595 nm bestimmt. Anhand einer mit BSA-Standards erstellten Eichkurve wurde die Gesamtprotein-Konzentration ermittelt.

3.5.3 SDS-Gelelektrophorese

Proteinextrakte (35–50 μg) wurden mit vierfach konzentriertem *NuPAGE[®] LDS Sample Buffer* (Invitrogen) und 1 M DTT versetzt und die Proteine für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlung wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen. Für die Elektrophorese wurden vorgefertigte Minigele (*NuPAGE[®] Novex[®] Tris-Acetate 7%* bzw. *Bis-Tris 10%* und *4-12%*) und die Elektrophoresekammer *XCell SureLockTM Mini-Cell* von Invitrogen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V in *NuPAGE[®] Tris-Acetate SDS Running Buffer* im Falle von TA-Gelen bzw. bei 200 V in *NuPAGE[®] MOPS / MES SDS Running Buffer* bei BT-Gelen. Um den sogenannten *Smily-Effekt*¹ zu vermeiden, wurde die Elektrophoresekammer in Eiswasser platziert. Als Molekulargewichtsmarker diente ein Gemisch gefärbter Proteinstandards bekannter Molekulargewichtsgrößen (s. Abschnitt 2.6).

¹Ungleichmäßiges Laufverhalten der Banden.

3.5.4 Proteintransfer

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde entweder mit Hilfe des *XCell IITM Blot Module*-Systems (Invitrogen) oder nach dem Tankblot-Verfahren in einem vertikalen Puffertank *BlueBlot Wet/100* (Serva) durchgeführt. Um die PVDF-Membran zu aktivieren, wurde diese kurz in 100 % Methanol eingetaucht und danach in Transferpuffer überführt. Der Transfer erfolgte bei 30 V (*XCell IITM*) bzw. bei 75 V (Tankblot) für mindestens 1 h in mit 5 % Methanol versetztem *NuPAGE[®] Transfer Buffer* (Invitrogen).

3.5.5 Immunologische Detektion

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT mit Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver in PBST) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper in der Regel für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit PBST für jeweils 5 min folgte eine Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Im Anschluss daran wurden die Membranen mindestens dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurden die ECL-Detektionssysteme *ChemiGlowTM West* (Alpha Innotech) bzw. *LuminataTM Crescendo Western HRP Substrate* (Millipore) eingesetzt. Emittierte Chemilumineszenz wurde durch die Exposition der Membran gegenüber einem Autoradiografiefilm nachgewiesen. Die Expositionszeiten variierten je nach Typ des eingesetzten Primärantikörpers bzw. je nach Abundanz des untersuchten Antigens zwischen 1 sec und 1 h. Bei einem Teil der Untersuchungen wurde ein Geldokumentationssystem *FluorChem[®] HD2* (Alpha Innotech) zur Signalmessung verwendet. Die Dokumentation und quantitative Auswertung der Signalstärke erfolgten mit Hilfe des Programms *AlphaEaseFC* (Alpha Innotech).

3.5.6 “Strippen” von PVDF-Membranen

Um eine Membran nach einer Immunodetektion für eine weitere Analyse mit einem anderen Antikörper verwenden zu können, wurde diese in *RestoreTM Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) für 15 min bei RT gewaschen, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. In Fällen, in denen dieses Reagenz ineffizient war, wurde die Membran in selbst hergestelltem Stripping-Puffer (s. Abschnitt 2.8) bei 65 °C für 30 min gewaschen.

Nach einem weiteren Waschschrift in PBST wurde die Membran erneut mit Blockierungs-
lösung abgesättigt. Dann wurde weiter verfahren wie oben beschrieben. Nach Abschluss
aller Untersuchungen wurden die Membranen in PBST eingeschweißt und bei 4 °C gela-
gert. Sie waren nach Ablauf einiger Jahre noch immer verwendbar.

3.6 Dual-Luciferase Reporter Assay

Die Untersuchung von potentiellen Promotorregionen der core complex Gene fand mit Hilfe des *Dual-Luciferase*[®] Assay Systems (Promega) statt. Dabei handelt es sich um eine Methode, welcher zwei Reportergenkonstrukte zu Grunde liegen. Relevante *FANC*-Sequenzabschnitte wurden in den Vektor pGL3-Basic (Promega) über die Schnittstellen *KpnI* und *HindIII* aufwärts der *luc*⁺-cDNA einkloniert, die für die Firefly-Luciferase der Leuchtkäferart *Photinus pyralis* kodiert. Je nach Promotoraktivitätspotenzial der untersuchten Sequenzen erfolgte eine stärkere bzw. schwächere Expression des Reportergens. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten der Vektor pGL3-SV40, in dem das *luc*⁺-Gen unter Kontrolle des SV40-Promotors (*Simian virus 40*) stand und der pGL3-basic-Vektor, welcher keinen Promotor enthielt. Als Positivkontrolle für einen schwächeren Promoter diente ein *GLI3*-Promotorkonstrukt. Um Unterschiede zu eliminieren, die evtl. aus einer verschiedenen Transfektionseffizienz einzelner Ansätze resultieren würden, wurden die Reportergenkonstrukte mit dem Kontrollvektor pRL-SV40 kotransfiziert, welcher die Renilla-Luciferase aus der Seefedernart *Renilla reniformis* exprimiert. Der Nachweis der Expressionsstärke beider Reportergene erfolgte über die Aktivität der exprimierten Enzyme. Die Firefly-Luciferase katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin, die Renilla-Luciferase dagegen die Umsetzung von Coelenterazin zu Coelenteramid. Beide Reaktionen werden von einer Emission von Licht begleitet. Diese Lumineszenzen der beiden Reaktionen wurden sequentiell von einem Luminometer des Typs *Mithras LB940* (Berthold Technologies) detektiert. Alle Transfektionen wurden in Tripletts durchgeführt. 48 h nach der Transfektion (s. Abschnitt 3.2.1) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 250 µl *Passive Lysis Buffer* für 15 min bei RT auf einem Orbitalerschüttler lysiert. 20 µl des jeweiligen Lysats wurden in eine 96-well-Platte überführt, welche dann im Luminometer platziert wurde. Die Zugabe der spezifischen Substrate, die in den Reagenzien *LAR II* bzw. *Stop & Glow* enthalten sind, sowie die Messungen der Lichtintensitäten erfolgten automatisch am Gerät. Der Quotient der relativen Lichteinheiten (RLU) der Firefly-Luciferase geteilt durch die RLU der Renilla-Luciferase wurde als Wert der relativen Stärke der untersuchten Promotor-Sequenz bestimmt.

3.7 Expressionsstudien

3.7.1 Transfektion mit siRNA

Um den Einfluss der Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT4, SMAD1 und SMAD4 auf die Expression von FANC mRNA zu untersuchen, wurden die entsprechenden Gene mittels siRNA herunterreguliert. Dafür wurden Zellen 24 h nach dem Aussäen mittels ON-TARGET^{plus} siRNA[®](Dharmacon) transfiziert. Bei dieser siRNA handelte es sich um eine Mischung aus vier verschiedenen siRNAs, um die Effizienz der Expressionsminderung eines Genes zu maximieren. Neben dem Gen, welches reguliert werden sollte, wurden zusätzlich Zellen mit siRNA einer GAPDH Positivkontrolle sowie einer sogenannten *No target* siRNA als Negativkontrolle behandelt. Als Transfektionsreagenz kam das Produkt Dharmafect 1 (Dharmacon) und für Fibroblasten das Produkt Dharmafect 4 zum Einsatz. Transfiziert wurde nach dem Protokoll des Herstellers. Eine Ernte der Zellen fand in Abhängigkeit der im Anschluss verwendeten Methode statt. Bei mRNA Studien, zum Beispiel mittels qPCR, wurden die Zellen nach 36 h geerntet, für Proteinanalysen nach 48 h. Sollte eine Analyse von Zellzyklusparametern durchgeführt werden, wurden 24 h nach der Transfektion die Zellen mit MMC behandelt.

4 Kapitel 4

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation der Promotorregionen

4.1.1 Bestimmung der *Transkription start sites (TSSs)*

Um eine möglichst genaue Kartierung des Promotors durchführen zu können, musste zuerst der Punkt des Transkriptionsstarts (+1) bestimmt werden. Dies kann experimentell oder über Datenbanken erfolgen. Im vorliegenden Fall wurden die TSSs mit Hilfe der *Database of Transcription Start Sites (DBTSS)* bestimmt. In dieser Datenbank sind die TSS für eine große Anzahl von Genen annotiert, welche im Gegensatz zu anderen Datenbanken auch experimentell bestätigt sind. Dafür wurde sich der Methode des massiven parallelen Sequenzierens bedient. Sogenannte *oligo-capped cDNAs*, die dafür erstellt wurden, repräsentieren unterschiedliche Transkripte welche durch unterschied-

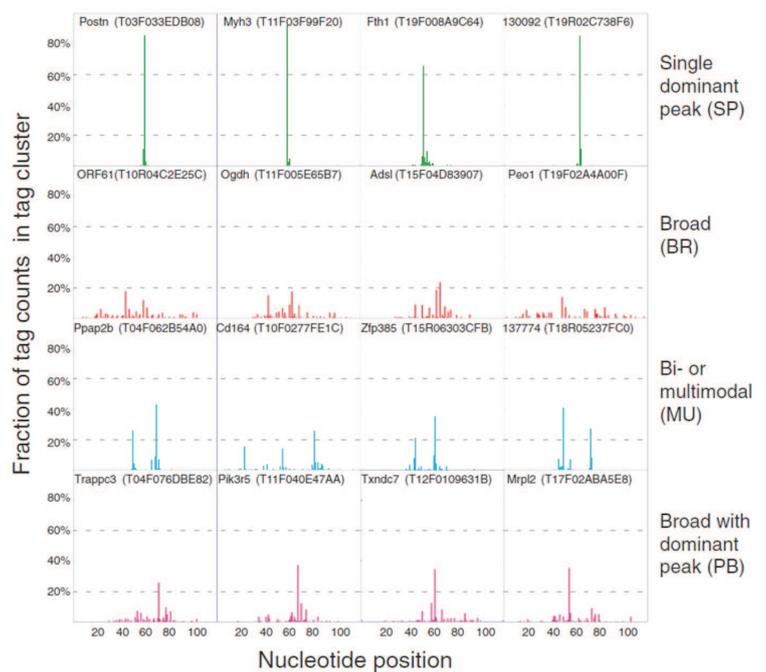


Abbildung 4.1 Darstellung der verschiedenen Promotertypen nach Carninci et al [92]. Für jeden Typ sind mehrere Vertreter dieser Art dargestellt. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der *cap analysis of gene expression (CAGE)* realisiert.

liche TSS charakterisiert sind. Aus diesem Grund wurde auf eine eigene experimentelle Bestimmung verzichtet, da die Daten dieser Datenbank aus redundanten Ergebnissen bestehen und daher als belastbar anzusehen waren. Generell finden sich wichtige Unterschiede in der Verteilung der TSSs, die für die Einteilung der Promotortypen in verschiedene Klassen verantwortlich sind, vergl. Abbildung 4.1. Die erste Klasse wird als die *single peak (SP)* Klasse bezeichnet und ist durch einen scharfen Ausschlag charakterisiert, der exemplarisch für eine einzelne gut definierte TSS steht. Die ausgedehnte Variante, *broad (BR)*, bezeichnet mehrere schwach definierte TSSs. Die bimodale/multimodale Verteilung *bimodal/multimodal (MU)* zeigt gut definierte TSSs innerhalb eines Clusters. Die Kombination von TSSs aus der Klasse der eindeutig definierten TSSs, welche von schwächeren TSSs umgeben werden, resultieren in einem Bild der ausgedehnten Verteilung mit einer dominanten Spitze, *broad with dominant peak shape (PB)*. Die Promotoren der FA core complex Gene gehören zur letzten Gruppe, PB. Bei den von uns untersuchten Promotoren begann die Transkription in der Regel mit einem Adenosin an der Position +1. Sehr häufig war eine Verteilung zu beobachten, die die Position -1 +1 als eine Abfolge von einem Pyrimidin, gefolgt von einem Purin beschreibt (PyPu). Als maßgeblicher Transkriptionsstart wurde die Stelle verwendet, die den vorliegenden Transkripten am häufigsten als TSS zugeordnet werden konnte.

4.1.2 Daten der Promotorregion

4.1.2.1 Bestimmung der relativen Promotorausdehnung

Ausgehend von der TSS wurde ein möglicher Promoterbereich gewählt, welcher sich an zwei Aspekten orientierte. Zum Einen an Daten, die aus der Literatur gewonnen wurden, zum Anderen aus Daten, die durch die Verwendung von *in silico* Vorhersagealgorithmen gewonnen wurden [93, 94, 95]. Somit wurde ein Bereich von ca 1 kb stromaufwärts von der +1 der TSS Position gewählt und als L1 bezeichnet. Diese Region wurde anschließend richtungsspezifisch über einen PCR Ansatz in das Reportergenplasmid pGL3 basic (Promega) kloniert. Mit Hilfe der Sequenzinformationen der FA core complex Gene und ihrer flankierenden Sequenzen als Grundlage der Primergestaltung, wurden weitere Fragmente aus genomischer DNA gewonnen und durch Sequenzierung ihre Integrität bestätigt. Neben den L1 Konstrukten wurde eine zweite Region kloniert, die in etwa halb so groß war wie die Region L1. Diese, als L2 bezeichnete Region, zeichnet sich durch ihre Ausdehnung von der proximal Seite des Promotors bis ungefähr in die Mitte der Gesamtregion aus (402 bp - 569 bp). Das kürzeste Fragment deckt einen Bereich von 186 bp bis 250 bp direkt stromaufwärts des TSS ab und wurde L3 bezeichnet, siehe Abbildung 4.2 und Tabelle 4.1.

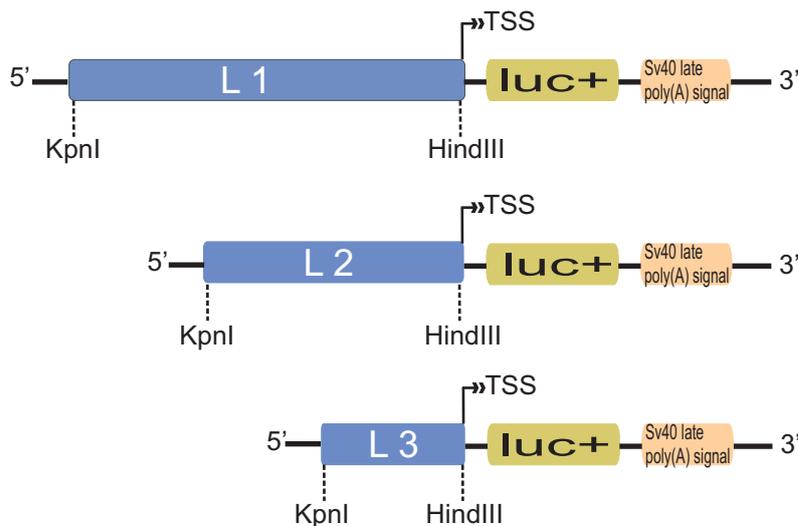


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der Promotorkonstrukte L1, L2 und L3 und ihrer Plasmidumgebung. Die Größen für L1, L2 sowie L3 können in 4.1 nachgelesen werden.

Im Laufe der Arbeit wurden noch weitere Konstrukte getestet, die weitere Charakteristika der Promotoren aufdecken sollten. So wurde die Region L2 in umgekehrt-komplementärer Orientierung in das Konstrukt inseriert, sowie die Region vom 5' Ende der L1 Region bis zum 5' Ende der L2 Region. Dieses Konstrukt wurde ebenfalls in umgekehrt-komplementärer Orientierung getestet. Die Aktivität der potentiellen Promotorfragmente wurde durch ein *Dual-Luciferase-Assay (DLR)* getestet, in der firefly und *renilla* Luziferasekonstrukte transient in HeLa und HEK293 Zellen transfiziert wurden.

Tabelle 4.1 Größe und Lage der einzelnen Promotorkonstrukte der FA core complex Gene

| Gen | Chromosom | Promotorregion | | | Strang | Größe in bp | | | Region relativ zur TSS | | |
|--|-----------|----------------|----------|----|--------|-------------|-----|-----------|------------------------|----------|--|
| | | Start | Ende | L1 | | L2 | L3 | L1 | L2 | L3 | |
| <i>chromosomale Position (ref. hg19)</i> | | | | | | | | | | | |
| FANCA | 16 | 89883006 | 89884049 | - | 1044 | 425 | 219 | -1002/+42 | -383/+42 | -177/+42 | |
| FANCB | X | 14891150 | 14892204 | - | 1055 | 436 | 250 | -1021/+34 | -402/+34 | -216/+34 | |
| FANCC | 9 | 98079252 | 98080351 | - | 1099 | 402 | 186 | -1098/+1 | -401/+1 | -185/+1 | |
| FANCE | 6 | 35419104 | 35420181 | + | 1078 | 410 | 225 | -1034/+44 | -366/+44 | -181/+44 | |
| FANCF | 11 | 22647334 | 22648403 | - | 1069 | 415 | 232 | -104/+23 | -392/+23 | -209/+23 | |
| FANCG | 9 | 35079995 | 35081083 | - | 1089 | 569 | 193 | -1071/+18 | -551/+18 | -178/+18 | |
| FANCL | 2 | 58468480 | 58469550 | - | 1071 | 466 | 223 | -1065/+6 | -460/+6 | -217/+6 | |
| FANCM | 14 | 45604137 | 45605214 | + | 1077 | 456 | 234 | -1012/+65 | -391/+65 | -169/+65 | |

4.1.2.2 Sequenzcharakteristika der Promotoren

Mit ca. 70% GC Gehalt wiesen die untersuchten Promotoren einen höheren Wert auf als der Durchschnitt des Gesamtgenoms. Außerdem fanden sich auffällig viele CpG Inseln

in der untersuchten Sequenz sowie keine TATA-Boxen oder ähnliche Strukturen wie sie bei TATA Box-gesteuerten Promotoren üblich wären. Ebenso waren die Promotoren der *core complex* Gene nur sehr rudimentär zwischen den verschiedenen Spezies konserviert, teilweise nur bis zum Huhn (z.B. FANCA). Daher handelte es sich um Promotoren, die zur Klasse der TATA-losen Promotoren gehören (vergl. 1.3.2) und damit Charakteristika aufwiesen, die typisch für Promotoren von Haushaltsgenen (*housekeeping genes*) sind [88].

4.1.3 Unterschiedliche Aktivität innerhalb der *core complex* Promotoren

Wie bereits in 4.1.2.1 kurz beschrieben, wurden die durch PCR gewonnenen Fragmente in Reporterplasmide kloniert. Dabei wurde das Fragment direkt vor das firefly Luziferasegen gesetzt und transient in zwei verschiedene Zelllinien transfiziert: HeLa und HEK293. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden zwei weitere, bekannte Promotoren als Kontrolle verwendet. Der Promotor des *simian virus 40* (SV40) lag bereits kommerziell erhältlich im pGL3 SV40 Vektor (Promega) vor und diente als Vergleichswert für einen starken Promotor. Als Beispiel für einen schwächeren Promoter wurde der des GLI3 Genes (NM_000168) (*Greig cephalopolysyndactyly syndrome*, MIM #175700, 300 bp) ausgewählt und in den pGL3 basic Vektor, analog zu den Fragmenten L1 - L3, eingebracht [96].

4.1.3.1 Aktivität der L1, L2 und L3 Fragmente

Die Messung der Promotorkonstrukte hatte gezeigt, dass alle getesteten Fragmente eine Promotoraktivität besitzen, sich aber untereinander in ihrer Aktivität stark unterscheiden können. Die Region L1 besaß eine Aktivität, die sich im Bereich von 20 % - 50 % der Stärke des SV40 befand. Die höchste Aktivität konnte bei FANCA beobachtet werden, sowohl in HeLa als auch in der HEK293 Zelllinie (Abb. 4.3). Die Unterschiede zwischen den anderen Genen (B-M) waren sehr gering und pendelten in einem Bereich von ca 20 % des SV40 Promotors. Für die bessere Übersicht und Vergleichbarkeit wurde in der Auswertung aller Messungen die SV40 Positivkontrolle

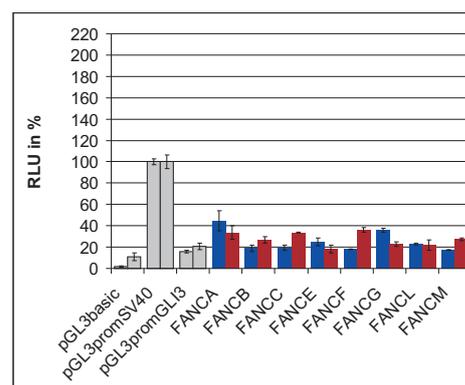


Abbildung 4.3 Promotoraktivität der Region L1, relativ zu SV 40. Ergebnisse aus der HeLa Zelllinie sind in blau dargestellt, die der HEK293 Zelllinie rot. Die Kontrollen sind in grau.

gleich 100 % gesetzt und ein promotorloses Konstrukt (pGL3 basic) als Negativkontrolle mitgeführt. Als Einheit für die Stärke werden üblicherweise die *relative light units (RLU)* verwendet.

Nach der Auswertung der Rohdaten für die Region L2 zeigte sich ein anderes Bild als es vorher für die Region L1 zu beobachten war. Die Stärke der Promotorfragmente war ungleich höher und zeigte Werte, die sich, verglichen mit denen des SV40, auf ca. 40 % - 115 % beliefen (Abb. 4.4). Interessant war auch die Tatsache, dass der Unterschied zwischen den einzelnen Werten nun deutlich größer war. Allerdings ließ sich auch in dieser Messreihe kein Unterschied zwischen den verschiedenen Zelllinien beobachten. Besonders *FANCA*, *FANCL* und *FANCM* zeigten Werte um die 100 % und hoben sich damit von den anderen Promotoren in ihrer Aktivität stark ab.

Die insgesamt stärkste Aktivität in den Reportergergen Untersuchungen war in der Region L3 zu beobachten. Obwohl die Fragmente am kürzesten waren, so war hier erneut ein Anstieg gegenüber den Regionen L1 und L2 zu beobachten. Auch wenn sich die untere Grenze mit Werten um 50 % nicht sehr stark änderte, so schnellte die Luziferaseaktivität bei *FANCF* auf ca. 203 % nach oben, also eine Verdoppelung des Wertes wie er für die positiv Kontrolle definiert wurde (Abb. 4.5). Auch die Werte von *FANCC* (107 %) und *FANCB* (166 %) bewegten sich oberhalb der 100 %.

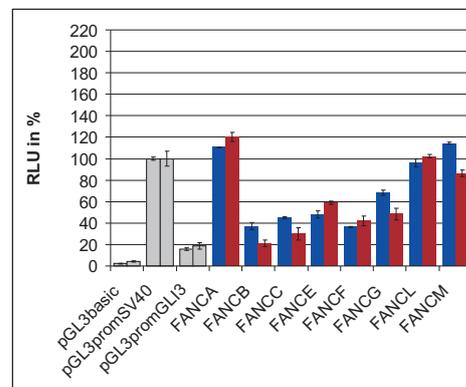


Abbildung 4.4 Promotoraktivität der Region L2, Darstellung analog zur Abbildung 4.3

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten aus dem HeLa, beziehungsweise dem HEK293 System, konnte nicht beobachtet werden.

4.1.3.2 Monodirektionalität und inhibitorische Regionen

Um die Frage zu beantworten, ob die Promotoren nur eine richtungsspezifische Initiation der Transkription zeigen, wurde die Region L2 in der umgekehrt-komplementären Leserichtung in das Reporter-gen Plasmid eingefügt und unter den gleichen Bedingungen gemessen wie vorher die Konstrukte L1-L3. Hier zeigte sich nun deutlich, dass die gemessenen Werte in den HeLa und HEK293 Zellen im Bereich der Negativkontrolle lagen (Abb. 4.6). Etwas höher, aber nicht signifikant unterschiedlich, rangierte der Wert für *FANCB*. Bei einer genauen Betrachtung der genomischen Region, in der *FANCB* liegt, fällt auf, dass ein weiteres Gen, *MOSPD2* (motile sperm domain containing 2) einen teilweise überlappenden Promotorbereich mit *FANCB* besitzt, allerdings auf dem Gegenstrang (Abb. 4.7).

Als interessant stellte sich auch die Beobachtung heraus, dass die Luziferaseaktivität wie sie für L1, L2 und L3 gemessen wurde mit der Verkürzung der Fragmente zunahm oder andersherum gesehen mit der zunehmender Länge abnahm, relativ zum TSS. Hinweise in der Literatur zeigten, dass es in seltenen Fällen innerhalb eines Promotors inhibitorische Regionen geben kann, die unter Umständen als Repressoren oder *silencer* fungieren können [97]. Um dies zu überprüfen, wurde die Sequenz, welche sich vom 5' Ende des L1 Fragmentes bis zum 5' Ende des L2 Fragmentes erstreckte, in das Reportgen Plasmid kloniert und via DLR gemessen. Allerdings wurde in diesem Fall nicht das pGL3 basic Plasmid zur Klonierung verwendet, sondern das pGL3 SV40 Plasmid. Durch den integrierten SV40 Promoter war es möglich festzustellen, ob die inserierten FA Promotor Sequenzen eine

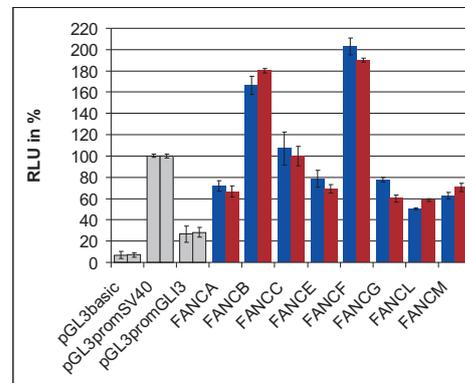


Abbildung 4.5 Promotoraktivität der Region L3, Darstellung analog zur Abbildung 4.3 und 4.4

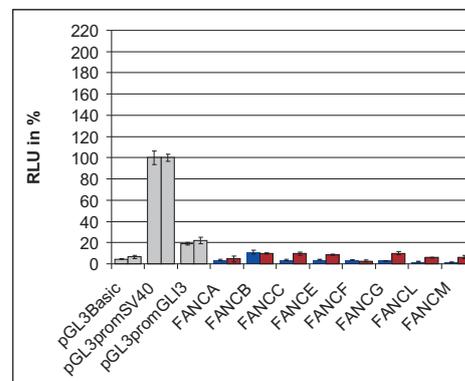


Abbildung 4.6 Die Promotoren sind nur monodirektional aktiv. Die umgekehrt-komplementäre Klonierung zeigte lediglich eine Promoteraktivität auf dem Niveau der Negativkontrolle.

