

Interaktionen zwischen Fanconi- und RAD51-Proteinen im Hefe-Hybrid-System

Alexandra Soback, Matthias Wagner

Zusammenfassung

Zellen von Fanconi Anämie-Patienten zeichnen sich durch eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-Interstrand-Quervernetzungen („interstrand crosslinks“, ICLs) aus, deren Reparatur über die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSBs) verläuft. Die Behebung solcher DNA-DSBs erfolgt durch homologe Rekombinations-Reparatur (HR-Reparatur), in die als zentraler Bestandteil das RAD51(A)-Protein involviert ist. Fünf weitere Proteine (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3) werden aufgrund schwacher Homologien zu RAD51A der humanen RAD51-Familie zugeordnet (RAD51-Paralogue). Die RAD51-Familienmitglieder werden mit HR-Reparaturmechanismen in Verbindung gebracht und bilden gemeinsam mit RAD51A einen nukleären Komplex. Knockout-Zelllinien von Hühnern, bei denen eines der RAD51-Paralogue defekt ist, weisen – ähnlich FA-Zellen – hohe chromosomale Bruchraten und eine hohe Sensitivität gegenüber ICLs auf. Das Gleiche gilt für murine Zellen, in denen das BRCA2-Gen mutiert ist, welches mit RAD51 interagiert. Mit Hilfe des „Interaction Trap“ konnten im „Hefe-2-Hybrid-System“ (Y2H) Interaktionen zwischen drei FA-Proteinen und verschiedenen RAD51-Paralogen nachgewiesen werden. Zur Überprüfung und weiteren Charakterisierung der Y2H-Ergebnisse wurden anschließend Koimmunpräzipitationen und Immunfluoreszenzfärbungen an humanen HEK293-Zellen durchführt.

Schlüsselwörter

Fanconi Anämie, RAD51-Familie, Hefe-2-Hybrid-System, homologe Rekombinationsreparatur

Summary

Cells of Fanconi anemia (FA) patients are hypersensitive towards DNA interstrand crosslinks (ICLs). Removal of ICLs includes the generation of DNA double strand breaks (DNA-DSBs) as an early intermediate. Repair of the DNA-DSB is then carried out by the homologous recombinational (HR) repair pathway, an essential component of which is the RAD51(A) protein. Due to weak homologies with RAD51A, a number of other proteins have been assigned to the so called RAD51 family, including RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 and XRCC3. These six proteins presumably act together in at least two different complexes and have all been implicated in HR pathways. Chicken knockout cell lines with defects in one of the five RAD51 paralogs show spontaneous chromosomal breakage rates and high sensitivity towards DNA crosslinking agents, similar to FA cells. This also holds for murine cells with biallelic inactivation of the BRCA2-gene, a known interactor of RAD51. In order to investigate a possible link between the FA pathway and the RAD51 family proteins, three FA proteins, FANCA, FANCC and FANCG were tested for interactions with the RAD51 paralogs using the yeast two-hybrid system. Several interactions were observed in the interaction trap assay between the three FA-proteins and different members of the RAD51 family. For further examination of the Y2H results, in vivo studies on human HEK293 cells were carried out using coimmunoprecipitation and colocalization methods.

Keywords

Fanconi anemia, RAD51, RAD51 paralogs, yeast two hybrid system, homologous recombination repair

1. Einleitung

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

Eine Reihe von Proteinen weist schwache Homologien (~30%) zu RAD51 auf und wird daher der sogenannten RAD51-Familie zugeordnet. Bisher konnten in menschlichen Zellen fünf RAD51-ähnliche Proteine, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 identifiziert werden. Verschiedene Studien in *S.cerevisiae* und Hamster-Zelllinien konnten zeigen, dass die Proteine der RAD51-Familie direkt miteinander interagieren und vermutlich als Komplex in homologe Rekombinationsmechanismen während der Meiose und der Reparatur von DNA-DSBs involviert sind (Abb. 3) (DOSANJH et al. 1998, SCHILD et al. 2000, BRAYBROOKE et al. 2000, MASSON et al. 2001). Ähnlich FA-Zellen zeigen Knockout-Hamsterzellen aller RAD51-Homologe hohe chromosomale Bruchraten und sind extrem sensitiv gegenüber ICL-induzierenden Agenzien wie MMC oder DEB, während die IR-Sensitivität nur mäßig

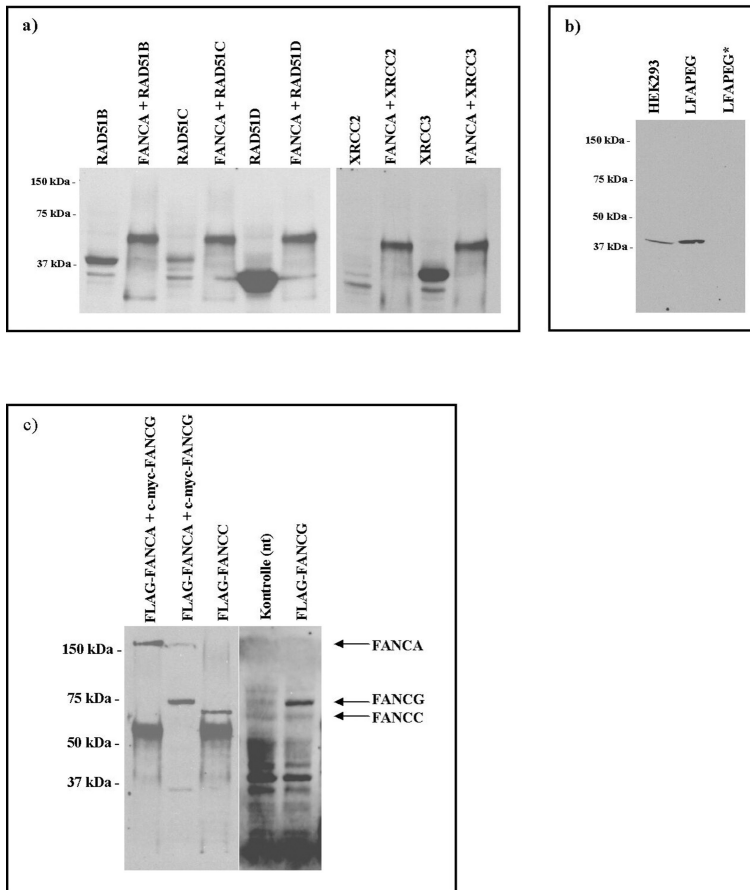


Abb 1 Nachweis der Proteine der RAD51-Familie und der FA-Proteine nach Überexpression in HEK293-Zellen durch Western Blotting

