

Anwendung des Hefe-„Two Hybrid“-Systems zur Aufklärung der Funktion der Fanconi Anämie-Proteine

Tanja Reuter, Sabine Herterich, Oliver Bernhard, Hans J. Gross

Zusammenfassung

Die Fanconi Anämie-Gene *FANCA*, *FANCC* und *FANCG* zeigen keine nennenswerten Homologien zu evolutionär konservierten Genen. Ein Beitrag zur Aufklärung ihrer Funktion kann die Identifikation interagierender Proteine liefern. Eine bewährte Methode hierfür ist das Screening einer cDNA-Bibliothek unter Anwendung des Hefe-Two-Hybrid-Systems. Auf diesem Wege können cDNAs isoliert werden, deren Produkte mit den FA-Proteinen *in vivo* in der Hefe interagieren. Eine HeLa-cDNA-Expressionsbibliothek wurde mit Vollängenklonen von *FANCC*, bzw. *FANCA* gescreent. Aus insgesamt 12 Mio. Cotransformanten wurden 27 cDNAs für potentiell interagierende Proteine, sogenannte Beute-Proteine, isoliert. In Kontrollversuchen wurde in allen Fällen bestätigt, dass die Interaktion von der Expression des Beuteproteins abhängig und somit spezifisch ist. Einige der isolierten Beute-Proteine interagierten im Hefe-Two-Hybrid-System außerdem mit einem oder zwei weiteren der getesteten FA-Proteine, *FANCA*, *FANCC* und *FANCG*, jedoch nicht mit als Kontrolle verwendeten Fremd-Ködern. Bei sieben der isolierten Interaktoren handelte es sich um zuvor unbekannte Proteine, 20 kodieren für Proteine mit beschriebenen Funktionen. Zwei von diesen nehmen eine Aufgabe im Kerntransport wahr, anderen ist eine Funktion bei der Abwehr oxidativer Schädigung gemeinsam. Zwei weitere Beute-Proteine besitzen Kinase-Eigenschaften. Eine überraschend große Zahl der Interaktoren erfüllen eine Chromatin-modifizierende Aufgabe oder sind mit einer solchen Funktion assoziiert. Basierend auf diesem Ergebnis wird eine Hypothese formuliert, welche eine Störung der notwendigen Chromatin-Modifikation bei Prozessen wie DNA-Reparatur, Replikation und/oder Rekombination als Ursache der erhöhten genomischen Instabilität in FA-Zellen postuliert.

Schlüsselwörter

Fanconi Anämie, *FANCA*, *FANCC*, *FANCG*, Hefe-Two-Hybrid-System, Fanconi Anämie Proteine, Interaktoren, Chromatin-Modifikation

Summary

*From the viewpoint of evolution, the genes defective in Fanconi Anemia (FA) complementation groups A, C, and G are relatively young since they lack substantial homologies to genes of lower organisms. An effective way to elucidate the function of such orphan genes consists in the application of the interaction trap yeast two hybrid system to isolate putative interactors of the FA proteins. A HeLa cDNA expression library was screened for interactors using full length *FANCC*, respectively *FANCA* as baits. Of a total number of 12 million cotransformants 27 different prey cDNAs were isolated. In control assays it was confirmed that the interactor phenotypes of these 27 yeast bait/prey cotransformants are all dependent on expression of the prey protein. Some of these prey proteins interact in the yeast two hybrid system with two or all three of the tested FA proteins, *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* but not with unrelated control baits. 7 of the isolated clones are identical to EST sequences, 20 of them encode for parts of known proteins. Among these known interacting proteins are two serine/threonine kinases as well as two proteins that may be involved in oxygen radical defense. Two others are part of the nuclear import machinery. Most of the other proteins have a function associated to the chromatin modifying machinery. Because of the surprisingly high number of two hybrid interactors which are associated with the latter function we suggest that the FA proteins maybe involved or connected to chromatin remodeling or assembly and that the genomic instability of FA patient cell lines may reflect defective chromatin modification.*

Keywords

Fanconi anemia, yeast two hybrid system, interaction trap, Fanconi anemia proteins, chromatin modification, chromatin assembly

1. Einleitung

Im Vergleich zu anderen Caretaker-Gen Syndromen, welche auf Defekten in evolutionär hoch-konservierten Genen mit bereits bekannter Funktion beruhen, steht die vollständige Aufklärung der Funktion der evolutionär relativ rezenten FA-Gene noch aus. FA-Patienten leiden an progressivem Versagen der Blutbildung im Knochenmark, prä- und postnatalem Minderwuchs und kongenitalen Missbildungen. Das Risiko, an Tumorbildungen verschiedenster Art zu erkranken, ist stark erhöht, wobei die akute myeloische Leukämie die häufigste Krebsform ist (Glanz und Fraser, 1982; Schroeder, 1982; Auerbach und Allen, 1991; Strathdee und Buchwald, 1992). Doch nicht nur das klinische Bild ist variabel, auch auf zellulärer Ebene ist der FA-Phänotyp mannigfaltig und variantenreich. FA-Zellen in Kultur zeigen einen spezifischen Phänotyp, der die mögliche Beteiligung der FA-Proteine an der Aufrechterhaltung der Stabilität unseres Genoms suggeriert. FA-Zellen zeigen eine erhöhte spontane chromosomale Aberrationsrate, Sauerstoffempfindlichkeit, langsames Wachstum aufgrund verlängerter und teilweise arretierter S- und G2-Phasen des Zellzyklus, apoptotische Abnormalitäten sowie eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber quervernetzenden Agenzien, wie Mitomycin C (MMC) (Schroeder et al. 1964; Schindler und Hoehn 1988; Sasaki und Tonomura, 1973; Ishida und Buchwald, 1982).