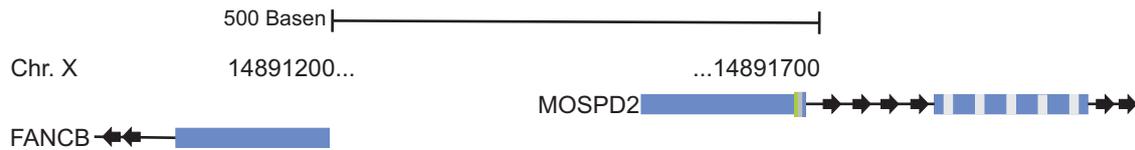


Abbildung 4.7 Genomische Umgebung der Gene *FANCB* und *MOSPD2*, eine mögliche Promotorüberlappung ist erkennbar (14891200-14891700). Dargestellt die 5'-UTR Region mit der Leserichtung sowie dem ersten Exons bei *MOSPD2*

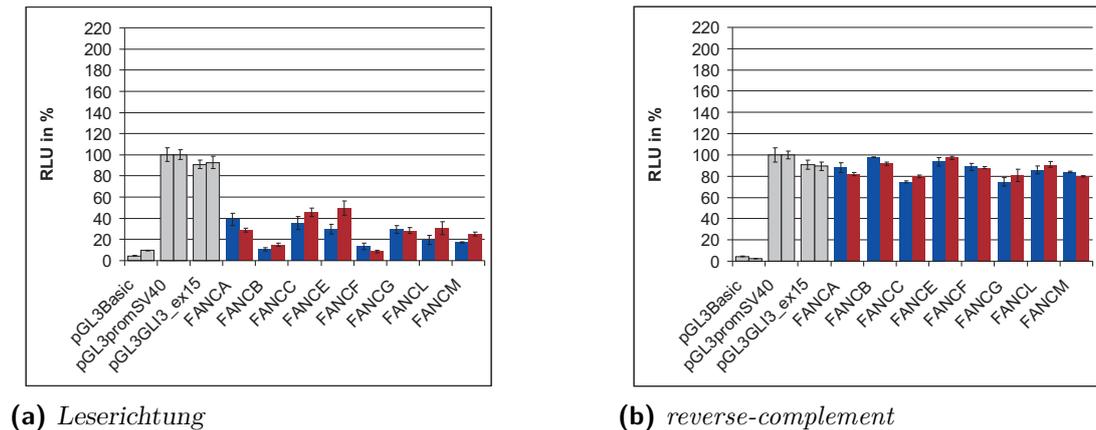


Abbildung 4.8 Ergebnisse der Luziferasemessungen für die inhibitorischen Regionen innerhalb der Promotoren. (a) Klonierung in Leserichtung (b) umgekehrt-komplementäre Klonierung (reverse-complement). Darstellung analog zu Abbildung 4.3.

mögliche inhibitorische Wirkung auf den Promotor hatten. Dafür wurde die gewünschte Sequenz in die *multiple cloning site* vor den SV40 Promoter kloniert (Vergl. 5.4b). Eine Sequenz, 600 bp proximal von Exon 15 des *GLI3* Gens, wurde ebenfalls in pGL3 SV40 eingebracht, um auszuschließen, dass es sich um positive oder negative Effekte handelte, welche nur durch die Insertion eines Sequenzabschnittes hervorgerufen wurde. Dies diente daher als Kontrolle. Wie Abbildung 4.8a zeigt, wurde die Aktivität des SV40 Promotor durch die Fragmente deutlich reduziert. Teilweise war nur noch eine Restaktivität von 5% zu beobachten (*FANCF*). Auch in diesem Beispiel ließ sich kaum ein Unterschied zwischen den verwendeten Zelllinien messen. Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob ähnlich wie bei den transkriptionsaktivierenden Regionen des Promotors auch die inhibitorische Sequenz eine monodirektionale Wirkungsweise zeigte. Die Messung der für diese Frage erstellten Reportergerätenkonstrukte lieferte ein erstaunliches Ergebnis. Eine Repression der Promotoraktivität konnte nicht mehr beobachtet werden. Wie Abbildung 4.8b zeigt, unterscheiden sich die gemessenen Werte nur wenig von der Positivkontrolle (pGL3 SV40). Selbst die Werte für die Promotoren mit den niedrigsten Werten, *FANCC* und *FANCG*, zeigen immer noch ca. 75% der SV40 Kontrollaktivität. Von einer signifikant inhibitorischen Funktion kann weder in HeLa noch in HEK293 Zellen gesprochen werden.

4.1.4 Der FAAP100 Promotor

Als Mitglied des *core complexes* wurde *FAAP100* (NM_025161) erst kürzlich identifiziert [98] und einem Subkomplex von FANCB-FANCL-FAAP100 zugeordnet. Da es bisher keine Patienten gibt, die mit einer Mutation in *FAAP100* in Verbindung gebracht werden konnten, ist *FAAP100* (noch) kein FANC-Gen. Daher wurde das Gen nicht in alle unsere Untersuchungen mit einbezogen, sondern lediglich überprüft, ob sich bei der Verteilung von starken und schwachen Promoterregionen Gemeinsamkeiten mit anderen *FA core complex* Genen finden ließen. Dafür wurde der *FAAP100* Promotor mit den in 4.1.1 und 4.1.2.1 beschriebenen Methoden identifiziert und anschließend im Ganzen (1 kb) und in Fragmenten zu 200 bp zerlegt, in pGL3 basic kloniert, und im Vergleich mit *FANCA* in HEK293 Zellen auf Promotoraktivität hin untersucht. Es zeigte sich, dass *FAAP100* eine ähnliche, wenn auch nicht identische Verteilung von starken und schwachen Promotorsegmenten besitzt. So zeigten die 200 bp langen Teilstücke, die die Region von -1000 bis -400 abdeckten, nur eine geringe Aktivität, welche sich auf dem Niveau der Negativkontrolle oder knapp darüber befand (max. 16%) (Abb. 4.9). Identisch bei beiden Genen war die Beobachtung, dass die höchste Aktivität im 3' Ende des Promotors zu finden war, also von -400 bis +1. Unterschiede gab es jedoch in der genauen Verteilung. Während bei *FANCA* die höchste Promotoraktivität im Bereich von -400 bis -200 zu finden war, zeigte, im Gegensatz dazu, *FAAP100* im Bereich von -200 bis +1 die höchste Aktivität. Neben diesen Gemeinsamkeiten ließ sich jedoch eine Besonderheit von *FAAP100* gegenüber *FANCA*, aber auch allen anderen *FA core complex* Genen feststellen. Der Wert für die Gesamtregion des *FAAP100* Promotors von 1 kb lag mit 115% genau 15% über dem der Positivkontrolle und war somit der höchste Wert, der für ein Promotorkonstrukt gemessen wurde. Möglicherweise fehlt dem *FAAP100* Promotor eine inhibitorische Region.

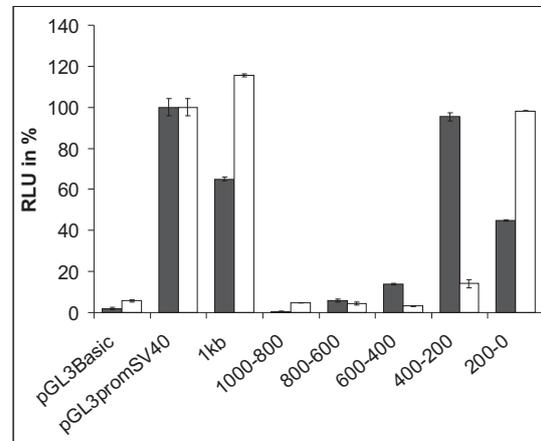


Abbildung 4.9 Promotoraktivität von *FAAP100* im Vergleich zu *FANCA*. Die Messungen wurden in HEK293 Zellen durchgeführt. *FAAP100* ist in weiß, *FANCA* in schwarz dargestellt. Die Zahlen geben die relative Entfernung zum TSS an.

4.2 Bestimmung der Transkriptionsfaktorbindestellen (TBS)

4.2.1 Identifikation mittels *in silico* Ansätzen

Um potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen (TBS) zu identifizieren, wurde ein *in silico* Ansatz gewählt, der die Sequenz der Promotorbereiche anhand einer Matrix auf Konsensussequenzen für bekannte Transkriptionsfaktoren (TFs) hin untersucht hat. Die verwendeten Programme für diese Aufgabe waren einerseits das kommerzielle Programm MatInspector® der Firma Genomatix sowie das frei zugängliche Programm PROMO. Beide Programme bedienen sich der TRANSFAC Datenbank, in der die Konsensussequenzen der TFs hinterlegt sind. Da die beiden Programme unterschiedliche Algorithmen verwendeten, erwarteten wir auch leicht divergente Resultate. Die Analysen wurden unter zwei verschiedenen Voraussetzungen durchgeführt. So wurde zuerst die sogenannte *matrix similarity*, also der Grad der Übereinstimmung zwischen der Erkennungssequenz des TF und der eigentlichen vorliegenden Sequenz des Promotors eingestellt. Standardmäßig ist diese Größe auf 70 % voreingestellt. Dies bedeutet, dass eine Sequenz als TBS erkannt wird, wenn sie eine 70 %ige Übereinstimmung mit der TF Erkennungssequenz aufweist. Zusätzlich wurden die Promotoren noch mit einer Übereinstimmung von 85 % durchsucht, um noch belastbarere Ergebnisse zu erhalten. Unsere Ergebnisse ließen sich in zwei Gruppen aufteilen: So gab es TFs, die wir ausnahmslos in allen Promotoren finden konnten (mit 70 % Übereinstimmung) und Faktoren die vereinzelt in den vorliegenden Promotorsequenzen auftraten. Zu der ersten Gruppe gehörten die Faktoren:

- TFII-I
- TFIID
- E2F
- STAT4
- YY1
- c-Jun
- IRF1

In dieser Gruppe befinden sich mit TFIID, E2F, STAT4 und IRF gleich mehrere Faktoren, die neben der Transkriptionsinitiation in der Literatur auch mit der Regulation der FA Gene in Verbindung gebracht wurden [80, 89, 99, 100, 101]. Tabelle 4.2 zeigt die Gruppe von TBSs, die ebenfalls stark repräsentiert waren, jedoch nicht in allen Promotoren eine Bindungsstelle aufwiesen. Eine Übereinstimmung der Konsensussequenz in 85 %

Tabelle 4.2 Verteilung der TFs, welche in mehreren, aber nicht in allen *core complex* Promotorsequenzen identifiziert wurden. *matrix similarity von 70 %, sonst 80 %

| <i>FANCA</i> | <i>FANCB</i> | <i>FANCC</i> | <i>FANCE</i> | <i>FANCF</i> | <i>FANCG</i> | <i>FANCL</i> | <i>FANCM</i> |
|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|---------------|
| <i>STAT1beta</i> | <i>STAT1beta</i> | <i>STAT1beta</i> * | <i>STAT1beta</i> | <i>STAT1beta</i> | <i>STAT1beta</i> | <i>STAT1beta</i> * | |
| <i>SP1</i> | <i>SP1</i> | <i>SP1</i> | <i>SP1</i> | | <i>SP1</i> | <i>SP1</i> | |
| <i>XCPE</i> | <i>XCPE</i> | <i>XCPE</i> | <i>XCPE</i> | | <i>XCPE</i> * | <i>XCPE</i> | |
| <i>AP1</i> | | <i>AP1</i> | | | <i>AP1</i> | <i>AP1</i> | |
| | | <i>STAT5A</i> | | <i>STAT5A</i> * | <i>STAT5A</i> | <i>STAT5A</i> | <i>STAT5A</i> |
| | | <i>c-Fos</i> | | | | | <i>c-Fos</i> |
| | <i>NFκB</i> * | | | | | <i>NFκB.</i> | |
| <i>SMAD</i> | <i>SMAD</i> * | | | <i>SMAD</i> * | <i>SMAD</i> | <i>SMAD</i> * | |
| | | | | | | | <i>YB1</i> |
| <i>GATA3</i> * | | | <i>GATA3</i> * | | | | |

der Nucleotide war allerdings ein recht hoher Wert. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Suche mit 70 % durchgeführt. Es muss erwähnt werden, dass ein Wert von 70 % in vielen Vorhersageprogrammen der üblichen Voreinstellung entspricht und somit keinen niedrigen Wert darstellt. Bei dieser Einstellung wurden noch weitere, neue Bindestellen identifiziert, zusätzlich konnten bereits gefundene Bindestellen auch in anderen Genen ermittelt werden. Aufgrund der Daten aus diesen beiden Suchdurchgängen wurden für weitere Untersuchungen STAT1, STAT4 sowie aus der Gruppe der SMADs SMAD1 und SMAD4 ausgewählt. Die Festlegung auf diese Transkriptionsfaktoren ergab sich jedoch nicht ausschließlich aus den durchgeführten *in silico* Prädiktionen. Diese vermittelten vielmehr eine Idee, welche Faktoren nun *in vivo* eine Rolle spielen könnten. Neben den Vorhersagen waren Angaben in der Literatur wichtig, um mögliche, regulative Faktoren einzugrenzen [18, 102, 103].

4.2.2 Überprüfung mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)

Zur Überprüfung der *in vitro* Bindung eines Transkriptionsfaktors (Protein) an die DNA, war ein EMSA oder *auch gel shift assay* genannt, die Methode der Wahl. Hierbei wurde die Tatsache genutzt, dass ein DNA-Protein Komplex in einem DNA-Retardierungsgel deutlich langsamer wandert, als freie DNA oder freies Protein. Für diesen Versuch wurden Oligonukleotide verwendet, die eine Erkennungssequenz für STAT oder SMAD enthielten und durch einen Biotinanzhang gekennzeichnet waren. Mit Hilfe dieser Markierung ergab sich später die Möglichkeit, durch eine nicht radioaktive Detektionsmethode (Streptavidin

- HRP), das Ergebnis des Experiments auf dem Röntgenfilm beziehungsweise mit einem Gelddokumentationsgerät anschaulich darzustellen. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Analysen. Dabei repräsentierte jede Auftragsspur ein spezifisches Ereignis. Die linke Spur bestand lediglich aus dem markierten Oligonukleotid ohne die Zugabe von Protein in Form eines Kernextraktes. In der mittleren Spur wurde der Kernextrakt hinzugefügt und eine spezifische Bindung von DNA und Protein konnte stattfinden. In der rechten Bande wurde ein unmarkiertes Oligonukleotid, welches sequenzidentisch zu dem biotinmarkierten Oligo war, hinzugegeben, allerdings in einem 200-fachen Überschuss. Dies fing, sofern die vorherige Bindung spezifisch war, den Transkriptionsfaktor vor der Bindung an die den biotinylierten Oligonukleotide ab und der *gel shift* wurde rückgängig gemacht. In Bezug auf unsere *core complex* Gene ließ sich feststellen, dass in allen Fällen ein deutlicher, spezifischer *gel shift* zu beobachten war. Ebenfalls ließ sich der *shift* durch Hinzufügen von nicht biotinylierten Oligonukleotiden rückgängig machen. Die EBNA Kontrolle diente als positiv Kontrolle für die grundlegende Funktionalität des Experiments. Ebenso wie das verwendete unspezifische, markierte Oligonukleotid (*E.coli* M13). Durch diese Kontrolle konnte ausgeschlossen werden, dass die Proteine unspezifisch an jede Art von DNA binden. (Abb. 4.10).

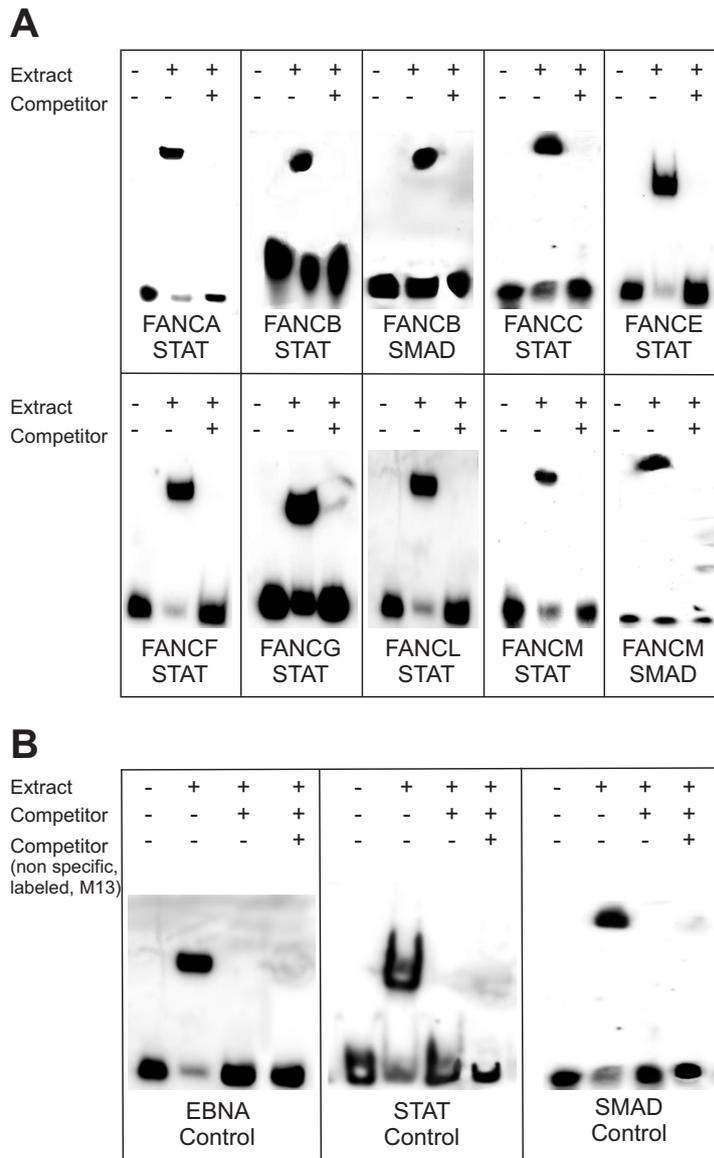


Abbildung 4.10 *Electrophoretic mobility shift assay.* (a) Untersuchung der spezifischen Bindung verschiedener Oligonukleotide (STAT/SMAD) an den Promotorbereich der angegebenen Gene. Ein *shift*, und damit eine spezifische DNA:Protein Duplexbildung, konnte gezeigt werden. (b) Neben der Kontrolle aus DNA und Proteinextrakt des Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen, wurde auch STAT und SMAD auf ihre Spezifität getestet indem ein unspezifisches, markiertes Oligonukleotid (*E.coli* M13) verwendet wurde. Da hier kein *shift* beobachtet werden konnte, durch das Binden des Proteins an jegliche Art von DNA, muss von der Spezifität der Duplexe in (a) ausgegangen werden.

4.3 Konservierte Sequenzabschnitte innerhalb der FA Promotorregionen

4.3.1 Untersuchungen mit sequenzbasierten Analysemethoden

Auch wenn die Promotoren von Haushaltsgenen in der Regel nur sehr schwach konserviert sind, so gibt es doch Bereiche, die Gemeinsamkeiten aufwiesen [88], weniger zwischen den verschiedenen Spezies als zwischen Genen einer bestimmten Gruppe, wie zum Beispiel der *core complex* Gene. Daher sollte auch für die *core complex* Gene untersucht werden, ob es konservierte Sequenzabschnitte innerhalb der Promotoren gibt, denen möglicherweise funktionelle Eigenschaften zugeschrieben werden können. Zu diesem Zweck wurde mit dem MEME Programm (Multiple Em for Motif Elicitation) in den Sequenzen der *core complex* Gene nach *de novo* Motiven gesucht. *De novo* deshalb, da diese Motive noch nicht annotiert sind. Das Programm suchte in den vorgegebenen *core complex* Promotorsequenzen nach Gemeinsamkeiten in der Sequenz. Diese so erstellten Sequenzlogs zeichneten sich dadurch aus, dass sie keine Lücken enthielten und somit einem Motivblock entsprachen. Insgesamt suchte das Programm nach fünf unterschiedlichen Motiven, da dies ungefähr der Hälfte der maximal auflösbaren Motive darstellt. Dabei stellte sich heraus, dass die *core complex* Gene mehrere Sequenzhomologien besitzen, die ein oder mehrmals in der Sequenz vorkommen konnten. Eine Homologie beschrieb in diesem Fall jedoch keine 100%ige Übereinstimmung, sondern Sequenzen, die durchaus in Teilen voneinander abweichen konnten, jedoch ein sehr ähnliches Grundgerüst besaßen. Beim Vergleich der FA *core complex* Gene ergab sich ein interessantes Bild im Hinblick auf das Vorkommen und die Verteilung verschiedener Motive. Wie Abbildung 4.11 übersichtlich verdeutlicht, gab es eine offensichtliche Zweiteilung der Motivverteilung. In Abbildung 4.11a ist der Bereich von -1000 nt bis ca -850 nt abgebildet. Hier zeigte sich eine ungleichmäßige Verteilung von vier unterschiedlichen Motiven (schwarz, rot, grün und blau) die lediglich in einem Teil der untersuchten Sequenzen vorhanden waren. Abbildung 4.11b zeigt die Verteilung wie sie im Bereich von -500 nt bis -250 nt vorgelegen hatte. Auffällig erschien gleich der Unterschied zur Region im 5' Bereich der Sequenzen. Der 3' Bereich fiel dadurch auf, dass nur zwei Motive (violett und grün) in dieser Region identifiziert werden konnten, die darüber hinaus in fast allen Genen, mit Ausnahme von *FANCF*, vorkamen. Bei genauer Betrachtung bedeutete dies, dass entweder das violette oder das grüne Motiv in allen Genen vorhanden war.

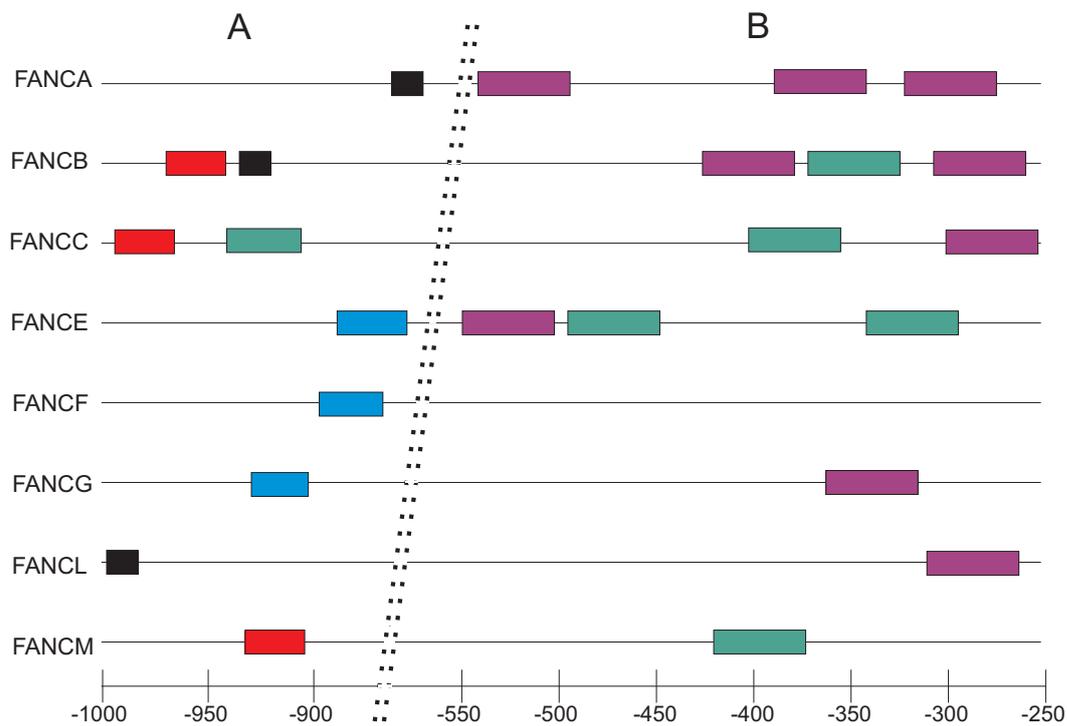


Abbildung 4.11 Darstellung der unterschiedlichen Motive, die mit dem MEME Programm in den core complex Promotoren gefunden wurden. (a) Der 5' Bereich zeigt eine eher zufällige Verteilung verschiedener Motivblöcke. (b) Im mittleren Bereich sowie im 3' Ende der Promotoren verteilen sich zwei unterschiedliche, spezifisch Sequenzmotive (violett und grün).

4.3.2 Analyse von Sequenzlogos (*sequence logos*)

Damit die in Abbildung 4.11 gefundenen Motive nicht nur als abstrakte Balken erkennbar waren, wurden diese in Sequenzlogos übersetzt. Dabei gab die Größe der Buchstaben gleichzeitig den Grad der Konservierung der Nukleotide an den betreffenden Positionen wieder. So ist das Cytosin an Position 2 in allen miteinander verglichenen Sequenzen an dieser Position vorhanden (Abb. 4.12). Bei zwei gleich großen Buchstaben wie zum Beispiel an Position 6, Guanin und Adenosin, war an dieser Stelle in der Hälfte der Sequenzen ein „G“ oder ein „A“ zu finden. Daher war nicht nur die Größe, sondern auch die Anzahl der Buchstaben von Bedeutung, um Aussagen über die Konservierung machen zu können. In der vorliegenden Sequenz (Abb. 4.12) ließen sich an zwei Positionen, welche stärker konserviert waren, zwei Bindestellen für TFs identifizieren: TFII-I, ein Transkriptionsfaktor der für die basale, aber auch aktivierte Transkription in eukaryotischen Genen eine Rolle spielt (RNA Polymerase III) sowie E2F, der in der Literatur auch direkt mit Fanconi Anämie in Verbindung gebracht wurde [99, 100]. Da beide Faktoren in allen untersuchten Sequenzen vorkamen, wenn auch mit einer unterschiedlich starken Konservierung der Konsensussequenz, so konnte davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um eine Gemeinsamkeit der FA *core complex* Promotoren mit funktionellen Implikationen handelt.

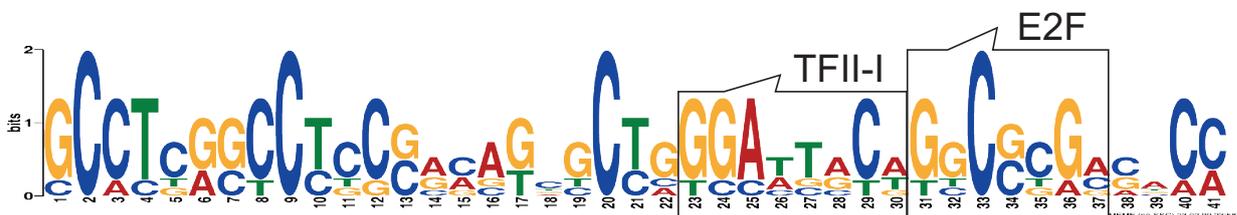


Abbildung 4.12 Sequenzlogo des violetten Motives aus 4.11B. Die Sequenz ist 41 nt lang und beinhaltet zwei Bindungsstellen für prominente TFs. Das Logo wurde von MEME generiert.

Das zweite Sequenzlogo zeichnete sich durch seinen hohen GC Gehalt aus sowie eine relativ starke Konservierung der Nukleotide „G“ und „C“. Die gefundene Sequenz beinhaltete ebenfalls zwei TF Bindestellen, die schon in Abbildung 4.12 dargestellte Konsensussequenz für E2F sowie zusätzlich eine Bindungsstelle für p53. Allerdings war die Bindestelle für p53 wohl eher schwach, da der Vergleich zwischen der idealen Konsensussequenz für p53 5' -PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy- 3' und der maximalen Übereinstimmung in der gefundenen Sequenz, 5' -GGGCT_GCCC- 3' nicht nur eine Lücke aufwies, sondern besonders an der Position der Pyrimidine eine schwache Konservierung zeigte. Daher konnte anhand dieses Logos nicht darauf geschlossen werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit diese TFB *in vivo* auch genutzt würde. Im Idealfall, also einer maximalen, möglichen Übereinstimmung von Konsensussequenz und der hier gefundenen Sequenz, entsprachen neun

von zehn Nukleotidpositionen der Erkennungssequenz, wobei an Position sechs immer ein Fehlbase zu finden war (G/C statt T/A). Die E2F Bindestelle war deutlich stärker konserviert und beschrieb daher eine Gemeinsamkeit, die die untersuchten Promotorsequenzen in Abbildung 4.12 und 4.13 miteinander verband.

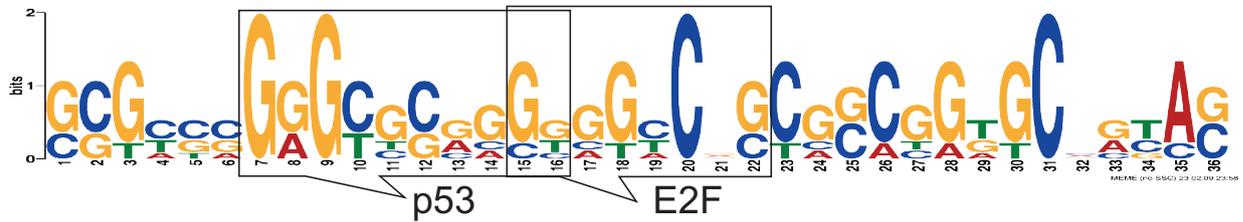


Abbildung 4.13 Sequenzlogo des grünen Motives aus 4.1B. Die Sequenz ist 36 nt lang und beinhaltet eine Konsensussequenz für p53 und E2F. Darstellung analog zu Abb. 4.12.