- a) Nachweis der RAD51-Fusionsproteine c-myc-RAD51B, -C, -D, -XRCC2 und -XRCC3. Gleichzeitig wurde hier eine Ko-IP zwischen parallel überexprimiertem FLAG-FANCA und den c-myc-Fusionsproteinen RAD51B, C, D, XRCC2 und XRCC3 durchgeführt (Spuren 2, 4, 6, 8 und 10, respektive). Die c-myc-Fusionsproteine RAD51B und D, sowie XRCC3 waren deutlich nachweisbar (Spuren 1, 5 und 9), während die Fusionsproteine RAD51C (Spur 3) und XRCC2 (Spur 7) nicht detektiert werden konnten. Primäre Aks: anti-c-myc (RAD51-Paraloge) und anti-FLAG (FANCA).
- b) Endogener Nachweis von RAD51A aus HEK293-Zellen (Spur 1) und aus primären Fibroblasten mit konstitutiver FANCA-Überexpression (LFAPEG, Spuren 2 und 3). Spur 2 (LFAPEG): Lysat aus einer nicht-konfluenten Zellpopulation. Spur 3 (LFAPEG*): Lysat aus einer konfluenten Zellpopulation; RAD51A wird in ruhenden Fibroblasten nicht exprimiert.
- c) Nachweis der transient überexprimierten FA-Fusionsproteine FLAG-FANCA, -FANCC und -FANCG aus HEK293-Zellen. Spur 1: Nachweis von FLAG-FANCA aus aufgereinigtem Protein-Lysat. Spur 2: Nachweis von c-myc-FANCG aus Gesamt-Protein-Lysat. Spur 3: Nachweis von FLAG-FANCC aus aufgereinigtem Protein-Lysat. Spur 4: nichttransfizierte Kontrolle. Spur 5: Nachweis von FLAG-FANCG aus Gesamt-Protein-Lysat. Primäre Axs: anti-FLAG (Maus) und anti c-myc (Kaninchen).

ausgeprägt ist. Ferner ist die Focibildung des RAD51-Proteins nach DNA-Schädigung in Knockout-Zellen stark oder völlig reduziert (TAKATA et al. 2001).

Die Gemeinsamkeit des zellulären Phänotyps wirft die Frage auf, ob der Reparaturweg der FA-Proteine möglicherweise in funktionellem Zusammenhang mit dem der homologen Rekombinations-Reparatur steht. Um potentielle Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und den RAD51-Homologen zu untersuchen, wurde daher zunächst ein „Interaction Trap“ mit den FA-Proteinen FANCA, FANCC und FANCG sowie den Angehörigen der RAD51-Familie, RAD51(A), RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 mit Hilfe des „Yeast Two Hybrid“-Systems (Y2H) durchgeführt. Dabei konnten mehrere Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und verschiedenen RAD51-Orthologen beobachtet werden. Anschließend wurden die jeweiligen Interaktionspartner in humanen HEK293-Zellen überexprimiert, um die im Y2H-System identifizierten Wechselwirkungen durch Koimmunpräzipitationen und/oder Immunfluoreszenzstudien zu bestätigen.

2. Material und Methoden

2.1 Interaction Trap und Hefe-2-Hybrid-System

Zur Durchführung des Interaction Trap wurden die Plasmide des „MATCH-MAKER LexA Two-Hybrid System“ (CLONTECH) verwendet. Zur Expression der LexA- bzw. der B42-Fusionskonstrukte (Köder- bzw. Beuteproteine) wurden cDNAs der RAD51-Genfamilie durch RT-PCR aus Gesamt-RNA gewonnen und in die Vektoren pEG 202 und pJG4-5 kloniert. Die FANCA-, FANCC- und FANCG-Fusionskonstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Tanja Reuter zur Verfügung gestellt.

Hefezellen des Stammes EGY48 wurden paarweise mit verschiedenen Kombinationen aus LexA- und B42-Fusionskonstrukten transformiert. Der Interaction Trap erfolgte unter Verwendung zweier verschiedener Reportersysteme:

1. Wachstum der Hefezellen auf Galaktose-Medium durch Aktivierung des chromosomalen LEU2-Reportergens
2. Blaufärbung der Hefezellen auf Galaktose-Medium durch Aktivierung des episomalen lacZ-Reportergens

Schwache oder fehlende Aktivierung des Reporters auf glukosehaltigen Platten diente dabei als Kontrolle, da die Expression des B42-Fusionsproteins durch Glukose reprimiert wird. Die Expression und Funktionalität der RAD51-Fusionsproteine wurde vor dem eigentlichen Interaction Trap durch verschiedene Kombinationen von Köder- und Beuteproteinen aus der RAD51-Familie in Anlehnung an das vorgeschlagene Modell von SCHILD et al. (2000) im lacZ-Reportersystem getestet und bestätigt.

2.2 Transfektion von HEK293-Zellen

Die cDNAs der FA-Proteine FANCA, C, G und der RAD51-Familie wurden in die Vektoren pCMV2 und pCMV3 der Firma Stratagene kloniert, was eine Expression der jeweiligen cDNA in Fusion mit N-terminalem FLAG- oder c-myc-Tag ermöglicht. Zur Transfektion wurden HEK293-Zellen (HEK, human embryonic kidney cells) verwendet.

Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Lipofektion mit FUGENE (Boehringer) gemäß Herstellerprotokoll.

Tab 1 a) Ergebnisse des „Interaction Trap“ bei Selektion auf Aktivierung des lacZ-Reporters

| bait | prey | activation | bait | prey | activation |
|-------|--------|------------|--------|-------|------------|
| FANCA | RAD51A | +++ | RAD51A | FANCA | +++ |
| FANCA | RAD51B | ++ | RAD51B | FANCA | + |
| FANCA | RAD51C | - | RAD51C | FANCA | + |
| FANCA | RAD51D | +++ | RAD51D | FANCA | ++ |
| FANCA | XRCC2 | - | XRCC2 | FANCA | -/- |
| FANCA | XRCC3 | - | XRCC3 | FANCA | +/- |
| FANCC | RAD51A | +++ | RAD51A | FANCC | - |
| FANCC | RAD51B | - | RAD51B | FANCC | - |
| FANCC | RAD51C | - | RAD51C | FANCC | - |
| FANCC | RAD51D | - | RAD51D | FANCC | + |
| FANCC | XRCC2 | - | XRCC2 | FANCC | - |
| FANCC | XRCC3 | - | XRCC3 | FANCC | - |
| | | | RAD51A | FANCG | + |
| | | | RAD51B | FANCG | +++ |
| | | | RAD51C | FANCG | +++ |
| | | | RAD51D | FANCG | ++ |
| | | | XRCC2 | FANCG | +/- |
| | | | XRCC3 | FANCG | +++ |

