

Caretaker-Gene: Schutz vor exogener und endogener DNA-Schädigung

Reinhard Kalb, Holger Höhn

Zusammenfassung

Unsere Somazellen sind ständiger Schädigung durch exogene und endogene Faktoren ausgesetzt. Wichtige endogene Schädigungs-Ursachen sind die Thermoinstabilität unserer DNA bei 37 Grad Körpertemperatur sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als Nebenprodukt der Energiewinnung durch oxidative Phosphorylierung. Um die relative Langlebigkeit hochentwickelter, warmblütiger Organismen sicherzustellen haben sich eine Reihe von Genfamilien entwickelt, deren Aufgabe es ist, die genetische Stabilität in unseren Körperzellen so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Diese von Kinzler und Vogelstein als "Caretaker" bezeichneten Gene sind für die Erkennung und Reparatur von DNA-Läsionen im Zellkern zuständig. Ihre Produkte sind Teil eines protektiven, multifunktionalen Protein-Netzwerkes, dessen Komponenten bei der Schadensbekämpfung zusammenarbeiten. Die enge Verbindung zu dem Brustkrebsgen BRCA1 und die überraschende Identität eines der Fanconi Anämie Gene mit dem Brustkrebsgen BRCA2 hat gezeigt, dass die Fanconi-Proteine vor allem bei der Beseitigung von Doppelstrangbrüchen und Quervernetzungen auf dem Wege der Rekombinationsreparatur eine wichtige Rolle spielen. Mutationen in Caretaker Genen führen zu genetischer Instabilität unserer Körperzellen. Dies hat längerfristig ein stark erhöhtes Krebsrisiko und das verfrühte Auftreten von Alterserscheinungen zur Folge.

Schlüsselwörter

DNA-Schäden, Caretaker-Gene, reaktive Sauerstoffspezies, Fanconi Anämie, Rekombinationsreparatur, genetische Instabilität

Summary

Our body cells suffer continuous damage from exogenous and endogenous sources. Inevitable endogenous DNA-damage is caused by thermoinstability of our DNA at 37 degrees body temperature and by the generation of reactive oxygen species during oxidative phosphorylation. In order to secure the relative longevity of warm-blooded species such as ours, a number of gene families have evolved which maintain the genetic stability of our body cells. These so-called caretaker genes are responsible for the recognition and elimination of DNA-lesions. The proteins encoded by these genes are part of a protective, multifunctional protein network whose components cooperate in DNA-damage recognition and damage removal. The close connection to the BRCA1 and surprising identity with the BRCA2 breast cancer genes has shown that the Fanconi anemia (FA) family of genes plays an important role in the elimination of double-strand breaks and interstrand crosslinks. There is now convincing evidence that the FA-genes participate in DNA repair via homologous recombination and non-homologous endjoining. Inactivation of caretaker genes causes genetic instability and, as a longterm consequence, increases cancer risk and leads to premature aging.

Keywords

DNA-damage, thermoinstability, DNA-repair, caretaker genes, homologous recombination, Fanconi anemia, genetic instability

Caretaker Gene: Garanten für genetische Stabilität

Jede unserer Körperzellen ist ständiger Schädigung durch exogene und endogene Faktoren ausgesetzt. Zu den exogenen Schädigungsfaktoren gehören z.B. ionisierende Strahlen, UV-Licht, sowie eine Vielzahl von Chemikalien. Zu den endogenen Schädigungsfaktoren gehört vor allem die Tatsache, dass wir bei 37 Grad Körpertemperatur existieren, bei der unser genetisches Material aus energetischen Gründen nicht völlig stabil sein kann. Die unvermeidliche Thermoinstabilität unserer DNA führt zusammen mit der ebenso unvermeidbaren Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmolekülen während der Zellatmung zu erheblichen Schädigungsraten. So gehen durchschnittlich aus dem Genom jeder unserer Körperzellen pro 24 Stunden 12.000 Purin-Basen und 600 Pyrimidin-Basen verloren. Etwa 200 Cytosin-Basen werden durch Desaminierung verändert. Hinzu kommen bis zu 55.000 Einzelstrangbrüche, bis zu 9 Doppelstrangbrüche und bis zu 8 Quervernetzungen pro Zelle und Tag (1). Um das Überleben eines warmblütigen Organismus, der seine zelluläre Energie auf dem Wege der oxydativen Phosphorylierung gewinnt, langfristig sicherzustellen, haben sich im Verlaufe der Evolution eine Reihe von Überwachungs- und Reparatursysteme entwickelt, welche für die Erkennung, Entfernung und gegebenenfalls Reparatur der geschädigten Zellen verantwortlich sind. Für die Gene, welche die Stabilität und Integrität des Genoms unserer Körperzellen sicherstellen, haben Kinzler und Vogelstein (2) den Begriff „Caretaker“ Gene geprägt. Das Prototyp Caretaker Gen ist das p53 Gen („guardian of the genome“), welches über die Aktivierung von p21 in den Ablauf des Zellzyklus eingreift. Zellen mit DNA-Schäden werden so an ihrer Teilung und Proliferation gehindert, um der Zelle Gelegenheit zur Reparatur der geschädigten DNA zu geben. Gelingt die Reparatur nicht, so wird die geschädigte Zelle durch Apoptose unschädlich gemacht. Die Genprodukte der Caretaker Gene sind also wichtige Schutzsysteme gegenüber DNA-Schädigung und genetischer Instabilität, wobei