Auf genetischer Ebene ist inzwischen bekannt, dass FA durch Defekte in jeweils einem von mindestens acht unterschiedlichen Genen hervorgerufen wird (Strathdee et al. 1992; Lo Ten Foe, 1996; Fanconi Anemia/Breast Cancer Consortium; 1996; de Winter et al. 1998; Waisfisz et al. 1999; De Winter et al. 1999; Timmers et al. 1999; Timmers et al, 2001; Howlett et al, 2002). Außer bei *FANCD2*- und *FANCD1/BRCA2*-Genen handelt es sich um evolutionär rezente Gene ohne Homologien zu bekannten Sequenzen in den Datenbanken. Obwohl bisher noch unbekannt ist, in welchem zellulären Prozess die FA-Proteine eine Rolle spielen, erbrachten neuere Arbeiten wichtige Hinweise auf die Art und Weise ihrer Funktion. Es wurde

gezeigt, dass die FA-Proteine, FANCA, C, G, F und E miteinander sequenziell zu einem nukleären Komplex zusammengefügt werden, welcher daraufhin die Ubiquitinierung von FANCD2 vermittelt. Dabei interagieren FANCA, C und G, in Abhängigkeit von der Phosphorylierung von FANCA, bereits im Cytoplasma miteinander, gelangen dann in den Zellkern und bilden hier zusammen mit FANCE und FANCF den sogenannten FA-„Core“-Komplex (Kupfer et al. 1997; Waisfisz et al. 1999; Garcia-Higuera et al. 1999; Kruyt et al, 1999; Reuter et al. 2000; Medhurst et al. 2001; Übersicht in Joenje und Patel, 2001). Dabei scheint insbesondere dem FANCE-Protein eine wichtige Verbindungsfunktion zwischen dem FA-Proteinkomplex und dem „Effektor“-Protein FANCD2 zuzukommen (Pace et al, 2002).

Ein Beitrag zur Aufklärung der Funktion des FA-Komplexes und zu dessen Einordnung in den Metabolismus der Zelle kann die Identifikation interagierender Proteine liefern. Eine bewährte Methode hierfür ist das Screening einer cDNA-Bibliothek unter Anwendung des Hefe-„Two-Hybrid“-Systems. In dieser Arbeit wurden 12 Mio Kotransformanten einer Hela cDNA Bibliothek nach Interaktoren der FANCA- und FANCC-Proteine gescreent. Die 27 isolierten Interaktoren wurden anschließend auch auf Interaktion mit FANCG, sowie auf wechselseitige Interaktion mit FANCA, bzw. FANCC getestet. Die Analyse der Interaktoren ergab zum einen das Vorhandensein von Proteinen, welche möglicherweise Prozesse wie Phosphorylierung oder Kernimport der FA-Proteine vermitteln, zum anderen wurde eine erstaunlich große Zahl von Interaktoren isoliert, die im Zusammenhang mit der Modifizierung von Chromatin stehen. Auf Grund dieser Ergebnisse wird postuliert, dass die chromosomale Instabilität bei FA-Zellen auf einem Defekt der Chromatin-modifizierenden Prozesse beruht, der möglicherweise im Zusammenhang mit elementaren Zellprozessen wie DNA-Reparatur, Replikation und/oder Rekombination steht und somit Auswirkungen auf die Integrität des zellulären Genoms hat.

2. Methoden

2.1 Durchführung des „Interaction Trap“-Hefe-„Two Hybrid“-Systems

Für Genbank-Transformationen von Hefen wurde die Hocheffizienz-Transformation nach Schiestl und Gietz (1996) sowie Finley und Brent (1996) eingesetzt. Für die Transformation mit nur einem Plasmid war die schnellere Standard-Transformation nach Gietz and Woods (1994) ausreichend effizient. Mit dieser Methode wurden bei hoher Plasmid-Konzentration (mind. 0,5 µg/µl) und ausreichenden Hefezellmengen auch bei gleichzeitiger Transformation mit zwei Plasmiden noch genügend hohe Transformationsraten erreicht. Für die Kennzeichnung der Nährstoffzusammensetzung von Medien wurde folgender Schlüssel verwendet: Glu, GalHTL = Glukose-, bzw. Galaktose-haltiges Medium mit einer Defizienz folgender Aminosäuren: H (Histidin), T (Tryptophan), L (Leucin). Der Hefestamm EGY48 wurde zunächst mit einem der pEG202-Vektoren (vermittelt Wachstum auf Histidin-freiem Medium), der ein LexA-Fusionsprotein als „Köder“ kodiert, transformiert. Die transformierten Hefen wurden durch Ausstrich vereinzelt, eine Einzelkolonie in Flüssigkultur vermehrt und mit der HeLa-cDNA-Fusions-Genbank im Vektor pJG4-5 (Beutevektor, vermittelt Wachstum auf Tryptophan-freiem Medium) transformiert. 1/200 der Suspension wurde auf einer kleinen GluHT-Platte zur Bestimmung der Transformations-Effizienz ausplattiert. Der Rest der Suspension wurde mit Glasperlen auf mehreren großen GluHT-Platten ausplattiert und, mit Parafilm umwickelt, drei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert. Transformanten-Kolonien auf GluHT-Platten wurden für die Selektion auf Galaktose-abhängigen Leu⁺-Phänotyp (Wachstum auf Leucin-defizientem Medium) zunächst geerntet. Platten von verschiedenen Transformationen wurden getrennt behandelt.

