

**Die hMutS α -hMutL-Interaktionen bei der Initiation der
humanen *Mismatch*-Reparatur**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
(Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Guido Plotz
aus Kronberg/Taunus

Frankfurt, 2002

vom Fachbereich 14 (Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften) der Johann
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation

1. Danksagung

Die Recherchen, Überlegungen und Experimente für diese Arbeit wurden zwischen Januar 2000 und September 2002 im Labor der Gastroenterologie, Medizinische Klinik II, im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main gemacht. Herrn Professor Dr. Wolfgang F. Caspary danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in seinem Klinikum durchzuführen.

Herrn Professor Dr. Stefan Zeuzem möchte ich für die Betreuung, die unkomplizierte Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima in seiner Abteilung danken.

Herrn Professor Dr. Theo Dinger mann danke ich für die Vertretung der Arbeit im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt.

Ich danke Herrn Dr. Jochen Rädle für seine stete Hilfsbereitschaft und sorgfältige Betreuung. Frau Dr. Angela Brieger danke ich für die Betreuung und (Start-)hilfe, die sie mir im Labor gegeben hat, sowie ihren „infektiösen“ wissenschaftlichen Enthusiasmus. Herrn Dr. Jörg Trojan danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die Initiierung des PTEN-Projektes. Frau Nicole Weber hat mir die Arbeit durch ihre Begeisterung für die Thematik genauso verschönert wie durch ihre unentwegte Hilfsbereitschaft erleichtert.

Herrn Dr. Dr. Albrecht Piiper, Herrn Dr. Dr. Robert Elez und Herrn Se-Jong You danke ich für die freundschaftlich-lockere Atmosphäre im Labor ebenso wie für die kritischen, konstruktiven Diskussionen.

Allen anderen Mitarbeitern des Gastro-Labors möchte ich für das gute, häufig fröhliche Arbeitsklima und die vielfältige Unterstützung danken, die ich erfahren habe.

Mein Dank geht auch an meine Familie und meine Freunde, die mir während dieser Zeit durch ihr Interesse an „diesen Mutessen und Mutells“ Auftrieb gegeben haben.

Die beste „Entdeckung“ meiner Doktorandenzeit ist meine Frau Heike. Ihr danke ich, neben vielem anderen, für die akribische Korrektur dieser Arbeit, die leider nur von den anderen, kleineren Entdeckungen berichtet.

„...cancer is a genetic disease caused by genetic instability. That instability is a function of all the inherited and acquired effects that mediate plasticity and alterability at the level of DNA. The success of molecular genetics over the past two decades has been the identification of genes involved in pathways of growth and development (...). The elucidation of the necessary and sufficient factors that govern genetic instability, the description of the common and disparate themes among different types of instability (...) are within the purview and distinct perspective of this branch.“

Ilan R. Kirsch, M.D.

2. Inhaltsverzeichnis

1. Danksagung	1
2. Inhaltsverzeichnis	2
3. Publierte Daten	7
4. Zusammenfassung	8
5. Einführung	10
5.1. Die Bedeutung genetischer Instabilität in der Krebsentstehung	10
5.2. Die Mismatch-Reparatur (MMR)	11
5.3. Die Mikrosatelliteninstabilität	13
5.4. Das erbliche nicht-polypöse kolorektale Karzinom (<i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>, HNPCC)	13
5.5. Modellvorstellungen des Reparaturablaufes	16
5.5.1. Übersicht über den generellen Reparaturablauf.....	16
5.5.2. Die Strangunterscheidung bei der Endonukleaseaktivierung.....	17
5.5.3. Die Modelle zum Reparaturablauf.....	18
5.5.3.1. Das <i>Translocation model</i>	19
5.5.3.2. Das <i>Sliding clamp model</i>	20
5.5.3.3. Das <i>DNA bending model</i>	21
5.6. Struktur und Biochemie der an der MMR beteiligten Proteine	22
5.6.1 MutS.....	22
5.6.1.1. Struktur des bakteriellen MutS Proteins.....	22
5.6.1.2. Die eukaryontische MutS Familie.....	26
5.6.1.3. Biochemie der MutS Proteine.....	26
5.6.2 MutL.....	27
5.6.2.1. Struktur der MutL-Proteine.....	27
5.6.2.2. Die eukaryontische MutL Familie.....	29
5.6.2.3. Biochemie der MutL Proteine.....	30
5.7. Proteininteraktionen	31
5.8. Ternäre Komplexe und Nukleotidphosphate	32
6. Fragestellung und Zielsetzung	32
7. Material	34
7.1. Geräte	34
7.2. Datenbanken und Sequenzdaten	35
7.2.1. Verwendete Datenbanken.....	35
7.2.2. Zugriffsnummern verwendeter Sequenzen.....	35
7.3. Allgemeine Chemikalien	35
7.4. Molekularbiologische Chemikalien	36
7.4.1. Restriktionsendonukleasen.....	36
7.4.2. Weitere Enzyme.....	36
7.4.3. DNA-Längenstandards.....	37
7.5. Weitere molekularbiologische Chemikalien	37
7.6. Oligonukleotide	37
7.6.1. Kommerzielle Oligonukleotide.....	37
7.6.2. Spezielle Oligonukleotide.....	37
7.6.2.1. Primer für die Amplifikation von <i>PTEN</i>	37
7.6.2.2. Primer für die reverse Transkription und Amplifikation der <i>PTEN</i> -mRNA.....	37