Tab 1 Klinische Klassifikationen der Fanconi Anämie

Klinische Klassifikation	Gene	Schutzfunktion	Molekulare Funktion	Neoplasie
Hautkrebs-Gruppe Xeroderma pigmentosum	XPA-XPG	UV-Licht	Nukleotid Exzisions-Reparatur (NER)	Hautkarzinom
Progerie-Gruppe ohne Tumoren Cockayne-Syndrom Trichothiodystrophie	XPD, XPG XPB	UV-Licht UV-Licht	Helikase/Replikations-gekoppelte Reparatur
Progerie-Gruppe mit Tumoren Werner-Syndrom Bloom-Syndrom Rothmund-Thompson S.	WRN BLM RTS	4-NQO UV-Licht, BrdUrd; UV-Licht	Helikase Helikase Helikase	Sarkome, u.a. Alle Tumoren Sarkome
Lymphom-Gruppe Ataxia telangiectasia (AT) Nijmegen Breakage Syndrom AT-ähnliche Syndrome	ATM Nibrin, Mre11, Rad50 Ligase IV	ionisierende Strahlen ionisierende Strahlen ionisierende Strahlen	DSB-Erkennung/Reparatur DSB-Erkennung/Reparatur DSB-Erkennung/Reparatur	Lymphome Lymphome Lymphome
Fanconi Anämie-Gruppe	FANCA- FANCG BRCA2	Alkylantien oxidativer Stress	DSB-Erkennung/Reparatur /Rekombinations-Reparatur	AML, Karzinome
Brustkrebs-Gruppe	BRCA1, BRCA2	oxidativer Stress	Rekombinations-Reparatur	Mammakarzinom Ovarialkarzinom
Darmkrebs-Gruppe	MSH2, MSH6, MLH1, PMS1,2	Oxidativer Stress	Mismatch-Reparatur	Non-Polyposis Kolonkarzinom
Li-Fraumeni-Gruppe	p53	ionisierende Strahlen Chemikalien	Zellzyklusarrest	Alle Tumoren

Legende

4NQO = 4 Nitrosoquinoline;
AML = akute myeloische Leukämie;
DSB= Doppelstrangbruch

der Korrektur von Doppelstrang-Brüchen für das Überleben der Zelle eine besonders hohe Priorität zukommt (3,4). Mutationen in unseren Caretaker Genen führen zu genetischer Instabilität in unseren Körperzellen, als deren Folge sich die Wahrscheinlichkeit von Mutationen in kritischen Genen und damit die Wahrscheinlichkeit einer neoplastischen Transformation um ein Vielfaches erhöht. Frühzeitiges Auftreten von Krebserkrankungen und vorzeitige Alterungserscheinungen sind die klassischen klinischen Manifestationen von defekten Caretaker Genen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die beim Menschen bisher näher charakterisierten Caretaker Genfamilien. Die klinische Klassifikation erfolgt dabei nach der Art des erhöhten Neoplasie-Risikos, welches durch Mutationen in den jeweiligen Caretaker Genen bedingt wird.

Fanconi Anämie: klinische Auswirkungen von Mutationen in Caretaker Genen

Das erhöhte *Neoplasie-Risiko* von FA-Patienten betrifft vor allem die Gefahr einer akuten myeloischen Leukämie (AML), die 15000-fach häufiger auftritt als in der Durchschnittsbevölkerung (5,6). Bei fehlenden oder nur geringfügigen somatischen und hämatologischen Auffälligkeiten kann AML sogar die klinische Erstmanifestation ei-

ner FA sein (7). Aber auch das Risiko für unterschiedliche Arten von soliden Tumoren ist stark erhöht. Dabei stehen sehr aggressive Plattenepithel-Karzinome der Mundhöhle, der oberen Atemwege, der Speiseröhre und des Genitales (bei Frauen) im Vordergrund (6,8,9). Dieses erhöhte Risiko persistiert leider auch nach erfolgreicher Knochenmarktransplantation (10). In der Folge einer Androgentherapie kann es zu Lebertumoren kommen (Dietrich, in dieser *edition* S.24–32), die in der Regel aber gutartige Adenome sind (11).