2.2 Aufnahmen transformierter Hefen

Nach dem Auszählen der Hefekolonien wurden die Platten zum besseren Härten des Agars für einige Stunden bei 5°C gelagert. Anschließend wurden sie mit 5 ml ddH₂O geflutet und

die Hefen durch Schaben mit dem Drygalski-Spatel suspendiert. Die Suspension wurde durch Schrägstellen der Platte mit einer Glaspipette abgenommen, die Suspension anschließend zentrifugiert und das Hefesediment nochmals mit 10 ml ddH₂O gewaschen. Das Hefesediment wurde mit dem doppelten Volumen 40% Glycerin versetzt, in 1 ml Aliquote aufgeteilt, dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3 Selektion von Hefen mit Galaktose-abhängigem Leu⁺-Phänotyp

Die Plattierungseffizienz der Bibliotheks-Transformanten bei der Selektion auf den Galaktose-abhängigen Leu⁺-Phänotyp war höher, wenn vorher die Expression des Beute-Fusionsproteins induziert wurde. Hierzu wurden je 100 µl der eingefrorenen Aliquote 8h bei 30°C in 10ml 2% Galaktose-haltigem Minimalmedium geschüttelt. Anschließend wurde abzentrifugiert und das Zellsediment in 800 µl ddH₂O aufgenommen. Um den Titer an Hefen mit Galaktose-abhängigen Leu⁺-Phänotyp aus der Transformation zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen auf GalHT- bzw. GalHTL-Medium ausplattiert. Für Selektionen im größeren Maßstab wurden die induzierten Hefen mit Glasperlen auf große GalHTL-Platten ausplattiert. Nach drei bis fünf Tagen konnten die auf den Leucin-defizienten Platten wachsenden Hefekolonien isoliert werden.

2.4 Identifizierung von Hefen mit Glukose-induziertem Leu⁺-Phänotyp

Hefen, die Galaktose-abhängig auf Leucin-defizientem Medium wachsen, müssen aufgrund der Repression des Beuteprotein-Promotors auf Glukose-haltigem Leucin-defizientem Medium eine starke Inhibierung ihres Wachstums aufweisen. Nur dann kann davon ausgegangen werden, dass der Leu⁺-Phänotyp auf einer Interaktion zwischen Köder- und Beute-Fusionsprotein beruht. Hierfür wurden von der GalHTL-Platte gepickte Hefeklonen in ddH₂O suspendiert und in je drei Verdünnungen auf folgende Selektionsplatten aufgetropft: GluHT, GalHTL, GluHTL.

2.5 Plasmid-Isolierung aus

S. cerevisiae

10ml Hefekultur einer 18h gewachsenen Kultur ($A_{600} = 0,8$ bis $1,5$) wurden abzentrifugiert und in $500 \mu\text{l}$ S-Puffer ($10\text{mM K}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH}7,2$, $10\text{mM Na}_2\text{EDTA}$, $50 \text{mM } (\beta\text{-Mercaptoethanol})$) mit 300 bis 500 Units Lyticase suspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 30°C für 30 bis 90min bis Schlierenbildung beobachtet wurde. Anschließend wurden $100\mu\text{l}$ Lyse-Puffer ($25 \text{mM Tris/HCl pH } 7,5$, $25 \text{mM Na}_2\text{EDTA}$, $2,5 \%$ SDS) zugegeben, durch Vortexen gemischt, und die Hefe-Sphäroblasten durch Inkubation bei 65°C für 30min lysiert. Proteine wurden durch Zugabe von $170 \mu\text{l}$ $3 \text{M Natriumacetat (pH } 5,5)$ und 10 bis 20min Inkubation auf Eis gefällt und durch Zentrifugieren (17000Upm , 10min) sedimentiert. Der Überstand wurde mit $800 \mu\text{l}$ Isopropanol versetzt, die präzipitierte DNA sedimentiert, mit 70% EtOH gewaschen und in $40 \mu\text{l ddH}_2\text{O}$ gelöst. $7 \mu\text{l}$ einer solchen DNA-Präparation wurden für die Transformation von *E. coli*-Zellen eingesetzt. Für die Isolierung des Beute-Plasmids aus Hefen, die außerdem das Köder-Plasmid enthielten, wurden Einzelkolonien in GluT-Medium angeimpft, in welchem ausschließlich auf das Beuteplasmid selektiert wird. Nach etwa 18h Wachstum wurden $4 \mu\text{l}$ dieser Kultur in 10ml frisches GluT-Medium übergeimpft. Durch zweimalige Wiederholung dieser Prozedur wurde eine selektive Anreicherung des Beute-Plasmids in der Kultur erreicht.

2.6 „Mating“-Test

Prinzip dieser Methode ist die Fusion haploider Hefezellen unterschiedlichen Paarungstyps („mating type“) zu diploiden Zellen. Werden Köder- und Beuteprotein von Hefestämmen unterschiedlichen Paarungstyps exprimiert und diese Stämme zur Fusion gebracht, kann in den jetzt diploiden Hefen die Interaktion der beiden Proteine untersucht werden.