4.4 STAT und SMAD knockdown mit siRNA

In diesen Experimenten wurde versucht herauszufinden, inwiefern die FA *core complex* Gene durch STAT1/4 sowie SMAD1/4 reguliert werden. Nach den Hinweisen, die durch die bisherigen Experimente sowie die Literatur gegeben waren, wurde auf diese Weise versucht, mit funktionellen Tests eine mögliche Regulation zu verifizieren, beziehungsweise zu falsifizieren. Zu diesem Zweck wurden HeLa und HEK293 Zellen mit siRNA gegen STAT1, STAT4, SMAD1 oder SMAD4 transfiziert und anschließend mit Hilfe der RT-qPCR die Menge des Transkriptes der *core complex* Gene quantifiziert. Somit konnte beurteilt werden, ob die Menge der *core complex* mRNA durch die herunterregulierten TFs beeinträchtigt wurden. Als Kontrolle und zum Ausschluss von zelltypspezifischen Reaktionen wurden die gewonnenen Ergebnisse auch in primären Fibroblasten, einer Kontrolllinie sowie in einer Patientenlinie, die biallelische Mutationen im *FANCA* Gen trägt, reproduziert.

4.4.1 STAT1 knockdown

In diesem Experiment wurden HeLa Zellen mit einer gegen *STAT1* gerichteten siRNA transfiziert und anschließend die Transkriptmenge der *core complex* Gene mit Hilfe der real time PCR quantifiziert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanz wurde der *student's t-test* gewählt und Werte unter $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Abbildung 4.14 zeigt die Auswirkungen des Knockdowns von STAT1 auf die Transkriptmenge der *core complex* Gene. Eine deutliche Reduzierung konnte für FANCA, B, C, E sowie L beobachtet werden. Die Restmenge der entsprechenden Transkripte war deutlich unter 20 % der ursprünglichen Menge. Für die Gene FANCF, G und M war ebenfalls eine Reduzierung der Transkriptmenge zu beobachten, allerdings war diese nicht signifikant, da die Menge des Transkripts, die noch zu beobachten war, zwischen 55 % und 65 % der Ausgangsmenge entsprach. Die Ergebnisse deckten sich mit den *in silico* Daten, die sich für *STAT1* ergeben hatten. Der Western Blot diente als eine weitere

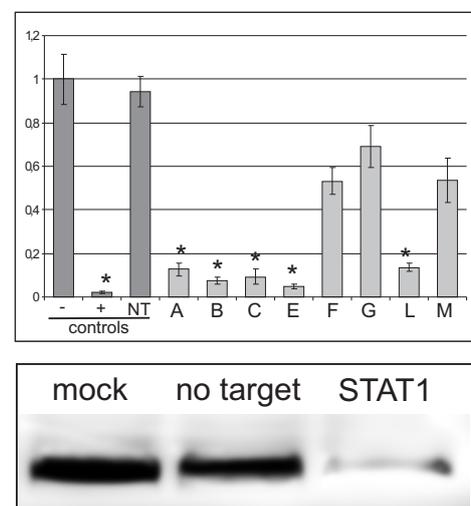


Abbildung 4.14 Auswirkung des knockdowns von *STAT1* auf die Expression der *core complex* Gene. Die Negativkontrolle ist untransfiziert, die Positivkontrolle mit *STAT1* siRNA und NT mit einer 'no target' siRNA transfiziert. Der Western Blot bestätigt eine adäquate Regulierung von *STAT1*. * $p < 0,05$

Kontrolle, um zu zeigen, dass durch die Transfektion mit *STAT1* siRNA auch tatsächlich ein *knockdown* stattgefunden hatte, der sich ebenfalls auf der Proteinebene bestätigen lassen konnte.

4.4.2 *STAT4* knockdown

Es wurden wieder HeLa Zellen verwendet, um die Regulierung der *core complex* Gene durch *STAT4* zu zeigen. Die Transfektion mit *STAT4* siRNA zeigte ein Ergebnis, welches sich von den *STAT1* Experimenten unterschied, sowohl in der Anzahl der regulierten Gene, als auch in den residualen Transkriptmengen (Abb. 4.15). Lediglich drei Gene, nämlich *FANCB*, *E* und *F* zeigten eine signifikante Verringerung ihrer Transkriptmengen auf 30%–18% des Ausgangsniveaus. Im Gegensatz dazu waren von *FANCG* noch deutlich mehr, nämlich 80% der ursprünglichen Transkriptmenge vorhanden. Interessant war das Ergebnis insofern, da nur in drei von acht Genen eine signifikante Verringerung messbar war, obwohl in allen Genen eine *STAT4* Bindestelle mit den *in silico* Programmen vorhergesagt wurden. Zwar waren die Werte für *FANCL* und *M* mit 45% bzw. 35% des ursprünglichen Transkriptes relativ niedrig, in diesen Fällen allerdings statistisch nicht signifikant. Dieses zeigte, dass die Ergebnisse der Vorhersageprogramme immer mit Vorsicht zu genießen sind und nicht ein Faktum, sondern mehr eine Voraussage repräsentierten. Man sollte sich vor Augen führen, dass *in silico* Programme nicht unbedingt eine Aussage darüber treffen können, ob eine Bindestelle auch *in vivo* verwendet wird und wie groß ihr Anteil an der Transkriptionsinitiation ist. Auch in diesem Beispiel wurde durch einen Western Blot gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem siRNA *knockdown* sowie einer verminderten Proteinmenge besteht.

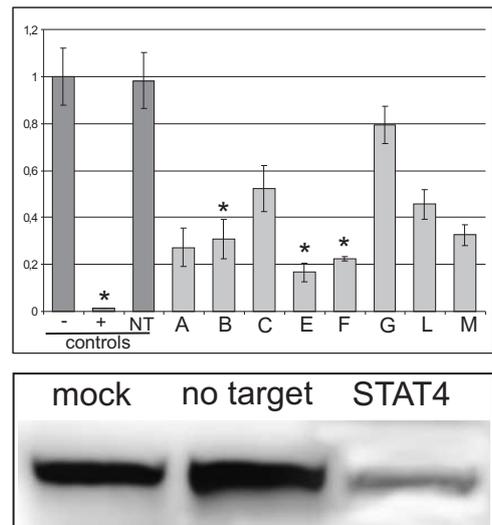


Abbildung 4.15 Auswirkung des *knockdowns* von *STAT4* auf die Expression der *core complex* Gene. Die Negativkontrolle ist untransfiziert, die Positivkontrolle mit *STAT4* siRNA und NT mit einer 'no target' siRNA transfiziert. Der Western Blot bestätigt auch hier eine adäquate Regulierung von *STAT4*. * $p < 0,05$

4.4.3 *SMAD1* knockdown

Abbildung 4.16 verdeutlicht die Ergebnisse, die für den Transkriptionsfaktor *SMAD1* beobachtet wurden. Dadurch, dass das Gen für *SMAD1* fast vollständig durch siRNA herunterreguliert wurde, zeigte sich auch eine deutliche Auswirkung auf Teile der *core complex* Gene. So waren besonders *FANCB*, *L* und *M* hervorzuheben, deren Transkripte nur noch zu maximal 10% der ursprünglichen Menge der Negativkontrolle vorhanden waren. Aber auch die Transkription von *FANCG* war signifikant herabgesetzt und die Auswertung der RT-qPCR Ergebnisse ergab eine Restmenge von knapp unter 30%. Auf die Expression von *FANCE* war praktisch kein Einfluss feststellbar. Selbst wenn die Standardabweichung miteinbezogen wurde, lag die Menge an messbarem Transkript zwischen 80% und 110%. Ein Western Blot bestätigte auch hier die tatsächliche Regulierung von *SMAD1* Protein durch die entsprechende siRNA. Zu sehen war nur noch eine schwache Bande, wie bei den vorherigen Experimenten, was auch zu erwarten war, da es sich bei der siRNA Methode um eine *knockdown* und nicht um eine *knock out* Methode handelt.

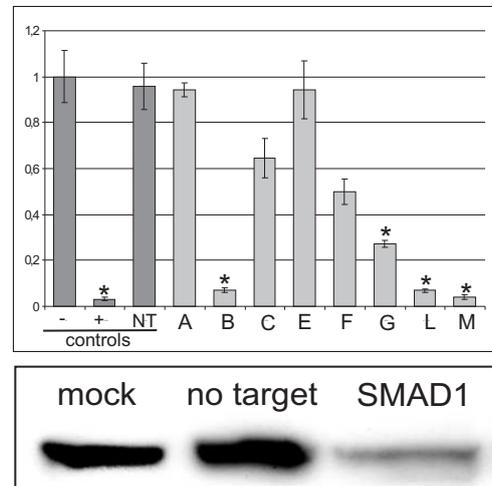


Abbildung 4.16 Auswirkung des *knockdowns* von *SMAD1* auf die Expression der *core complex* Gene. Die Negativkontrolle ist untransfiziert, die Positivkontrolle mit *SMAD1* siRNA und NT mit einer 'no target' siRNA transfiziert. Der Western Blot bestätigt auch hier eine adäquate Regulierung von *SMAD1*. * $p < 0,05$

4.4.4 SMAD4 knockdown

Die Ergebnisse des *SMAD4* knockdowns deckten sich ebenfalls mit den *in silico* Vorhersagen sowie mit Daten aus der Literatur und waren daher von besonderem Interesse. Da *SMAD4* auch als *common Smad* bezeichnet wird und eines der wichtigsten Mitglieder des TGF- β Signalweges ist, könnte seine Missregulation eine große Auswirkung auf unterschiedliche Gene haben. SMAD4 interagiert direkt mit anderen R-SMADs wie SMAD1 oder SMAD5 und kann die Transkription mit Hilfe von weiteren Partnern wie EP300 oder auch STAT aktivieren. Ein direkter Einfluss eines *SMAD4* knockdowns ließ sich auf die Expression von *FANCA*, *C*, *F* und *L* beobachten. Für alle diese Transkripte galt eine maximale Restmenge von 38 %, verglichen mit der ursprünglichen Menge. Eine Aktivitätsreduktion von 62 % bis 90 % (Abb. 4.17) wurde via RT-qPCR gemessen. Besonders *FANCA* zeigte eine starke Reduktion nach Transfektion mit siRNA. Die übrigen *core complex* Gene sprachen ebenfalls in Form einer Aktivitätsminderung auf die siRNA Transfektion an, jedoch waren die gemessenen Werte zu gering, um als signifikant zu gelten. Es zeigte sich auch hier, dass eine Schwelle von ungefähr 50 % des Ausgangstranskripts über die Signifikanz der Regulation entscheidet. Wie in den vorangegangenen Beispielen war die statistische Grundlage der *student's t-test* mit einer Signifikanzschwelle von $p < 0,05$. Der erfolgreiche *knockdown* konnte erneut durch einen Western Blot bestätigt werden. Dieser wies verminderte SMAD4 Expression auf Proteinebene nach (Abb. 4.17).

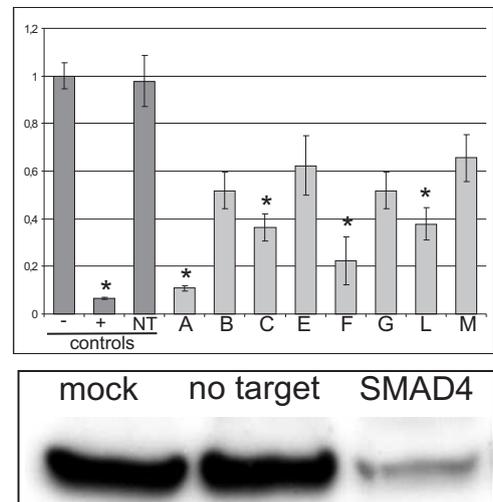
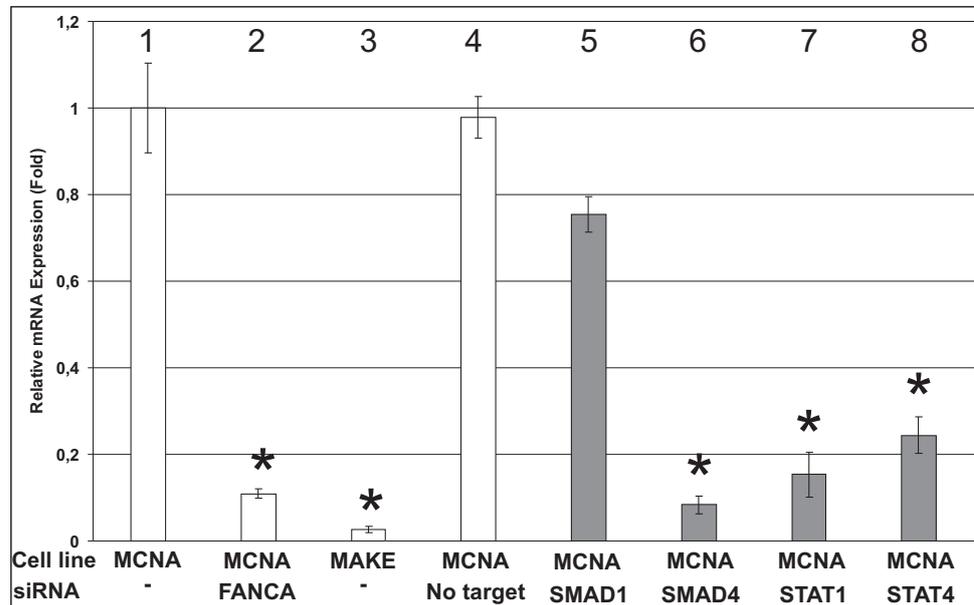


Abbildung 4.17 Auswirkung des knockdowns von *SMAD4* auf die Expression der *core complex* Gene. Die Negativkontrolle ist untransfiziert, die Positivkontrolle mit *SMAD4* siRNA und NT mit einer 'no target' siRNA transfiziert. Der Western Blot bestätigt auch hier eine adäquate Regulierung von *SMAD4*. * $p < 0,05$

4.4.5 *FANCA* Expression bei *SMAD/STAT* knockdown im Vergleich mit *FANCA* Mutationen in primären Fibroblasten



(a) Signifikant (*) verminderte *FANCA* Expression nach Behandlung von primären, normalen Kontrollfibroblasten mit *SMAD4*, *STAT1* oder *STAT4* siRNA (Spur 6-8). Das Ausmaß des knockdowns ist vergleichbar mit derjenigen bei Exposition gegenüber *FANCA* siRNA (Spur 2). Weniger *FANCA* Expression zeigte eine *FANCA* defiziente Zelllinie mit biallelischen Mutationen in diesem Gen (Spur 3). *SMAD1* siRNA führte hingegen zu keiner signifikant veränderten *FANCA* Expression (Spur 5). Grau = Experimentalergebnisse, weiß = Kontrollen



(b) Western Blot zeigt die Expression von *FANCA* nach dem knockdown von *SMAD4* bzw. *STAT1*. Con = HeLa Kontrolle, 1 = MCNA untransfiziert, 2 = MCNA mit siRNA transfiziert, 3 = FA-A (MAKE)

Abbildung 4.18 Expression von *FANCA* in primären Fibroblasten (MCNA) nach der Transfektion mit *STAT* und *SMAD* siRNA. Im Vergleich dazu die *FANCA* Expression in FA-A Fibroblasten (MAKE)

Durch die Tatsache, dass es sich bei HeLa Zellen um eine Tumorzelllinie handelt, eignete sie sich hervorragend für die Kultivierung und für die Analysen. Da die metabolischen als auch die regulativen Abläufe einer Tumorzelle sich grundlegend von denen einer gesunden Zelle unterscheiden können, war es notwendig, die gewonnenen Ergebnisse der siRNA Experimente aus HeLa Zellen in einem anderen Zelltyp zu verifizieren. Dafür wurde sich einer gesunden, primären Kontrollfibroblastenzelllinie bedient (MCNA) und diese mit einer weiteren, primären Fibroblastenzelllinie verglichen, die von einem Patienten mit bialleli-

schen Mutationen im *FANCA* Gen stammte (MAKE, Splicemutation c.3349-1 G > A und Punktmutation c.4069 G > C)). Dementsprechend stand eine *FANCA* negative, sowie eine *FANCA* positive, primäre Zelllinie zur Verfügung. Dies war wichtig, um zelltypspezifische Ergebnisse, wenn vorhanden, von anderen unterscheiden zu können. Eine Reihe von Kontrollen trug dazu bei, die Ergebnisse in ihrer Gesamtheit beurteilen zu können. Die Ergebnisse, die in den untersuchten primären Fibroblasten gewonnen wurden, unterschieden sich nur marginal von den Ergebnissen in der HeLa Zelllinie. Daher waren zelltypspezifische Abweichungen nicht zu beobachten. Abbildung 4.18a zeigt die relative mRNA Expression, die mit Hilfe der RT-qPCR gemessen wurde. Die untransfizierte Fibroblastenzelllinie (MCNA) zeigte wie erwartet keine Veränderung der mRNA Expression. Die gleiche Zelllinie, mit einer siRNA gegen *FANCA* transfiziert, zeigte eine deutliche Reduktion der *FANCA* Expression um 85 %. Noch deutlicher fiel das Ergebnis für die Patientenzelllinie (MAKE) aus. Eine biallelische *FANCA* Mutation führte zu einem fast vollständigen Verlust der mRNA Expression. Bei der letzten Kontrolle handelte es sich um ein 'no target' siRNA, also eine siRNA, die nicht an Sequenzen menschlicher mRNA bindet und daher als Negativkontrolle fungierte. Durch diese Anzahl verschiedener Kontrollen war es möglich, die eigenen Ergebnisse besser zu vergleichen und einzuordnen. Durch die Transfektion mit *SMAD1* siRNA zeigte sich nur ein geringer Effekt auf die *FANCA* Expression. Zwar wurde die Expression um ca. 20 % verringert, doch dies entsprach keiner signifikanten Reduktion und deckte sich mit den Ergebnissen aus den HeLa Zellen. Eine deutliche Abnahme der *FANCA* Expression zeigten die MCNA Zellen nach einer *SMAD4* siRNA Transfektion. Wie schon im HeLa Zellsystem war in diesem Fall lediglich eine Restaktivität von 10 % zu beobachten. Diesem Ergebnis schloss sich der Messwert für *STAT1* siRNA an, 18 % der ursprünglichen Transkriptmenge konnte noch detektiert werden. Dies entsprach einem signifikanten Verlust von genetischer Information (s.a. Abb. 4.18b). *STAT4* siRNA behandelte Zellen waren ebenfalls signifikant in ihrer *FANCA* Proteinbiosynthese gestört. Eine 75 %ig verringerte Expression, verglichen mit den untransfizierten Zellen, konnte an diesem Beispiel beobachtet werden. In Abbildung 4.18b wurde für die beiden am stärksten an der *FANCA* Expression beteiligten TFs ein Western Blot durchgeführt, um zu sehen, ob auf der Proteinebene die Ergebnis-

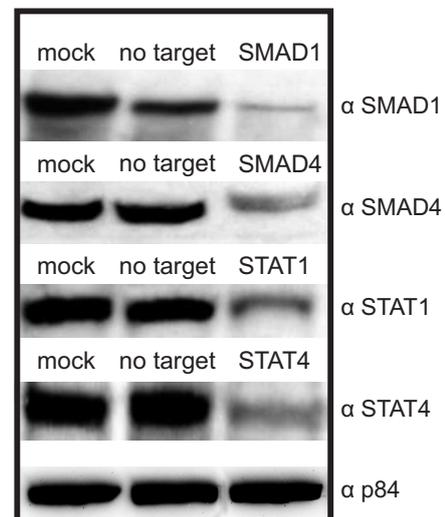


Abbildung 4.19 Der Western Blot zeigt eine deutliche Reduktion der Transkriptionsfaktorproteinmenge nach der Transfektion mit der entsprechenden siRNA. P84 ist die Ladungskontrolle.

schloss sich der Messwert für *STAT1* siRNA an, 18 % der ursprünglichen Transkriptmenge konnte noch detektiert werden. Dies entsprach einem signifikanten Verlust von genetischer Information (s.a. Abb. 4.18b). *STAT4* siRNA behandelte Zellen waren ebenfalls signifikant in ihrer *FANCA* Proteinbiosynthese gestört. Eine 75 %ig verringerte Expression, verglichen mit den untransfizierten Zellen, konnte an diesem Beispiel beobachtet werden. In Abbildung 4.18b wurde für die beiden am stärksten an der *FANCA* Expression beteiligten TFs ein Western Blot durchgeführt, um zu sehen, ob auf der Proteinebene die Ergebnis-

se des *knockdowns* bestätigt werden konnten. Ein Antikörper gegen das Matrixprotein 84 (p84) diente als Ladungskontrolle, um auszuschließen, dass eine eventuell verringerte FANCA Proteinmenge auf eine Differenz in der Auftragsmenge zurückzuführen war. Interessant waren insbesondere die Spuren, die mit „2“ und „3“ beschriftet wurden. Hier war ein direkter Vergleich zwischen den primären Fibroblasten, die mit siRNA gegen *SMAD4* bzw. *STAT1* behandelt wurden (Spur 2) und der Patientenzelllinie möglich (Spur 3). Während im Proteinextrakt, der aus den Patientenzellen gewonnen wurde, keine Bande zu sehen und somit kein Protein mehr nachzuweisen war, konnte nach dem *knockdown* durch siRNA noch residuales FANCA Protein detektiert werden, wenn auch nur sehr schwach. Dies deutete auf eine effektive, negative Regulierung durch die Transkriptionsfaktoren hin. Abbildung 4.19 zeigt den Vergleich zwischen untransfizierten Zellen (MCNA), Zellen, die mit 'no target' siRNA transfiziert wurden, sowie Zellen, die mit siRNA gegen die jeweiligen Transkriptionsfaktoren behandelt wurden. Detektiert wurde mit entsprechenden Antikörpern. Es zeigte sich, dass auch auf Proteinebene ein effektiver *knockdown* nachgewiesen werden konnte und dadurch die Ergebnisse aus 4.18a unterstützt.

4.5 Expressionsänderungen im TGF- β und JAK / STAT Signalweg

4.5.1 Transkriptanalyse von TGF- β Mitgliedern in FA-A Patientenzellen

Um die bisherigen Ergebnisse zu vertiefen und zu beantworten, ob noch weitere Mitglieder des TGF- β Signalweges mittelbar oder unmittelbar an der Regulation des FA *core complex* beteiligt sind, speziell *FANCA*, wurde sich einer Transkriptanalyse bedient, die nahezu alle Mitglieder und assoziierte Proteine des TGF- β Signalwegs beinhaltet. Dieses „Human TGF- β Signaling & Response 96 StellarArray™“ ist eine Array Methode, die auf RT-qPCR basiert. Auf einer Platte sind Primer für insgesamt 96 Gene des TGF- β Signalwegs enthalten, die nach der Zugabe der entsprechenden cDNA der FA-A Fibroblastenzelllinie und in einem weiteren Ansatz mit der cDNA einer Kontrolle verglichen werden.

Tabelle 4.3 Auf einem TGF- β StellarArray™ getestete Genexpression. Fett sind die Gene markiert, die signifikant einer Regulationsänderung unterlagen ($p < 0,05$). Rot kennzeichnet die Kontrollen und blau die sogenannten Normalizer.

| | | | | | | |
|---------------|------------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|------------------|
| <i>LEFTY2</i> | HSGenomic | <i>NOV</i> | <i>MAPK3</i> | <i>ROCK1</i> | <i>TGIF2</i> | <i>KLF11</i> |
| <i>MSTN</i> | SMAD1 | <i>THBS1</i> | <i>BMPR1B</i> | <i>SMURF1</i> | <i>CEBPB</i> | <i>MAP3K/IP1</i> |
| <i>INHBC</i> | HS18s | <i>ENG</i> | <i>RHOA</i> | <i>BMP2</i> | <i>ACVR1B</i> | <i>BMP7</i> |
| <i>SMAD4</i> | AMH | <i>GDF1</i> | <i>PITX2</i> | <i>ACVR1</i> | <i>TGFB2</i> | <i>GDF9</i> |
| <i>ID3</i> | ID2 | <i>BMP4</i> | <i>TGFB1</i> | <i>RBL1</i> | <i>THBS2</i> | <i>TGIF1</i> |
| <i>INHBA</i> | FST | <i>BMP1A</i> | <i>ZFYVE16</i> | <i>ACVR2A</i> | <i>SMURF2</i> | <i>VWF</i> |
| <i>ACVR1C</i> | <i>MAPK1</i> | <i>SERPINE1</i> | <i>LTBP4</i> | <i>SMAD7</i> | <i>GDF15</i> | <i>PGFB</i> |
| <i>TNF</i> | <i>CHRD</i> | <i>TGFB3</i> | <i>GDF11</i> | <i>COL1A2</i> | <i>E2F4</i> | <i>SMAD5</i> |
| <i>INHBB</i> | <i>SMAD6</i> | <i>BMP5</i> | <i>GDF5</i> | <i>ACVR2B</i> | <i>RUNX2</i> | <i>ACVRL1</i> |
| <i>NOG</i> | <i>LEFTY1</i> | <i>SMAD2</i> | <i>GDF10</i> | <i>COMP</i> | <i>TGFB2</i> | <i>BMPR2</i> |
| <i>LTBP1</i> | <i>ZFYVE9</i> | <i>MYC</i> | <i>CDKN2B</i> | <i>BMP3</i> | <i>CREBBP</i> | <i>BMP8A</i> |
| <i>ID1</i> | <i>CTGF</i> | <i>KLF10</i> | <i>MAP3K7</i> | <i>TGFB3</i> | <i>TFDP1</i> | <i>NBL1</i> |
| <i>NODAL</i> | <i>GDF6</i> | <i>SMAD3</i> | <i>DCN</i> | <i>TGFB1</i> | <i>BMP6</i> | <i>INHA</i> |
| <i>SP1</i> | <i>GDF3</i> | <i>GDF2</i> | <i>IFNG</i> | <i>BMP15</i> | | |

Tabelle 4.4 Mitglieder des TGF- β Signalweges, die exemplarisch für weitere Analysen ausgewählt wurden.

| <i>Gen</i> | <i>Funktion (Auswahl)</i> | <i>GPR Fold Change</i> | <i>18s Fold Change</i> |
|--------------|---|------------------------|------------------------|
| <i>TNF</i> | <i>Zellproliferation, Apoptose, Lipidmetabolismus</i> | 13 | 3 |
| <i>MSTN</i> | <i>Regulator von Zellwachstum und Differenzierung</i> | -33 | -100 |
| <i>NODAL</i> | <i>Mesodermentwicklung, Axialstrukturen im Embryo</i> | -83 | -30 |

Auf diese Weise erhielt man Daten darüber, welche Gene im vorliegenden Fall hoch oder runter reguliert waren. Die Kandidaten, welche am interessantesten erschienen, wurden mit Hilfe eines Western Blots auf ihre Proteine hin in dieser Zelllinie überprüft. Die Analysen des StellARray™ wurden als Triplikate durchgeführt, um belastbarere Ergebnisse zu erhalten. Die Auswertung erfolgte in diesem Fall mit einer vom Hersteller bereitgestellten Software, dem „Global Pattern Recognition Tool“[®]. Im Gegensatz zu den üblichen Verfahren zur Auswertung von qPCR Daten wurden zur Normalisierung keine *house-keeping genes* wie sonst üblich verwendet sondern gDNA (HSGenomic) und 18s RNA (HS18s) sowie sogenannte *normalizer*, die aus besonders gleichmäßig exprimierten Transkripten zwischen Kontrolle und Probe bestehen. Tabelle 4.3 zeigt die verschiedenen Gene, auf deren Expression gleichzeitig getestet werden konnte. Die Auswahl der Gene war vom