Die *phänotypischen Manifestationen* der Fanconi Anämie bestehen aus einer Kombination von Entwicklungsstörungen, Störungen der Hämatopoese und somatischen Auffälligkeiten, die vor allem bei erwachsenen Patienten den Eindruck einer vorzeitigen Alterung hervorrufen. Jedoch sind bei FA-Patienten progeroide Symptome deutlich geringer ausgeprägt als bei den klassischen Progerien des Kindes- (Hutchinson-Gilford Syndrom) oder Erwachsenen-Alters (Werner-Syndrom; Rothmund-Thompson-Syndrom). Während es auch beim normalen Alterungsvorgang zur allmählichen Einschränkung der Knochenmarkfunktion kommt, tritt diese Einschränkung bei FA bereits zwischen dem 5. und 8. Lebensjahr auf und entwickelt sich oft innerhalb von wenigen Jahren zu einer schweren aplastischen Anämie mit

Panzytopenie. Das Knochenmarkversagen beginnt in der Regel mit einer Thrombopenie. Nachfolgend kommt es zu einer makrozytären Anämie und Leukopenie, während die Funktion der lymphatischen Zellreihen am längsten aufrecht erhalten wird (12,13) Ca. 70% der Patienten sind von Entwicklungsstörungen betroffen. Zu den häufigsten Entwicklungsstörungen gehören Kleinwuchs, Radialstrahl-Defekte, Pigmentveränderungen, Fehlbildungen des Urogenitalsystems und des Verdauungstraktes, Skelettanomalien, und Ohrfehlbildungen (14, 15). Zu den progeroiden Manifestationen gehören Endokrinopathien sowie das verfrühte Auftreten von Myelodysplasien und Karzinomen. Über 80% der Patienten sind von Endokrinopathien betroffen (16). Hierzu gehören Hyperinsulinämie, Wachstumshormon-Defizienz, und Unterfunktionen der Schilddrüse. Alle diese Veränderungen findet man auch beim normalen Alterungsprozess, jedoch treten sie bei FA-Patienten 30 bis 40 Jahre früher auf. Dies gilt vor allem auch für das bei FA-Patienten häufige myelodysplastische Syndrom. Weniger als 50% der Patienten erreichen das Erwachsenenalter, wobei im Erwachsenenalter ein Geschlechtsunterschied zugunsten von Frauen auffällig ist (Dietrich, in dieser *edition* S.24-32). Die Fertilität ist stark herabgesetzt, und Männer sind auf Grund fehlender Spermatogenese in der Regel infertil (17).

Tab 2 Fanconi Anämie Genfamilie: Charakteristiken der Gene und ihrer Produkte

Gen	%	Chromosom	Exons	mRNA	AA	Protein	Konserv.	Motive
FANCA	70	16q24.3	43	5.5 kb	1456	163 kDa	Nein	NLS;LZ
FANCD1=BRCA2	<5	13q12	27		3418	384	Nein	NLS; BRC-repeats
FANCC	8	9q22.3	14	4.7	558	63	Nein	LZ(?)p53 binding ?
FANCD2	<5	3p25.3	44	4.4	1451	166	Ja	HMG-like
FANCE	<5	6p21.3	10	2.6	536	60	Nein	2 NLS
FANCF	<5	11p15	1	1.2	374	42	Nein	ROM ?
FANCG	12	9p13	14	2.7	622	68	Nein	=XRCC9;LZ

Abkürzungen

% = Prozentsatz der Patienten (europäischen Ursprungs) mit Mutationen im betreffenden FANC-Gen

NLS = Kernlokalisierungssignal

LZ = Leuzin-Zipper (Protein-Protein Interaktionssignal)

HMG = High Mobility Group Proteins (DNA-Bindungsmotive von Nicht-Histon Kernproteinen und Transkriptionsregulatoren)

ROM = RNA Modulator 1;

XRCC9 = menschliches DNA-Reparaturgen, welches die Mitomycin-C- und UV-sensitive Chinesische Hamster Zell-Linie UV40 komplementiert

Konserv. = evolutionär konservierte Sequenzmotive und Ähnlichkeiten zu bekannten Genen in den verfügbaren Datenbasen