Mit verschiedenen Köderplasmiden transformierte EGY48-Hefen („mating type“ α) wurden in dünnen parallelen Strichen mit einem Abstand von mind. 1cm auf eine GluH-Platte aufgetragen; mit Beuteplasmiden transformierte RFY206-Hefen („mating

type“ α) in der gleichen Weise auf eine GluT-Platte. Nach 2 Tagen erfolgte mittels eines sterilen Rundfilters ein Abklatsch auf eine Vollmedium-Platte. Dabei wurde der Filter zuerst auf die GluT-Platte mit den RFY206-Hefen und dann um 90° gedreht auf die GluH-Platte mit den EGY48-Hefen aufgelegt. Die Vollmedium-Platte wurde anschließend über Nacht bei 30°C inkubiert. An den Kreuzungspunkten der strichweise aufgetragenen Hefestämme unterschiedlichen Mating Typs erfolgt durch diese Prozedur Fusion und Konjugation der Zellen. Am nächsten Morgen wurde von der Vollmedium-Platte wiederum ein Filterabklatsch auf Platten folgender Zusammensetzung durchgeführt: GluHT, GluHTL und GalHTL. Anhand des Wachstums der diploiden Hefen auf Leucin-defizienten Platten können Interaktionen zwischen Köder- und Beute-Proteinen festgestellt werden. Für „Mating“-Tests auf Aktivierung des LacZ-Reporters (Blaufärbung der Hefen) wurde in einen der beiden Stämme zusätzlich das pSH18-34-Plasmid eingebracht und die entsprechenden Hefen dann auf Uracil-defizientem Medium gezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Suche nach FA-Protein-Interaktoren im „Interaction Trap“

Die Interaktoren-Suche erfolgte im „Interaction Trap“, einer Version des Hefe-„Two Hybrid“-Systems, bei der eines der interagierenden Proteine, der sog. Köder, an die LexA-DNA-bindende Domäne fusioniert ist, das andere (Beute) an die B42-transkriptionsaktivierende Domäne. Eine Interaktion der beiden Proteine bringt DNA-bindende und transkriptionsaktivierende Domäne in räumliche Nähe zueinander, und rekonstituiert damit einen funktionellen Transkriptionsaktivator. Hieraus resultiert die Expression eines Reportergens, was als Nachweis der Interaktion gewertet wird (Gyuris et al. 1993). Trotz schwieriger Handhabung wurde besonderer Wert darauf gelegt, Vollklonen im „Two Hybrid“-System einzusetzen. Da keine besonderen funktionellen Domänen von FANCA, FANCC und FANCG bekannt sind wurde somit sichergestellt, dass keine essentiellen

Interaktionsdomänen unterbrochen waren. Immunologisch konnte im Western-Blot gezeigt werden, dass die Fusionsproteine in der Hefe in ihrer vollen Länge exprimiert werden.

In vorbereitenden Versuchen zeigte sich, dass ausschließlich FANCA und FANCC für die Interaktoren-Suche mit der vorliegenden B42-fusionierten cDNA-Bibliothek geeignet waren. FANCG dagegen bewirkte in der Fusion mit der DNA-bindenden Domäne bereits ohne Interaktionspartner die Reporter-gen-Aktivierung und eignete sich daher nicht als Köderprotein. Die transkriptionsaktivierende Eigenschaft von FANCG in der Hefe wurde hinsichtlich einer möglichen physiologischen Relevanz auch im Säugerzell-System untersucht, bestätigte sich hier jedoch nicht. Auch eine Koexpression von FANCA und FANCC mit FANCG, was der Rekonstituierung des putativen FA-prä-„Core“-Komplexes dienen sollte, führte nicht zu einem positiven Ergebnis. Vermutlich handelte es sich demnach entweder um ein „Two Hybrid“-Artefakt oder die Verhältnisse im Säugerzell-System sind ungleich komplizierteren regulatorischen Mechanismen unterworfen, was den Nachweis einer möglichen transkriptionsaktivierenden Wirkung von FANCG erschweren könnte.

Sowohl für FANCA, wie auch für FANCC wurden mindestens 6×10^6 Transformanten einer HeLa-cDNA-Beute-Bibliothek auf einen Reporter-gen-vermittelten Interaktionsphänotyp untersucht. Bei dieser Zahl ist zu erwarten, dass ein repräsentativer Anteil der in der Bibliothek vertretenen cDNAs in den transformierten Hefen exprimiert wird. Die „Two Hybrid“-Suche resultierte in der Isolierung von 137 Beuteplasmiden, die für potentielle Interaktoren von FANCA oder FANCC codieren. Über Retransformationsexperimente wurden Interaktionsphänotypen und Interaktorspezifitäten verifiziert und falsch-positive Interaktoren aussortiert. Nach Sequenzierung und Identifizierung identischer Beuteklone blieben von ursprünglich 180 untersuchten Hefekolonien zunächst 67 unterschiedliche Interaktoren, wovon 14 mit FANCC und 53 mit FANCA als Köder identifiziert worden waren (Tab. 1).

Tab 1 Ablauf des „Interaction Trap“-Hefe-„Two Hybrid“-Systems und Anzahl der an den einzelnen Stationen bearbeiteten Interaktoren

Köder im „Interaction Trap“	FANCC	FANCA
Ursprüngliche Zahl untersuchter Hefe-Kolonien mit Interaktionsphänotyp	60	120
Interaktionsphänotypen mit Abhängigkeit von der Expression des Beuteproteins	56	116
Isolierte Beuteplasmide	46	98
Unterschiedliche Beuteplasmide	24	81
Beuteklone mit Köder-spezifischem Phänotyp in Retransformationen	18	81
Bibliothek-cDNAs mit unterschiedlichen Sequenzen	14	53
Interaktoren mit möglichem Zusammenhang mit dem FA-Phänotyp, nach Aussortierung von „Two Hybrid“-Falsch-positiven	5	23
Interaktoren mit Homologien zu bekannten Sequenzen	2	19
Interaktoren mit Homologien zu „expressed sequence tags“, bei denen keine Information über das codierte Polypeptid vorlag	3	4