Hersteller (Lonza) vorgegeben. Für die Arbeit waren die fett markierten Gene von besonderem Interesse, da diese nach der Auswertung einen signifikanten Unterschied in ihrer Expression aufwiesen. In der Konsequenz heißt dies, dass diese Gene des TGF- β Signalweges in Zellen eines FA-A Patienten in veränderter Expressionsstärke vorlagen. Diese Unterschiede waren in einer verminderten als auch in einer erhöhten Expression zu beobachten. Interessanterweise handelte es sich dabei auch um Gene, deren bisher bekannte Funktionen keine Verbindung zu Fanconi Anämie erkennen ließen. Aufgrund der qPCR Ergebnisse wurden drei Gene ausgewählt, die in der entsprechenden FA-A Zelllinie eine eindeutig veränderte Expression im Vergleich zur Kontrolle zeigten und darüber hinaus durch sehr kleine p-Werte auffielen. Zuerst wurde *Myostatin* (*MSTN*), ein Mitglied der *bone morphogenetic protein* (*BMP*) Familie, ausgewählt, welches offensichtlich nach unten reguliert wurde (Tab. 4.4) und einen p-Wert von 0,002 besaß. Myostatin gilt als ein Regulator des Zellwachstums und dessen Differenzierung in adultem sowie embryonalem Gewebe. Es wird angenommen, dass *MSTN* das Wachstum der Skelettmuskulatur negativ reguliert. Nimmt man den arithmetischen Mittelwert der Expressionsveränderung auf die beiden Kontrollen bezogen (HSGenomic, HS18s), so ergab sich eine 66,5-fache Verminderung der Expression von *MSTN* in der FA-A Probe, verglichen mit der cDNA, die aus einer nicht betroffenen Zelllinie gewonnen wurde. Eine 8-fache Erhöhung der Expression konnte

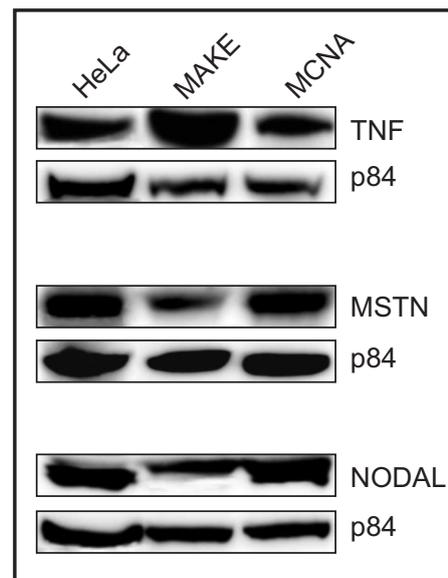


Abbildung 4.20 Deutliche Änderung der Proteinmenge durch ein verändertes Expressionsmuster in MAKE (FA-A) Zellen, analog zu den qPCR Ergebnissen. P84 ist hier wieder die Ladungskontrolle

für den *tumor necrosis factor (TNF)* gemessen werden. Dessen p-Wert wurde mit 0,008 berechnet und wie Tabelle 4.4 zeigt, ist TNF unter anderem an einem weiten Spektrum von biologischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel die Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Fettmetabolismus und Koagulation. TNF wird häufig auch mit einigen Autoimmunerkrankungen sowie Krebs in Verbindung gebracht. Als dritter interessanter Kandidat erschien das von *Drosophila* bekannte Gen *NODAL*. Die statistische Signifikanz der gemessenen Werte war mit einem p-Wert von 0,03 kleiner als die der beiden anderen Gene, lag aber noch unter der Grenze von $p < 0,05$. Eine mittlere Minderung der Expression um den Faktor 56,5 stand für eine deutliche negative Regulation in der FA-A Zelllinie. In Abbildung 4.20 sind die Resultate der Expressionsänderungen auf Proteinebene durch einen Western Blot dargestellt. HeLa Zellen dienten als Kontrolle für das prinzipielle Funktionieren der Methode und p84 wiederum als Ladungskontrolle, um auszuschließen, dass unterschiedliche Stärken der Banden auf Differenzen in der aufgetragenen Proteinmenge zurückzuführen waren. Von der FA-A Zelllinie MAKE wurden 35 µg Proteinextrakt aufgetragen der aus Fibroblasten eines FA-A Patienten gewonnen wurde. Als Vergleich diente eine unbetroffene Fibroblastenlinie (MCNA). So zeigte sich, dass für TNF eine stärkere Bande in der Patientenzelllinie detektiert werden konnte als in der Vergleichszelllinie. Eine Beobachtung, die sich mit dem Ergebnis aus dem StellarArray™ deckte. Ebenso eine Übereinstimmung gab es mit den Ergebnissen für Myostatin (MSTN); auch hier war eine deutliche Abnahme der Bandenintensität in der FA-A Zelllinie zu beobachten. Im dritten Beispiel, NODAL, war ebenfalls eine Abnahme der NODAL-spezifischen Proteinmenge in dem aus MAKE gewonnenen Proteinextrakt zu verzeichnen. Es zeigte sich daher, dass die Ergebnisse auf mRNA-Ebene mit den Ergebnissen auf der Proteinebene korrespondierten.

4.5.2 Transkriptanalyse von JAK / STAT Mitgliedern in FA-A Patientenzellen

Die gleichen Fragen, die es schon bei den TGF-β Ergebnissen zu beantworten galt, sollten auch für die Ergebnisse der Analysen des JAK / STAT Signalweges versucht werden zu beantworten, nämlich ob in der FA-A Zelllinie MAKE eine Expressionsänderung der Mitglieder dieses Signalweges zu beobachten ist. In der Tabelle 4.5 listet die Gene auf, die mit dem „Human Interferon Signaling & Response 96 StellarArray™“ im Hinblick auf ihre Expression analysiert werden konnten. In diesen Analysen waren im Unterschied zu 4.5.1 mehr Gene mit einem niedrigen p-Wert gefunden worden. Dies bedeutete, dass die Ergebnisse eine quantitativ höhere Signifikanz besaßen und somit mehr Gene in zukünftige Analysen einfließen könnten. Die Vorgehensweise war identisch zu der der TGF-β

Analysen. Das StellarArray™ wurde durch RT-qPCR auf Expressionsänderung hin untersucht und die Rohdaten mit Hilfe des vom Hersteller zur Verfügung gestellten Analyseprogramms ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass bis auf *IFNG* (*Interferon, Gamma*) und *IFNA7* (*Interferon, Alpha 7*), alle analysierten Gene eine statistisch signifikante Änderung ihrer Expression in FA-A Zellen im Vergleich zu normalen Kontrollzellen zeigten. Analog zu den TGF- β Resultaten wurden auch für den JAK/STAT Signalweg drei Kandidatengene ausgewählt, die den schon unter 4.5.1 genannten Voraussetzungen entsprachen. Im Falle des JAK / STAT Signalwegs handelte es sich um den *Toll Like Receptor 7* (*TLR7*), welcher in der FA-A Patientenzelllinie im Mittel eine 249,5-fache Reduktion der Expression, im Vergleich mit der Kontrolle, zeigte. Ein extrem niedriger p-Wert von 0,00001 verdeutlichte die Signifikanz dieser Analyse.

Tabelle 4.5 Auf einem JAK / STAT StellarArray™ getestete Genexpression. Fett sind die Gene markiert, die signifikant einer Regulationsänderung unterlagen ($p < 0,05$). Rot kennzeichnet die Kontrollen und blau die sogenannten Normalizer.

| | | | | | | |
|----------------|---------------|----------------|------------------|---------------|----------------|---------------|
| <i>OAS1</i> | <i>IL28RA</i> | <i>IL10</i> | <i>IL28B</i> | <i>TP53</i> | <i>IRF3</i> | <i>IRF9</i> |
| <i>TLR7</i> | <i>IRF8</i> | <i>MYC</i> | <i>IFITM1</i> | <i>TYK2</i> | <i>GBP1</i> | <i>STAT2</i> |
| <i>OAS2</i> | <i>IFI27</i> | <i>HS18s</i> | <i>IFNA16</i> | <i>IL6ST</i> | <i>EIF4G2</i> | <i>IFNAR1</i> |
| <i>HLA-DRA</i> | <i>TLR9</i> | <i>PIAS1</i> | <i>CXCL11</i> | <i>PSMB9</i> | <i>HDAC1</i> | <i>TRIM21</i> |
| <i>IRF6</i> | <i>IFI44</i> | <i>CASP1</i> | <i>IL2</i> | <i>IFI16</i> | <i>TAP1</i> | <i>IFI35</i> |
| <i>IFIT3</i> | <i>SPI1</i> | <i>IFNAR2</i> | <i>TICAM1</i> | <i>MYD88</i> | <i>MX1</i> | <i>ADAR</i> |
| <i>IL1B</i> | <i>CIITA</i> | <i>IRF2BP2</i> | <i>IFNE</i> | <i>RB1</i> | <i>PRKRA</i> | <i>CEBPB</i> |
| <i>VCAM1</i> | <i>TGFB1</i> | <i>RNASEL</i> | <i>STAT1</i> | <i>ISG20</i> | <i>PSME1</i> | <i>JAK2</i> |
| <i>IFIH1</i> | <i>IL6</i> | <i>IFNGR2</i> | <i>STAT4</i> | <i>IFNB1</i> | <i>IKBKE</i> | <i>STAT3</i> |
| <i>CXCL10</i> | <i>USP18</i> | <i>JAK1</i> | <i>HSGenomic</i> | <i>IL4R</i> | <i>IRF1</i> | <i>IFNG</i> |
| <i>IFI30</i> | <i>IFNK</i> | <i>IRF5</i> | <i>MAVS</i> | <i>PRKRIR</i> | <i>EIF2AK2</i> | <i>IFNA5</i> |
| <i>IFIT2</i> | <i>IL12B</i> | <i>HLA-A</i> | <i>IRF4</i> | <i>IRF2</i> | <i>F2</i> | <i>FAS</i> |
| <i>TNFSF10</i> | <i>SOCS1</i> | <i>CXCL9</i> | <i>IFITM3</i> | <i>IFNGR1</i> | <i>IL10RB</i> | <i>SPP1</i> |
| <i>IRF7</i> | <i>ISG15</i> | <i>IFIT1</i> | <i>IRF2BP1</i> | <i>IFNG</i> | <i>IFNA7</i> | |

Bei TLR7 handelt es sich um ein Mitglied der *TLR* Familie, welches eine fundamentale Rolle in der Pathogenerkennung spielt sowie in der Aktivierung der angeborenen Immunantwort. *TLRs* sind hoch konserviert bis hin zu *Drosophila* und zeigen, je nach Mitglied, unterschiedliche Expressionsmuster. Ein zweites Gen, welches ebenfalls eine verminderte Expression, im Mittel um das 15,5-fache, zeigte, war der *Interferon Regulatory Factor 6* (*IRF6*). Dieses Gen gehört zur Familie der Interferon regulierenden Transkriptionsfaktoren (IRF), die eine hoch konservierte N-terminale helix-turn-helix DNA-Bindedomäne und eine weniger konservierte C-terminale Protein-Bindedomäne als Charakteristikum besitzen. Das IRF6 Protein ist unter anderem an der Gaumenentwicklung beteiligt und Mutationen im Gen können zum van der Woude Syndrom führen (MIM #119300). *OAS2* als dritter Kandidat steht für *2'-5'-oligoadenylate synthetase 2*, ein Mitglied der 2-5A

Tabelle 4.6 Mitglieder des JAK/STAT Signalweges, die exemplarisch für weitere Analysen ausgewählt wurden.

| Gen | Funktion (Auswahl) | GPR Fold Change | 18s Fold Change |
|-------------|--|-----------------|-----------------|
| <i>TLR7</i> | Pathogenerkennung, angeborene Immunantwort | -287 | -212 |
| <i>IRF6</i> | Transkriptionsfaktor, beteiligt an der Gaumenbildung | -18 | -13 |
| <i>OAS2</i> | Immunantwort bei vir. Infektion, RNaseL Aktivierung | 96 | 130 |

Synthetasefamilie. Dieses Gen ist für die angeborene Immunantwort auf virale Infektionen verantwortlich. Unter anderem aktiviert es eine RNaseL, was zu einer Degradation der viralen RNA und somit zu einer Inhibierung der viralen Replikation führt. *OAS2* zeigte eine um das 113-fache erhöhte Expression in der MAKE (FA-A) Zelllinie im Vergleich zu der Kontrolle (MCNA).

So wie für die TGF- β Ergebnisse wurden auch für die Transkriptanalysen des JAK / STAT Signalweges die Resultate der ausgewählten Gene auf Proteinebene überprüft, dies zeigt Abbildung 4.21. Wie in Tabelle 4.6 gezeigt, waren die Gene *TLR7* und *IRF6* nach unten reguliert sowie *OAS2* nach oben reguliert. Der Western Blot bestätigte diese Ergebnisse auch auf der Ebene der Proteine. So zeigte die FA-A Patientenzelllinie (MAKE), bezogen auf die Menge des aufgetragenen Proteins, eine deutlich schwächere *TLR7* Bande als in der Kontrollzelllinie (MCNA). Auch die Menge des IRF6 Protein, welche detektiert wurde, war geringer als in der Vergleichzelllinie. Auch hier bestätigte sich wieder das Ergebnis der RT- qPCR Experimente. In diesen Fällen als auch bei *OAS2* fungierte p84 wieder als Ladungskontrolle, um ausschließen zu können, dass eine Reduktion oder Zunahme der Proteinmenge nicht durch ungleiche Auftragskonzentrationen verfälscht wurden.

Aus diesem Grund ließ sich die stärkere Bande bei *OAS2* auch als eine Zunahme der Expression erklären wie sie nach der Transkriptanalysen auch für das Protein zu erwarten war.

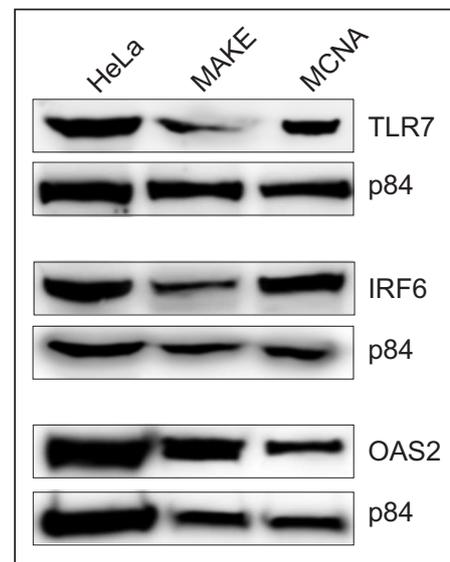


Abbildung 4.21 Deutliche Änderung der Proteinmenge durch ein verändertes Expressionsmuster in MAKE (FA-A) Zellen, analog zu den qPCR Ergebnissen. P84 ist hier wieder die Ladungskontrolle

4.6 Zellulärer Phänotyp nach STAT und SMAD *knockdown*

Wie schon unter 1.2.4 beschrieben, reagieren FA Zellen sensitiv auf DNA Doppelstrangquervernetzende Substanzen wie MMC. Dieser Aspekt kann für eine Klassifikation mit Hilfe der Durchflusszytometrie genutzt werden. Sollen Zellen auf ihren zellulären Phänotyp hin untersucht werden, so gibt man in der Zellkultur verschiedene Konzentrationen von MMC zum Medium. Durch die Unfähigkeit von FA Zellen, die eingefügten Strangvernetzungen zu reparieren, führt dies zu einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase (G2 arrest). Dieser Unterschied zwischen FA und normalen Kontrollen lässt sich gut grafisch darstellen. Via Durchflusszytometrie lässt sich der DNA Gehalt der einzelnen Zellzyklus Phasen bestimmen. Dieser Sachverhalt konnte daher für weitere Analysen genutzt werden. Wieder wurden MCNA Zellen mit STAT1/4 und SMAD1/4 siRNA transfiziert und im direkten Vergleich zu untransfizierten Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Frage, die sich stellte war, ob ein knockdown der Transkriptionsfaktoren zu einem zellulären FA Phänotyp führen würde und so die Hypothese eines direkten Zusammenhangs zwischen den beiden Signalwegen unterstützt.

4.6.1 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen

Zur besseren Einordnung der eigenen Ergebnisse wurden zuerst zwei verschiedene Kontrollen gemessen. Die Fibroblastenzelllinie eines Patienten (MAKE) als Positivkontrolle, jeweils mit 0 MMC, 10 MMC und 50 MMC (entspricht 10 bzw. 50 ng / ml) sowie die Zelllinie MCNA als Negativkontrolle, welche von einer gesunden Person stammte. Dabei zeigte sich das erwartete Ergebnis. In der Positivkontrolle führte die Zugabe von MMC zu nicht reparablen Doppelstrangvernetzungen und schließlich zu einer Akkumulation von Zellen in der G2-Phase. In der Positivkontrolle stieg der Wert der Zellen, die sich in der G2-Phase befinden, von 11,1% (0 MMC) auf 33,5% (50 MMC) (Abb. 4.22). Die Negativkontrolle zeigte diesen Phänotyp nicht. Aufgrund der erhaltenen Fähigkeit DNA Schäden, die durch strangvernetzende Substanzen verursacht wurden, zu reparieren, gibt es in dieser Zelllinie keine G2-Arretierung. In der Negativkontrolle blieb er hingegen fast unverändert 11,9% (0 MMC) zu 13,4% (50 MMC) (Abb. 4.23).

In gleicher Weise ließ sich der zelluläre Phänotyp auch für die Zelllinien mit *STAT1/4* und *SMAD1/4* *knockdown* bestimmen. Leider zeigten die Messungen keine so deutlich abgegrenzten *peaks* wie in den Kontrollen, sondern schon eine Akkumulation in der S-Phase zusätzlich zur G2-Arretierung. Abbildung 4.24 zeigt einen solchen Fall für *STAT1*.

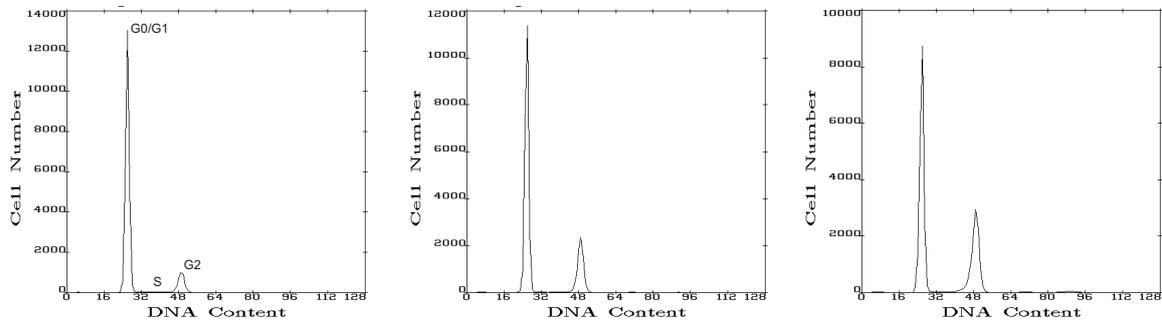


Abbildung 4.22 Positivkontrolle: FA-A Fibroblastenzelllinie MAKE. Von links nach rechts ist eine Zunahme der Zellen in der G2-Phase zu beobachten. Die Teilabbildungen zeigen von links nach rechts MMC Konzentrationen von 0-50ng/ml MMC (0 MMC, 10 MMC und 50 MMC) über 72h, Färbung mit DAPI.

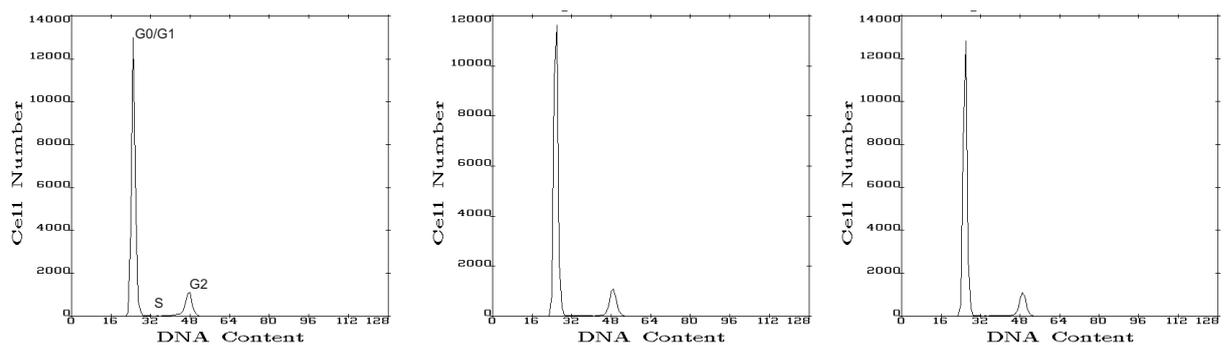


Abbildung 4.23 Negativkontrolle: Normale Fibroblastenzelllinie MCNA. Von links nach rechts ist kaum eine Zunahme der Zellen in der G2-Phase zu beobachten. Die Teilabbildungen zeigen von links nach rechts MMC Konzentrationen von 0-50ng/ml MMC (0 MMC, 10 MMC und 50 MMC) über 72h, Färbung mit DAPI.

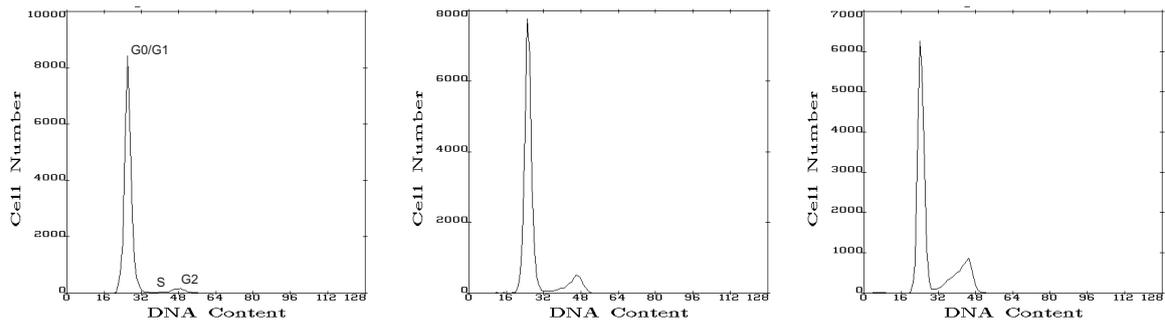


Abbildung 4.24 *STAT1*: siRNA transfizierte MCNA Fibroblasten. Eine Akkumulation in der G2-Phase bei steigende MMC Konzentrationen. MMC Inkubation und Färbung wie in Abb. 4.22.

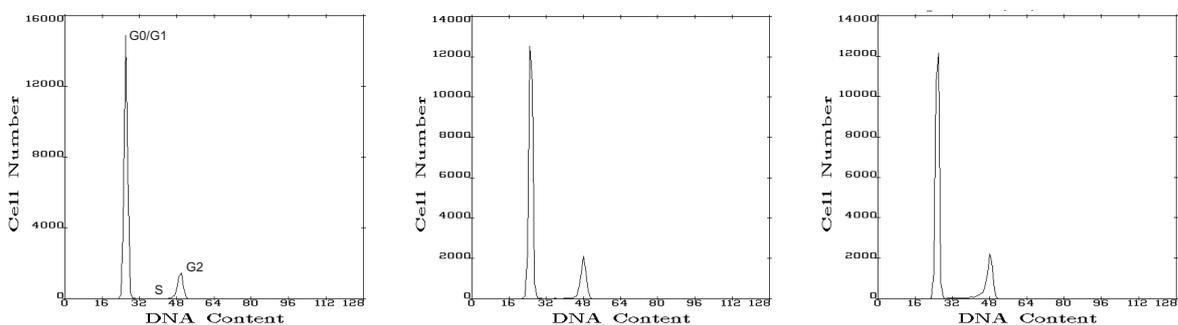


Abbildung 4.25 *STAT4*: siRNA transfizierte MCNA Fibroblasten. Hier ist ebenfalls eine Arretierung von Zellen in der G2-Phase erkennbar, wenn auch weniger stark als in Abbildung 4.24. MMC Inkubation und Färbung wie in Abb. 4.22.

Nachdem die Zellen mit einer siRNA gegen *STAT1* behandelt wurden und mit drei verschiedenen MMC Konzentrationen inkubiert wurden (0 MMC, 10 MMC und 50 MMC), zeigte die Messung eine Zunahme der G2 arretierten Zellen von 3,2% auf 14,6% bei einer Konzentration von 50 MMC. Ebenso wie die Zellen, die sich in der G2-Phase befinden, fand auch eine Verdreifachung der Zellen statt, die sich in der S-Phase befanden. *STAT4* zeigte ein ähnliches Resultat wie *STAT1*, allerdings war der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befanden auf einem normalen Niveau und auch der Anstieg zwischen 0 MMC und 50 MMC war nicht übermäßig erhöht (1,4% zu 6,2%). Diese Ergebnisse werden in Abbildung 4.25 grafisch dargestellt. Die Akkumulation der Zellen in der G2-Phase war auch hier zu beobachten, wenn auch in einer schwächeren Form (12,9% zu 17,6%). Dies deckt sich insofern mit den Ergebnissen aus 4.4.5, da auch dort schon die Expression von *FANCA* nach siRNA Behandlung bei *STAT4* weniger stark nach unten reguliert wurde als bei *STAT1*.

Die Messungen bei *SMAD1* siRNA Behandlung waren erneut durch ein unverhältnismäßiges Ansteigen der S-Phase gekennzeichnet. Abbildung 4.26 stellt dies wieder deutlich in einer Grafik dar. Die Anzahl der Zellen, die sich in der S-Phase befanden, stieg nach

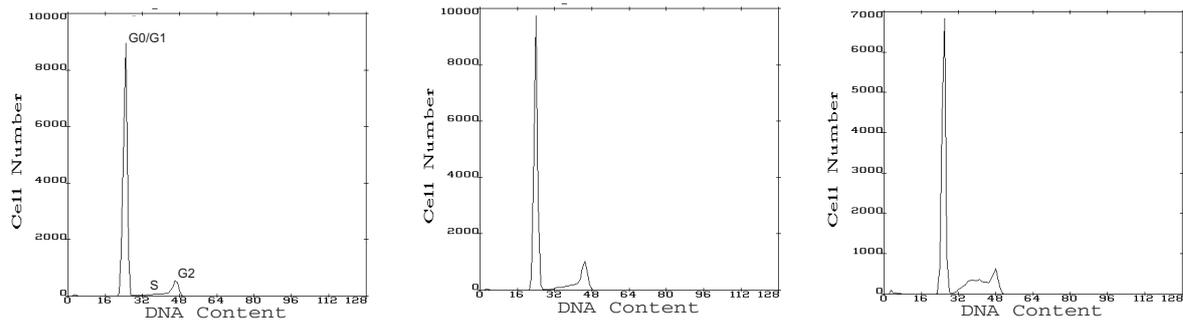


Abbildung 4.26 *SMAD1*: siRNA transfizierte MCNA Zelllinie. Eine erneute S-Phasen Anomalie mit geringem „G2 arrest“ sind deutlich zu erkennen

der MMC Behandlung, mit Konzentrationen von 0 bis 50ng / μ l übermäßig von 5,4% auf 23,6% an. Hingegen zeigten die Zellen, die sich in der G2-Phasen befanden, nur eine leichte Zunahme. Von einem Ausgangswert mit 9,1% stieg die Anzahl der Zellen bei 10 MMC leicht auf 11,7% an, um dann, sehr untypisch, bei 50 MMC wieder auf 8,6% abzufallen, wahrscheinlich infolge der starken Akkumulation von Zellen in der S-Phase. Dieses Ergebnis scheint sich mit dem sehr schwache Einfluss eines *SMAD1 knockdowns* auf die *FANCA* Expression zu decken, wie die Ergebnisse aus 4.4.5 zeigen. Auch dort war in den RT-qPCR Experimenten kaum ein Einfluss auf die *FANCA* Expression messbar.

Bei *SMAD4* siRNA Behandlung konnte wieder ein zellulärer Phänotyp beobachtet werden wie er bei FA Zellen typisch ist. Allerdings musste auch hier wieder eine Einschränkung vorgenommen werden: Die S-Phase stieg erneut, parallel zur Erhöhung der MMC Konzentration, stark an (3,4% bis 30%) bei 0 bis 50ng / ml. FA-typisch waren jedoch die Zellen, die in der G2-Phase angehalten wurden, auf fast ein Viertel der Gesamtzellzahl anstieg. Diese Entwicklung ist grafisch in Abbildung 4.27 wiedergegeben. Es zeigte sich daher, dass durch den *knockdown* mit siRNA gegen die untersuchten TFs in der Regel ein FA-typischer zellulärer Phänotyp hervorgerufen werden konnte. Allerdings war der Effekt nicht so stark wie man es normalerweise bei der Messung von FA Zellen gewohnt war. Sicherlich ungewöhnlich war auch die Tatsache, dass in drei von vier Fällen eine Veränderung in der S-Phase beobachtet werden konnte. Diese Veränderung ist eher untypisch bei Messungen von FA Zellen. Eine Interpretation wird in Kapitel 5 versucht.