Tab 1 b) Ergebnisse des „Interaction Trap“ bei Selektion auf Aktivierung des LEU2-Reporters

| bait | prey | activation | bait | prey | activation |
|-------|--------|------------|--------|-------|------------|
| FANCA | RAD51A | + | RAD51A | FANCA | - |
| FANCA | RAD51B | ++ | RAD51B | FANCA | - |
| FANCA | RAD51C | - | RAD51C | FANCA | - |
| FANCA | RAD51D | + | RAD51D | FANCA | ND |
| FANCA | XRCC2 | ++ | XRCC2 | FANCA | - |
| FANCA | XRCC3 | ++ | XRCC3 | FANCA | - |
| FANCC | RAD51A | - | RAD51A | FANCC | - |
| FANCC | RAD51B | - | RAD51B | FANCC | - |
| FANCC | RAD51C | - | RAD51C | FANCC | - |
| FANCC | RAD51D | - | RAD51D | FANCC | ND |
| FANCC | XRCC2 | - | XRCC2 | FANCC | - |
| FANCC | XRCC3 | - | XRCC3 | FANCC | - |
| | | | RAD51A | FANCG | - |
| | | | RAD51B | FANCG | + |
| | | | RAD51C | FANCG | + |
| | | | RAD51D | FANCG | ND |
| | | | XRCC2 | FANCG | - |
| | | | XRCC3 | FANCG | - |

bait = Köderprotein (LexA-Fusion);
 prey = Beuteprotein (B42-Fusion);
 activation = Grad der Aktivierung des jeweiligen Reportersystems;
 ND = nicht durchführbar.

2.3 Immunpräzipitation (IP)

Zur Immunpräzipitation wurden HEK 293-Zellen in 6-well-Platten mit je einem pCMV2- und pCMV3-Konstrukt kotransfiziert. Die Präparation der Zellen erfolgte nach 24–72h. Die Zellen einer Schale wurden mit 250 ml eiskaltem Lysepuffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % Deoxycholat, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 1/25 Protease-Inhibitor-Cocktail) lysiert. Zur Vorinkubation wurden je 100 µl Lysat, 400 µl Lysis-Puffer und 5 µl Serum zugegeben und 90 min bei 4 °C leicht geschwenkt. Nach Zugabe von 30 µl Protein A/G plus Agarose wurde 30 min bei 4 °C rotiert und anschließend 3 min bei 800g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,3 – 1,0 µg Antikörperlösung bzw 5 µl Antiserum für mindestens 3 h oder über Nacht bei 4 °C unter langsamen Rotieren inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Protein A/G plus Agarose und 30 min leichtem Rotieren erfolgte die Sedimentation der Agarose. Der Überstand wurde verworfen und die Protein-Agarose dreimal in je 500 µl eiskaltem Lysis-Puffer gewaschen. Die Proteine wurden durch Denaturierung bei 96 °C von der Agarose gelöst und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.4 Immunfluoreszenzfärbung (IF)

HEK293-Zellen wurden in 12-well-Platten auf Deckelgläser (Ø 1 cm) gesät und mit einem pCMV2- und/oder pCMV3-Plasmid transfiziert. Zur IF wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd, 0,1 Triton X-100 fixiert und permeabilisiert (10 min). Unspezifische Bindestellen wurden über Nacht bei 4 °C in Serum

geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Maus anti-FLAG, Sigma; Kaninchen anti-c-myc, Santa Cruz; Kaninchen anti-RAD51A, Novus Biologicals) erfolgte für 1 h, RT, mit dem sekundären Antikörper (Ziege anti-Kaninchen AlexaFluor488 bzw. Ziege anti-Maus/Ziege anti-Kaninchen AlexaFluor594, Molecular Probes) für 30 min, RT. Zur Kernfärbung wurden die Zellen abschließend mit DAPI gefärbt und in Vectashield Mounting Medium (Vector) eingebettet. Die Auswertung erfolgte an einem Axiophot Mikroskop unter Verwendung von Texas Red-, FITC- und DAPI-Filtern und dem Applied Imaging System (EasyFish Version 1.2).

3. Ergebnisse

3.1 Interaktionen zwischen FANCA, FANCC, FANCG und der RAD51-Familie im Hefe-2-Hybrid-System (Y2H)

Für den Interaction Trap im Hefe-2-Hybrid-System wurden zwei verschiedene Reportergene, LEU2 (Wachstumss Selektion) und lacZ (Selektion auf Blaufärbung), sowie die gleichzeitige Kombination beider Systeme verwendet. Die FA-Proteine FANCA und C, und die RAD51-Proteinfamilie wurden sowohl als Köder in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne LexA als auch als Beute in Fusion mit der transkriptionsaktivierenden Domäne B42 eingesetzt. FANCG konnte aufgrund seiner stark transaktivierenden Eigenschaften beider Reportergene nur als B42-Fu-

sionsprotein verwendet werden (REUTER et al. 2000). RAD51D wies im LEU2-Reportersystem eine stark transaktivierende Eigenschaft auf und wurde daher nur im lacZ-System getestet.

Die Ergebnisse des „Interaction Trap“ sind nachfolgend zusammengefasst (siehe Tabellen 1a, 1b, 1c) :

FANCA in der Köderposition zeigte Interaktionen mit den Beuteproteinen RAD51A, RAD51B und RAD51D in allen drei Testsystemen (LEU2, lacZ und LEU2/lacZ). In umgekehrter Orientierung der Fusionsproteine mit FANCA in der Beuteposition ließen sich die Interaktionen mit RAD51A, RAD51B und RAD51D nur anhand der Aktivierung der lacZ-Expression nachweisen, der LEU2-Reporter wurde nicht aktiviert. Darüberhinaus fanden im LEU2-System weitere Interaktionen zwischen FANCA und XRCC2 bzw. XRCC3 statt, die allerdings ebenfalls asymmetrisch waren, d.h. nur mit FANCA in der Köderposition beobachtet werden konnten.