3.2 Validierung von Interaktoren im Hefe-„Two Hybrid“-System

Zahlreiche Versuche im „Two Hybrid“-System lieferten Ergebnisse, die eine Einteilung der isolierten Interaktoren nach falsch-positiven und putativ-relevanten Interaktoren gestattete. Bereits vor der Plasmidisolierung wurden Hefeklone, die zu einer Reporter-gen-Aktivierung führten, daraufhin überprüft, ob eine Abhängigkeit dieses Phänotyps von der Expression des Beuteproteins bestand. Hierbei wurde davon profitiert, dass die Synthese des cDNA-codierten Bibliothekproteins durch einen Galaktose-induzierbaren und Glukose-reprimierbaren Promotor kontrolliert wird, so dass durch die Wahl der Kohlenstoffquelle im Medium die Expression des Beuteproteins unterdrückt, bzw. gefördert werden kann. Der Interaktionsphänotyp sollte dann auf Galaktose-Medium stärker sein als auf Glukose-Medium. Weitere Kontrollversuche erfolgten erst nach Isolierung der Beuteplasmide in Form von Retransformationen in Hefen in Kombinationen mit dem ursprünglichen Köder und mit einem Fremdköder. Diese Versuche dienten der Überprüfung der Spezifität der „Two Hybrid“-Interaktion mit dem jeweiligen Köder. Nach partieller Sequenzierung der Bibliothek-cDNAs wurden Interaktoren aussortiert, die bekanntermaßen in „Two Hybrid“-Systemen falsch-positiv reagieren. An zwei Stationen im Verlauf des „Interaction Traps“ wurden identische Beuteklone identifiziert: Dies erfolgte zunächst direkt nach Isolierung der Beuteplasmide durch Restriktionsanalyse sowie eine

modifizierte Methode der Sanger-Sequenzierung, bei der nur eines der Nukleotid-Analoga eingesetzt wurde. Andere Beuteklone stellten sich erst nach Erhalt der Sequenz-Information der Bibliothek-cDNAs als identisch heraus. So blieben letztendlich für FANCC fünf, für FANCA 23 unterschiedliche und spezifische Interaktoren. Tab. 1 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der an den einzelnen Stationen im „Interaction Trap“ untersuchten und eliminierten FANCA- und FANCC- Beuteproteine.

Bei der Durchführung der „Two Hybrid“-Suchen nach FANCA-, respektive FANCC-Interaktoren zeigten sich signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Köder. Der deutlichste Unterschied war der prozentuale Anteil an Hefe-Transformanten, die zu einer Reporter-gen-Aktivierung führten: dieser lag bei FANCA mit einem Wert von fast 3 % deutlich höher als bei FANCC mit 0,14 %. Die Auswertung von Literaturdaten nach Sequenzierung der Interaktoren zeigte, dass der erhöhte Wert bei FANCA nicht mit einer häufigeren Isolierung falsch-positiver „Two Hybrid“-Interaktoren zusammenhing, sondern eine generell höhere Anzahl des sehr großen FANCA-Polypeptids an Protein-Wechselwirkungen reflektierte.

3.3 Etablierung eines Interaktionsnetzwerkes zwischen FANCA, FANCC und FANCG-Interaktoren

Mit den isolierten Interaktoren, sowie den FA-Proteinen untereinander wurden weitere „Two Hybrid“-Analysen

durchgeführt. Nachdem zuvor nur mit haploiden Hefen gearbeitet worden war, wurden die Interaktionen jetzt auch in diploiden Hefen untersucht, in denen die verwendeten Reporter eine allgemein geringere Sensitivität zeigten. Aus diesem Grunde konnte auch FANCG in diese Versuche miteinbezogen werden, da sich hier die intrinsische transaktivierende Eigenschaft der LexA-FANCG-Fusion nur sehr schwach auswirkte.

Eine FANCA-FANCG sowie FANCA-FANCC-Wechselwirkung war bereits zuvor durch Coimmunpräzipitation gezeigt worden (Garcia-Higuera et al. 1999; Waisfisz et al. 1999) und beide Interaktionen konnten auch im Hefe-„Two Hybrid“-System nachgewiesen werden, wobei jedoch die FANCA-FANCC Wechselwirkung nur zu einer sehr schwachen Aktivierung der Reporter gene führt (Reuter et al. 2000). Da die Interaktionen der FA-Proteine untereinander vermuten ließen, dass es auch unter den isolierten Interaktoren Proteine gab, die mit mehr als einem der FA-Proteine wechselwirken und möglicherweise Teil des FA-Komplexes sein könnten, wurden auch kreuzweise Retransformationen der isolierten Beuten mit allen drei Ködern durchgeführt. Einige Bibliothek-cDNAs wurden außerdem in den Ködervektor umklontiert, so dass ein Interaktionsnachweis auch in der umgekehrten Köder-/Beute-Kombination möglich war. Es zeigte sich, dass eine beträchtliche Anzahl der isolierten Interaktoren auch in Kombination mit einem der anderen Köder zur Aktivierung der Reporter gene führte. So in-

teragierten die fünf isolierten FANCC-Interaktoren ebenfalls mit FANCA, sowie fünf der 23 isolierten FANCA-Beuteproteine auch mit FANCC. Eine Interaktion mit FANCG zeigten zwölf von allen 27 untersuchten Interaktoren.