Fanconi Anämie: zellbiologische Auswirkungen von Mutationen in Caretaker Genen

Charakteristische *Laborparameter* sind neben Thrombopenie, makrozytärer Anämie und Leukopenie eine Erhöhung des Tumor Nekrose Faktors alpha (18) sowie des Serum alpha-Fetoproteins (19). Charakteristische *zellgenetische* und *zellbiologische* Befunde sind die Erhöhung der spontanen und induzierten Chromosomenbrüchigkeit in mononukleären Zellen des peripheren Blutes, sowie eine erhöhte Sensitivität von Blut- Haut- und Amnionzellen gegenüber bifunktionellen alkylierenden Substanzen wie Diepoxybutan (DEB) und Mitomycin C (MMC) (12). Charakteristische Störungen des Zellzyklus, insbesondere des S- und G2-Phasen Transits (20-23) werden neben der Bestimmung der Chromosomenbrüchigkeit und Alkylanzien-Sensitivität als diagnostische Parameter zur Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose genutzt (24). Wegen der häufigen Mosaikbildung in Zellen des peripheren Blutes muss bei persistierender Diskrepanz zwischen zytogenetischen und klinischen Befunden zur diagnostischen Bestätigung auf die Analyse von Fibroblastenkulturen zurückgegriffen werden (25). Zytogenetisch aberrante Zellklone werden in Blut und Knochenmarkspiraten der Patienten bereits vor dem Auftreten eines morphologisch eindeutigen myelodysplastischen Syndroms beobachtet (26). Jedoch scheint das Auftreten dieser Klone bei FA-Patienten hinsichtlich einer Leukämie-Entwicklung weniger bedrohlich zu sein als bei anderen

Patienten mit einem myelodysplastischem Syndrom (27,28). Dies gilt offenbar nicht für Einzelzellen und Zellklone mit einer Duplikation 3q, welche als Marker einer ungünstigen Entwicklung interpretiert werden müssen (H. Neitzel, pers. Mitteilung, 2002).

Prognostisch ebenfalls ungünstig ist das Auftreten von Klonen mit einer Monosomie 7, deren Frequenz in CD34 positiven Blutstammzellen experimentell durch Behandlung mit Benzen-Derivaten wie Phenol und Hydrochinon erhöht werden kann (29). Diese potentiell schädlichen Stoffe entstehen als Produkte des Nahrungsstoffwechsels und der gastrointestinalen Flora auch natürlicherweise in unserem Körper (30). Wenn bei FA-Patienten auf Grund ihrer defekten Caretaker Gene eine erhöhte Sensitivität gegenüber Benzen-Derivaten besteht, könnte dies zum verfrühten und häufigen Auftreten klonaler Knochenmarksaberrationen und Leukämien beitragen.

Die Fanconi Anämie Genfamilie

Die genetische Heterogenität der FA wurde durch umfangreiche Komplementationstudien der Gruppen von Karl Sperling in Berlin, Manuel Buchwald in Toronto und Hans Joenje in Amsterdam belegt (31). Inzwischen sind die Gene für sieben der bisher eindeutig bestätigten Komplementationsgruppen identifiziert. Die Charakteristika dieser Gene und ihrer Produkte sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Caretaker Genen des Menschen fanden sich für die innerhalb der letzten 10 Jahre entdeckten FA-Gene (mit Ausnahme von FANCD2) keine nennenswerten Homologien zu bekannten Genen niedriger Organismen. Diese fehlenden Homologien sowie das überwiegende Fehlen von spezifischen Funktionsdomänen auf der Proteinebene haben die Suche nach möglichen Funktionen der FA-Gene lange Zeit erschwert. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Mehrheit der FA-Gene relativ rezenten evolutionären Ursprungs sind. Joenje und Patel (31) vermuten, dass der phylogenetische Ursprung dieser Gene in der frühen Vertebratenreihe liegt und mit dem Zeitpunkt der Entwicklung eines internen Skelettsystems zusammenfällt.

Beteiligung der FA-Gene an Erkennung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) erfolgt in Säugerzellen vorwiegend auf dem Wege der Rekombinationsreparatur (*homologous recombination* und *non-homologous end-joining*; 3,4). Die FA-Gene sind offenbar an beiden Arten von Rekombinationsreparatur beteiligt. Konkrete Hinweise auf diese Funktion der FA-Gene ergaben sich erst in jüngster Zeit mit der Entdeckung des evolutionär sehr viel älteren FANCD2-Gens, welches eine zentrale Rolle in der Funktionskaskade der FA-Gene spielt (32). Nach DNA-Schädigung wird das FANCD2 Protein offenbar durch einen Proteinkomplex ubiquiniert, der aus