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

Tab 1 c) Ergebnisse des „Interaction Trap“ bei Selektion auf Aktivierung beider Reportersysteme (lacZ/LEU2)

| bait | prey | activation | bait | prey | activation |
|-------|--------|------------|--------|-------|------------|
| FANCA | RAD51A | +/- | RAD51A | FANCA | ++ |
| FANCA | RAD51B | + | RAD51B | FANCA | + |
| FANCA | RAD51C | - | RAD51C | FANCA | + |
| FANCA | RAD51D | ++ | RAD51D | FANCA | +/- |
| FANCA | XRCC2 | - | XRCC2 | FANCA | - |
| FANCA | XRCC3 | - | XRCC3 | FANCA | - |
| FANCC | RAD51A | +/- | RAD51A | FANCC | - |
| FANCC | RAD51B | - | RAD51B | FANCC | - |
| FANCC | RAD51C | - | RAD51C | FANCC | - |
| FANCC | RAD51D | - | RAD51D | FANCC | +/- |
| FANCC | XRCC2 | - | XRCC2 | FANCC | - |
| FANCC | XRCC3 | - | XRCC3 | FANCC | - |
| | | | RAD51A | FANCG | +/- |
| | | | RAD51B | FANCG | ++ |
| | | | RAD51C | FANCG | ++ |
| | | | RAD51D | FANCG | + |
| | | | XRCC2 | FANCG | + |
| | | | XRCC3 | FANCG | ++ |

Tab 1a-c) Ergebnisse des „Interaction Trap“ zwischen den FA-Proteinen FANCA, FANCC, FANCG und der RAD51-Familie RAD51A, B, C, D, XRCC2 und XRCC2.

Interpretation der Aktivierung bei Selektion auf Blaufärbung (lacZ-Reporter):
 +, helle Blaufärbung;
 ++, mittlere Blaufärbung;
 +++, starke Blaufärbung.

Interpretation der Aktivierung bei Selektion auf Wachstum (LEU2-Reporter):
 +, leichtes Wachstum;
 ++, mittleres Wachstum;
 +++, starkes Wachstum.

Bei Doppelselektion (c) wurden gleichzeitig Intensität der Blaufärbung und Stärke des Wachstums interpretiert. Das Zeichen +/- wurde gewählt, wenn Interaktionen nur sehr schwach und nicht in jedem Experiment zu beobachten waren; -, keine Aktivierung des Reportersystems.

- a) Test auf Interaktion durch Aktivierung des lacZ-Reporters;
- b) Test auf Interaktion durch Aktivierung des LEU2-Reporters;
- c) Test auf Interaktion durch Doppelaktivierung beider Reporter lacZ und LEU2.

bait = Köderprotein (LexA-Fusion);
 prey = Beuteprotein (B42-Fusion);
 activation = Grad der Aktivierung des jeweiligen Reportersystems;
 nd = nicht durchführbar.

FANCG, das aufgrund seiner transaktivierenden Eigenschaften nur als Beuteprotein in B42-Fusion verwendet wurde, interagiert im „Interaction Trap“ unter Verwendung des lacZ-Reporters schwach bis sehr stark mit allen Mitgliedern der RAD51-Familie. Besonders starke Interaktionen wurden dabei in der Kombination aus FANCG mit RAD51B, RAD51C und XRCC3 beobachtet, während die Interaktionen mit den übrigen Familienmitgliedern RAD51A, RAD51D und XRCC2 schwächer ausfielen. Die im lacZ-System stärksten Interaktionen ließen sich mit Hilfe des LEU2-Reporters bestätigen: ein Wachstum der Hefezellen war nur mit den Kombinationen aus FANCG mit RAD51B und RAD51C zu beobachten.

Zusammengefasst wurden im „Interaction Trap“ zwar vielfältige Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und den Mitgliedern der RAD51-Familie nachgewiesen, allerdings konnte eine Aktivierung der Reportersysteme häufig nach wechselseitigem Austausch der Fusionsdomänen in der umgekehrten Orientierung nicht bestätigt werden. Zusätzlich wurden Interaktionen häufig in nur einem der beiden Reportersysteme, LEU2 oder lacZ, identifiziert. Dieses Phänomen scheint generell einer der Schwachpunkte der RAD51-Familie im „Yeast Two Hybrid“-System (DOSANJH et al. 1998, SCHILD et al. 2000) zu sein, wobei asymmetrische Interaktionen etwa auf störende Wechselwirkungen zwischen der DNA-bindenden Domäne (LexA) und dem jeweiligen Fusionspartner zurückzuführen sind.

Trotz widersprüchlicher Ergebnisse deutet die Fülle der verschiedenen Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie im „Yeast Two Hybrid“-System auf eine tatsächlich existierende Verbindung zwischen beiden Gruppen hin. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde daher versucht, direkte physikalische und/oder funktionelle Verbindungen durch Koimmunpräzipitationen und Immunfluoreszenzanalysen nachzuweisen.

3.2 Überexpression der FA- und RAD51-Proteine in menschlichen HEK293-Zellen

Die FA-Proteine FANCA, FANCC, FANCG und alle sechs RAD51-Familienmitglieder wurden in humanen HEK293-Zellen in N-terminaler Fusion mit FLAG- und/oder c-myc-Tag exprimiert. Zum Nachweis zellulärer Lokalisierung wurden die Fusionskonstrukte zunächst einzeln transfiziert; für Koimmunpräzipitations- und Kolokalisations-Experimente wurden gleichzeitig verschiedene Kombinationen zweier Fusionsvektoren eingesetzt. Die einzelnen Expressionsraten der FA-Gene lagen im Bereich von 20 %–35 % (Tab. 2). Die intrazelluläre Lokalisation von FA-Fusionskonstrukten ist stark von Position und Typ des jeweiligen Fusionspartners abhängig (KRUYT und YOUSOUFIAN 1998, WALSH et al. 1999, YOUSOUFIAN 1996, HOATLIN et al. 1998, GARCIA-HIGUERA und D'ANDREA 1999). Die hier verwendeten N-terminalen Fusionskonstrukte von FANCA und FANCC zeigten ein breites Spektrum zel-

lulärer Verteilung. Dabei lag das Verhältnis von Kern- zu Zytoplasmafärbung am häufigsten bei etwa 70 % zu 30 %. Die intrazelluläre Verteilung von FANCG zeigte – unabhängig vom Fusionspartner – ebenfalls eine gewisse Variabilität mit einem nukleären Anteil zwischen 50 % und 90 %.