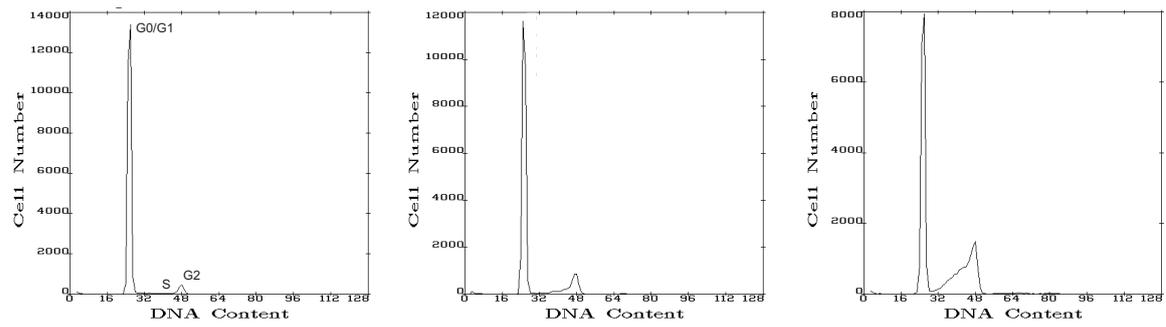


Abbildung 4.27 *SMAD4*: siRNA transfizierte MCNA Zellen. Anstieg, sowohl der G2 arretierten Zellen als auch der Zellen in der S-Phase, nach Erhöhung der MMC Konzentration.

4.7 Auswirkungen einer *IRF1* Defizienz auf die *FANCA* Expression

Wie schon in Abschnitt 4.2.1 gezeigt wurde, konnten in allen Promotorbereichen der *FA core complex* Gene jeweils mindestens eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor *IRF1* *in silico* vorausgesagt werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob *IRF1* funktionelle Beziehungen zur *FANCA* Regulation aufweist. In diesem Fall wurde nur *FANCA* untersucht, da es sich um das Gen handelt, welches am häufigsten von Mutationen betroffen ist und für die Mehrheit der Fanconi Anämie Erkrankungen verantwortlich ist. Es wurde erneut mit siRNA transfizierten Zellen gearbeitet, um zu sehen, welchen Einfluss ein *IRF1* *knockdown* auf die *FANCA* Expression hat.

4.7.1 Reduzierte *FANCA* Expression nach *IRF1* *knockdown*

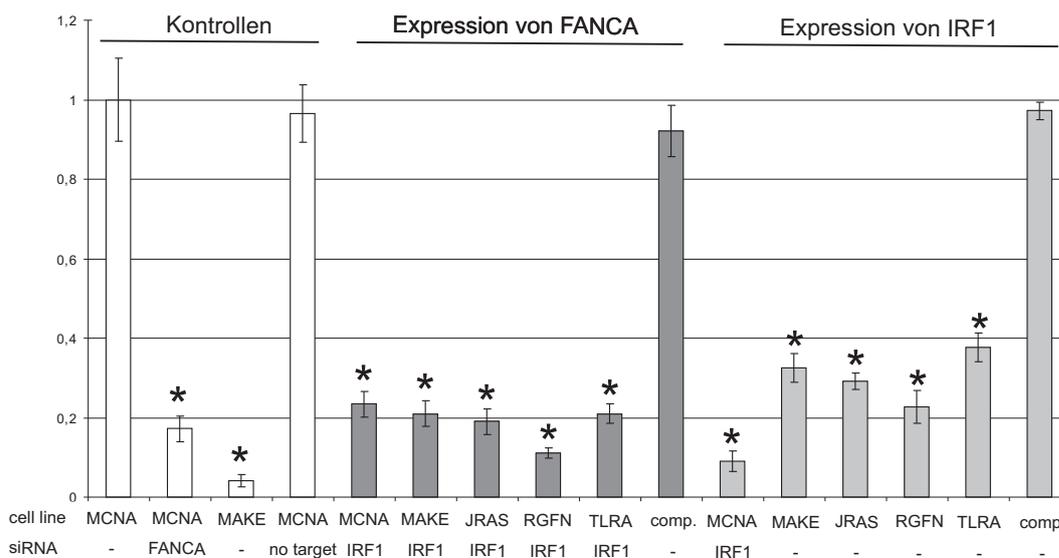


Abbildung 4.28 Expression von *FANCA* und *IRF1* in unterschiedlichen, primären Fibroblastenlinien. Als Kontrollen wurde eine normale Kontrollzelllinie (MCNA) in ihrer nativen Form verwendet, sowie mit einer siRNA gegen *FANCA* transfiziert. Zusätzlich diente eine FA-A Zelllinie (MAKE) sowie eine *no target* siRNA als weitere Kontrolle. Dort wurde die *FANCA* Expression gemessen als Vergleichsgröße und Funktionskontrolle. Die Expression von *FANCA* zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien als signifikant reduziert, auch nachdem *IRF1* durch einen gerichtete siRNA runterreguliert wurde (* = $p < 0,05$). Ein zusätzlich *IRF1* *knockdown* zeigt keine multiplizierende Effekte. Die nicht behandelte, komplementierte Zelllinie (comp.) zeigte keine signifikante Expressionsänderung. Ohne einen zusätzlichen *IRF1* *knockdown* war in den FA-A Zelllinien (MAKE, JRAS, RGFN sowie TLRA Fibroblasten) das Transkriptlevel von *IRF1* signifikant erniedrigt. Wie zu erwarten wurden diese Level nur durch den Werte der mit siRNA behandelten Zelllinie MCNA unterboten.

In diesem Experiment wurde untersucht, inwieweit sich in verschiedenen primären FA-A Fibroblastenzelllinien von verschiedenen Patienten die Expression von *FANCA* veränderte, nachdem das Gen *IRF1* mit Hilfe von spezifischer siRNA herunterreguliert wurde. Im Vergleich dazu wurde eine Kontrollzelllinie sowie eine Zelllinie, welche stabil mit *FANCA* komplementiert war, untersucht. *IRF1* siRNA verminderte die *FANCA* Expression signifikant. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.28 zusammengefasst. Außerdem wurden die Patientenzelllinien auf ihre *IRF1* Expression hin untersucht. FA-A Zelllinien auf ihre *FANCA* Transkriptmenge hin zu untersuchen macht insofern Sinn, da ein *IRF1 knock-down* das Ergebnis nicht signifikant beeinflussen sollte, aber als hervorragender Vergleich für die MCNA Zelllinie diente, welche mit *IRF1* siRNA transfiziert wurde. Das Ergebnis einer reduzierten *IRF1* Expression in FA-A Zelllinien war von besonderer Bedeutung, da hier erstmals ein möglicher funktionaler Zusammenhang zwischen *FANCA* und *IRF1* gezeigt wurde.

4.7.2 Auswirkungen eines *IRF1 knockdown* auf die FANCD2 Monoubiquitinierung

Neben den Ergebnissen der Transkriptanalyse mit Hilfe der RT-qPCR sollte überprüft werden, inwieweit durch den *knock-down* von *IRF1* auch die Funktion des FA *core complex*, nämlich die Gewährleistung der Monoubiquitinierung von FANCD2, beeinträchtigt wird. Dafür wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen FANCD2 durchgeführt. Im Falle einer erfolgreichen Monoubiquitinierung sollten zwei FANCD2 Banden sichtbar sein. L bedeutet *long* (163 kDa), also FANCD2 in seiner monoubiquitinierten Form, S bedeutet *short* (155 kDa), FANCD2 ohne Monoubiquitinierung. In Abbildung 4.29 wird dieses Ergebnis grafisch dargestellt. Es zeigte sich, dass eine normale Kontrollfibroblastenzelllinie, die einem *IRF1 knock-down* unterzogen wurden eine FANCD2 Monoubiquitinierung nicht mehr gewähr-

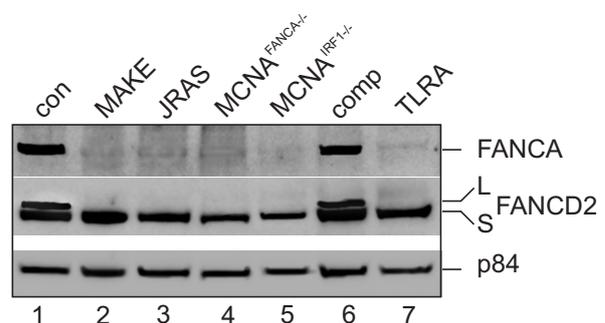


Abbildung 4.29 Western Blot zum Nachweis einer FANCD2 Monoubiquitinierung durch den FA *core complex*. Die Kontrollen con (HeLa) und comp, eine komplementierte Fibroblastenzelllinie, zeigten sowohl die Existenz von FANCA Protein sowie eine FANCD2 L-Bande. Im Gegensatz dazu konnte, in den FA-A Fibroblastenzelllinien MAKE, JRAS sowie TLRA keine FANCA und FANCD2 L-Bande beobachtet werden. MCNA^{FANCA-/-} und MCNA^{IRF1-/-} zeigten ebenfalls nur eine äußerst schwache bis nicht existierende FANCA Expression, sondern auch eine nicht funktionierende D2 Monoubiquitinierung. p84 diente auch in diesem Fall als Ladungskontrolle.

leisten konnten (Spur 2-5 und 7). Sie zeigte, auf diesen Umstand bezogen, ein identisches Bild wie die FA-A Zelllinien MAKE, JRAS und S1EG sowie die *FANCA knockdown* Zelllinie MCNA^{FANCA^{-/-}}. Ein gegensätzliches Bild konnte, wie zu erwarten in den beiden Kontrollen, con (HeLa) und comp (komplementiert), beobachtet werden. Hier war auch ein Nachweis von FANCA und FANCD2L möglich. Ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der FANCD2 Monoubiquitinierung und der reduzierten *IRF1* Expression scheint daher wahrscheinlich. Expressionsunterschiede zu Abbildung 4.28 resultieren aus einer nicht immer exakt gleichen *knockdown* Effizienz.

4.7.3 Untersuchungen des zellulären Phänotyps nach *IRF1 knockdown*

So wie schon im Fall von STAT und SMAD 4.6 sollte auch für *IRF1* defiziente Zelllinien der zelluläre Phänotyp mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die Frage die sich stellte war, ob durch die negative Regulation von *IRF1* mittels eines siRNA knockdowns, ebenfalls die typische Akkumulation von Zellen in der G2-Phase beobachtet werden konnte. Wieder erfolgte eine Behandlung mit MMC in den unter 4.6 genannten Konzentrationen. Als Kontrollen diente einerseits die Wildtyp Fibroblastenlinie AITO (Negativkontrolle) als auch die FA-A Fibroblastenlinie MAKE (Positivkontrolle). Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Erhöhung der in der G2-Phase akkumulierten Zellen nach einem *IRF1* knockdown. Die Anzahl der Zellen korreliert ebenfalls mit der Zunahme der MMC Konzentration.

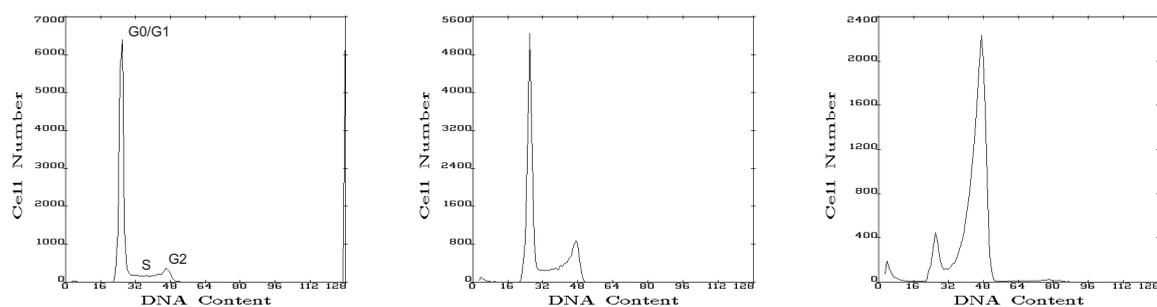


Abbildung 4.30 Positivkontrolle: FA-A Fibroblastenzelllinie MAKE. Von links nach rechts ist eine konzentrationsabhängige Zunahme des Anteils der Zellen in der G2-Phase zu beobachten. Die Teilabbildungen zeigen von links nach rechts MMC Konzentrationen von 0-50ng / ml MMC (0MMC, 10MMC und 50MMC). Inkubation mit MMC für 72 h, Färbung mit DAPI.

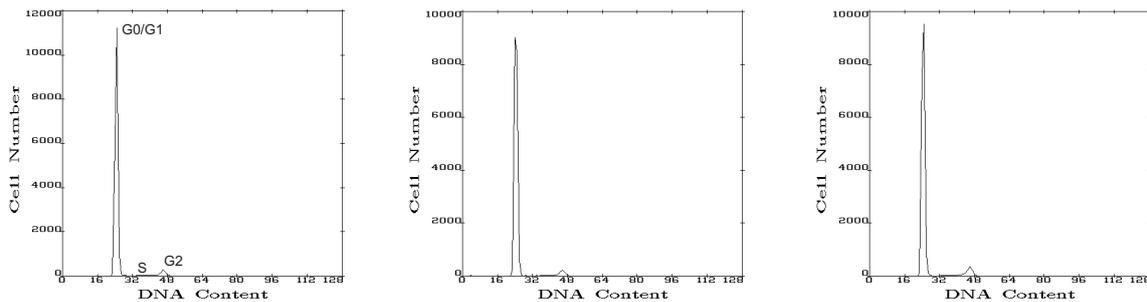


Abbildung 4.31 Negativkontrolle: Normale Kontrollfibroblastenlinie MCNA. Von links nach rechts ist kaum eine Zunahme des Anteils von Zellen in der G2-Phase zu beobachten. (0 MMC, 10 MMC und 50 MMC, 72 h, DAPI)

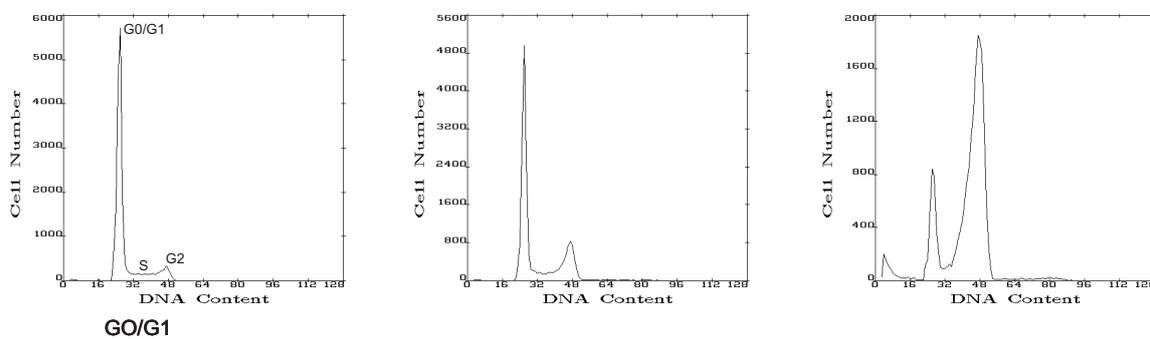


Abbildung 4.32 *IRF1* siRNA transfizierte normale Kontrollfibroblasten MCNA. Eine konzentrationsabhängige Akkumulation von Zellen in der G2-Phase bei MMC Konzentrationen von 0, 10 und 50 ng/ml statt. (72 h, DAPI)

Während bei der Negativkontrolle die Werte für in der G2-Phase akkumulierte Zellen praktisch kaum ansteigen (3,5 %, 3,3 % und 4,6 %) tun sie dies bei der Positivkontrolle deutlich (5,3 %, 12,6 % und 54,7 %). Nach der Verminderung der Expression von *IRF1* durch siRNA Behandlung kann auch hier mit steigender MMC Konzentration ein Auflaufen der Zellen in der G2-Phase beobachtet werden (5,7 %, 17,3 % und 59,2 %), jeweils für 0, 10 und 50 ng/ml MMC.

4.8 Halbwertszeiten der FA core complex Proteine

Die Halbwertszeiten von Proteinen können in Zellen, ähnlich wie TFs, Methylierungen oder Phosphorylierungen eine regulatorische Funktion einnehmen. Konkret bedeutet dies, dass, wenn ein Protein zum Beispiel als Antwort auf DNA Schäden gebildet wird, sollte es in der Regel eine Zeit lang in ausreichender Menge und Konzentration vorhanden sein um seine Funktion zu erfüllen. Sollte, in diesem Beispiel der DNA Schaden, behoben sein, macht es wenig Sinn, dass eine größere Menge des Proteins weiterhin an der Schadensstelle

verbleibt. Es beginnt daher ein Degradationsprozess. Es war daher von Interesse zu untersuchen, ob die Proteinhalbwertszeiten der FA *core complex* Proteine Gemeinsamkeiten aufweisen und daher nicht nur Ähnlichkeiten auf der Ebene der Transkription bestehen, sondern auch in der regulativen Eigenschaft des Abbaus der entsprechenden Proteine. Im Falle von Gemeinsamkeiten auf verschiedenen Ebenen, DNA und Protein, könnte dies die Hypothese einer Koevolution des FA *core complex* unterstützen.

4.8.1 Bestimmung und Vergleich der Halbwertszeiten

Für diesen Versuch wurden HeLa Zellen, nachdem sie einen Tag gewachsen waren, mit 250µg/µl Cycloheximid (CHX) behandelt. CHX blockiert die Proteinbiosynthese und macht es daher möglich, den Degradationsprozess des gewünschten Proteins mit Hilfe von Antikörpern in einem Western Blot sichtbar zu machen. Die behandelten Zellen wurden in festgelegten Zeitabständen geerntet und anschließend daraus ein Proteinextrakt gewonnen. Insgesamt wurden sieben verschiedene Zeitpunkte ausgewählt. So wurde gleich nach der Zugabe von CHX der erste Zeitpunkt, quasi als Referenzpunkt „null“ ausgewertet und darauf folgend die Zeitpunkte 1, 2, 4, 6, 9 und 12,

wobei die Zahlen die Zeit in Stunden nach der ersten Behandlung mit CHX angeben. Die gewonnenen Proteinextrakte wurden für Western Blots verwendet, mit deren Hilfe und den entsprechenden Antikörpern gegen die FA *core complex* Proteine, die Abnahme der Proteinmenge über die Zeit beobachtet werden konnte. Die Auswertung dieser Blots wurde durch Bestimmung der Bandengröße und Intensität sowie mit Hilfe mathematischer Berechnungen realisiert. So wurden die Banden der Western Blots mit einem Geldokumentationsgerät sichtbar gemacht und mit der dazugehörigen Software auf ihre

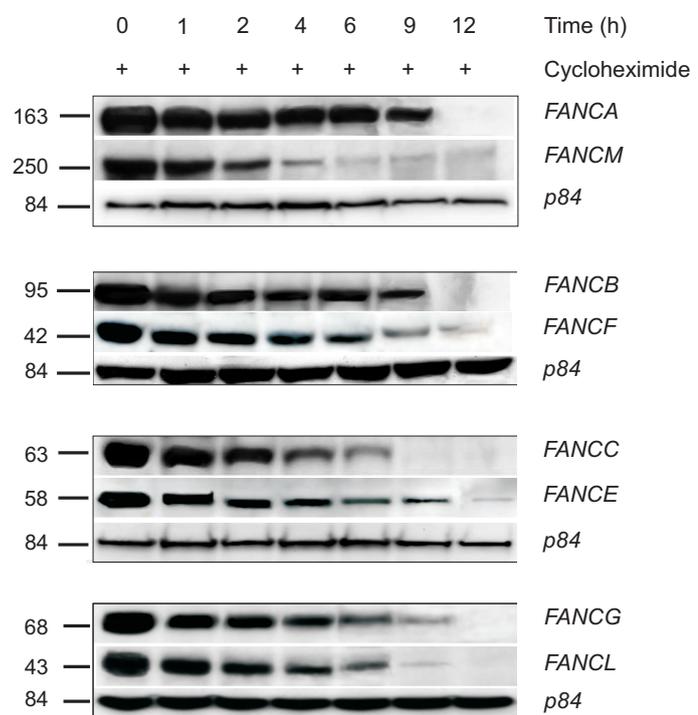


Abbildung 4.33 Degradation der FA *core complex* Proteine als Funktion der Zeit nach Cycloheximid Behandlung, dargestellt auf einem Western Blot. Als Ladungskontrolle wurde p84 verwendet.

Größe und Intensität hin untersucht. Die mit diesem Verfahren erlangten Werte konnten nun unter Verwendung der Formel für den exponentiellen Verfall $f = a \exp(-bx)$ berechnet werden. Abbildung 4.33 zeigt, wie entlang der Zeitskala die Banden der einzelnen Proteine schwächer werden, bis sie in der Regel nach ca. 12 h nicht mehr sichtbar sind. Das Protein war, so zeigte es sich, nach 12 h nicht mehr mit der gewählten Methode in der Zelle nachweisbar. Die kürzeste Halbwertszeit der FA *core complex* Proteine hat, das wird schon durch visuelle Betrachtung der Western Blots sehr deutlich, FANCM.

Werden diese Banden mathematisch ausgewertet, so ergibt sich für FANCM eine Halbwertszeit von 1,5 h. Die Ergebnisse dieser Auswertungen sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Wichtig für die Berechnungen waren nicht nur der Zeitpunkt, an welchem keine Bande mehr zu sehen war, sondern auch die Größen- und Intensitätsabnahme der einzelnen Banden gegenüber ihren Vorgängerbanden. So war bei FANCE mit einer Halbwertszeit von 4,2 h noch

Tabelle 4.7 Halbwertszeiten der FA *core complex* Proteine und ihre Standardabweichungen. Gemessen wurden Triplikate.

| Protein | Halbwertszeit (h) | Standardabweichung \pm SD (h) |
|---------|-------------------|---------------------------------|
| FANCA | 4,5 | 0,3 |
| FANCB | 4,5 | 0,3 |
| FANCC | 3,8 | 0,2 |
| FANCE | 4,2 | 0,1 |
| FANCF | 3,2 | 0,1 |
| FANCG | 5 | 0,2 |
| FANCL | 2,4 | 0,1 |
| FANCM | 1,5 | 0,2 |

selbst nach 12 h eine hauchdünne Bande sichtbar, während bei FANCC bereits nach 6 h keine Bande mehr zu sehen war. Dennoch unterschieden sich beide Halbwertszeiten nur um 0,4 h. Dies hing unter anderem damit zusammen, dass die Bandengröße und Intensität von FANCC die ersten 3 h kaum abnahmen, um dann umso stärker zu verblassen, wohingegen die Banden von FANCE kontinuierlich schwächer wurden. Als Nachweis dafür, dass die Abnahme der Bandenintensität auf einen Degradationseffekt zurückzuführen war, wurde eine Ladungskontrolle verwendet. Allerdings musste dieses Protein eine lange Halbwertszeit aufweisen, um nicht selbst innerhalb der untersuchten Zeitspanne signifikant degradiert zu werden. Wie schon in vorangegangenen Western Blot Experimenten eignete sich hierfür wieder das *nuclear matrix protein 84* (p84). Vergleiche Abb. 4.33.

4.9 Kodongebrauch (*codon usage*)

Funktionale Gemeinsamkeiten wie beispielsweise spezifische Regulationsmuster oder TFBs innerhalb einer Gruppe von Genen beziehungsweise einer Genfamilie können Hinweise für

| | FANCA | FANCB | FANCC | FANCE | FANCF | FANCG | FANCL | FANCM |
|-------------|------------------|------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|------------|
| Ala | <u>GCC</u> ; GCT | GCT | GCT | <u>GCC</u> | GCT | <u>GCC</u> | GCT | GCT |
| Arg | <u>AGG</u> | <u>AGA</u> | <u>AGA</u> | <u>AGG</u> | <u>AGA</u> | <u>AGG</u> | <u>AGA</u> | <u>AGA</u> |
| Asn | <u>AAC</u> | AAT | AAT | <u>AAC</u> ;AAT | AAT | <u>AAC</u> | AAT | AAT |
| Asp | <u>GAC</u> | GAT | GAT | GAT | GAT | <u>GAC</u> ;GAT | GAT | GAT |
| Cys | <u>TGC</u> | TGT | <u>TGC</u> | <u>TGC</u> | TGT | TGT | TGT | TGT |
| Stop | <u>TGA</u> | <u>TGA</u> | <u>TGA</u> | <u>TGA</u> | TAG | <u>TGA</u> | <u>TGA</u> | TAA |
| Gln | <u>CAG</u> | <u>CAG</u> | <u>CAG</u> | <u>CAG</u> | CAG | <u>CAG</u> | CAG | CAG |
| Glu | <u>GAG</u> | GAA | GAA | <u>GAG</u> | GAA | <u>GAG</u> | GAA | GAA |
| Gly | <u>GGC</u> | GGA | <u>GGC</u> | GGG | GGA | GGG | GCA | GGA |
| His | <u>CAC</u> | CAT | <u>CAC</u> | <u>CAC</u> | CAT | <u>CAC</u> | CAT | CAT |
| Ile | ATT | ATT | ATT | ATC | ATT | ATT | ATA | ATT |
| Leu | <u>CTG</u> | TTG | <u>CTG</u> | <u>CTG</u> | CTT | <u>CTG</u> | TGG | TTA |
| Lys | <u>AAG</u> | AAA | AAA | AAA | AAA | <u>AAG</u> | AAA | AAA |
| Phe | <u>TTC</u> | TTT | TTT | TTT | TTT | <u>TTC</u> | TTT | TTT |
| Pro | CCT | CCT | CCT | <u>CCC</u> | CCT | CCA | CCA | CCA |
| Ser | <u>AGC</u> | TCA | TCT | <u>AGC</u> | TCT | <u>AGC</u> | TCC | TCT |
| Thy | ACA | ACT | ACT | <u>ACC</u> | <u>ACC</u> | <u>ACC</u> | ACT | ACA |
| Trp | <u>TGG</u> | <u>TGG</u> | <u>TGG</u> | <u>TGG</u> | <u>TGG</u> | <u>TGG</u> | <u>TGG</u> | <u>TGG</u> |
| Tyr | <u>TAC</u> | TAT | TAT | TAT | TAT | <u>TAC</u> | TAT | TAT |
| Val | <u>GTG</u> | GTT | <u>GTG</u> | GTC | <u>GTG</u> | GTC | GTT | GTT |

Abbildung 4.34 Kodongebrauch der *core complex* Gene. Die häufig verwendeten Triplets sind unterstrichen. Das Startcodon ATG für Methionin wurde nicht in die Tabelle aufgenommen, da es hier nur eine Kodierung gibt.

eine molekulare Koevolution sein. Aus diesem Grund war es interessant zu analysieren, inwieweit sich die *core complex* Gene von ihrem evolutionärem Alter her gesehen unterscheiden. Dabei ging es nicht darum, ein genaues zeitliches Alter zu definieren, sondern einen Überblick über die Entwicklung dieser Gene zu erhalten. Dafür wurde sich der Kodonanalyse bedient. Die Kodonfrequenz beschreibt, wie häufig ein bestimmtes Triplett zur Kodierung einer Aminosäure verwendet wird. Daher werden in einem Organismus die bestimmten Aminosäuren überdurchschnittlich häufig, oder selten, durch ein bestimmtes Triplett kodiert. Allerdings gibt es einen Trend, dass Gene, welche stark konserviert und somit sehr alt sind, im Laufe der Evolution ihre Sequenz so verändert haben, dass sie die eher seltenen Triplets bevorzugen [104].

Man erkennt in Abbildung. 4.34 sehr gut, dass FANCM nur noch für zwei Aminosäuren das „Standardtriplett“ verwendet, während FANCA bis auf drei Triplets immer das häufigste „Standardtriplett“ verwendet. Das Triplett für das Startcodon wurde nicht aufgeführt, da es bekannterweise nur eines gibt und daher nicht zwischen „häufig“ und „selten“ unterschieden werden kann. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass es sich bei *FANCM* um das evolutionär älteste Gen handelt und bei *FANCA* um das Rezenteste. *FANCM* ist auch das Gen des *core complex*, welches evolutionär am stärksten konserviert ist und noch in der Hefe zu finden ist. Es ließe sich daher eine evolutionäre Zeitleist von alt nach jung aufstellen die wie folgt aussieht: *FANCM*, *FANCL*, *FANCB/FANCF*, *FANCC*, *FANCE*,

FANCG sowie *FANCA*.