den evolutionär rezenten FA-Genen besteht; dabei spielt das FANCE-Gen als Bindeglied zwischen FANCC und FANCD2 eine wichtige Rolle (33). Die Ubiquinierung von FANCD2 resultiert in seiner Aktivierung, so dass es sich zusammen mit dem Produkt des BRCA1-Gens in sogenannten Kernfoci nachweisen lässt. Diese Kernfoci werden als topographische Marker für die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden und an der DNA-Reparatur beteiligten Proteinkomplexen angesehen, welche sich nach Zellschädigung durch ionisierende Strahlen immunhistochemisch im Zellkern nachweisen lassen (34). Insbesondere nach Schädigung durch ionisierende Strahlung erfolgt die Aktivierung des FANCD2-Proteins überraschenderweise auch auf dem Wege der Phosphorylierung durch das Produkt des ATM-Gens. Dies suggeriert eine direkte Verbindung zwischen den FA-Proteinen und dem System der Doppelstrangbruchreparatur auf dem Wege des sogenannten „nicht-homologen Endjoining“ (35). Mit dieser Querverbindung zum ATM-Gen als einem zentralen Gen der Schadensabwehr und Steuerung der DSB-Reparatur werden Überschneidungen und Überlappungen zwischen den einzelnen Caretaker-Gensystemen offensichtlich.

Das Brustkrebsgen BRCA2 ist ein (sehr seltenes) FA-Gen mit einer zentralen Rolle bei der homologen Rekombinationsreparatur

Ein weiterer ganz entscheidender Hinweis auf die wichtige Rolle der FA-Gene bei der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen war die Entdeckung, dass biallelische Mutationen in dem bereits seit 1995 bekannten Brustkrebsgen BRCA2 den Phänotyp einer Fanconi Anämie bedingen können (36). Hinweise auf das BRCA2-Gen als ein bona fide FA-Gen hatten sich durch Beobachtung ergeben, dass murine Zellen mit inaktivierten BRCA2-Genen chromosomale Instabilität und Chromatid-Austauschfiguren zeigen, wie sie für FA-Zellen typisch sind. (37,38). Wenn man von einer Heterozygotenfrequenz von 1/100 bis 1/200 für BRCA2 Mutationsträger in unserer Bevölkerung ausgeht, so würde man nach der Har-

dy-Weinberg Regel eine Häufigkeit von biallelen Mutationsträgern in der Größenordnung von 1/40000 bis 1/80000 erwarten. In Deutschland wären dies über 1000 Patienten. Tatsächlich weisen aber über 80% der schätzungsweise 200 FA Patienten in Deutschland Mutationen in den anderen FA-Genen und nicht im BRCA2-Gen auf (vgl. Tabelle 2). Dies impliziert dass, wie bei BRCA2-/-Mäusen, die große Mehrzahl der biallelischen Mutationen in diesem Gen beim Menschen bereits im Embryonalstadium letal sein muss. Unter Paaren mit wiederholten spontanen Fehlgeburten sind demnach gehäuft BRCA2-Mutationsträger zu erwarten. Lebensfähig sind biallele Mutationsträger offensichtlich nur, wenn eine Restfunktion des BRCA2 Proteins erhalten bleibt (36). Durch seine BRC-Bindungsdomänen für die RAD51 Rekombinase reguliert das BRCA2-Protein sowohl den Transport dieses Reparaturenzym in den Zellkern, als auch dessen Bindung an die geschädigte DNA (39). Nach Röntgenbestrahlung oder MMC-Exposition bilden sich in Fibroblasten mit biallelischen Mutationen im FANCD1/BRCA2-Gen erwartungsgemäß keine typischen RAD51 Kernfoci (40). Auf Grund seiner engen Interaktion mit der Rekombinase RAD51 spielt das BRCA2 Gen eine entscheidende Rolle in der Korrektur von DSB auf dem Wege der homologen Rekombinationsreparatur (41,42). Durch die Identität von FANCD1 mit BRCA2 ist die direkte Beteiligung der FA-Gene an diesem für die Reparatur von DSB sehr wichtigen Reparaturweg außer Frage gestellt.