Innerhalb der RAD51-Familie reichten die Expressionsraten von 2 % (XRCC2) bzw. 4 % (RAD51C) bis etwa 40 % (RAD51A) (Tab. 2). Alle RAD51-Familienmitglieder wiesen eine primär nukleäre Lokalisation auf, wobei der prozentuale Anteil der Kernfärbungen für RAD51B und RAD51D stets etwas niedriger lag, als bei den übrigen RAD51-Homologen. Möglicherweise sind die extrem niedrigen Expressionsraten der beiden Proteine RAD51C und XRCC2 darauf zurückzuführen, dass die N-terminale Fusion des c-myc-Tag in beiden Fällen eine korrekte Faltung der Aminosäurekette verhinderte und somit zur Destabilisierung des Fusionsproteins beitrug. Interessanterweise konnte man in RAD51A-überexprimierenden Zellen häufig eine strichelförmige Kernfärbung beobachten, die vermutlich auf eine Polymerisierung der in hoher Konzentration vorliegenden RAD51A-Proteine zurückzuführen ist (Thomas Haaf, persönliche Mitteilung, 2001).

3.3 Versuch der Induktion nukleärer FA- und RAD51-Foci nach MMC-Behandlung

Das humane RAD51A-Protein wandert – wie viele Angehörige des HR-Reparaturweges – nach DNA-Schädi-

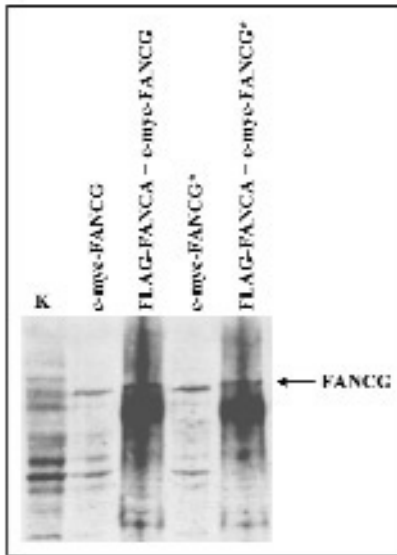


Abb 2 Koimmunpräzipitation überexprimierter FA-Fusionsproteine FLAG-FANCA und c-myc-FANCG aus HEK293-Zellen

K, untransfizierte Kontrolle.

Spuren 1 und 2: Ko-IP von FANCA und FANCG aus unbehandelten HEK293-Zellen;

Spur 1: Nachweis von c-myc-FANCG aus Gesamt-Protein-Lysat;

Spur 2: Nachweis von c-myc-FANCG nach Inkubation des Gesamt-Protein-Lysats mit anti-FLAG (FANCA) Antikörper.

Spuren 3 und 4: Ko-IP von FANCA und FANCG aus MMC-behandelten HEK293-Zellen. Die Zellen wurden mit 500 ng/ml MMC für 1 h behandelt (*) und nach 12-24 h präpariert.

Spur 3: Nachweis von c-myc-FANCG(*) aus Gesamt-Protein-Lysat;

Spur 4: Nachweis von c-myc-FANCG(*) nach Inkubation des Gesamt-Protein-Lysats mit anti-FLAG (FANCA) Antikörper.

Primärer Ak zum „Fischen“: anti-FLAG (FANCA); primärer Ak zum Proteinnachweis im Western Blot: anti-c-myc (FANCG).

gung durch IR oder MMC in nukleäre Foci (HAAF et al. 1995, TASHIRO et al. 2000), die gegenwärtig als Orte aktiver DNA-Reparatur interpretiert werden (NELMS et al. 1998). Um die FA-Proteine und die RAD51-Orthologe auf ihre Fähigkeit zur Focibildung zu testen, wurden transfizierte HEK293-Zellen für 1 h mit 500 ng/ml MMC behandelt und nach weiteren 12–16 Stunden präpariert.

Etwa 35–40 % der HEK293-Zellen zeigten RAD51A-Focibildung nach MMC-Behandlung, unabhängig davon, ob RAD51A endogen oder in Überexpression nachgewiesen wurde. Die übrigen fünf Mitglieder der RAD51-Familie zeigten unabhängig von DNA-Schädigung keine signifikante Foci-Bildung. Die FA-Proteine FANCA, FANCC und FANCG zeigten in manchen Experimenten nach DNA-Schädigung eine Konzentration in subnukleäre Regionen. Der prozentuale Anteil focihaltiger Zellen schwankte dabei zwischen 1 und 32 %, wobei die Struktur der FA-Foci von klein und punktuert bis hin zu groß und flächig variierte. In seltenen Fällen war eine Abschnürung focihaltiger Mikronuklei vom Zellkern sichtbar, die auch von HAAF et al. (1999) für RAD51A-Foci beobachtet und als Ausschluss irreversibel vernetzter DNA-RAD51A-Komplexe aus der Kernregion interpretiert wurde.

Die Inkonsistenz der FA-Focibildung weist zunächst nicht auf eine Induktion durch vorangegangene DNA-Schädigung hin. Allerdings wurden FA-Foci ohne MMC-Behandlung nicht

oder in < 1 % aller transfizierten Zellen beobachtet, so dass ein Zusammenhang zwischen DNA-Schädigung und FA-Focibildung nicht ausgeschlossen werden kann. Auffälligerweise wurden FA-Foci zumeist in Zellkernen mit unregelmäßiger DAPI-Färbung beobachtet, wobei die FA-Färbung häufig auf Bereiche besonders schwacher DAPI-Färbung beschränkt war. Die Intensität der DAPI-Färbung steht in indirekt proportionalem Verhältnis zur Dichte des zellulären Chromatins, d.h. je lockerer die Chromatinstruktur, desto intensiver die DAPI-Färbung (MASCETTI et al. 2001). Eine Chromatinauflockerung als unmittelbare Reaktion auf DNA-Schädigung wurde von BELYAEV et al. (2001) beschrieben. Sollte nach einer MMC-Behandlung in besonders schwer geschädigten Zellen eine übermäßige Auflockerung des Chromatins zu einem Herauslösen der FA-Proteine führen, würde dies einen weiteren Hinweis auf die postulierte Rolle der FA-Proteine im sogenannten „Chromatin remodelling“ darstellen. Ein Zusammenhang der FA-Proteine mit Chromatin und nukleärer Matrix wurde bereits mehrfach postuliert (HOTLIN et al. 1999, QIAO et al. 2001), dabei könnte ein Herauslösen der FA-Proteine aus der Chromatinmatrix weiterführend auch mit apoptotischen Vorgängen in Zusammenhang gebracht werden.

Zwischen den FA-Proteinen FANCA und FANCG wurde niemals eine Ko-lokalisierung in Foci beobachtet, allerdings waren die Ko-Expressionsraten extrem niedrig (siehe Tab. 3). Da in

doppelt transfizierten Zellen niemals Foci für nur eines der beiden Proteine gefunden wurden, konnte über eine etwaige Kolokalisation der beiden FA-Proteine FANCA und FANCG keine definitive Aussage getroffen werden.