7.6.2.3. Primer für die Herstellung und Kontrolle der hPMS1-cDNA	37
7.6.2.4. Primer für die Kontrolle des Plasmides pSGV	38
7.6.2.5. Primer für die Mutagenese von Vektoren	38
7.6.2.6. Primer für die Herstellung von hMLH1-cDNA-Fragmenten	38
7.6.2.7. Primer für die Herstellung der 200bp-Homoduplex	38
7.6.2.8. Oligonukleotid-Substrate für die MMR-Bindungsversuche	38
7.6.2.8.1. 32mer Substrate	38
7.6.2.8.2. 81mer Substrate	38
7.6.2.8.3. 200mer Substrat	39
7.7. Bakterien.....	39
7.8. Plasmide	39
7.8.1. Prokaryontischer Klonierungsvektor (pCR 2.1)	39
7.8.2. Eukaryontische Expressionsvektoren (pcDNA3.1(+) und pSG5)	40
7.9. Medien für die Bakterienkultur	40
7.10. Patienten	41
7.11. Material und Medien für die eukaryontische Zellkultur	42
7.11.1. Allgemein verwendete Zellkulturmaterialien	42
7.11.2. Material und Medien für die Transfektion	42
7.12. Allgemein verwendete Puffer	42
7.13. Puffer für die DISC-Elektrophorese und Western Blotting	43
7.14. Puffer für die Proteinextraktion aus humanen Zelllinien.....	43
7.14.1. Puffer für die Kernextraktion nach Dignam	43
7.14.2. Puffer für die native Gesamtextraktion von Proteinen	43
7.15. Puffer für die DNA-Interaktionsversuche	43
7.16. Antikörper	44
7.17. Kit-Systeme.....	44
7.18. Proteinmarker	44
7.19. Membranen	44
8. Methoden.....	45
8.1. Allgemeine Methoden	45
8.1.1 Sterilisation von Lösungen und Gebrauchsmaterialien	45
8.1.2 Spektralphotometrische Messungen	45
8.2. Mikrobiologische Methoden	45
8.2.1 Kulturbedingungen	45
8.2.2 Herstellung einer Vorkultur	45
8.2.3 Dauerkulturen von <i>E.coli</i> -Zellen	46
8.2.4 Selektion rekombinanter Klone	46
8.2.5 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	46
8.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden.....	46
8.3.1 Allgemeine molekularbiologische und biochemische Methoden	46
8.3.1.1. Präparation und Reinigung von DNA aus Leukozyten	46
8.3.1.1.1. DNA Extraktion aus Leukozyten und Plasma	46
8.3.1.1.2. Reinigung von DNA mittels Centricon 100-Säulen	47
8.3.1.2. Isolierung und Reinigung von Plasmiden	47
8.3.1.2.1. Schnellisolation von Plasmiden	47
8.3.1.2.2. Plasmid-Mini-Präparation.....	47
8.3.1.2.3. Plasmid-Maxi-Präparation	47
8.3.1.3. Präparation von RNA.....	47
8.3.1.3.1. Extraktion von Gesamt-RNA mittels Tristar	47
8.3.1.4. Konzentrieren von Nukleinsäuren	48
8.3.1.4.1. Ethanol-Fällung	48
8.3.1.4.2. Isopropanol-Fällung.....	48