Besondere Empfindlichkeit von FA-Zellen gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies

Sowohl die Produkte der BRCA1- als auch der BRCA2- Gene sind an der Transkriptions-abhängigen Reparatur von oxidativ bedingten DNA-Schäden beteiligt (43), was die erhöhte Sensitivität von FA-Zellen gegenüber reaktiven Sauerstoff-Spezies erklären könnte. Die erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit reflektiert eine besondere Empfindlichkeit von FA-Zellen gegenüber der unter Standard-Zellkulturbedingungen herrschenden

Sauerstoffspannung (44). Diese erhöhte Sensitivität von FA-Zellen gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) *in vitro* und *in vivo* wurde vielfach bestätigt (45-49), ohne dass jedoch eindeutige Hinweise auf eine fehlende Detoxifizierung von ROS-Effekten in FA-Zellen gefunden wurden (50-52). Allerdings konnten die ROS-Effekte *in vitro* durch erhöhte Expression von Antioxidantien wie Thioredoxin beeinflusst werden (53). Speziell für das FANCC Gen gibt es bereits experimentelle Hinweise für eine direkte Beteiligung an der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden (54) und für eine Funktion als Redox-Regulator in hämatopoetischen Zellen (55). Während die knock-out Mausmodelle für die A,C, G und D2 FA-Gene überraschenderweise keine Anämie oder Panzytopenie entwickeln, zeigen Mäuse, in denen gleichzeitig Fancd und das Gen für die Cu/Zn Superoxid-Dismutase ausgeschaltet wurden, Störungen der Hämatopoese (56). Dies suggeriert, dass unzureichende Protektion gegen endogen generierte ROS Ursache des Knochenmarksversagens bei FA-Patienten sein könnte. Auf Grund der Beteiligung von BRCA1 und BRCA2 an der Reparatur von oxidativ bedingten Schäden erscheint es insgesamt plausibel, dass die Sauerstoff-Überempfindlichkeit von FA-Zellen weniger auf einer ungenügenden Detoxifizierung von ROS sondern vielmehr auf einer unzureichenden Reparatur von ROS-induzierten DNA-Schäden beruht (57). Die Minimierung dieser Art von Schädigung, möglicherweise mit gezielter pharmakologischer Unterstützung, muss daher ein vordringliches Ziel der medizinischen Betreuung von FA-Patienten sein (58).

Rolle der FA-Gene bei der Schadensbehebung: Modifikation der Chromatinstruktur?

Voraussetzung für die Behebung von DNA-Schäden *in vivo* ist eine Modifizierung der Chromatinstruktur, um den an der Reparatur beteiligten Multi-Proteinkomplexen Zugang zu den Läsionen ermöglichen. Deutliche Hinweise auf die Beteiligung der FA-Proteine an der Modifizierung der Chromatinstruktur ergeben sich durch In-

teraktionsstudien im Hefe-Hybrid System (Reuter et al, in dieser *edition* S.89–95), sowie durch die Verbindungen zwischen den BRCA1 und BRCA2 Proteinen zu Komponenten des SWI/SNF Chromatin-Remodulierungs-Komplexes und zu den Azetylasen, Deazetylasen, Phosphatasen und Kinasen, welche auf dem Wege der Histon-Modifikation an Änderungen der Chromatinstruktur beteiligt sind (59-61). Die darüber hinaus zu der ATM-Kinase und der Bloom Syndrome Helikase bestehenden Beziehungen (35,62) weisen darauf hin, dass eine Vielzahl von Caretaker Genen bei der Schadenserkennung und Schadensbehebung in unseren Zellkernen zusammenarbeiten. Je nach Art des Insultes werden dabei unterschiedliche Komponenten eines extensiven Caretaker-Proteinnetzwerkes rekrutiert und aktiviert (Demuth et al., in dieser *edition* S.17-23).

Sowohl die Caretaker Gene BRCA1 und BRCA2 als auch die meisten der FA-Gene (vgl. Tab. 2) sind evolutionär rezente Additionen zum Vertebraten-genom. Sie verstärken und erweitern die phylogenetisch alten Abwehrmechanismen gegenüber DNA-Schäden und ermöglichen damit die außergewöhnliche Langlebigkeit von hochentwickelten Vertebraten (63). Auf Grund dieser Erkenntnisse wird verständlich, warum Menschen mit Mutationen in Caretaker Genen ein erhöhtes Risiko für die Persistenz von DNA-Schäden und, daraus folgend, ein erhöhtes Risiko für neoplastische Zelltransformation, Zellalterung und Zelluntergang haben. Um angesichts der ständigen exogenen und endogenen Schädigung unseres Genoms die Funktion eines so langlebigen Organismus überhaupt aufrecht erhalten zu können, mussten sich die Caretaker Gene als Genfamilien mit einem hohen Grad an Austauschbarkeit und Redundanz entwickeln. Diese Redundanz ermöglicht vermutlich das Überleben von Patienten mit gravierenden Mutationen in diesen Genen und weist gleichzeitig darauf hin, dass dem Schutz der Patienten vor endogener und exogener DNA-Schädigung eine hohe präventive Priorität zukommt.