3.4 Versuch der Ko-Immünpräzipitation der FA- und RAD51-Proteine

Zur Identifizierung möglicher physikalischer Interaktionen zwischen den FA-Proteinen FANCA, FANCC, FANCG und der RAD51-Familie wurden HEK293-Zellen mit je zwei Expressionsvektoren doppelt transfiziert. Nach 48 Stunden wurden Proteinextrakte gewonnen und einem Ko-Immünpräzipitationsverfahren (Ko-IP) unterzogen. Da die Interaktion zwischen FANCA und FANCG als besonders stark beschrieben ist (REUTER et al. 2000, HUBER et al. 2000), wurde die Ko-IP zwischen FLAG-FANCA und c-myc-FANCG als Positivkontrolle verwendet. Im Western Blot waren endogenes RAD51A, sowie die Fusionsproteine FANCA, FANCC, FANCG, RAD51B, Rad51D und XRCC3 deutlich nachweisbar, während – wie aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenzstudie bereits erwartet – die RAD51C- und XRCC2-Expression unterhalb der Nachweisgrenze lag (siehe Abb. 1 a, b, c).

Anhand der Hefe-2-Hybrid-Ergebnisse wurden Ko-IP-Versuche für die in Tabelle 4 aufgeführten Kombinationen durchgeführt; dabei wurde in Bezug auf RAD51A stets der Nachweis endogen exprimierter Proteine verfolgt, um die Artefaktanfälligkeit zu senken.

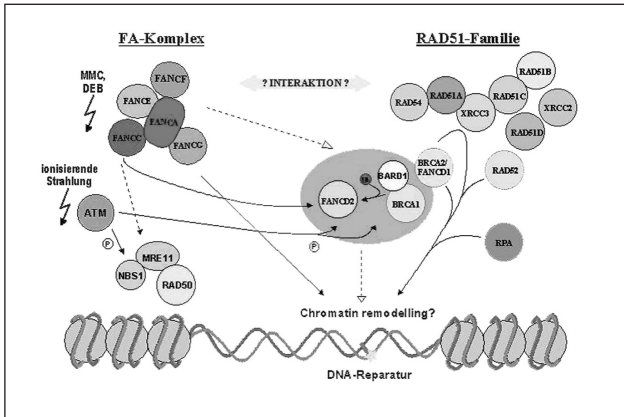


Abb 3 Gegenwärtige Vorstellung von möglichen Interaktionen und Funktionen der FA-, BRCA- und RAD51-Genfamilien

Zentrales Dogma sind dabei Komplexbildung und Kerntransport der FA-Proteine nach DNA-Schäden durch Klastogene wie MMC. Im Kern erfolgt die Ubiquitinierung von FANCD2, welches zusammen mit BRCA1 in Kernfoci erscheint. Ebenso erfolgt der Kernimport der Rad51 Proteine durch Bindung an FANCD1/BRCA2. Bei Schadensauslösung durch ionisierende Strahlung erfolgt die Aktivierung von FANCD2 auf dem Wege der Phosphorylierung durch das ATM Genprodukt. Vor der eigentlichen Korrektur der DNA-Läsionen auf dem Wege der Rekombinationsreparatur sind die Proteinkomplexe vermutlich an der erforderlichen Konformationsänderung des Chromatins beteiligt („Chromatin remodelling“). Die Autoren danken Reinhard Kalb, Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, für die Aktualisierung der Graphik.

MMC = Mitomycin C;
ATM = Produkt des Ataxia telangiectasia-Gens;
NBS = Produkt des Nijmegen Breakage-Syndrom-Gens

Für keine der aufgeführten Kombinationen konnte eine Interaktion zwischen einem FA-Protein und einem RAD51-Ortholog nachgewiesen werden, trotz Verwendung mehrerer Strategien zum Isolieren der Proteinkomplexe, wie etwa der Verwendung verschiedener Zellaufschluss- und Puffersysteme sowie einer Behandlung der Zellen mit MMC. Die Interaktion zwischen FLAG-FANCA und c-myc-FANCG war dagegen zumeist deutlich dokumentierbar (vgl. Abb. 2).

Eine mögliche Interaktionsstörung durch Überexpression der FA-Proteine kann dabei ausgeschlossen werden, da bereits mehrere Interaktoren der FA-Proteine durch Überexpression beider Partner identifiziert wurden (KRUYT et al. 1998, OTSUKI et al. 1999, HOATLIN et al. 1999).

Offen bleibt die Möglichkeit, dass Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und den RAD51-Familienmitgliedern zu schwach oder zu empfindlich sind, um durch die angewandten Ko-IP-Strategien nachgewiesen zu werden.

4. Diskussion

Auf Grund der hier vorgelegten Ergebnisse muss die Frage nach einer möglichen funktionellen Verbindung zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Proteinfamilie offen bleiben. Obwohl viele reproduzierbare Interaktionen der FA-Proteine mit Mitgliedern der RAD51-Familie mit Hilfe des „Yeast TwoHybrid“-Systems identifiziert werden konnten, war die Art der

Interaktion häufig asymmetrisch und/oder in nur einem der beiden Hefe-Reportersysteme sichtbar. Darüberhinaus konnte eine direkte physikalische Verbindung zwischen den im „Interaction Trap“ identifizierten Interaktionspartnern in humanen HEK293-Zellen durch Immunpräzipitation nicht bestätigt werden. Auch eine Induktion nukleärer Foci nach DNA-Schädigung, wie sie von RAD51A her bekannt ist, war weder für die übrigen Angehörigen der RAD51-Familie, noch für die drei FA-Proteine möglich. Dagegen zeigten die FANCA-, FANCC- und FANCG-Färbungen nach MMC-Behandlung eine Beschränkung auf subnukleäre Bereiche, die gleichzeitig Regionen besonders kondensierten Chromatins darstellen. Rein spekulativ könnte dies mit der Beteiligung der FA-Proteine am sogenannten „Chromatin Remodelling“ in Zusammenhang gebracht werden (vgl. REUTER et al. in dieser *edition* S. 89-95).