5 Kapitel 5 Diskussion

15 krankheitsverursachende Gene und die zugehörigen Proteine sind für die Fanconi Anämie (FA) mittlerweile identifiziert worden. Aufgrund der Tatsache, dass es immer noch Patienten gibt, die keiner der bekannten Komplementationsgruppen zugeordnet werden können, ist davon auszugehen, dass noch zusätzliche FA Gene identifiziert werden. Ein weiteres Merkmal von FA, neben der Heterogenität, ist die Organisation der Proteine in verschiedenen Funktionsbereichen (z.B. *core complex*, *ID complex* und Koordinatoren der DNA Reparatur). Siehe dazu auch 1.2.5. Aufgrund der Vielzahl der Gene / Proteine und ihrer aufeinander abgestimmten Aufgaben kann von einer komplexen Krankheit gesprochen werden und die Regulation dieser Gene muss genau und zuverlässig funktionieren, um eine Beeinträchtigung der Funktion des FA / BRCA Signalweges zu verhindern. Ausgehend von dieser Grundlage stellte sich die Frage, inwieweit ein solch komplexes System von unterschiedlichen Mechanismen reguliert wird, und ob es für die Zelle beziehungsweise den Organismus nicht von Vorteil wäre, bestimmte Gene, zum Beispiel innerhalb eines Komplexes, mit ähnlichen Mechanismen zu regulieren. Es war zwar bekannt, dass bestimmte regulative Mechanismen wie Phosphorylierungen oder Monoubiquitinierungen nur bestimmte Proteine betreffen, aber über die vorgeschaltete transkriptionelle Regulation der entsprechenden Gene war bisher wenig bekannt. Aus diesem Grund bot sich der *core complex* als größter Proteinkomplex innerhalb des FA Signalweges besonders an, diese Mechanismen an seinen korrespondierenden Genen zu untersuchen. Darüber hinaus bestand die Vorstellung, Argumente für eine potentielle Koevolution der *core complex* Gene durch den Nachweis spezifischer Gemeinsamkeiten in ihrer Regulation zu unterstützen [105].

5.1 Charakteristika der Promotorbereiche

Um eine Aussage über die transkriptionelle Regulation treffen zu können, wurden zuerst die Promotorbereiche der einzelnen FA Gene identifiziert und charakterisiert. Zwar wird dies sehr oft nur durch *in silico* Programme mit Hilfen von mathematischen Algorithmen vorhergesagt, in diesem Fall war es jedoch notwendig, die Promotorbereiche physisch zu isolieren und mit funktionellen Tests auf ihre Stärke hin zu untersuchen. Das Ziel dieser Arbeit war daher, die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Regulationsmaschinerie zu bestimmen, die die *core complex* Gene antreibt. Dies beinhaltete auch die Analyse der typischen und weniger typischen Transkriptionsfaktorbindestellen sowie ihre Verteilung. Die klonierten *core complex* Promotorregionen zeigten Charakteristika, die typisch sind für Haushaltsgene (*housekeeping genes*). Diese Charakteristika sind wie folgt: ein hoher GC Gehalt sowie CpG Inseln, das Fehlen von TATA und CCAAT regulatorischen Sequenzen sowie das Auftreten bestimmter Transkriptionsfaktoren wie YY1, STAT1, AP2 sowie SP1 / GC-Box *cis*-Elementen [88]. Zusätzlich sind diese Promotoren, was ebenfalls typisch ist, nicht besonders stark evolutionär konserviert. Diese sequenzspezifischen Eigenschaften, verknüpft mit den Ergebnissen aus Datenbanken für Transkriptionsstartpunkte legten nahe, dass die FA *core complex* Genpromotoren zu einer speziellen Subgruppe gehören, die durch einen dominanten TSS gekennzeichnet sind, der wiederum von schwächeren TSS umrahmt wird (Abb. 4.1) [92]. Eigene Daten zeigten, dass die Region mit der höchsten Aktivität in der zentralen sowie proximalen Promotorregion zu finden war, eine typische Region hoher Aktivität wie sie für eine Vielzahl von Genen bereits beschrieben wurde [94, 106, 107]. Verglichen mit dem SV40 Promotor zeigten unsere L2 und L3 Promotorkonstrukte eine vergleichbare und teilweise höhere Aktivität, die darauf schließen ließ, dass diese Regionen starke Elemente für die Bildung des Präinitiationskomplexes beinhaltet. Diese Beobachtung war überraschend, da die FA Genfamilie und ihre Proteine Mitglieder von Signalwegen sind, die für Entwicklungsvorgänge und Genomstabilität verantwortlich sind und verglichen mit dem *GLI3* Promoter eine schwächere Aktivität zeigen sollten [96]. Der *GLI3* Promotor ist ebenfalls ein entwicklungspezifischer Genpromoter und eine vergleichbare Stärke wäre zu erwarten gewesen. Das schwächere Aktivierungspotential, welches bei den L1 Konstrukten beobachtet werden konnte, legte das Vorhandensein eines negativ regulierenden Elementes (*repressor, silencer*) in dieser speziellen Region nahe. Dies ist nicht völlig ungewöhnlich, da *silencing elements* schon im humanen AZFa (*azoospermia factor 1*) Genpromotor identifiziert wurden, um ein Beispiel zu nennen [97]. Die FA *core complex* Gene sind unabhängig und weitläufig über das gesamte Genom verteilt. Mit der Ausnahme von *FANCB* überlappen diese Gene generell nicht mit anderen Genen in größerem Umfang. Aus den vorliegenden Experimenten ging

hervor, dass ausschließlich *FANCB* eine leichte bidirektionale basale Promotoraktivität im Dual Luciferase Assay besaß (Abb. 4.6). Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass *FANCB* eine Promotorregion hat, die teilweise mit der Promotorregion des humanen *MOSPD2* Gens überlappt (*motile sperm domain containing 2*). Zelltypspezifische Effekte der eigenen Messungen als Ursache für die Unterschiede in der Promotoraktivität konnten ausgeschlossen werden, da die Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien HeLa und HEK293 nur marginal waren. Die transkriptionelle Regulation von Genen, die an der Bildung eines Proteinkomplexes beteiligt sind, sind oft durch Sequenzähnlichkeiten gekennzeichnet [108, 109]. Zwei verschiedene Motive wurden innerhalb der FA Promotorregion mit der höchsten Aktivität charakterisiert, die in dieser Kombination des Auftretens spezifisch für die FA *core complex* Gene sind (Abb. 4.11). Mit der Ausnahme von *FANCF* beinhalten alle *core complex* Promotoren eines dieser beiden Motive, wenn auch in unterschiedlicher Anzahl. Ähnlich dem, was für *FANCD2* berichtet wurde, könnten die E2F Bindestellen in diesen Motiven eine Beteiligung des E2F / Rb Signalweges an der Regulation des *core complex* nahelegen [100]. Darüber hinaus unterstreicht die Lage dieser Motive im 3' Bereich im Gegensatz zu den *silencing elements* in der 5' Region eine zweiteilige (*bi-partite*) Natur der FA *core complex* Promotoren.

5.2 Transkriptionelle Verknüpfung mit anderen Signalwegen

Über die Regulation des JAK / STAT Signalweges durch den FA / BRCA wurde bereits vorher in einer sehr kleinen Anzahl von Publikationen berichtet [102]; in dieser Arbeit stellte sich jedoch die genau umgekehrte Frage, nämlich ob der FA / BRCA Signalweg durch den JAK / STAT Signalweg reguliert wird. Die *in silico* Daten wiesen darauf hin, dass alle FA *core complex* Genpromotoren eine oder mehr STAT1/4/5 Bindestellen in ihrer Sequenz aufweisen, immer auch in Kombination mit SP1, einem Kofaktor von STAT1. Unabhängige, aber nahe beieinander liegende DNA Bindestellen für STAT und andere Transkriptionsfaktoren scheinen für eine maximale transkriptionelle Aktivität von Promotoren notwendig zu sein [110]. Im Gegensatz zu der einheitlichen Präsenz der STAT Bindestellen wurden SMAD Bindestellen mit hoher Konservierung nur in *FANCG* sowie *FANCA* gefunden, mit einer geringeren Konservierung der Konsensussequenz jedoch auch in *FANCB*, *FANCF* und *FANCL*. Diese Daten legen ein regulatives Netzwerk nahe, in das auch der TGF- β Signalweg involviert ist [111, 112, 113]. Weshalb dennoch SMAD in die Promotoranalysen mit aufgenommen wurde, war die Tatsache, dass *in silico* Methoden nicht den „Ist-Zustand“ abbilden, sondern lediglich eine Idee vermitteln, welche Faktoren

möglicherweise eine Rolle bei der Regulation spielen. Zudem gab es ermutigende Studien, die einen möglichen STAT / SMAD Komplex postulieren, der offensichtlich kooperativ zusammen arbeitet [114, 115]. Ein weiterer Hinweis auf eine SMAD gesteuerte Regulation geben die AP1 und c-Jun / c-Fos Bindestellen, die in den meisten FA *core complex* Promotoren vorhanden sind. Das SMAD Konsensusmotiv, GTCTAGAC, ist eine palindromische Sequenz mit zwei Kopien von GTCT mit seinem umgekehrt-komplementären AGAC auf dem Gegenstrang. Tandemwiederholungen dieser Sequenz haben, so wurde gezeigt, die Fähigkeit TGF- β -induzierbare Transkription zu fördern bzw. zu verstärken [116]. SMAD bindet ebenfalls an TGAGTCAGAC, eine AP1 Bindestelle (TGAGTCA), die mit einer AGAC-enthaltenden SMAD Bindestelle überlappt [117]. An AP1 Bindestellen, die von TGF- β angesprochen werden können, interagiert SMAD durch sein N-L Segment mit c-Jun und durch seine C-Domäne mit c-Fos und bildet dadurch einen Multiproteinkomplex. Diese Kooperation führt zu einer TGF- β induzierten Transkription (Abb. 5.1) [118]. Dieses Modell einer transkriptionellen Kooperation zeigt darüber hinaus einen Mechanismus auf, der die Integration zweier Signalwege an der Promotorsequenz verdeutlicht.

Dieses Modell scheint auch auf die Gene des *core complex* anwendbar zu sein, da die entsprechenden Bindestellen in den untersuchten Promotorsequenzen vorhanden waren. Ein weiterer Punkt ist die Initiation der Transkription durch c-Jun / c-Fos, welche in der Regel durch mitogene Stimuli, oxidativen Stress sowie UV-Strahlen induziert wird, wohingegen die SMAD-Aktivierung durch TGF- β initiiert wird [118]. Die genannten Mechanismen der Induktion sind dafür bekannt, DNA Schäden zu verursachen [1]. Ein direkter

Einfluss von SMAD4 auf die FA Genexpression konnte bereits in der Maus gezeigt werden [18] und wurde durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Umgekehrt führt der Verlust von SMAD4 zu einer erhöhten genomischen Instabilität sowie einem signifikant erhöhtem Risiko an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken (*head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC*), ein Tumor welcher ungewöhnlich häufig bei FA Patienten zu beobachten ist [18, 119]. Bisher gab es nur einzelne Publikationen, die sich mit einer möglichen Wechselwirkung zwischen zwei der FA *core complex* Gene (*FANCA* und *FANCC*) und dem TGF- β beziehungsweise dem JAK / STAT Signalweg beschäftigten [102, 120, 103]. Betrachtet man die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen nicht als isolierte Ereig-

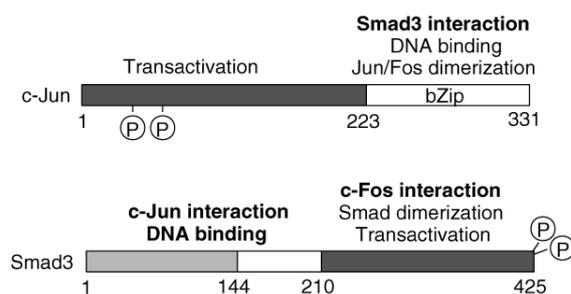


Abbildung 5.1 Darstellung der Interaktionsdomänen für Smad3 von c-Jun und für c-Jun / c-Fos am Beispiel von Smad3. Bei der Bindung an AP1 kann hierdurch ein Multiproteinkomplex entstehen der die Signalwege von JAK / STAT und TGF- β verbindet. Abbildung aus [118].

nisse, sondern als Hinweis auf ein regulatorisches System, so kristallisieren sich immer stärker Verbindungen der *core complex* Gene zu anderen Signalwegen heraus. Gerade das Zusammenspiel einzelner Transkriptionsfaktoren, die ein koordiniertes Regulationsmuster beschreiben, indem sie an der Mehrzahl oder sogar an allen, der *core complex* Promotoren binden können, um auf diese Weise die Genexpression zu koordinieren. Einer dieser TFs ist YY1, ein Transkriptionsfaktor, der dafür bekannt ist, die Transkription von Genen zu initiieren, die mit dem hämopoetischen System in Verbindung stehen. Insbesondere die Aktivierung der Megakaryozyten im Knochenmark wird durch YY1 reguliert. Außerdem gibt es Daten, die ein Zusammenwirken von YY1 mit SMAD(4) zeigen, sowie über die Rolle von YY1 als Substrat der Polo-like Kinase 1 im Übergang G2/M im Zellzyklus [121, 122, 123]. Weitere Hinweise, die die Hypothese der Involvierung von STAT und SMAD in die Regulation der *core complex* Gene unterstützt, sind zwei weitere Transkriptionsfaktoren mit Bindestellen in den Promotorregionen: E2F und STAT1 selbst. Beide sind dafür bekannt, dass sie im Falle eines DNA Schadens regulativ die Schadensantwort modulieren [124, 125]. Interessanterweise wurde bisher nicht untersucht, ob beide Faktoren auch einen Einfluss auf den FA / BRCA Signalweg haben. Es war bekannt, dass beide in Verbindung gebracht werden können mit dem ATM / ATR Signalweg sowie mit BRCA1, die wiederum selbst mit dem FA / BRCA Signalweg in Verbindung stehen. Außerdem zeigten Untersuchungen, dass beide Faktoren durch eine Koppelung an Chk2 einen Einfluss auf den Zellzyklus nehmen konnten. Bei STAT1 führt der Verlust von STAT1 zu einer Reduktion der Chk2 Phosphorylierung am Threonin 68 (Chk2^{T68}) [125]. Wohingegen bei E2F die Regulation in gegensätzlicher Richtung verläuft. Hier reguliert Chk2 die E2F Aktivität. Im Fall einer DNA Schädigung phosphoryliert Chk2 E2F, was zu einer Stabilisierung des Proteins, einer verlängerten Halbwertszeit sowie einer transkriptionellen Aktivierung von E2F führt [124]. Die Auswirkungen auf den Zellzyklus sind nicht uninteressant, da hier, ähnlich wie bei FA, Zellen in bestimmten Phasen des Zellzyklusses angehalten werden können. Bei E2F ist der Übergang der G1- zur S-Phase betroffen. Für die eigene Arbeit von größerer Bedeutung ist jedoch die Tatsache, dass STAT1 defiziente Zellen Anomalien an den intra-S-Phase sowie G2-M Checkpoints aufweisen. Vergegenwärtigt man sich nun die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Experimente aus 4.6.1, so entsteht der Verdacht, dass die hohen Zellanteile in der S-Phase, wie sie untypisch für klassische FA Zellen sind, keine Artefakte oder Messfehler bedeuteten, sondern zwei regulative Ereignisse verdeutlichten. Diese Ereignisse scheinen miteinander verknüpft zu sein und ergänzen sich gegenseitig. Zum Einen sieht man den zellulären FA Phänotyp nach der Behandlung mit MMC in Form einer G2-Arretierung. Diese wurde durch den *knockdown* der getesteten *STAT* und *SMAD* Gene verursacht. Zum Anderen lässt sich nun möglicherweise auch die Akkumulation eines Teils der Zellen in der intra-S-Phase mit dem *STAT*

knockdown erklären. Zusammengefasst würde dies bedeuten, dass die Zellen die von dem *knockdown* betroffen sind in der S-Phase angehalten werden. Allerdings handelte es sich nicht um einen absoluten *knockout* sondern nur einen *knockdown* von maximal 95%, so dass die Zellen, welche die S-Phase passieren konnten, nun in der G2-Phase akkumulieren, da die Doppelstrangvernetzung an der Replikationsgabel nicht behoben werden konnte. Diese Annahme würde nicht nur für STAT1 gelten, sondern auch auf die Faktoren STAT4 sowie SMAD1/4 erweitert werden können. Abbildung 5.2 zeigt eine Übersicht von hypothetischen oder bestätigten Interaktionen der genannten Gene beziehungsweise Proteine mit Komponenten des FA / BRCA Signalwegs.

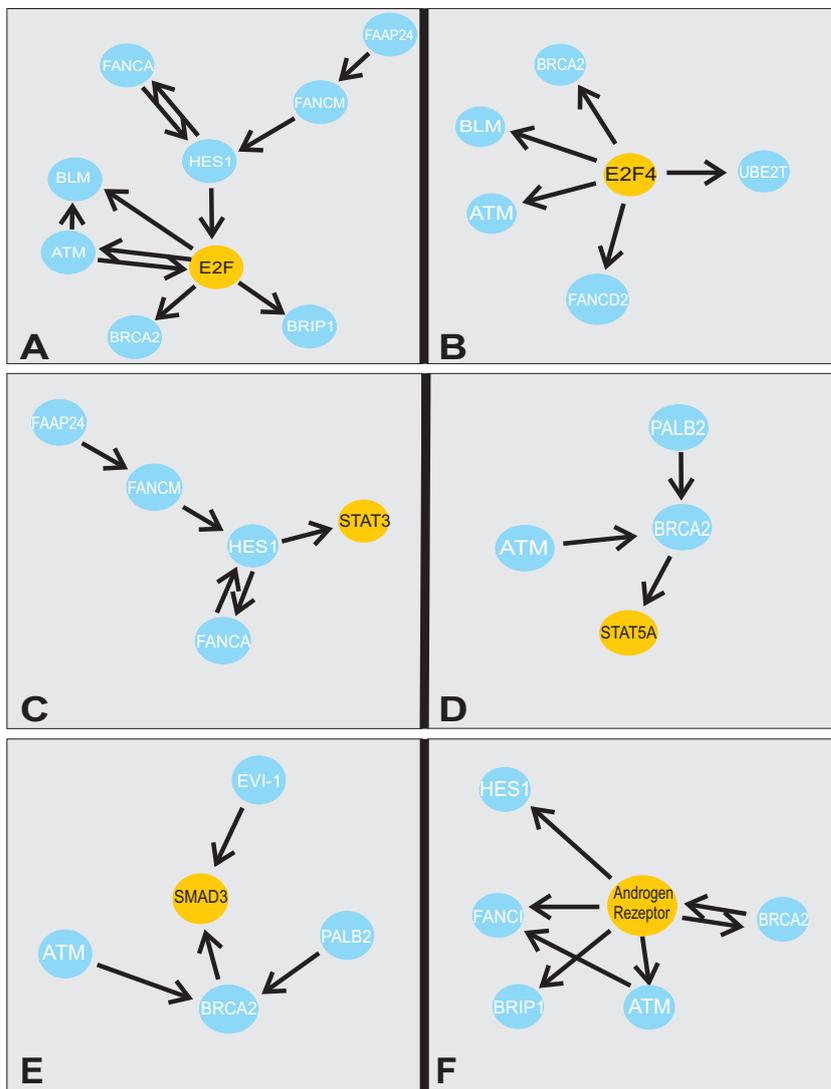


Abbildung 5.2 Übersicht über mögliche Wechselwirkungen zwischen Mitgliedern des FA / BRCA Signalweges sowie anderer DNA Reparatur Signalwege mit (A) E2F (B) E2F4 (C) STAT3 (D) STAT5A (E) SMAD3 und (F) Androgen Rezeptor. Die Diagramme zeigen Verbindungen, die in der Literatur berichtet wurden, oder als mögliche Interaktionen von *in silico* Programmen vorhergesagt wurden. Nicht alle beteiligten Gene/Proteine sind in dieser Arbeit untersucht worden.

Dabei wird deutlich, dass einige dieser Faktoren immer wieder direkt oder indirekt mit Mitgliedern aus Signalwegen interagieren, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden. Aus diesem Grund könnte die diskutierte Annahme einer Erweiterung der STAT1 Ergebnisse in analoger Form auf die anderen TFs durchaus im Bereich des Möglichen liegen. Dass diese Idee nicht unmöglich ist, kann zumindest für STAT postuliert werden. Schaut man sich die Promotorregion der *core complex* Gene genauer an, so findet man, dass aus der Familie der STATs ZWEI Bindestellen NIE in diesen Sequenzen zu finden waren: STAT2 und STAT3. Die Regulation eines so essentiellen Vorganges wie der DNA Reparatur unter die (teilweise) Kontrolle von STAT2/3 zu stellen, wäre für die Zelle extrem unvorteilhaft da bereits gezeigt wurde, dass der Verlust von STAT2/3 embryonal letal ist [127, 126]. Diese Arbeit nun bestätigte das Ergebnis fehlender STAT2/3 Bindestellen auf alle Mitglieder des FA *core complex*. Um die Ergebnisse zu untermauern, die aus den HeLa Zellen gewonnen wurden, wurden die Experimente in einer normalen (Kontrolle) sowie in einer primären FA-A Fibroblastenzelllinie wiederholt und bestätigt. Unterstützt werden die Ergebnisse durch die StellARrayTM Experimente, wie sie für den JAK / STAT sowie den TGF- β Signalweg durchgeführt wurden. Allein die große Anzahl der Gene beider Signalwege, die in der FA-A Zelllinie eine signifikante Expressionsänderung im Vergleich zur normalen Kontrolle zeigten, unterstützt die These, dass zumindest *FANCA* unter der Kontrolle der beiden genannten Signalwege steht. Da diese Arbeit jedoch gezeigt hat, dass die Gene des *core complex* sehr ähnlich, wenn auch nicht in allen Details identisch reguliert werden, so kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse für *FANCA* an humanen Fibroblasten auch für die anderen *core complex* Gene gelten dürften. Dies bedeutet jedoch nicht, dass identische Gene wie in *FANCA* eine vergleichbare Expressionsänderung auch in anderen Genen zeigen müssen. Die Frage, weshalb gerade Gene wie *MSTN*, *NODAL* oder *TLR7* in den untersuchten Zellen eine veränderte Expression zeigten, bleibt spekulativ. Ausgehend von diesen Genen lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Brücke schlagen zu den molekularen Ursachen der FA. Auch in der aktuellen Literatur gibt es keine Hinweise, die dieses Thema betreffen. Lediglich bei *OAS2* und *TNF* ließe sich, wenn auch spekulativ, eine Erklärung für die Expressionsänderungen finden. Wie in Tabelle 4.4 bereits beschrieben, übernimmt *TNF* Aufgaben während der Zellproliferation sowie der Apoptose [128]. Eine Idee wäre, dass in einer Zelle, in der die DNA Reparatur gestört oder auch defekt ist, diese Zelle wohlmöglich auch Probleme mit der Proliferation zeigt und sogar in die Apoptose läuft. Möglicherweise kann in diesem Stadium die Aufgabe von *TNF* nur durch seine Hochregulierung gewährleistet bleiben. *OAS2* übernimmt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort im Falle von viralen Infekten (Tab. 4.6) [129]. Manche FA Patienten erkranken öfter an Virusinfektionen als der Durchschnitt der Bevölkerung. Auch die humanen Papillomviren HPV16 und

HPV18 spielen bei der FA eine besondere Rolle. Einerseits wäre es möglich, eine Häufung viraler Infektionen mit der Grunderkrankung FA zu erklären, da die Virusproteine E6 und E7 die Apoptose verhindern. Man muss bedenken, dass dies alles in einem System geschieht, in dem die DNA Reparatur per se schon Defekte zeigt. Allerdings könnte es jedoch auch sein, dass ein falsch exprimiertes *OAS2* Gen dazu beiträgt, Viren im Falle einer Infektion nicht richtig abwehren zu können, da die Aktivierung der RNase L fehlschlägt [130]. Weit weniger spekulativ, vielmehr schon mehrfach publiziert, ist das Zusammenspiel von JAK / STAT mit dem TGF- β Signalweg. Nun gibt es neben der Interaktion von STAT und SMAD, vermittelt durch das Brückenmolekül p300, noch eine gegenseitige Interaktion und Beeinflussung durch andere Mitglieder der einzelnen Signalwege. So erhöht TNF die STAT1 Serin Phosphorylierung und die STAT4 Tyrosin Phosphorylierung und aktiviert auf diese Weise die Expression des NF- κ B und STAT1 Zielgenes *IFN regulatory factor 1 (IRF1)* [131]. Vergleicht man nun die Ergebnisse der Expressionsstudien aus 4.5 dieser Arbeit mit den dargelegten Fakten, so ergibt sich ein interessantes Bild. In unserem FA-A Zelllinie war *TNF* tatsächlich erhöht exprimiert, da jedoch die *STAT1* sowie *STAT4* Transkriptmenge signifikant reduziert wurde (Abb. 4.18a) und so wahrscheinlich ungenügende Mengen dieser Proteine gebildet wurden, blieb eine Fortführung der Signalkaskade aus, oder sie wurde deutlich abgeschwächt. Aus diesem Grund kommt es dann nicht zur Expressionsaktivierung des STAT1 und NF- κ B Zielgens *IRF1*, welches, so zeigten die Experimente, ebenso wie *IRF6* in der FA-A Zelllinie stark nach unten reguliert wurde. Eine weitere Rolle von IRF1 betrifft direkt die DNA Schadensantwort. So konnte gezeigt werden, dass IRF1 direkt *FANCI* reguliert [101]. Eine Überexpression von *IRF1* führte zu einer Hochregulation von *FANCI* sowie der *knockdown* zu einer Verminderung der *FANCI* Expression. Damit bestätigt sich, dass *IRF1* eine Rolle in der Regulation der ICL Reparatur spielt. *FANCI* gehört zwar nicht zum FA *core complex* und die Daten stammen aus der Literatur. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Mechanismus auch für *FANCA*, als Mitglied des *core complex* gilt. Auch wenn nur die Auswirkungen eines *knockdowns* und nicht die Überexpression untersucht wurde sind die Ergebnisse eindeutig. In allen untersuchten FA-A Zelllinien (primäre Fibroblasten) war die Expression von *IRF1* stark reduziert und vergleichbar mit einer normalen Kontrollzelllinie die mit einer siRNA gegen *IRF1* herunterreguliert wurde. Des Weiteren führte der *IRF1 knockdown* zu einer signifikant reduzierten *FANCA* Expression und dies deckt sich mit den Daten für *FANCI* aus der Literatur [101]. Weiterhin konnte ein funktionaler Zusammenhang zwischen einer verminderten *IRF1* Expression und einer Funktionsstörung des FA *core complex* gezeigt werden. Der Verlust, beziehungsweise die signifikante Reduktion der *IRF1* Expression führte *in vitro* dazu, dass die FANCD2 Monoubiquitinierung nicht stattfand und somit der FA Signalweg unterbrochen wurde. Möglicherweise ist die

IRF1 Bindestelle im *FANCA* Promotor, wahrscheinlich auch in den anderen *core complex* Promotoren, von hoher Wichtigkeit und ein Verlust der spezifischen Bindung könnte zum Verlust der Genexpression führen. Eine weitere Gemeinsamkeit der Untersuchungen an *IRF1* mit den Untersuchungen an *STAT* und *SMAD* zeigt sich bei der Beobachtung des zellulären Phänotyps. So wie der *knockdown* von *STAT* und *SMAD* zu einer G2-Phasen Arretierung führte, so konnte dies auch nach einem *IRF1 knockdown* beobachtet werden. Da IRF1 wie auch STAT1/4 Mitglied des JAK / STAT Signalwegs ist, verwundert es nicht wenn IRF1 ähnliche Funktionen wie STAT1 oder STAT4 wahrnehmen kann (Vergl. 4.5.2). Insbesondere weil es Hinweise darauf gibt, dass IRF1 auch mit ähnlichen Proteinen wie zum Beispiel ATM interagieren kann [132]. Aus diesem Umstand lässt sich eine weitere Brücke schlagen, denn die Beteiligung von STAT1 an der ATM-abhängigen *checkpoint* Kontrolle im gleichnamigen Reparaturweg ist bereits beschrieben [125]. Die Daten aus der Literatur, ergänzt durch die eigene Arbeit lassen daher den Schluss zu, dass die *STAT*, *SMAD* und *IRF* Gene, gemeinsam oder unabhängig voneinander, die Expression des FA *core complex* transkriptionell beeinflussen.