Letztlich zeigt sich am Beispiel der menschlichen Caretaker Gene wieder einmal sehr eindrücklich, dass die Erforschung der genetischen und pathophysiologischen Grundlagen seltener monogener Erkrankungen des Menschen („orphan diseases“) eine wichtige Voraussetzung zum Verständnis der häufigen und multifaktoriellen Gesundheitsstörungen (z.B. Krebserkrankungen) ist. Offensichtlich wichtige molekulare Mechanismen der Krebsentstehung können durch die Aufklärung der protektiven Funktionen der Fanconi Anämie Gene in der Abwehr oxidativ bedingter DNA-Läsionen hinsichtlich ihrer pathogenetischen Bedeutung besser eingeschätzt und für die Prävention von Krebserkrankungen zugänglich gemacht werden.

Literatur

1. Kulozik AE, Hentze MW, Hagemeyer C, Bartlam CR (2000) Molekulare Medizin. Walter de Gruyter, Berlin / New York, Seite 129
2. Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer susceptibility genes: gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761-3
3. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2:196-206
4. Kanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247-54
5. Auerbach AD, Allen RG (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
6. Alter BP (1996) Fanconi's anemia and malignancies. *Am J Hematol* 53:99-110
7. Auerbach AD et al. (1982) Acute myeloid leukemia as the first hematologic manifestation of Fanconi anemia. *Am J Hematol* 12:289-300
8. Oksuzoglu B, Yalcin S (2002) Squamous cell carcinoma of the tongue in a patient with Fanconi's anemia: case report and review of the literature. *Ann Hematol* 81:294-8
9. Carvalho JP, Dias ML, Carvalho FM, Del Pilar Estevez Diz M, Petit JW (2002) Squamous cell vulvar carcinoma associated with Fanconi's anemia: a case report. *Int J Cancer* 12:220-2
10. Millen FJ, Rainey MG, Hows JM et al. (1997) Oral squamous cell carcinoma after allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Br J Haematol* 99:410-14
11. Touraine RL, Bertrand Y, Foray P, Gilly J, Philippe N (1993) Hepatic tumors during androgen

therapy in Fanconi anemia. *Eur J Pediatr* 152 :691-3

12. Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G (1989) Fanconi Anemia. *Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects*. Springer-Verlag, Heidelberg Berlin

13. Young NS, Alter BP (1994) Aplastic anemia, acquired and inherited.. WB Saunders, Philadelphia

14. Giampetro PF, Adler-Becher B, Verlander PC et al. (1993) The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatr* 91:1116-20

15. Gillio AP, Verlander PC, Batish SD et al. (1997) Phenotypic consequences of mutations in the Fanconi anemia FAC gene: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 90:105-110

16. Wajnrajch MP, Gertner JM, Huma Z et al. (2001) Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia registry. *Pediatr* 107:744-54

17. Alter BP, Frissora CL, Halperin DS et al. (1991) Fanconi anemia and pregnancy. *Br J Hematol* 77:410-18

18. Shultz JC, Shahidi NT (1993) Tumor necrosis factor alpha overproduction in Fanconi's anemia. *Am J Hematol* 42:196-201

19. Cassinat B, Guardiola P, Chevret S et al. (2000) Constitutive elevation of serum alpha-fetoprotein in Fanconi anemia. *Blood* 96:859-63

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

21. Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ et al. (1998) DNA crosslinker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood* 91: 275-87

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

23. Akkari YM, Bateman RL, Reifsteck CA et al. (2001) The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase. *Mol Genet Metab* 74:403-12

24. Schindler D, Hoehn H (1999) Flowcytometric diagnosis of chromosome instability syndromes. In: *Diagnostic Cytogenetics* (Wegner M, ed) Springer, Berlin, p345-60

25. Joenje H, Arwert F, Kwee ML, Madan K, Hoehn H (1998) Confounding factors in the diagnosis of Fanconi anemia. *Am J Med Genet* 79:403-5

26. Berger R, Jonveaux P (1996) Clonal chromosome abnormalities in Fanconi anemia. *Hematol Cell Ther* 38:291-196

27. Alter BP, Scalise A, McCombs J, Najfeld V (1993) Clonal chromosomal abnormalities in Fanconi's anemia: what do they really mean? *Br J Haematol* 85:627-30