Obwohl eine mögliche Interaktion zwischen den FA-Proteinen und der RAD51-Familie vorläufig auf das „Yeast Two Hybrid“-System beschränkt bleibt, erscheint es nicht sinnvoll, die beobachteten Interaktionen insgesamt als falsch positiv einzustufen, da sowohl die FA-Proteine als auch die RAD51-Familienmitglieder von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich im Hefe-Two Hybrid-System eingesetzt wurden. Zusätzlich wäre aufgrund der Kolo-kalisationierung des FANCD2-Proteins mit BRCA1 (GARCIA-HIGUERA et al. 2001) eine Verbindung zwischen den FA-Proteinen

und RAD51A plausibel, da RAD51A einer der bekannten Interaktoren des BRCA1-Proteins ist. Die Tatsache, dass BRCA1-Foci hauptsächlich mit RAD51A-Foci überlappen, ließe eine Kolo-kalisation und Interaktion von FANCD2 und RAD51A erwarten, in die weitere Proteine des nukleären FA-Komplexes involviert sein könnten.

4.1 BRCA2, RAD51 und FA: eine unerwartet enge Beziehung

Die vermutete enge Kooperation zwischen den FA-Proteinen und den Hauptkomponenten der homologen Rekombinationsreparatur wurde in jüngster Zeit durch die Entdeckung bestätigt, dass es zum Krankheitsbild der Fanconi Anämie kommen kann, wenn die regelrechte Funktion des BRCA2-Gens durch Mutationen in beiden Allelen beeinträchtigt ist (HOWLETT et al. 2002). Besonders enge funktionelle Beziehungen bestehen dabei zwischen den RAD51 Rekombinasen und BRCA2. Sowohl der Kerntransport von RAD51 als auch dessen Rekrutierung in Kernfoci nach DNA-Schädigung wird offenbar durch das BRCA2 Protein bewerkstelligt (YUAN et al. 1999; DAVIES et al. 2001; VENKITARAMAN, 2001). GODT-HELP et al. (2002) konnten überdies zeigen, dass die Bildung von RAD51-Kernfoci nach Strahlenexposition in FA-Fibroblasten gestört ist. Allerdings wurde dieser Befund nur in Fibroblasten der Komplementationsgruppe FANCD1 (die inzwischen als identisch mit dem BRCA2-Gen identifiziert wurde) erhoben, während DIGWEED et al. (2002) über ähnliche Befunde für

Tab 2 Expressionsraten der verschiedenen FLAG- und c-myc-Fusionskonstrukte der FA- und RAD51-Proteine nach Einzeltransfektion in HEK293-Zellen

| Fusionskonstrukt | T-Rate der HEK293-Zellen (in %) |
|------------------|---------------------------------|
| FLAG-FANCA | 30 |
| FLAG-FANCC | 20 |
| FLAG-FANCG | 35 |
| c-myc-FANCG | 36 |
| c-myc-RAD51A | 40 |
| c-myc-RAD51B | 25 |
| c-myc-RAD51C | 4 |
| c-myc-RAD51D | 22 |
| c-myc-XRCC2 | 2 |
| c-myc-XRCC3 | 19 |
| GFP-Vektor | 50 |

Es wurden jeweils mindestens 300 Zellen aus gezählt.

Tab 3 Ko-Expressionsraten verschiedener Kombinationen aus je einem FLAG- und einem c-myc-Fusionskonstrukt nach Doppeltransfektion in HEK293-Zellen in Prozent.

| Plasmid-Kombinationen | Ko-Expressionsraten (in %) |
|-------------------------|----------------------------|
| FLAG-FANCA c-myc-FANCG | 6 |
| FLAG-FANCA c-myc-RAD51A | 5 |
| FLAG-FANCA c-myc-RAD51B | 8 |
| FLAG-FANCA c-myc-RAD51D | 2 |
| FLAG-FANCC c-myc-FANCG | 2 |
| FLAG-FANCC c-myc-RAD51A | 8 |
| FLAG-FANCC c-myc-RAD51B | 7 |
| FLAG-FANCC c-myc-RAD51D | 4 |
| FLAG-FANCG c-myc-RAD51A | 8 |
| FLAG-FANCG c-myc-RAD51B | 7 |
| FLAG-FANCG c-myc-RAD51D | 3 |

Es wurden jeweils mindestens 300 Zellen ausgezählt.

Tab 4 Übersicht der verwendeten Kombinationen aus je einem FA-Fusionskonstrukt (FLAG) und einem RAD51-Fusionskonstrukt (c-myc) zum Nachweis physikalischer Interaktionen durch Ko-IP.

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

HEK293-Zellen wurden hierfür mit zwei Plasmiden doppelt transfiziert und nach 24 bis 72 h präpariert. Ko-IP-Studien mit RAD51A wurden ausschließlich durch Nachweis von endogenem RAD51A durchgeführt, um die Artefaktanfälligkeit auf Grund besonderer Strukturen des RAD51A Proteins in Überexpression zu minimieren.

Fibroblasten aller FA-Komplementationsgruppen berichten. Die möglicherweise gestörte Rekrutierung von RAD51 in schadensinduzierte Kernfoci wäre ein weiterer Hinweis auf eine eingeschränkte Funktion der durch die Bindung zwischen BRCA2 und RAD51 vermittelten homologen Rekombinationsreparatur in FA-Zellen. Die hier vorgelegten Befunde sprechen dafür, dass es auch zwischen den anderen FA-Proteinen und Mitgliedern der RAD51 Familie zu Interaktionen kommen kann, deren mögliche funktionelle Bedeutung allerdings offen bleiben muss. Die schadensinduzierte Ubiquitinierung von FANCD2 durch den FA-Protein-Komplex, die damit einhergehende Rekrutierung von FANCD2 und BRCA1 in Kernfoci, die überraschende Identifizierung von BRCA2 als ein bona fide FA-Gen, sowie die Reduktion von strahleninduzierten RAD51-Kernfoci in FA-Zellen weisen auf sehr enge funktionelle Beziehungen zwischen diesen wichtigen Komponenten der Schadensabwehr in unseren Körperzellen hin. Vermutlich sind alle diese Gene Komponenten eines Multi-Protein-Netzwerkes, welches zur Aufrechterhaltung der Stabilität und Integrität unseres Genoms beiträgt. Für die Multifunktionalität und interaktive Konstruktion dieses Netzwerkes spricht u.a. die Beobachtung, dass es im Verlaufe der Strahlenantwort auch zur Aktivierung von FANCD2 auf dem Wege der Phosphorylierung durch die ATM-Kinase kommen kann (TANIGUCHI et al. 2002). Das auf Grund unserer Ergebnisse suggerierte Szenario einer interaktiven Beteiligung der FA- und

RAD51 Proteinfamilien in der Erkennung und Reparatur von interstrand crosslinks und DNA- Doppelstrangbrüchen auf dem Wege der homologen Rekombinationsreparatur wird in der Abbildung 3 skizziert. Dabei wird auch auf die zentrale Rolle der BRCA1 und BRCA2 Proteine (KERR and ASHWORTH, 2001), auf die mögliche Interaktion zwischen p53 und FANCC (LIEBETRAU et al. 1995), auf die Rolle der BRCA-Proteine in der transkriptionsgekoppelten Reparatur von oxidativen DNA-Schäden (LE PAGE et al. 2000), sowie auf die mögliche Chromatin-modifizierende Funktionen der FA-Proteine (REUTER et al, in dieser *edition* S. 89-95) hingewiesen. Zusammen mit den Literaturdaten sind die hier vorgelegten Ergebnisse aus dem Hefe-Hybrid System mit einer direkten Beteiligung der FA-Gene an der nukleären Schadensbekämpfung auf dem Wege der homologen Rekombinationsreparatur vereinbar.