8.3.1.5. Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	48
8.3.1.5.1. Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten.....	48
8.3.1.5.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
8.3.1.6. Herstellung von Oligoduplices aus DNA-Oligomeren	49
8.3.1.7. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	49
8.3.1.7.1. Restriktionsschnitt von Plasmid-DNA	49
8.3.1.7.2. Ligation von DNA-Fragmenten	49
8.3.1.7.3. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
8.3.1.7.4. Reverse Transkription (RT)	50
8.3.1.7.5. Klonierung von PCR-Produkten	51
8.3.1.7.6. Einführen von Mutationen (Site-directed mutagenesis).....	51
8.3.1.8. Sequenzierung	51
8.3.1.8.1. Sequenzierungsreaktion	51
8.3.1.8.2. Direktsequenzierung aus Plasmid-DNA	52
8.3.1.8.3. Aufreinigen der Sequenzreaktion.....	52
8.3.1.8.4. Elektrophorese und Detektion.....	52
8.3.1.9. Bindung biotinylierter DNA-Stränge an Dynabeads Streptavidin.....	52
8.3.1.10. Isolierung von Proteinen aus humanen Zellen	53
8.3.1.10.1. Gesamtproteinisolierung	53
8.3.1.10.2. Native Kernextraktion.....	53
8.3.1.10.3. Native Gesamtproteinextraktion	53
8.3.1.11. Proteindetektion	54
8.3.1.11.1. Western-Blot	54
8.3.1.11.2. Immunchemische Detektion mittels ECL-Detektionsreagenz.....	54
8.3.1.11.3. Entfernen der auf Nitrocellulosemembran gebundenen Antikörper.....	54
8.3.1.12. Transfektion	54
8.3.1.12.1. Calciumphosphat-Präzipitation.....	54
8.3.1.12.1.1. Herstellung der Kristallsuspension.....	55
8.3.1.12.1.2. Vorbereitung und Transfektion der Zellen.....	55
8.3.2. Spezielle molekularbiologische und biochemische Methodik.....	55
8.3.2.1. Klonierung der hPMS1-Vollängen-cDNA.....	55
8.3.2.2. Herstellung von hMutL α -ATPase-Mutanten.....	56
8.3.2.3. Herstellung von hMLH1-Fragment-cDNAs im Vektor pSG5.....	57
8.3.2.4. PCR des PTEN-Gens	58
8.3.2.5. Reverse Transkription und Amplifikation der PTEN-mRNA.....	58
8.3.2.6. Proteinbindungsexperiment.....	58
8.3.2.6.1. Inkubationsbedingungen und Pipettierschema.....	58
8.3.2.6.2. Durchführung:	59
8.3. Zellbiologische Methoden	59
8.4.1. Kultivierung von eukaryontischen Zellen.....	60
8.4.1.1. Kulturbedingungen.....	60
8.4.1.2. Zellpassage.....	60
8.4.1.3. Tiefrieren und Auftauen.....	60
8.4.1.4. Bestimmung der Zellzahl	61
8.4.1.5. Mycoplasmen-Test.....	61
9. Ergebnisse	62
9.1. Etablierung der Methodik	62
9.1.1. Kontrolle der Zelllinien und Kernextraktion.....	62
9.1.2. Überlegungen zur Verwendung von DNA-gekoppelten Dynabeads.....	63
9.1.3. Herstellung der substratgekoppelten Dynabeads	64
9.1.4. Bindung der MMR-Proteine an 32mer DNA-Dynabeads.....	65
9.1.1.1. Bindung von hMutS α	65