3.4 Funktionelle Zuordnung der Interaktoren

Die Auswertung der Interaktoren lieferte deutliche Hinweise auf eine Beteiligung der FA-Proteine an bestimmten Prozessen des Zellmetabolismus. Die Interaktoren können anhand ihrer Funktionen in Gruppen eingeteilt werden: Zwei von ihnen nehmen eine Aufgabe im Kerntransport wahr und vermitteln möglicherweise den nukleären Transport der FA-Proteine. Zweien ist eine Funktion bei der Abwehr oxidativer Schädigung zuzuschreiben, ein Prozess, mit dem insbesondere FANCC bereits mehrfach in Zusammenhang gebracht wurde (Clarke et al, 1997; Lackinger et al, 1998; Kruyt et al, 1998; Cumming 2001). Zwei andere Beute-Proteine sind Kinasen. Möglicherweise handelt es sich bei einem dieser beiden Proteine um die von Yagasaki et al. (1999) beschriebene FANCA-Protein-Kinase. Eine überraschend große Zahl der Interaktoren konnten jedoch mit Funktionen in Zusammenhang gebracht werden, welche bei der Modifizierung des Chromatins für DNA-Reparatur, Replikation und Rekombination eine Rolle spielen.

4. Diskussion

Durch Hefe-Two-Hybrid-Screening einer HeLa-cDNA-Expressionsbibliothek gelang uns die Isolierung von 27 Proteinen, welche mit FANCA, FANCC und/oder FANCG interagieren. Unter diesen Interaktoren waren solche, die möglicherweise die Phosphorylierung der FA-Proteine vermitteln (Yagasaki et al, 2001). Jedoch war keines dieser Proteine mit der ATM-Kinase identisch, welche an der Phosphorylierung des FANCD2-Gens beteiligt ist (Taniguchi et al, 2002). Da die überwiegend nukleäre Funktion der FA-Proteine inzwischen außer Frage steht, war es zu erwarten, dass sich unter den Interaktoren Proteine befinden, welche für den Transport des FANCA/FANCC/FANCG prä-

„Core“-Komplexes in den Zellkern verantwortlich sind. Weitere Interaktoren sind möglicherweise an Abwehrmechanismen der Zelle gegenüber reaktiven Sauerstoff-Spezies beteiligt. Für eine protektive Funktion der FA-Proteine gegen oxidative Schäden gibt es eine Vielzahl von Hinweisen (Ahmad et al, 2002). In diesem Zusammenhang wird von manchen Autoren für das FANCC-Protein eine entsprechende cytoplasmatische Funktion postuliert (Lackinger et al. 1998; Kruyt et al. 1998). Der weitaus größte Anteil der Interaktoren erscheint jedoch an der Modifikation von Chromatin beteiligt, z.B. in Form von Histon H4-Acetylierung oder Histon-H3-Phosphorylierung, oder ist in anderer Art und Weise mit der Modifizierung von Chromatin verknüpft, z.B. durch die Aktivierung/Repression der Transkription.

Die Wechselwirkung der isolierten Interaktoren wurde in dieser Arbeit ausschließlich durch verschiedene Methoden im Hefe-Two-Hybrid-System, wie z.B. wechselseitige Fusion an Köder/Beute, Aktivierung verschiedener Reporter oder Mating-Test überprüft, jedoch nicht durch alternative Techniken zur Analyse der Proteininteraktion. Eine Validierung der Interaktionen mit Hilfe immunologischer Methoden, wie Koimmunpräzipitation oder subzellulärer Kolkalisierung ist zur Bestätigung der Interaktionen unumgänglich. Die letzte Sicherheit, dass es sich um eine physiologisch relevante Interaktion handelt, erbringt letztlich erst der Nachweis eines funktionellen Zusammenhangs. Betrachtet man jedoch die relative Häufigkeit Chromatin-modifizierender Proteine unter den isolierten „Kandidaten“-Interaktoren, liegt es nahe, hieraus einen möglichen Zusammenhang zur FA zu postulieren, welcher als Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen dienen kann.

5. Entwicklung einer Hypothese zur Funktion der FA-Proteine

Wir postulieren, dass der Phänotyp der FA im Gegensatz zu bisherigen Modellen nicht auf einer fehlerhaften DNA-Reparatur an sich beruht, sondern auf einer Störung der Chromatin-Modifikation, welche insbesonde-

re im Zusammenhang mit DNA-Reparaturprozessen negative Auswirkungen haben kann. Folge einer defekten Chromatin-Struktur wäre eine verminderte oder deregulierte Zugänglichkeit der DNA für die Enzyme der Rekombinations-, Replikations- und Reparatur-Maschinerie. Das Resultat könnte ein pleiotroper Phänotyp sein, wie er aus klinischer Sicht bei FA-Patienten beobachtet wird. Resultat einer fehlerhaften Chromatin-„Assembly“ wäre eine instabile Chromatin-Struktur, welche möglicherweise der Grund für die bei FA beobachtete chromosomale Instabilität ist.

Die von uns vorgeschlagene „Chromatin-Hypothese“ beruht auf den zahlreichen Interaktoren mit putativen „Chromatin“-Funktionen, welche als Ergebnis dieser Arbeit gefunden wurden, sowie auf folgenden Überlegungen: Die Organisation von DNA in Chromatin setzt Mechanismen voraus, mit deren Hilfe nicht nur schnell, sondern auch reversibel spezielle Chromatin-Bereiche dekomprimiert werden können, so dass die DNA-Sequenz für die Transkriptions-, Replikations- und Reparatur-Enzyme zugänglich wird. An der Aufrechterhaltung und Modulation der Chromatin-Struktur sind zwei wesentliche Vorgänge beteiligt: Als Chromatin-„Assembly“ wird das mit Acetylierung/Deacetylierung verbundene Anfügen neu-synthetisierter Histone an die DNA bezeichnet. Dieser Vorgang ist unerlässlich für den reibungslosen Ablauf von Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur. Unter Chromatin-„Remodeling“ wird die Veränderung der bestehenden Chromatinstruktur verstanden: durch Dekompaktierung/Rekompaktierung werden bestimmte Bereiche der DNA vorübergehend für benötigte Enzymaktivitäten, z.B. der Transkriptionsmaschinerie, zugänglich gemacht (Übersicht bei Cairns, 2001).