5.3 Posttranslationale Regulation der FA *core complex* Gene

Es lässt sich vermuten, dass die Regulation der FA *core complex* Gene nicht nur durch die Promotoren gewährleistet wird. Eine Regulation auf Transkriptebene hat sich als wichtiger Aspekt in der Expressionskontrolle vieler Gene erwiesen. In *Drosophila* kennt man die sogenannten *box motifs* („K box, GY box and Brd box“), die scheinbar als regulatorische Elemente des Notch Signalwegs funktionieren [133, 134]. Als Mediatoren für miRNABindung spielen diese drei Sequenzmotive eine Schlüsselrolle in der Regulierung von Genexpression [133, 134, 135, 136]. Eigene Analysen zeigten, dass K-Boxen in den meisten der FA *core complex* Transkripten vorkommen und mindestens eines dieser Motive konnte in jedem Transkript des *core complex* vorhergesagt werden, mit Ausnahmen von FANCE. Allerdings sind diese Motive nur in den 5'-UTRs sowie den 3'-UTRs zu finden.

Durch den häufigen oder seltenen Gebrauch der Aminosäuretripletts kann bestimmt werden, welche Gene aus einer Gruppe evolutionär am ältesten beziehungsweise am jüngsten sind. Im Laufe der Evolution ändert sich für eine bestimmte Aminosäure das kodierende Tripletts von der häufigsten Form zu einer weniger häufigen Form [104]. Die Aussagekraft dieser evolutionären Entwicklung kann nun durch die molekulare Koevolution erweitert

werden. Dieser Aspekt ist besonders bei Genen, die miteinander interagieren von großer Bedeutung.

Bei nahezu gleichen Regulationsmechanismen wie bei den FA Genen die von den gleichen Faktoren gesteuert werden, vermutet man, dass daher auch die Expressionlevels ähnlich evolvieren. Das heißt, Genregulation kann Bestandteil einer Koevolution sein und die Funktionalität der Gene, hier die des *core complex*, wären gesichert [137].

Ein weiterer Punkt, den es zu diskutieren gilt, ist die Rolle der FA Protein Halbwertszeiten innerhalb des regulativen Kontextes. Im Gegensatz zu der transkriptionellen Regulation, in der die *core complex* Gene das Ziel von *cis*-regulierenden Faktoren sind, ist bei der Halbwertszeit das Protein selbst das regulative Moment. Daher war es nicht wichtig, die genauen Mechanismen der Degradation zu untersuchen, sondern vielmehr zu zeigen, dass es für die *core complex* Gene eine koordinierte, gemeinsame Regulation gibt, die sich auf die von ihnen kodierten Proteine erweitern lässt, um die Annahme dieser gemeinsamen Regulation zu unterstützen. Vergegenwärtigt man sich die Funktion des *core complex* innerhalb der FA / BRCA Signalweges, so gilt, dass diese Proteine im Falle eines DNA Schadens, also eines ICL, schnell an die Schadensstelle gelangen, um selbst weitere Proteine zu rekrutieren. Dies bedeutet jedoch auch, dass die Funktion des *core complex* genau vorgegeben ist und zeitlich begrenzt sein muss, damit die abhängigen Proteine des FA / BRCA Signalweges selbst an der blockierten Replikationsgabel binden können, um die Doppelstrangläsion zu beheben. Die in dieser Arbeit ermittelten Halbwertszeiten der *core complex* Proteine, im Mittel 3,6 h, sind relativ kurz, wenn man sie mit anderen Proteinen, zum Beispiel *Alpha-N-Acetylgalactosaminidase (α-GalNAc)* vergleicht. Hier beträgt die Halbwertszeit circa 37 h [138]. In Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit könnte man daher ein Modell entwickeln, bei dem eine bestimmte Menge der *core complex* Proteine an die Schadenstelle rekrutiert werden muss, nachdem ein DNA Schaden eingetreten ist. Dies wird in einem ersten Schritt durch die vergleichsweise hohe Promotorstärke gewährleistet, die in kurzer Zeit die nötige Transkriptmenge zur Verfügung stellt. Nachdem die *core complex* Proteine ihre Aufgabe übernommen haben, werden sie, so scheint es, schnell wieder degradiert, um an der Schadensstelle Raum freizugeben für die eigentlichen Reparaturenzyme. Die relativ einheitlichen Halbwertszeiten innerhalb der *core complex* Proteine verdeutlichen, dass die Proteine nicht nur in einem ähnlichen molaren Verhältnis zur Verfügung stehen, sondern auch gleichmäßig abgebaut werden [32, 20, 139]. Es zeigen sich auch hier wieder koordinierte Regulationsmechanismen.

Basierend auf vielen Gemeinsamkeiten ist eine Schlussfolgerung dieser Arbeit, dass die FA *core complex* Gene und ihre Produkte einer koordinierten Regulation unterliegen. Ferner wurde deutlich, dass zumindest die Mitglieder des *core complex* innerhalb des FA / BRCA Signalweges durch weitere, übergeordnete Signalwege beeinflusst werden. In diesem Fall

handelt es sich um den JAK / STAT Signalweg mit den Mitgliedern STAT1 und STAT4 sowie dem TGF- β Signalweg vertreten durch SMAD1 und SMAD4. Die beschriebenen funktionellen Gemeinsamkeiten könnten zusätzlich einen Hinweis für die Koevolution der *core complex* Gene geben. Die Arbeit kann diese Frage jedoch nicht abschließend beantworten.

Ausgehend von der Wichtigkeit der DNA Schadenserkennung und Reparatur in Bezug auf die Krebsentstehung und das Altern scheint es sinnvoll einen zusätzlichen Schutz für langlebige, warmblütige Spezies wie des Menschen zur Verfügung zu stellen. Dieser Schutz beinhaltet einen bestimmten Grad regulatorischer und funktionaler Redundanz wie wir sie bei den FA *core complex* Genen finden konnten. Abbildung 5.3 soll eine schematische Darstellung darüber geben, wie die Regulation der FA Gene, nicht nur die des *core complex*, verstanden werden kann. Posttranslationale Regulationsmechanismen wie Phosphorylierungen, Methylierungen und Ubiquitinierungen sind bewusst nicht verzeichnet. Die Abbildung setzt sich aus den bisher bekannten regulativen Mechanismen und den in dieser Arbeit aufgezeigten neuen Mechanismen zusammen. So kann es unmittelbar durch den Verlust der DNA:Proteinbindung (TF) und somit zu einer verminderten Transkriptmenge zu einem zellulären FA Phänotyp kommen, mittelbar aber auch durch Mutationen in dem TF kodierenden Gen. Außerdem können durch Defekte in Kofaktoren von Genen, die für die Aufrechterhaltung der Regulationsfähigkeit eines übergeordneten Signalweges verantwortlich sind, nachgeschaltet auch Probleme in den *core complex* Genen und somit direkt auch in den entsprechenden Proteinen entstehen (z.B. zu geringe Proteinmenge oder falsche post-translationale Modifikationen).

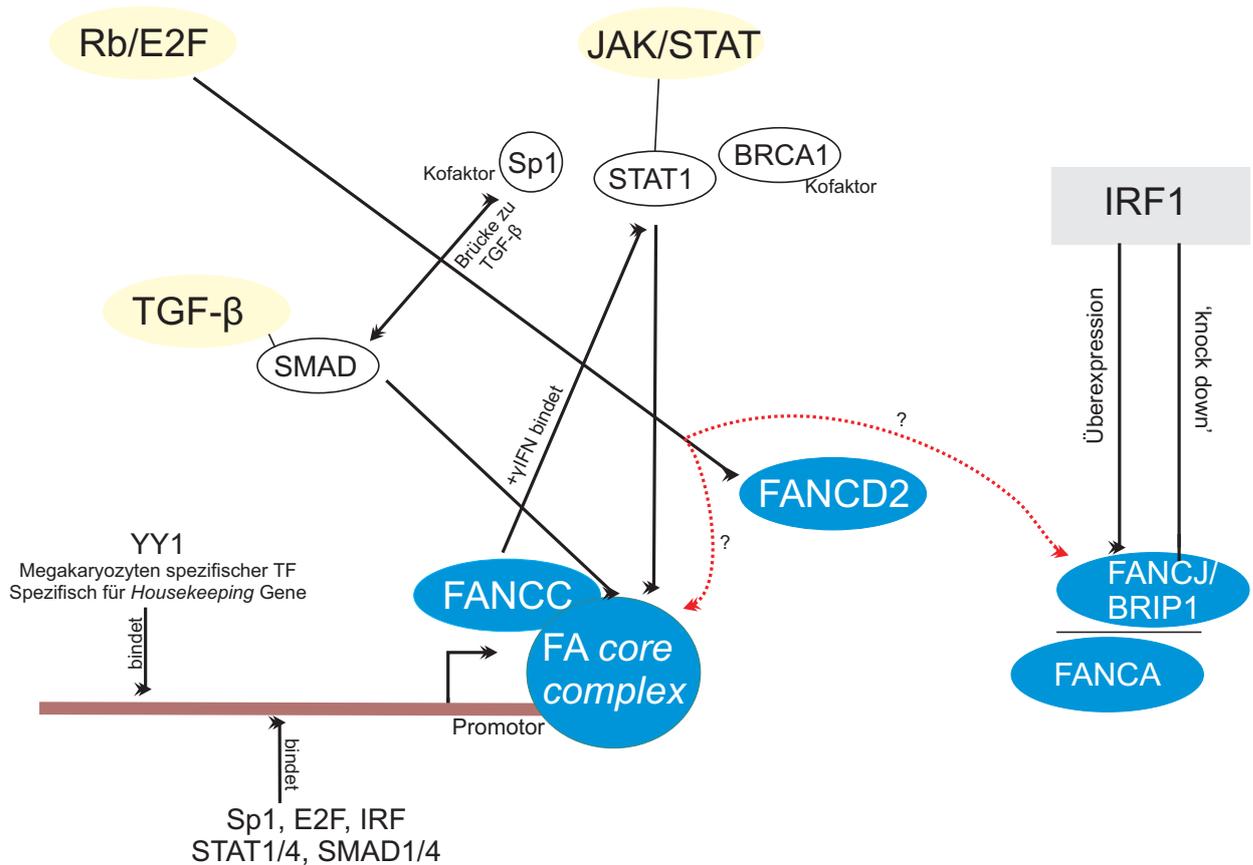


Abbildung 5.3 Hypothese eines regulativen Signalweges, wie er sich möglicherweise darstellen könnte unter Einbeziehung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten. E2F hat eine direkte Wirkung auf FANCD2 und möglicherweise auch auf FANCI und den FA core complex. Ebenso wie IRF1, welches in den core complex Genpromotoren eine TF Bindestelle besitzt. BRCA1 dient für STAT1 als Kofaktor, genau wie Sp1, welches dadurch eine Verbindung zu den SMADs und damit zwischen dem JAK/STAT und dem TGF-β Signalweg herstellt. Durch die Zugabe von γ IFN bindet FANCC an STAT1, umgekehrt binden STAT1/4 aber auch am FA core complex.

Zusammenfassung & Ausblick: Diese Arbeit bietet eine Grundlage, von der ausgehend weitere Untersuchungen in Bezug auf die Regulation der FA core complex Gene durchgeführt werden könnten. Besonders die Frage nach der Wirkung von Interferon und TGF- β regulierten Genen auf den FA Phänotyp wäre ein interessantes Gebiet, auf dem funktionelle Experimente weiteren Aufschluss geben könnten. Diese Frage ist deshalb auch von Interesse, da von einer direkten Genotyp-Phänotyp Korrelation auf dem Gebiet der Interferon und TGF- β regulierten Gene bei FA bisher keine Erkenntnisse vorliegen. Dies beinhaltet, dass bisher kein Patient bekannt ist, dessen Phänotyp auf einer Mutation beruht, die ausschließlich den Promotorbereich eines der FA core complex Gene betrifft. Auch für die anderen FA Gene gibt es dafür keine publizierten Daten. Möglicherweise zeigt sich an diesem Beispiel, wie wichtig eine koordinierte und konservierte Regulation dieser Gene für die Zelle und letztendlich den Organismus ist. Eine Missregulation könnte weitrei-

chende Folgen haben und wird von der Zelle durch redundante Funktionswege auf ein Minimum begrenzt. Eine Synopsis der interagierenden Faktoren könnte dazu beitragen, das regulatorische Umfeld des FA / BRCA Signalwegs besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

- [1] Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361, 1475-1485.
- [2] Harper, J. W., and Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell* 28, 739-745.
- [3] Starcevic, D., Dalal, S., and Sweasy, J.B. (2004). Is there a link between DNA polymerase beta and cancer? *Cell Cycle* 3, 998-1001.
- [4] Oksenysh, V., and Coin, F. (2010). The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell cycle* 9, 90-96.
- [5] Martin, A., and Scharff, M.D. (2002). AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nat Rev Immunol* 2, 605-614.
- [6] Hartlerode, A. J., and Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *The Biochemical journal* 423, 157-168.
- [7] Hammel, M., Yu, Y., Mahaney, B. L., Cai, B., Ye, R., Phipps, B. M., Rambo, R. P., Hura, G. L., Pelikan, M., So, S., et al. (2010). Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *The Journal of biological chemistry* 285, 1414-1423.
- [8] Mahaney, B. L., Meek, K., and Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *The Biochemical journal* 417, 639-650.
- [9] Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40, 179-204.
- [10] Hlavin, E. M., Smeaton, M. B., and Miller, P. S. (2010). Initiation of DNA interstrand cross-link repair in mammalian cells. *Environmental and molecular mutagenesis* 51, 604-624.
- [11] Hinz, J. M. (2010). Role of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. *Environmental and molecular mutagenesis* 51, 582-603.

- [12] Fanconi G. Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (pernizioses Blutbild und Konstitution) *Jahrb Kinderh.* 1927;117:257–280.
- [13] Fanconi, G. (1967). Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (F.A.). I. Clinical aspects. *Semin Hematol* 4, 233-240.
- [14] Auerbach, A.D., and Allen, R.G. (1991). Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet Cytogenet* 51, 1-12.
- [15] Auerbach, A.D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 668, 4-10.
- [16] Faivre, L., Guardiola, P., Lewis, C., Dokal, I., Ebell, W., Zatterale, A., Altay, C., Poole, J., Stones, D., Kwee, M.L., et al. (2000). Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. *European Fanconi Anemia Research Group. Blood* 96, 4064-4070.
- [17] Auerbach, A.D., Buchwald, M., Joenje, H., Fanconi Anemia. (1998).:In: Vogelstein, B., Kinzler, K.W., esd. *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York: McGraw-Hill, 317-20
- [18] Bornstein, S., White, R., Malkoski, S., Oka, M., Han, G., Cleaver, T., Reh, D., Andersen, P., Gross, N., Olson, S., et al. (2009). Smad4 loss in mice causes spontaneous head and neck cancer with increased genomic instability and inflammation. *J Clin Invest* 119, 3408-3419.
- [19] Verlander, P.C., Kaporis, A., Liu, Q., Zhang, Q., Seligsohn, U., and Auerbach, A.D. (1995). Carrier frequency of the IVS4 + 4 A→T mutation of the Fanconi anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population. *Blood* 86, 4034-4038.
- [20] Joenje, H., and Patel, K.J. (2001). The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2, 446-457.
- [21] Rosendorff, J., Bernstein, R., Macdougall, L., and Jenkins, T. (1987). Fanconi anemia: another disease of unusually high prevalence in the Afrikaans population of South Africa. *Am J Med Genet* 27, 793-797.
- [22] Callen, E., Casado, J.A., Tischkowitz, M.D., Bueren, J.A., Creus, A., Marcos, R., Dasi, A., Estella, J.M., Munoz, A., Ortega, J.J., et al. (2005). A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* 105, 1946-1949.
- [23] Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Kim, S.T., Lane, W.S., Kastan, M.B., and D'Andrea, A.D. (2002). Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 109, 459-472.

- [24] Schindler, D., Kubbies, M., Hoehn, H., Schinzel, A., and Rabinovitch, P.S. (1985). Presymptomatic diagnosis of Fanconi's anaemia. *Lancet* 1, 937.
- [25] Schindler, D., Kubbies, M., Hoehn, H., Schinzel, A., and Rabinovitch, P.S. (1987). Confirmation of Fanconi's anemia and detection of a chromosomal aberration (1Q12-32 triplication) via BrdU/Hoechst flow cytometry. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 9, 172-177
- [26] D'Andrea, A.D., and Grompe, M. (1997). Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. *Blood* 90, 1725-1736.
- [27] Buchwald, M., and Moustacchi, E. (1998). Is Fanconi anemia caused by a defect in the processing of DNA damage? *Mutat Res* 408, 75-90.
- [28] Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., Neveling, K., Endt, D., Kesterton, I., Autore, F., et al. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet* 42, 406-409.
- [29] Thompson, L.H., and Jones, N.J. (2010). Stabilizing and remodeling the blocked DNA replication fork: anchoring FANCM and the Fanconi anemia damage response. *Mol Cell* 37, 749-751.
- [30] Ciccia, A., Ling, C., Coulthard, R., Yan, Z., Xue, Y., Meetei, A.R., Laghmani el, H., Joenje, H., McDonald, N., de Winter, J.P., et al. (2007). Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol Cell* 25, 331-343.
- [31] Singh, T.R., Saro, D., Ali, A.M., Zheng, X.F., Du, C.H., Killen, M.W., Sachpatzidis, A., Wahengbam, K., Pierce, A.J., Xiong, Y., et al. (2010). MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM. *Mol Cell* 37, 879-886.
- [32] Yan, Z., Delannoy, M., Ling, C., Daele, D., Osman, F., Muniandy, P.A., Shen, X., Oostra, A.B., Du, H., Steltenpool, J., et al. (2010). A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. *Mol Cell* 37, 865-878.
- [33] Kim, J.M., Kee, Y., Gurtan, A., and D'Andrea, A.D. (2008). Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. *Blood* 111, 5215-5222.
- [34] Collis, S.J., Ciccia, A., Deans, A.J., Horejsi, Z., Martin, J.S., Maslen, S.L., Skehel, J.M., Elledge, S.J., West, S.C., and Boulton, S.J. (2008). FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the fanconi anemia core complex. *Mol Cell* 32, 313-324.

-
- [35] Deans, A.J., and West, S.C. (2009). FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Mol Cell* 36, 943-953.
- [36] Schwab, R.A., Blackford, A.N., and Niedzwiedz, W. (2010). ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. *EMBO J* 29, 806-818.
- [37] Huang, M., Kim, J.M., Shiotani, B., Yang, K., Zou, L., and D'Andrea, A.D. (2010). The FANCM/FAAP24 complex is required for the DNA interstrand crosslink-induced checkpoint response. *Mol Cell* 39, 259-268.
- [38] Moldovan, G.L., and D'Andrea, A.D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 43, 223-249.
- [39] Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D., et al. (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* 129, 289-301.
- [40] Sobbeck, A., Stone, S., Landais, I., de Graaf, B., and Hoatlin, M.E. (2009). The Fanconi anemia protein FANCM is controlled by FANCD2 and the ATR/ATM pathways. *J Biol Chem* 284, 25560-25568.
- [41] Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., et al. (2008). FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1138-1146.
- [42] Knipscheer, P., Raschle, M., Smogorzewska, A., Enoiu, M., Ho, T.V., Scharer, O.D., Elledge, S.J., and Walter, J.C. (2009). The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* 326, 1698-1701.
- [43] Kratz, K., Schopf, B., Kaden, S., Sendoel, A., Eberhard, R., Lademann, C., Cannavo, E., Sartori, A.A., Hengartner, M.O., and Jiricny, J. (2010). Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand cross-linking agents. *Cell* 142, 77-88.
- [44] Liu, T., Ghosal, G., Yuan, J., Chen, J., and Huang, J. (2010). FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science* 329, 693-696.
- [45] MacKay, C., Declais, A.C., Lundin, C., Agostinho, A., Deans, A.J., MacArtney, T.J., Hofmann, K., Gartner, A., West, S.C., Helleday, T., et al. (2010). Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell* 142, 65-76.

- [46] Smogorzewska, A., Desetty, R., Saito, T.T., Schlabach, M., Lach, F.P., Sowa, M.E., Clark, A.B., Kunkel, T.A., Harper, J.W., Colaiacovo, M.P., et al. (2010). A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol Cell* 39, 36-47.
- [47] Cohn, M.A., Kowal, P., Yang, K., Haas, W., Huang, T.T., Gygi, S.P., and D'Andrea, A.D. (2007). A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell* 28, 786-797.
- [48] Lee, K.Y., Yang, K., Cohn, M.A., Sikdar, N., D'Andrea, A.D., and Myung, K. (2010). Human ELG1 regulates the level of ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA) through Its interactions with PCNA and USP1. *J Biol Chem* 285, 10362-10369.
- [49] Lo Ten Foe, J.R., Rooimans, M.A., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Wijker, M., Parker, L., Lightfoot, J., Carreau, M., Callen, D.F., Savoia, A., et al. (1996). Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet* 14, 320-323.
- [50] The Fanconi/Breast cancer consortium (1996). Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nat Genet* 14, 323-328.
- [51] Fei, P., Yin, J., and Wang, W. (2005). New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. *Cell Cycle* 4, 80-86.
- [52] Strathdee, C.A., Duncan, A.M., and Buchwald, M. (1992). Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet* 1, 196-198.
- [53] Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., et al. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297, 606-609.
- [54] Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7, 249-262.
- [55] de Winter, J.P., Leveille, F., van Berkel, C.G., Rooimans, M.A., van Der Weel, L., Steltenpool, J., Demuth, I., Morgan, N.V., Alon, N., Bosnoyan-Collins, L., et al. (2000). Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet* 67, 1306-1308.
- [56] de Winter, J.P., Rooimans, M.A., van Der Weel, L., van Berkel, C.G., Alon, N., Bosnoyan-Collins, L., de Groot, J., Zhi, Y., Waisfisz, Q., Pronk, J.C., et al. (2000).

- The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet* 24, 15-16.
- [57] de Winter, J.P., Waisfisz, Q., Rooimans, M.A., van Berkel, C.G., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Carreau, M., Bender, O., Demuth, I., Schindler, D., et al. (1998). The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet* 20, 281-283.
- [58] Sims, A.E., Spiteri, E., Sims, R.J., 3rd, Arita, A.G., Lach, F.P., Landers, T., Wurm, M., Freund, M., Neveling, K., Hanenberg, H., et al. (2007). FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* 14, 564-567.
- [59] Dorsman, J.C., Levitus, M., Rockx, D., Rooimans, M.A., Oostra, A.B., Haitjema, A., Bakker, S.T., Steltenpool, J., Schuler, D., Mohan, S., et al. (2007). Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol* 29, 211-218.
- [60] Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M.A., Pals, G., et al. (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet* 37, 934-935.
- [61] Levrán, O., Attwooll, C., Henry, R.T., Milton, K.L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S.D., Kalb, R., Velleuer, E., Barral, S., et al. (2005). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 37, 931-933.
- [62] Meetei, A.R., Sechi, S., Wallisch, M., Yang, D., Young, M.K., Joenje, H., Hoatlin, M.E., and Wang, W. (2003). A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol* 23, 3417-3426.
- [63] Meetei, A.R., Medhurst, A.L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T.R., Bier, P., Steltenpool, J., Stone, S., Dokal, I., Mathew, C.G., et al. (2005). A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* 37, 958-963.
- [64] Xia, B., Dorsman, J.C., Ameziane, N., de Vries, Y., Rooimans, M.A., Sheng, Q., Pals, G., Errami, A., Gluckman, E., Llera, J., et al. (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet* 39, 159-161.
- [65] Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., et al. (2007). Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 39, 162-164.

- [66] Stoepker, C., Hain, K., Schuster, B., Hilhorst-Hofstee, Y., Rooimans, M.A., Steltenpool, J., Oostra, A.B., Eirich, K., Korthof, E.T., Nieuwint, A.W., et al. (2011). SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nat Genet* 43, 138-141.
- [67] Crossan, G.P., van der Weyden, L., Rosado, I.V., Langevin, F., Gaillard, P.H., McIntyre, R.E., Gallagher, F., Kettunen, M.I., Lewis, D.Y., Brindle, K., et al. (2011). Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nat Genet* 43, 147-152.
- [68] Smith, A.R., and Wagner, J.E. (2009). Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood. *Br J Haematol* 147, 246-261.
- [69] MacMillan, M.L., and Wagner, J.E. (2010). Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia - when and how? *Br J Haematol* 149, 14-21.
- [70] MacMillan, M.L., Hughes, M.R., Agarwal, S., and Daley, G.Q. (2011). Cellular therapy for fanconi anemia: the past, present, and future. *Biol Blood Marrow Transplant* 17, S109-114.
- [71] Habi, O., Girard, J., Bourdages, V., Delisle, M.C., and Carreau, M. (2010). Correction of Fanconi Anemia Group C Hematopoietic Stem Cells Following Intrafemoral Gene Transfer. *Anemia* 2010.
- [72] Zhang, Q.S., Marquez-Loza, L., Eaton, L., Duncan, A.W., Goldman, D.C., Anur, P., Watanabe-Smith, K., Rathbun, R.K., Fleming, W.H., Bagby, G.C., et al. (2010). *Fancd2*^{-/-} mice have hematopoietic defects that can be partially corrected by resveratrol. *Blood* 116, 5140-5148.
- [73] Schindler, D., Endt, D., Neveling, K. (2011). Fanconi Anemia. In: Schwab M (ed) *Encyclopedia of Cancer*. Springer
- [74] Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J., and Roeder, R.G. (1979). Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18, 469-484.
- [75] Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* 7, 1291-1308.
- [76] Kornberg, R.D. (2001). The eukaryotic gene transcription machinery. *Biol Chem* 382, 1103-1107.
- [77] Woychik, N.A., and Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108, 453-463.
- [78] Koleske, A.J., and Young, R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466-469.

- [79] Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Kedinger, C., and Chambon, P. (1980). Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* 209, 1406-1414.
- [80] Burke, T.W., and Kadonaga, J.T. (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* 10, 711-724.
- [81] Kadonaga, J.T. (2002). The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* 34, 259-264.
- [82] Kutach, A.K., and Kadonaga, J.T. (2000). The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol* 20, 4754-4764.
- [83] Reiter, W.D., Hudepohl, U., and Zillig, W. (1990). Mutational analysis of an archaebacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9509-9513.
- [84] Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., and Ebright, R.H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* 12, 34-44.
- [85] Tsai, F.T., and Sigler, P.B. (2000). Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *EMBO J* 19, 25-36.
- [86] Suzuki, Y., Tsunoda, T., Sese, J., Taira, H., Mizushima-Sugano, J., Hata, H., Ota, T., Isogai, T., Tanaka, T., Nakamura, Y., et al. (2001). Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res* 11, 677-684.
- [87] Blake, M.C., Jambou, R.C., Swick, A.G., Kahn, J.W., and Azizkhan, J.C. (1990). Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol* 10, 6632-6641.
- [88] Farre, D., Bellora, N., Mularoni, L., Messeguer, X., and Alba, M.M. (2007). House-keeping genes tend to show reduced upstream sequence conservation. *Genome Biol* 8, R140.
- [89] Smale, S.T., Schmidt, M.C., Berk, A.J., and Baltimore, D. (1990). Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4509-4513.
- [90] Savoia, A., Centra, M., Ianzano, L., de Cillis, G.P., Zelante, L., and Buchwald, M. (1995). Characterization of the 5' region of the Fanconi anaemia group C (FACC) gene. *Hum Mol Genet* 4, 1321-1326.