9.1.1.2. Bindung von hMutS β	67
9.1.1.3. Bindung von hMutL α	67
9.2. Untersuchung der hMutSα-Bindung an 32mer Duplices	68
9.2.1. Gradientenelution.....	68
9.2.2. Einfluß von ATP.....	69
9.2.2.1. Affinitätsherabsetzung zur Duplex.....	69
9.2.2.2. Effektive ATP-Konzentration.....	69
9.2.2.3. Effekt auf Homoduplex- versus Heteroduplexbindung.....	70
9.3. Bindung von hMutL-Proteinen an längere DNA-Duplex-Substrate	71
9.3.1. Bindung von hMutL-Proteinen.....	71
9.3.2. hMutL-Bindung ist abhängig von hMutS α	73
9.3.3. Eine hMSH6-ATPase-Mutante bindet auch hMutL-Proteine.....	75
9.3.4. Zeitreihe der Bindung der hMutL-Proteine.....	76
9.3.5. ATP-Konzentration der Komplexbildung.....	76
9.3.6. Notwendigkeit der ATP-Hydrolyse für die hMutL-Bindung.....	77
9.4. Genauere Charakterisierung der hMutSα-hMutL-Interaktion	78
9.4.1. Verwendung der Zelllinie 293T.....	78
9.4.2 Interaktion mit hMutL β	80
9.4.2.1. Reverse Transkription und Klonierung der humanen <i>PMS1</i> -mRNA.....	80
9.4.2.2. Expression.....	80
9.4.2.3. Interaktion.....	80
9.4.3. Interaktion mit einer hMutL α -ATPase-Mutante.....	81
9.4.3.1. Leitlinien für die Auswahl der Mutationen.....	81
9.4.3.2. Expression.....	82
9.4.3.3. Interaktion.....	82
9.4.4. Interaktion mit den hMutL-Monomeren.....	83
9.4.4.1. Expression.....	83
9.4.4.2. Interaktion.....	84
9.4.5. Interaktion mit hMLH1-Fragmenten und hMutL α MLH1 Δ 9/10.....	85
9.4.5.1. Expression.....	86
9.4.5.2. Interaktion.....	87
10. Diskussion	89
10.1. Eignung der etablierten Methodik für MMR-Untersuchungen.....	89
10.2. Bindung von hMutSα an DNA-Substrate und Reaktion auf ATP.....	89
10.3. Rekrutierung von hMutL-Dimeren an den hMutSα-DNA-Komplex.....	90
10.4. hMutLα versus hMutLβ	91
10.5. Interaktionszone von hMutL-Proteinen mit hMutSα-Proteinen.....	91
10.6. Modell der Initiation der humanen Mismatch-Reparatur	93
10.7. Ausblick	95
11. Ergebnisse und Diskussion der genetischen Untersuchung des PTEN-Status bei einer Patientin mit dem Cowden-Syndrom	97
11.1. Einführung	97
11.1.1. Das <i>PTEN</i> -Gen.....	97
11.1.1.1. Identifizierung von <i>PTEN</i> als neuer Tumorsuppressor.....	97
11.1.1.2. Die Cowden-Krankheit und das Bannayan-Zonana Syndrom.....	97
11.1.1.3. Struktur und Mutationsverteilung von PTEN.....	98
11.1.2. Funktion von PTEN.....	98
11.1.2.1. Biochemische Funktion von PTEN.....	98
11.1.2.2. PTEN im PI3K-Signalweg.....	99
11.2. Fragestellung und Zielsetzung.....	99

11.3. Ergebnisse	100
11.3.1. Sequenzierung von <i>PTEN</i>	100
11.3.2. Überlegungen zu der gefundenen Spleißmutation	100
11.3.3. Analyse der PTEN-mRNA	102
11.3.3.1. Erstellung von PTEN-transkriptselektiven Primern.....	102
11.3.3.2. Klonierung des PTEN-Transkripts und Analyse der Klone.....	103
11.4. Diskussion	105
12. Literatur	107
13. Anhang	116
13.1. Abkürzungen	116
13.2. Abbildungsverzeichnis	117
13.3. Tabellenverzeichnis.....	118
13.4. Lebenslauf.....	119

3. Publierte Daten

Plotz, G., Raedle, J., Brieger, A., Trojan, J. und Zeuzem, S.: *N-Terminus of hMLH1 is responsible for ATP-dependent interaction of hMutS α with hMutL α and hMutL β* . Manuscript in preparation.

Brieger, A., Trojan, J., Raedle, J., **Plotz, G.**, und Zeuzem, S. (2002): *Transient mismatch repair gene transfection for functional analysis of genetic hMLH1 and hMSH2 variants*. **Gut** (2002); accepted

Plotz, G., Raedle, J., Brieger, A., Trojan, J. und Zeuzem, S. (2002): *hMutS α forms an ATP-dependent complex with hMutL α and hMutL β on DNA*. **Nucleic Acids Res.** (30), 711-8.