Die Regulatoren der Chromatin-Struktur bilden ein kompliziertes Netzwerk von Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen. Die gefundenen FA-Interaktoren betreffen viele verschiedene Bereiche dieses Netzwerks (vgl. Abb. 1). Anhand von Abb. 1 wird auch deutlich, dass viele der Interaktoren nicht nur ähnli-

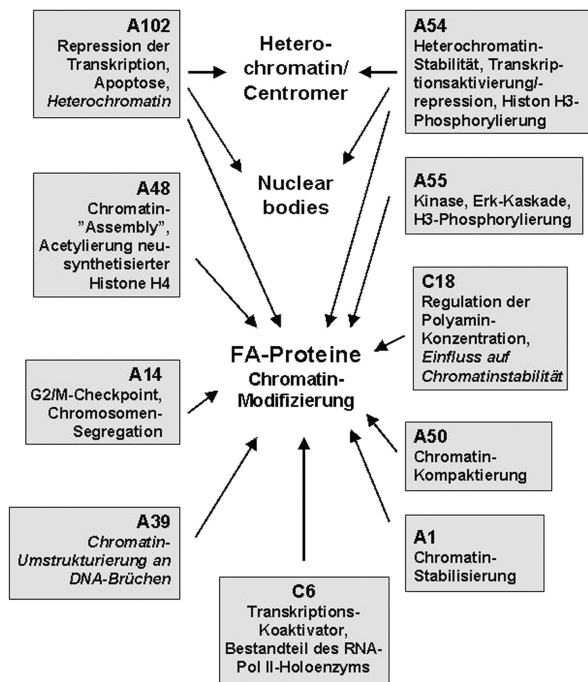


Abb 1 Zehn der in dieser Arbeit identifizierten und mit FANCA oder FANCC interagierenden Proteine ist eine Funktion im Bereich der Chromatin-Modifizierung gemeinsam. Einige dieser Interaktoren sind außerdem in denselben subzellulären Bereichen lokalisiert. Postulierte Funktionen sind kursiv dargestellt.

che Funktionen besitzen, sondern auch in ihren Wirkorten und ihrer subzellulären Lokalisierung überlappen, z.B. im Heterochromatin oder in „Nuclear bodies“. Auch von Otsuki et al. (2001) wurde kürzlich ein mit FANCA interagierendes Protein als die BRG1-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes identifiziert, der eine zentrale Rolle bei der Öffnung des Chromatins für Transkription und DNA-Reparatur spielt. Im Rahmen unserer Arbeit fanden sich (mit FANCA als Köder) zwei Interaktoren, A102 und A54, die beide in sogenannten „Nuclear bodies“ lokalisiert sind. Dabei handelt es sich um subnukleäre Strukturen noch unbekannter Funktion, in denen zahlreiche Chromatin- und DNA-modifizierende Proteine benachbart und organisiert sind (Weis et al. 1994, Seeler et al. 1998). Beide Interaktoren erfüllen zudem eine Chromatin-modifizierende Aufgabe im Heterochromatin- und Centromerbereich.

Deutliche Parallelen zwischen den durch mutierte FA-Gene und durch Chromatin-Modifikations-Defekte hervorgerufenen zellulären Phänotypen (Kim et al. 1988; Wolffe 1992; Megee et al. 1995; Borrow et al. 1996; Sobulo et al. 1997) lassen eine Beteiligung der FA-Proteine an Chromatin-modifizierenden Mechanismen möglich erscheinen. Dass die FA-Proteine eine enge physikalische Interaktion mit Chromatin und nukleärer Matrix eingehen, welche offenbar zellzyklus-abhängig ist und bei DNA-Schäden modifiziert wird, wurde inzwischen gezeigt (Qiao et al. 2001). Innerhalb der Chromatin-Modifikations-Maschinerie

ist basierend auf bestimmten Interaktoren insbesondere eine Beteiligung der FA-Proteine am Chromatin-„Assembly“ wahrscheinlich. Essentielle zelluläre Prozesse wie DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur erfordern strukturelle und funktionelle Integrität des Chromatins, welche durch Mutationen in den FA-Genen offenbar gefährdet ist.

Danksagung

Wir danken dem Schroeder-Kurth-Fonds für die Förderung dieser Arbeit.