Literatur

Belyaev IV, Czene S, Harms-Ringdahl M (2001) Changes in chromatin conformation during radiation-induced apoptosis in human lymphocytes. *Radiat Res* 156: 355-64

Braybrooke JP, Spink KG, Thacker J, Hickson ID (2000) The RAD51 family member, RAD51L3, is a DNA-stimulated ATPase that forms a complex with XRCC2. *J Biol Chem* 275: 29100-6

Davis AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and repair protein. *Mol Cell* 7:273-82

Digweed M, Rothe S, Demuth I, Scholz R, Schindler D, Stumm M, Grompe M, Jordan A, Sperling K (2002) Attenuation of the formation of

DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi anemia. *Carcinogenesis* 23:1121-6

Dosanjh MK, Collins DW, Fan W, Lennon GG, Al-bala JS, Shen Z, Schild D (1998) Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acids Res* 26: 1179-84

Dronkert ML, Kanaar R (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* 486: 217-47

Garcia-Higuera I, D'Andrea AD (1999) Nuclear localization of the Fanconi anemia protein FANCC is required for functional activity. *Blood* 93: 4025-6

Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7: 249-62

Godthelp BC, Arwert F, Joenje H, Zdzienicka MZ (2002) Impaired DNA damage-induced nuclear Rad51 foci formation uniquely characterizes Fanconi anemia group D1. *Oncogene* 21:5002-5

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

Haaf T, Raderschall E, Reddy G, Ward DC, Radding CM, Golub EI (1999) Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *J Cell Biol* 144: 11-20

Hoatlin ME, Christianson TA, Keeble WW, Hammond AT, Zhi Y, Heinrich MC, Tower PA, Bagby GC Jr (1998) The Fanconi anemia group C gene product is located in both the nucleus and cytoplasm of human cells. *Blood* 91: 1418-25

Hoatlin ME, Zhi Y, Ball H, Silvey K, Melnick A, Stone S, Arai S, Hawe N, Owen G, Zelent A, Licht JD (1999) A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood* 94: 3737-47

Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea

- AD (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297:606-9
- Huber PA, Medhurst AL, Youssoufian H, Mathew CG (2000) Investigation of Fanconi anemia protein interactions by yeast two-hybrid analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 73-7
- Joenje H, Patel, KJ (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Nat Rev Genet* 2: 446-57
- Kerr P, Ashworth A (2001) New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Current Biol* 11:R668-76
- Kruyt FA, Abou-Zahr F, Mok H, Youssoufian H (1999) Resistance to mitomycin C requires direct interaction between the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCG in the nucleus through an arginine-rich domain. *J Biol Chem* 274: 34212-18
- Kruyt FA, Youssoufian H (1998) The Fanconi anemia proteins FAA and FAC function in different cellular compartments to protect against cross-linking agent cytotoxicity. *Blood* 92: 2229-36
- Le Page F, Randrianarison V, Marot D, Cabannes J, Perricaudet M, Feunteun J, Sarasin A (2000) BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* 60:5548-52
- Liebetrau W, Buehner M, Hoehn H (1995) Liebetrau W, Buehner M, Hoehn H (1995) Prototype sequence clues in the FAC gene. *J Med Genet* 32:669-70
- Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA (1998) The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13869-74
- Mascetti G, Carrara S, Vergani L (2001) Relationship between chromatin compactness and dye uptake for in situ chromatin stained with DAPI. *Cytometry* 44: 113-9
- Masson JY, Stasiak AZ, Stasiak A, Benson FE, West SC (2001). Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8440-6
- McHugh PJ, Sones WR, Hartley JA (2000) Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20: 3425-33
- Nelms BE, Maser RS, MacKay JF, Lagally MG, Petrini JH (1998) In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 280: 590-2
- Otsuki T, Kajigaya S, Ozawa K, Liu JM (1999) SNX5, a new member of the sorting nexin family, binds to the Fanconi anemia complementation group A protein. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 630-5
- Qiao F, Moss A, Kupfer GM (2001) Fanconi anemia proteins localize to chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. *J Biol Chem* 276: 23391-6
- Raderschall E, Golub EI, Haaf T (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1921-6
- Reuter T, Herterich S, Bernhard O, Hoehn H, Gross HJ (2000) Strong FANCA/FANCG but weak FANCA/FANCC interaction in the yeast 2-hybrid system. *Blood* 95: 719-20
- Schild D, Lio Yc, Collins DW, Tsomondo T, Chen DJ (2000) Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J Biol Chem* 275: 16443-9
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, Lane WS, Kastan MB, D'Andrea AD (2002) Convergence of the Fanconi anemia and Ataxia telangiectasia pathways. *Cell* 109:459-72
- Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, Sonoda E, Schild D, Thompson LH, Takeda S (2001) Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* 21: 2858-66
- Tashiro S, Walter J, Shinohara A, Kamada N, Cremer T (2000) Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *J Cell Biol* 150: 283-91
- Tomilin NV, Solovjeva LV, Svetlova MP, Pleskach NM, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM (2001) Visualization of focal nuclear sites of DNA repair synthesis induced by bleomycin in human cells. *Radiat Res* 156: 347-54
- Venkitaraman AR (2001) Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* 114:3591-98
- Walsh CE, Yountz MR, Simpson DA (1999) Intracellular localization of the Fanconi anemia complementation group A protein. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 594-9
- Yuan SS, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY (1999) BRCA2 is required for ionising radiation-induced assembly of Rad51 complex *in vivo*. *Curr Opin Cell Biol* 13:338-43
- Youssoufian H (1996) Cytoplasmic localization of FAC is essential for the correction of a prerepair defect in Fanconi anemia group C cells. *J Clin Invest* 97: 2003-10