28. Alter BP, Caruso JP, Drachtman RA, Uchida T, Velagalet GV, Elghetany MT (2000) Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 117:125-31
29. Smith MT, Zhang L, Jeng M, Wang Y, guo W, Duramad P, Hubbard AE, Hofstadler G, Holland NT (2000) Hydroquinone, a benzen metabolite, increases the level of aneusomy of chromosomes 7 and 8 in human CD34 positive blood progenitor cells. *Carcinogenesis* 21:1485-90
30. McDonald TA, Holland NT, Skibola C, Duramad P, Smith MT (2001) Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukaemia. *Leukemia* 15:10-20
31. Joenje H, Patel KJ (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Nat Rev Genet* 2:446-59
32. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S et al. (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7:249-62
33. Pace P, Johnson M, Tan WM et al. (2002) FANCE : the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity. *EMBO J* 21:3414-23
34. 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 USA* 92:2298-2302
35. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B et al. (2002) Convergence of the Fanconi anemia and Ataxia telangiectasia signalling pathways. *Cell* 109:459-72
36. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S et al. (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297:606-9
37. Patel KJ, Yu VP, Lee H et al. (1998) Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* 347-57
38. Yu VPCC, Koehler M, Steinlein C et al. (2000) Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Development* 14:1400-06
39. Davies AA, Masson JY, McIlwraith et al. (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and repair protein. *Mol Cell* 7:273-82
40. 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
41. 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
42. Kerr P and Ashworth A (2001) New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Current Biol* 11:R668-R676
43. Le Page F, Randrianarison V, Marot D et al. (2000) BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* 60:5548-52
44. Joenje H, Arwert F, Eriksson AW et al. (1981) Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anemia. *Nature* 290:142-43
45. Schindler D, Hoehn H (1988) Fanconi anemia mutations causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am J Hum Genet* 43:429-35
46. Saito H, Hammond AT, Moses RE (1993) Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells. *Mutat Res* 294:255-62
47. Poot M, Gross O, Epe B et al. (1996) Cell cycle defect in connection with oxygen and iron sensitivity in Fanconi anemia lymphoblastoid cells. *Exp Cell Res* 222:262-68
48. Pagano G, Korkina LG, Degan P et al. (1997) In vitro hypersensitivity to oxygen in Fanconi anemia cells is linked to ex vivo evidence for oxidative stress in FA homozygotes and heterozygotes. *Blood* 89:1111-2
49. Liebetrau W, Runger TM, Mehling BE et al. (1997) Mutagenic activity of ambient oxygen and mitomycin C in Fanconi's anemia cells. *Mutagenesis* 12:69-77
50. Gille JJP, Wortelboer HM, Joenje H (1987) Antioxidant status of Fanconi anemia fibroblasts. *Hum Genet* 77:28-31
51. Will O, Schindler D, Boiteux S, Epe B (1998) Fanconi's anemia cells have normal steady-state levels and repair of oxidative DNA base modifications sensitive to Fpg protein. *Mutat Res* 409:65-72
52. Zunino A, Degan P, Vigo T et al. (2001) Hydrogen peroxide: effects on DNA, chromosomes, cell cycle and apoptosis induction in Fanconi's anemia cell lines. *Mutagenesis* 16:283-8
53. Ruppitsch W, Meisslitzer C, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M (1998) Overexpression of thioredoxin in Fanconi anemia fibroblasts prevents the cytotoxic and DNA damaging effect of mitomycin C and diepoxybutane. *FEBS Lett* 422:99-102
54. Lackinger D, Ruppitsch W, Ramirez MH, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M (1998) Involvement of the Fanconi anemia protein FA-C in repair processes of oxidative DNA damages. *FEBS Lett* 440:103-6
55. Cumming RC, Lightfoot J, Beard K et al. (2001) Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat Med* 7:814-20
56. Hadjur S, Ung K, Wadsworth L et al. (2001) Defective hematopoiesis and hepatic steatosis in mice with combined deficiencies of the genes encoding Fancc and Cu/Zn superoxide dismutase. *Blood* 98:1003-11
57. D'Andrea AD (2001) Cellular function of the Fanconi anemia pathway. *Nat Med* 7:1259
58. Pagano G, Korkina LG (2000) Prospects for nutritional intervention in the clinical management of Fanconi anemia. *Cancer Causes Control* 11:881-9
59. Bochar DA, Wang L, Beniya H et al. (2000) BRCA1 is associated with a human SWI/SNF – related complex: linking chromatin remodelling to breast cancer. *Cell* 102:257-65
60. Futaki M, Liu JM (2001) Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex. *Trends Mol Med* 7:560-5
61. Marmorstein LY, Kinev AV, Chan GK et al. (2001) A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell* 104:247-57
62. Wang Y, Cortez D, Yazdi P et al. (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14:927-39
63. Venkitesan AR (2001) Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* 114:3591-8