Literatur

Ahmad SI, Hanaoka F, Kirk SH (2002) Molecular biology of Fanconi anemia – an old problem, a new insight. *BioEssays* 24:439-48

Auerbach, A. D. & 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

Borrow, J., Stanton, J., Adresen, J.M., Becher, R., Behm, F.G., Chaganti, R.S.K., Civin, C.I., Distche, C., Dube, I. and Frischauf, A.M. (1996) The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nature Genet.* 14, 33-40

Cairns BR (2001) Emerging roles for chromatin remodeling in cancer biology. *Trends Cell. Biol.* 11, 15-21

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

Cumming, R.C., Liu, J.M., Youssouffian, M. and Buchwald, M. (1996) Suppression of apoptosis in hematopoietic progenitor cell lines by expression of the FAC gene. *Blood* 88, 4558-4567

De Winter, J.P., Waisfisz, Q., Roimans, M.A., van Berkel, C.G.M., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Carreau, M., Bender, O., Demuth, I., Schindler, D., Pronk, J.C., Arwert, F., Hoehn, H., Digweed, M., Buchwald, M. and Joenje, H. (1998) The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nature Genet.* 20, 281-283

Fanconi Anaemia/Breast Cancer Consortium (1996) Positional Cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nature Genet.* 14, 324-328

Finley, R.L. and Brent, R. (1996) Interaction Trap Cloning with yeast. *DNA Cloning -Expression Systems: A Practical Approach.* Glover, D. and Hames, B.D., (eds.), Oxford University Press Oxford, England, 168-203

Garcia-Higuera, I., Kuang, Y., Naf, D., Wasik, J. & D'Andrea, A. D. (1999) Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4866-4873

Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425-1427

Glanz, A. and Fraser, F. C. (1982) Spectrum of anomalies in Fanconi anaemia. *J. Med. Genet.* 19, 412-6

Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. (1993) Cdi1, a Human G1 and S Phase Protein Phosphatase That Associates with Cdk2. *Cell* 75, 791-803

Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia. *Science* 297:606-9

Ishida, R. & Buchwald, M. (1982) Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA cross-linking and alkylating agents. *Cancer Res.* 42, 4000-4006

Joenje H, Patel KJ (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Nat Rev Genet* 2:446-59

Kim, U.J., Han, M., Kayne, P. and Grunstein, M. (1988) Effects of Histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 7, 2211-2219

- Kruyt FA, Youssoufian, H. (1998a) The Fanconi Anemia Proteins FAA and FAC Function in Different Cellular Compartments to Protect Against Cross-Linking Agent Toxicity. *Blood* 92, 2229-2236
- Kruyt FA, Hoshino T, Liu JM, Joseph P, Jaiswal AK, Youssoufian H. (1998b) Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase. *Blood* 92, 3050-6
- 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, 34212-34218
- Kupfer, G. M., Naf, D., Suliman, A., Pulsipher, M. & D'Andrea, A. D. (1997) The Fanconi anaemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex. *Nature Genet.* 17, 487-490
- 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
- Lo Ten Foe, J.R., Kwee, M.L., Rooimans, M.A., Oostra, A.B., Veerman, A.J.P., van Weel, M., Pauli R.M., Shahidi, N.T., Dokal, I., Roberts, I., Altay, C., Gluckman, E., Gibson, R.A., Mathew, C.G., Arwert, F. and Joenje, H. (1997) Somatic Mosaicism in Fanconi Anemia: Molecular Basis and Clinical Significance. *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 137-148
- Medhurst, A. L., Huber, P. A., Waisfisz, Q., De Winter, J. P. & Mathew, C. G. (2001) Direct interactions of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway. *Hum. Mol. Genet.* 10, 423-429
- Megee, P.C., Morgan, B.A. and Smith, M.M. (1995) Histone H4 and the maintenance of genome integrity. *Genes Dev.* 9, 1716-1727
- Otsuki T, Furukawa Y, Ikeda K et al. (2001) Fanconi anemia protein FANCA associates with BRG1, a component of the human SWI/SNF complex. *Hum Mol Genet* 10:2651-60
- Pace P, Johnson M, Tan WM et al. (2002) FAN-CE : the link between Fanconi anemia complex assembly and activity. *EMBO J* 21:3414-23
- 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
- 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
- Sasaki, M. S. & Tonomura, A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res.* 33, 1829-1836 (1973).
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16, 339-346
- Schindler, D. and Hoehn, H. (1988) Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J. Hum. Genet.* 43, 429-435
- Schroeder, T. M., Anschütz, F. & Knopp, A. (1964) Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik* 1, 194-196
- Sobulo, O.M., Borrow, J., Tomek, R., Reshmi, S., Harden, A., Schlegelberger, B., Housman, D., Doggett, N.A., Rowley, J.D. and Zeleznik-Le, N.J. (1997) MLL is fused to CBP, a histone acetyltransferase, in therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;16)(q23;p13.3). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8732-8737
- Strathdee, C.A., Duncan, A.M.V. and Buchwald, M. (1992) Evidence for at least 4 Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nature Genet.* 1, 196-198
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, et al. (2002) Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia Pathways. *Cell* 109 :459-72
- Timmers C, Taniguchi T, Hejna J et al. (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol. Cell* 7, 241-248
- Waisfisz, Q, De Winter JP, Kruyt FA, et al. (1999) A physical complex of the Fanconi anemia proteins FANCG/XRCC9 and FANCA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 10320-10325
- Waisfisz, Q., Saar, K., Morgan, N.V., Altay, C., Leegwater, P.A., de Winter, J.P., Komatsu, K., Evans, G.R., Wegner, R.D., Reis, A., Joenje, H., Arwert, F., Mathew, C.G., Pronk, J.C. and Digweed, M. (1999) The Fanconi Anemia Group E Gene, FANCE, Maps to Chromosome 6p. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1400-1405
- Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A, Dejean A. (1994) Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76, 345-56
- Wolffe, A.P. (1992) Chromatin Structure and Function. Academic Press, San Diego, CA, USA
- Yagasaki H, Adachi D, Oda T, et al. (2001) A cytoplasmic serine protein kinase binds and may regulate the Fanconi anemia protein FANCA. *Blood* 98:3650-7