Trojan, J., Zeuzem, S., Randolph, A., Hemmerle, C., Brieger, A., Raedle, J., **Plotz, G.**, Jiricny, J. und Marra, G. (2002): *Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system*. **Gastroenterology** (122), 211-9.

Trojan, J.*, **Plotz, G.***, Brieger, A., Raedle, J., Meltzer, S.J., Wolter, M. und Zeuzem, S. (2001): *Activation of a cryptic splice site of PTEN and loss of heterozygosity in benign skin lesions in Cowden disease*. **J. Invest. Dermatol.** (117), 1650-3.

*Beide Autoren trugen gleichermaßen zur Arbeit bei

Raedle, J., Trojan, J., Brieger, A., Weber, N., Schafer, D., **Plotz, G.**, Staib-Sebler, E., Kriener, S., Lorenz, M. und Zeuzem, S. (2001): *Bethesda guidelines: relation to microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in patients with colorectal cancer*. **Ann. Intern. Med.** (135), 566-76.

Veröffentlichte Sequenzdaten:

Plotz, G., Trojan, J., Brieger, A., Raedle, J. und Zeuzem, S. (2001): *Homo sapiens PTEN pseudogene, partial sequence*. **GenBank**, Accession AF343912

Trojan, J., **Plotz, G.**, Brieger, A., Raedle, J., Meltzer, S.J., Wolter, M. und Zeuzem, S. (2001): *Homo sapiens PTEN pseudogene (LOC158174) on chromosome 9*. **GenBank**, Accession NG_001312

Kurzmitteilungen (eigene Posterpräsentationen):

Brieger A., **Plotz G.**, Trojan J., Raedle B., Zeuzem S. (2000): *Effects of hMSH2- and hMLH1-Mutations on Apoptosis*. DNA-Repair Poster

Plotz G., Raedle J., Trojan J., Brieger A., Weber N., Schaefer D., Kriener S., Zeuzem S. (2001): *Relation of Microsatellite instability, MLH1 promoter methylation and the Bethesda guidelines in patients with colorectal cancer*. AACR Poster #3322

4. Zusammenfassung

Die Mismatch-Reparatur (MMR) ist ein hochkonserviertes Kontroll- und Korrektursystem für die Erbinformation. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Behebung von Kopierfehlern unmittelbar nach der Replikation (postreplikative Reparatur). Mutationen in Genen der Mismatch-Reparatur (vor allem in *hMLH1* und *hMSH2*) führen beim Menschen zum "Erblichen nicht-polypösen kolorektalen Karzinom", HNPCC (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer*). Diese Erbkrankheit geht mit einem gesteigerten Risiko einher, an verschiedenen Karzinomen, vor allem des Kolons, zu erkranken. Obwohl zumindest in *Escherichia coli* alle an der Mismatch-Reparatur beteiligten Proteine bekannt sind, ist ihr biochemischer Mechanismus nach wie vor ungeklärt. Es existieren drei verschiedene Modellvorstellungen zum Reparaturablauf: das *Translocation model*, das *Sliding clamp model* und das *DNA bending model*.

Um einer Klärung des Reparaturmechanismus näherzukommen, sollten in dieser Arbeit die Bindungen der humanen Mismatch-Reparaturproteine an DNA und ihre Interaktionen untereinander näher untersucht werden. Im Zentrum stand dabei die Interaktion der heterodimeren ATPase hMutS α (hMSH2-hMSH6) mit den ebenfalls heterodimeren ATPasen hMutL α (hMLH1-hPMS2) und hMutL β (hMLH1-hPMS1). Die Hauptfunktion von hMutS α ist bekannt: das Dimer ist in der Lage, DNA-Paarungsfehler zu erkennen und an sie zu binden. Die Funktion von hMutL α liegt wahrscheinlich in der Weiterleitung des Signals „Fehler erkannt“ von hMutS α an die Reparaturmaschinerie. Somit kommt der Interaktion von hMutS α mit hMutL α eine wesentliche Bedeutung in der Initiation der Reparatur zu. Die Funktion von hMutL β ist noch unbekannt.