- [91] Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H., and Marky, L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 3746-3750.
- [92] Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C.A., Taylor, M.S., Engström, P.G., Frith, M.C., et al. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet* 38, 626-634.
- [93] Huang, X., Pawliczak, R., Yao, X.L., Madara, P., Alsaaty, S., Shelhamer, J.H., and Cowan, M.J. (2003). Characterization of the human p11 promoter sequence. *Gene* 310, 133-142.
- [94] Nabokina, S.M., and Said, H.M. (2004). Characterization of the 5'-regulatory region of the human thiamin transporter SLC19A3: in vitro and in vivo studies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G822-829.
- [95] Smale, S.T., and Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-479.
- [96] Abbasi, A.A., Pappas, Z., Malik, S., Goode, D.K., Callaway, H., Elgar, G., and Grzeschik, K.H. (2007). Human GLI3 Intragenic Conserved Non-Coding Sequences Are Tissue-Specific Enhancers. *PLoS ONE* 2, 1-12.
- [97] Rauschendorf, M.A., Zimmer, J., Hanstein, R., Dickemann, C., and Vogt, P.H. (2010). Complex transcriptional control of the AZFa gene DDX3Y in human testis. *Int J Androl*.
- [98] Ling, C., Ishiai, M., Ali, A.M., Medhurst, A.L., Neveling, K., Kalb, R., Yan, Z., Xue, Y., Oostra, A.B., Auerbach, A.D., et al. (2007). FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J* 26, 2104-2114.
- [99] Tategu, M., Aruchi, T., Tanaka, R., Nakagawa, H., and Yoshida, K. (2007). Systems biology-based identification of crosstalk between E2F transcription factors and the fanconi anemia pathway. *Gene Regulat Syst Biol* 1, 1-8.
- [100] Hoskins, E.E., Gunawardena, R.W., Habash, K.B., Wise-Draper, T.M., Jansen, M., Knudsen, E.S., and Wells, S.I. (2008). Coordinate regulation of Fanconi anemia gene expression occurs through the Rb/E2F pathway. *Oncogene* 27, 4798-4808.
- [101] Frontini, M., Vijayakumar, M., Garvin, A., and Clarke, N. (2009). A ChIP-chip approach reveals a novel role for transcription factor IRF1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Res* 37, 1073-1085.

- [102] Pang, Q., Fagerlie, S., Christianson, T.A., Keeble, W., Faulkner, G., Diaz, J., Rathbun, R.K., and Bagby, G.C. (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, 4724-4735.
- [103] Fagerlie, S.R., Koretsky, T., Torok-Storb, B., and Bagby, G.C. (2004). Impaired type I IFN-induced Jak/STAT signaling in FA-C cells and abnormal CD4+ Th cell subsets in *Fancc*^{-/-} mice. *J Immunol* 173, 3863-3870.
- [104] Baranov, P. V., Venin, M., and Provan, G. (2009). Codon size reduction as the origin of the triplet genetic code. *PLoS ONE* 4, e5708.
- [105] Dover, G. A., and Flavell, R. B. (1984). Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function. *Cell* 38, 622-623.
- [106] Cheng, Y. H., and Handwerger, S. (2003). Identification of an enhancer of the human activating protein-2alpha gene that contains a critical Ets1 binding site. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3305-3311.
- [107] Cheng, Y. H., Richardson, B. D., Hubert, M. A., and Handwerger, S. (2004). Isolation and characterization of the human syncytin gene promoter. *Biol Reprod* 70, 694-701.
- [108] Bailey, T. L., and Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2, 28-36.
- [109] Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., and Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37, W202-208.
- [110] Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19, 2638-2644.
- [111] Moustakas, A. (2002). Smad signalling network. *J Cell Sci* 115, 3355-3356.
- [112] Moustakas, A., and Heldin, C. H. (2002). From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 16, 1867-1871.
- [113] Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A., and Heldin, C. H. (2002). Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 82, 85-91.
- [114] Ulloa, L., Doody, J., and Massague, J. (1999). Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397, 710-713.

-
- [115] Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999). Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479-482.
- [116] Zawel, L., Dai, J. L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Kern, S. E. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1, 611-617.
- [117] Yingling, J. M., Datto, M. B., Wong, C., Frederick, J. P., Liberati, N. T., and Wang, X. F. (1997). Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 17, 7019-7028.
- [118] Zhang, Y., Feng, X. H., and Derynck, R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 394, 909-913.
- [119] Lustig, J. P., Lugassy, G., Neder, A., and Sigler, E. (1995). Head and neck carcinoma in Fanconi's anaemia—report of a case and review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31B, 68-72.
- [120] Fagerlie, S. R., Diaz, J., Christianson, T. A., McCartan, K., Keeble, W., Faulkner, G. R., and Bagby, G. C. (2001). Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood* 97, 3017-3024.
- [121] Lee, K. H., Evans, S., Ruan, T. Y., and Lassar, A. B. (2004). SMAD-mediated modulation of YY1 activity regulates the BMP response and cardiac-specific expression of a GATA4/5/6-dependent chick Nkx2.5 enhancer. *Development* 131, 4709-4723.
- [122] Yao, M., Niu, G., Sheng, Z., Wang, Z., and Fei, J. (2010). Identification of a Smad4/YY1-recognized and BMP2-responsive transcriptional regulatory module in the promoter of mouse GABA transporter subtype I (*Gat1*) gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 4062-4071.
- [123] Rizkallah, R., Alexander, K. E., Kassardjian, A., Luscher, B., and Hurt, M. M. (2011). The transcription factor YY1 is a substrate for Polo-like kinase 1 at the G2/M transition of the cell cycle. *PLoS one* 6, e15928.
- [124] Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N. B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nature cell biology* 5, 401-409.
- [125] Townsend, P. A., Cragg, M. S., Davidson, S. M., McCormick, J., Barry, S., Lawrence, K. M., Knight, R. A., Hubank, M., Chen, P. L., Latchman, D. S., and Stephanou, A. (2005). STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. *J Cell Sci* 118, 1629-1639.
- [126] Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S.,

- Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, 627-630.
- [127] Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.
- [128] Rushworth, S. A., and MacEwan, D. J. (2008). HO-1 underlies resistance of AML cells to TNF-induced apoptosis. *Blood* 111, 3793-3801.
- [129] Justesen, J., Hartmann, R., and Kjeldgaard, N. O. (2000). Gene structure and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57, 1593-1612.
- [130] Chakrabarti, A., Jha, B. K., and Silverman, R. H. (2011). New insights into the role of RNase L in innate immunity. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 31, 49-57.
- [131] Hu, Y., Park-Min, K. H., Yarilina, A., and Ivashkiv, L. B. (2008). Regulation of STAT pathways and IRF1 during human dendritic cell maturation by TNF-alpha and PGE2. *Journal of leukocyte biology* 84, 1353-1360.
- [132] Pamment, J., Ramsay, E., Kelleher, M., Dornan, D., and Ball, K.L. (2002). Regulation of the IRF-1 tumour modifier during the response to genotoxic stress involves an ATM-dependent signalling pathway. *Oncogene* 21, 7776-7785.
- [133] Lai, E. C., Burks, C., and Posakony, J. W. (1998). The K box, a conserved 3' UTR sequence motif, negatively regulates accumulation of enhancer of split complex transcripts. *Development* 125, 4077-4088.
- [134] Lai, E. C., Tam, B., and Rubin, G. M. (2005). Pervasive regulation of Drosophila Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev* 19, 1067-1080.
- [135] Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30, 363-364.
- [136] Lai, E. C., Bodner, R., Kavaler, J., Freschi, G., and Posakony, J. W. (2000). Antagonism of notch signaling activity by members of a novel protein family encoded by the bearded and enhancer of split gene complexes. *Development* 127, 291-306.
- Baranov, P. V., Venin, M., and Provan, G. (2009). Codon size reduction as the origin of the triplet genetic code. *PLoS ONE* 4, e5708.
- [137] Fraser, H. B., Hirsh, A. E., Wall, D. P., and Eisen, M. B. (2004). Coevolution of gene expression among interacting proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9033-9038.

- [138] Wang, A. M., Kanzaki, T., and Desnick, R. J. (1994). The molecular lesion in the alpha-N-acetylgalactosaminidase gene that causes angiokeratoma corporis diffusum with glycopeptiduria. *J Clin Invest* 94, 839-845.
- [139] de Winter, J. P., van der Weel, L., de Groot, J., Stone, S., Waisfisz, Q., Arwert, F., Scheper, R. J., Kruyt, F. A., Hoatlin, M. E., and Joenje, H. (2000). The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. *Hum Mol Genet* 9, 2665-2674.

Anhang I

Abkürzungen

Allgemein

| | |
|------------|---|
| α - | Anti- (Antikörperspezifität) |
| ATM | Ataxia telangiectasia mutated |
| ATR | ATM and Rad3 related |
| B2M | Beta-2-microglobulin |
| bp, kb | Basenpaare, Kilobasenpaare |
| BRCA1/2 | Breast cancer 1/2, early onset |
| BRCT | Breast cancer carboxy terminal |
| BSA | Bovine serum albumine |
| C | Cytidin |
| CDK5RAP2 | Cyclin-dependent kinase 5 regulatory associated protein 2 |
| CDS | Coding sequence |
| CDK5RAP2 | Cyclin-dependent kinase 5 regulatory associated protein 2 |
| CENPJ | Centromeric protein J |
| CHK1/2 | Checkpoint kinase 1/2 |
| CtIP | CTBP-interacting protein |
| DAPI | 4,6-diamino-2-phenylindol |
| DNA-PK | DNA-dependent protein kinase |
| DP1 | Differentiation regulated transcription factor protein |
| DSB | Doppelstrangbruch |
| dsDNA | Doppelsträngige DNA |
| DSE | Downstream sequence element |
| E2F | E2 factor |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycoltetraacetat |

| | |
|------------|---|
| FANCA-M | Fancoi anemia, complemetatin group A-M |
| FCS | Fetal calf serum |
| for-, rev- | Forward, reverse (Primer) |
| G | Guanosin |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| gDNA | Genomische DNA |
| GLI3 | GLI family zic finger 3 |
| H3P | Histon H3, Phospho-Serin 10 |
| HKG | Housekeeping genes |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| HPRT I | Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase I |
| IRF1/6 | Interferon reulatory factor |
| LCL | Lymphoblastoid cell line |
| M | Methionin |
| MDC1 | Mediator of DNA-damage checkpoint 1 |
| miRNA | MicroRNA |
| MMC | Mitomycin C |
| MPF | M-phase promoting factor |
| mRNA | Messenger RNA |
| MSTN | Myostatin |
| N | Nukleotid |
| NBS1 | Nijmegen breakage syndrome 1 |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NODAL | Nodal homolog |
| OAS2 | 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2 |
| ORF | Open reading frame |
| PAP | PolyA-Polymerase |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR, q- | Polymerase chain reaction, quantitative |
| PLCs | Prophase-like cells |
| PLK1 | Polo-like kinase 1 |
| Pol II | RNA-Polymerase II |
| PolyA- | Polyadenylierungs- |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| R | Purin |
| RACE | Rapid amplification of cDNA ends |
| Rb | Retinoblastoma tumor suppressor protein |

| | |
|--------|--|
| RLU | Relative light units |
| RT | Raumtemperatur |
| OAS2 | 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2 |
| S | Serin |
| SD | Standard deviation |
| siRNA | Small interfering RNA |
| SMAD | SMAD family member |
| snRNPs | Small nuclear ribonucleoprotein particles |
| STAT | Signal transducer and activator of transcription |
| SV40 | Simian virus 40 |
| T-Ag | T-Antigen |
| TLR7 | Toll-like receptor 7 |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TSS | Transkriptionsstartstelle |
| U | Uridin |
| UBC | Ubiquitin C |
| UsnRNA | Uridine-rich small nuclear RNA |
| UTR | Untranslated region |
| Y | Pyrimidin |
| Y | Tyrosin |
| YY1 | YY1 transcription factor |

Primersequenzen

Klonierung

| Bezeichnung | | Forward 5' > 3' | Reverse 5' > 3' |
|-------------|-----|-------------------------------|--------------------------------|
| FANCA | L1 | GTTCCAAGGCCACTGCCAG | GGCCTTGGCGCCTACAG |
| | L2 | AACACCGCCCTGCGCG | GGCCTTGGCGCCTACAG |
| | L3 | GCGGACTACACCGCGGC | GGCCTTGGCGCCTACAG |
| FANCB | L1 | CCAGCAGTGGAACCGTGG | TGCTCCAAACCTCCCCG |
| | L2 | CCGAGTATCTCATCACCCGG | TGCTCCAAACCTCCCCG |
| | L3 | TCGCCCCGCGACATCC | TGCTCCAAACCTCCCCG |
| FANCC | L1 | TTTAGTAGAGACGGGTTTTTGCCAT | GCATTCTGGGGCCTGGCTAG |
| | L2 | GGTAGGGGAAATCATTAAGTGAAGATG | GCATTCTGGGGCCTGGCTAG |
| | L3 | GCTTCCGCGCGAAACCG | GCATTCTGGGGCCTGGCTAG |
| FANCE | L1 | AGACTTCTATCTGGCTTGCCAAC | GTTGGGAGACCGGAGAAACC |
| | L2 | ATGCCGTCAGCGTAAATACAGC | GTTGGGAGACCGGAGAAACC |
| | L3 | AACTAACCCTTGTTTTGTCCACGC | GTTGGGAGACCGGAGAAACC |
| FANCF | L1 | AGCATGCACATCACTGCTTTACTTT | CGAAGGCCCTACTTCCGCTT |
| | L2 | AAGAGCGTTTCCTCACGTACAG | CGAAGGCCCTACTTCCGCTT |
| | L3 | AGGATGCCCTACATCTGCTCTCC | CGAAGGCCCTACTTCCGCTT |
| FANCG | L1 | GAGATGGAGTCTCGCTGTTGC | CACCCCCAGGTCCTCCTG |
| | L2 | CCGGGTTCAAGCGATTCTTC | CACCCCCAGGTCCTCCTG |
| | L3 | GAGCGTGTGGTGCTCGAC | CACCCCCAGGTCCTCCTG |
| FANCL | L1 | ATCAGCGGTGAAAACCTTGATTTTCT | CTAGACCTGCTGGGTCTCTGC |
| | L2 | AAAATAATACATTATTCTGTATGTTAAGG | CTAGACCTGCTGGGTCTCTGC |
| | L3 | TCTTGGTGTCAGTCAGTCTGTGG | CTAGACCTGCTGGGTCTCTGC |
| FANCM | L1 | TTTCCCTTTTAAAGATCACACAACC | ATCCGTAGCAGCAGCAGCT |
| | L2 | TCTGATTTAAAAGTACAAGGAATGAGG | ATCCGTAGCAGCAGCAGCT |
| | L3 | ACCGGAACCGCACCG | ATCCGTAGCAGCAGCAGCT |
| FANCA | r-c | GTTCCAAGGCCACTGCCAGAG | CGCGCAGGGCGGTGTT |
| FANCB | r-c | CCAGCAGTGGAACCGTGG | CCGGGTGATGAGATACTCGG |
| FANCC | r-c | TTTAGTAGAGACGGGTTTTTGCCAT | ATCTTCAGTTAATGATTTCCCCTACC |
| FANCE | r-c | AGACTTCTATCTGGCTTGCCAAC | GCTGTATTTACGCTGACGGCAT |
| FANCF | r-c | AGCATGCACATCACTGCTTTACTTT | CTGTGACGTGAGGAAACGCTCTT |
| FANCG | r-c | GAGATGGAGTCTCGCTGTTGCG | GAAGAATCGCTTGAACCCGGG |
| FANCL | r-c | ATCAGCGGTGAAAACCTTGATTTTCT | CCCTAACATAACAGAATAATGTATTATTTT |
| FANCM | r-c | TTTCCCTTTTAAAGATCACACAACC | GCCTCATTCTTGTACTTTTAAATCAGA |

Sequenzierung

| Bezeichnung | Sequenz 5' > 3' | Spezifität |
|-------------|-------------------------|--|
| RVprimer3 | CTAGCAAAATAGGCTGTCCC | <i>upstream</i> der <i>multiple cloning site</i> |
| GLprimer2 | CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA | luc+ kodierende Region |

EMSA

| Bezeichnung | Sequenz 5' > 3' |
|--------------|------------------------------|
| FANCA / STAT | CCCCAGTCATTCCCGGCAGGAACCA |
| FANCB / STAT | TTCTTAATACCTGGAACAGAGTACCC' |
| FANCB / SMAD | CGATTCTCGTCTGGCCTCGCCCC' |
| FANCC / STAT | AACTTTTCTTCAAAAGAACTAATTC |
| FANCE / STAT | GAGGAAGTTCAGAAGAAAGTCTTTGGC' |
| FANCF / STAT | CACGTGGTTCCGGAAATTCTCGGT |
| FANCG / STAT | AGTTACCGCTTTCTGGAAACACCAT' |
| FANCL / STAT | TCCAGGATCTTCCCGCCAAGGCTGG |
| FANCM / STAT | TGAAGGTTTCCGGGAAGCCAGCCAATC |
| FANCM / SMAD | GCTGGACCAGACCACGTT |

qPCR

| Bezeichnung | Sequenz 5' > 3' | Spezifität |
|-------------|------------------------------|------------|
| SMAD1 f | GCATCAATCCCTACCACTATAAGA | SMAD1 |
| SMAD1 r | GGCTCATTTTTGTCTAAGTTACG | |
| SMAD4 f | TAACAGCTATATAACTACAAATGGAGC | SMAD4 |
| SMAD4 r | GCATAGATCACATGAGGAAATC | |
| STAT1 f | GAATGAGAGAAAATACAGTAAAAGGATT | STAT1 |
| STAT1 r | GAAATTCAGCCGCCAGACT | |
| STAT4 f | GAATGTTTTCAACTCTAAGCAACC | STAT4 |
| STAT4 r | TCATTTCCCTTTACCTCCAG | |
| IRF1 f | GTGTCTGGCTTTTTCTCTGA | IRF1 |
| IRF1 r | GGGATTGGTGTTATGCTTTTTCTG | |
| FANCA f | TCCGCTGCTTGAAGGTTTG | FANCA |
| FANCA r | CCTGGACTCACTGGACTCTC | |
| FANCB f | GAATATCTCTCATTGCCCTTACTC | FANCB |
| FANCB r | CCTCCACCTGAATCCATAAGTT | |

| | | |
|---------|--------------------------|-------|
| FANCC f | AGAAGCAGTTGAAGACCAGAC | FANCC |
| FANCC r | ATCCTCCGAAGTGAATGAACAG | |
| FANCE f | ATGCTAAAGGTCTGGCTGAG | FANCE |
| FANCE r | CATCCTCCAATCCCTCTAACC | |
| FANCF f | ATGCCTTCGTGTGTCCAAA | FANCF |
| FANCF r | CTTCCAATCACTTCCTCTATCCA | |
| FANCG f | GAGAGTCTGGAGCTGCTAGTT | FANCG |
| FANCG | ACCTGCTTGCTAGTATGTGC | |
| FANCL f | GAAGTTGCCTTAAAGAATAGACAA | FANCL |
| FANCL r | CCTTCAACTTGAGAGTGATTA | |
| FANCM f | ACGTACACGTAGTACTTCAGCA | FANCM |
| FANCM r | GTTTCTTTTCAGTAGTGTTCAG | |

Klonierungsstrategien und Vektorkarten

pGL3 (Promotor-Analyse)

Die mittels PCR amplifizierte Sequenzen mit den mutmaßlichen Promotor-Aktivitäten wurden über die Schnittstellen *Kpn*I und *Hind*III in den pGL3-Basic-Vektor (Abb. 5.4a) einkloniert. Der pGL3-SV40-Vektor mit einkloniertem SV40-Promotor diente als positive Kontrolle. Für die Überprüfung einer möglichen Repressorfunktion wurden die entsprechenden Fragmente mit den gleichen Schnittstellen wie oben in den pGL3-SV40 Vektor kloniert. Als *renilla* Plasmid wurde in dem Fall der pRL-SV40 Vektor verwendet. Der Vektor pGBKT7 diente als „carrier-Vektor“ und sollte die Transfektionseffizienz erhöhen.

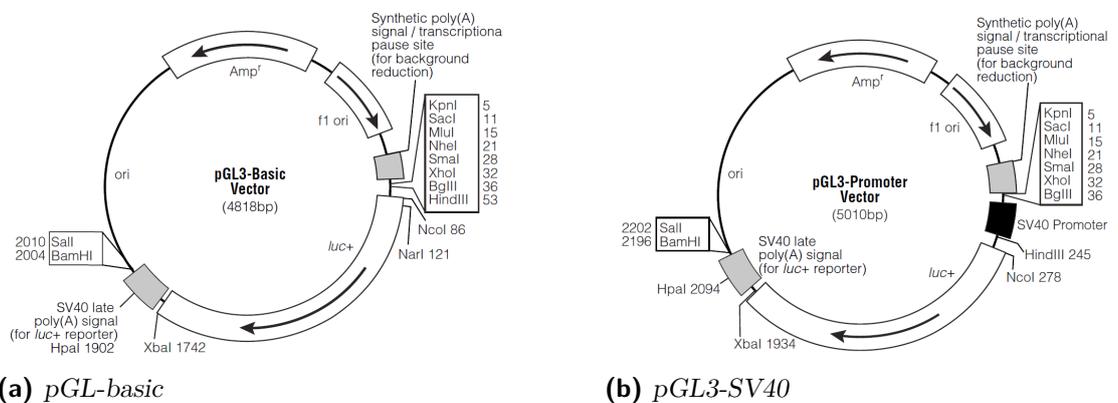


Abbildung 5.4 Klonierungsvektoren für firefly Luziferase

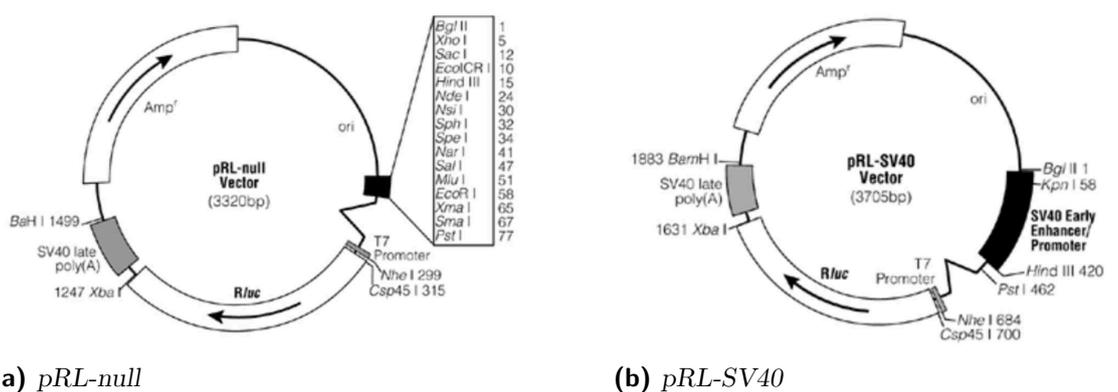


Abbildung 5.5 *renilla* Vektoren

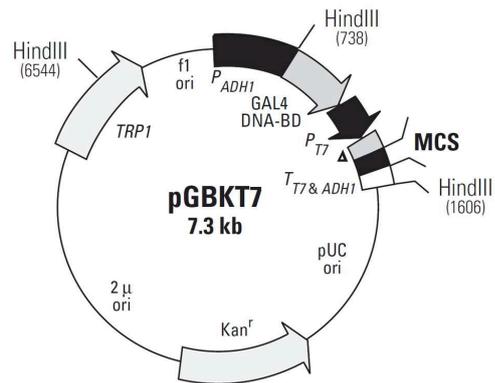


Abbildung 5.6 pGBKT7 „carrier“ Vektor

Anhang II

Eigene Publikationen

Artikel

- Palagyi A, Neveling K, Plinninger U, Ziesch A, Targosz BS, Denk GU, Ochs S, Rizzani A, **Meier D**, Thasler WE, Hanenberg H, De Toni EN, Bassermann F, Schäfer C, Göke B, Schindler D, Gallmeier E. (2010) Genetic inactivation of the Fanconi anemia gene FANCC identified in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 confers sensitivity towards DNA-interstrand crosslinking agents. *Mol Cancer*. May 28;9:127
- **Meier D**, Schindler D (2011) Fanconi Anemia Core Complex Gene Promoters Harbor Conserved Transcription Regulatory Elements. *PLoS ONE* (im Druck)

Tagungsbeiträge

- **Meier D**, Schindler D: Promoter studies in the FA genes. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2008, Hannover, Deutschland.
- **Meier D**, Neveling K, Schindler D: Promoter studies in the FA genes and their characteristics. The European Human Genetics Conference, 2008, Barcelona, Spain.
- **Meier D**, Neveling K, Hoehn H, Schindler D: Different causes for Fanconi anemia patients to reach childhood. The Fanconi anemia Research Fund Scientific Symposium, 2008, Eugene, USA
- Neveling K, **Meier D**, Kalb R, Hanenberg H, Castella M, Casado J.A, Léveillé F, de Winter J.P, Batish S.D, Lach F.P, Hoehn H, Bueren J, Surralles J, Auerbach A.D, Schindler D: Insights into FANCE functions through naturally occurring and site directed mutations. The Fanconi anemia Research Fund Scientific Symposium, 2008, Eugene, USA

-
- **Meier D**, Schindler D: Promoter studies of the Fanconi anemia core complex genes. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2009, Aachen, Deutschland.
 - Gavvovidis I, Trimborn M, Kaiser FJ, Schoenefeldt C, **Meier D**, Neitzel H, Schindler D: Analysis of the promoter and nuclear localization signals in MCPH1. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2009, Aachen, Deutschland.
 - Gavvovidis I, Trimborn M, Kaiser FJ, **Meier D**, Neitzel H, Schindler D: Analysis of promoter regions and nuclear localization signals in MCPH1. EMBO (European Molecular Biology Organization) Meeting, 2009, Amsterdam, Netherlands.
 - **Meier D**, Schindler D: Regulatory elements in the FA core complex promoters. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2010, Hamburg, Deutschland.
 - **Meier D**, Schindler D : 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2011, Regensburg, Deutschland.
 - **Meier D**, Schindler D: Comparative analyses of the Fanconi anemia core complex genes reveal conserved transcription regulatory elements. The European Human Genetics Conference. 2011, Amsterdam, Netherlands

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Daniel Meier

Geburtsdatum 08.02.1981

Geburtsort Koblenz

Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulbildung

1987-1991 Kunostein Grundschule, Neuwied-Engers

1991-2000 Wilhelm-Remy Gymnasium, Bendorf (Abitur)

Studium

2001-2006 Biologie-Studium, Philipps-Universität Marburg.
Marburg, Deutschland

2006 Studienabschluss: Diplom-Biologe Univ.

seit 2007 Promotion. Inst. für Humangenetik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
Würzburg, Deutschland

Berufliche Tätigkeiten

2000 Zivildienst

1999-2006 Studentische Hilfskraft. Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz. MIB
Biotech, Marburg sowie Institut für Humangenetik,
Philipps-Universität Marburg.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Detlev SCHINDLER angefertigt. Dem Leiter der Arbeitsgruppe und meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Detlev SCHINDLER gilt daher ein besonderer Dank für die interessante Themenstellung sowie die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in seinem Labor durchzuführen.

Mein Dank gilt dabei auch Herrn Prof. Dr. Holger HÖHN für sein Interesse am Verlauf dieser Arbeit, für seine moralische Unterstützung und für seine aufheiternden Kommentare.

Ein großer Dank geht aber auch an meine Kollegen Richard FRIEDL, Benni GOTTWALD, Ioannis, GAVVOIDIS, Beatrice SCHUSTER, Daniela ENDT, Dr. Tilman HEINRICH und alle, die hier namentlich nicht erwähnt wurden. Sie haben mich nicht nur tatkräftig unterstützt, sondern mich auch stets aufgebaut und für die erforderliche Abwechslung gesorgt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang G. BALLHAUSEN (Halle) danke ich besonders für die intensive Zusammenarbeit und die zahlreichen Diskussionen mit Ideen und Anregungen, welche entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik.

Herrn Prof. Dr. Thomas DANDEKAR danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen meinen Freunden, von denen jeder auf seine eigene Art direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, möchte ich ganz herzlich danken.

Meiner Familie möchte ich danken, dass sie mich zu dem gemacht haben, was ich bin.