Zur Analyse der hMutS α -hMutL-Interaktion wurde eine neue Methodik entwickelt, bei der DNA-Substrate an magnetische Partikel gebunden, diese mit Proteinlösungen inkubiert und die gebundenen Proteine anschließend mit Salzlösungen eluiert wurden. Hierdurch konnten die Bindungsstärken anhand der Salzresistenz differenziert werden und die Bindungsreaktionen nach ATP-Zugabe bei verschiedenen DNA-Substraten verfolgt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß hMutS α zwar nicht quantitativ mehr, aber fester an DNA-Paarungsfehler band als an fehlerfreie DNA-Oligoduplices. Die Bindung reagierte empfindlich auf die Zugabe von ATP: auf Homoduplex-DNA bewirkte ATP unter geeigneten Bedingungen einen vollständigen Bindungsverlust von hMutS α , während es an Heteroduplex-DNA auch in Gegenwart des Nukleotidtriphosphates gebunden blieb.

Eine weitere Wirkung von ATP bestand darin, daß hMutS α hMutL α und hMutL β rekrutierte. Dies geschah allerdings nur, wenn ausreichend lange DNA-Substrate (≥ 81 Basenpaare) verwendet wurden. Für hMutL α konnte außerdem eine eigene DNA-Bindungsfähigkeit, und zwar vorzugsweise an Einzelstrang-DNA, nachgewiesen werden. Beide Ergebnisse zusammen genommen legen nahe, daß hMutS α und hMutL α nur interagieren können, wenn beide gleichzeitig an DNA gebunden sind.

Obwohl nach bisherigen Erkenntnissen hMutL α , aber nicht hMutL β die Mismatch-Reparatur unterstützen kann, interagierte hMutL β ebensogut mit hMutS α . Dies läßt im Zusammenhang mit weiteren Ergebnissen vermuten, daß hMutL β eine modulierende Funktion in der MMR besitzen könnte. Alternativ könnte die hMutS α -hMutL β -Interaktion bei noch nicht charakterisierten anderen Prozessen von Bedeutung sein.

Die weitere Untersuchung der Interaktion ergab, daß diese wahrscheinlich nicht von der ATP-Hydrolyse abhängt, sondern allein durch die Bindung des Nukleotidtriphosphates zustande kommt. Darüber hinaus spielen die ATPasen von hMutL α keine Rolle bei der Interaktion, da das Protein auch dann noch die Bindung einging, wenn seine Nukleotidbindungsstellen gezielt mutiert worden waren.

Die Untersuchung zeigte außerdem, daß nur die hMutL-Untereinheiten hMLH1 und (in geringem Ausmaß) hPMS1 ATP-abhängig mit hMutS α interagierten, während hPMS2 alleine keine Bindung zeigte. Die sich daran anschließende Untersuchung von Fragmenten des hMLH1-Proteins erlaubte die Eingrenzung der Interaktionszone. hMutL α kontaktiert hMutS α demzufolge mit einem Proteinbereich, der innerhalb des N-Terminus von hMLH1 liegt.

Zusammenfassend wird aufgrund der vorliegenden Ergebnisse für das *DNA bending model* der Mismatch-Reparatur plädiert. Dessen Reparaturablauf wird abschließend unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten geschildert.

In einem separaten Kapitel der Arbeit wird über die Identifizierung und Charakterisierung einer neuen Spleißmutation des humanen *PTEN*-Gens berichtet. Diese Mutation wurde bei einer Patientin mit dem Cowden-Syndrom, einem weiteren erblichen Krebsyndrom, nachgewiesen.

5. Einführung

5.1. Die Bedeutung genetischer Instabilität in der Krebsentstehung

Jede Zelle innerhalb eines vielzelligen Organismus muß ihre eigene Vermehrung dem Wohle des Gesamtorganismus unterordnen. Ein strenges Regelsystem kontrolliert die Proliferation und Apoptose einzelner Zellen so, daß die Homöostase eines Gewebeverbandes erhalten bleibt und Wachstum sowie Verminderung eines Gewebes für den Gesamtorganismus sinnvoll gesteuert sind.

Bei der Entstehung von Krebs wird dieses Regelwerk von einzelnen Zellen durchbrochen. Hierfür ist die Veränderung der genetischen Informationen, die die Zelle dem Regelwerk unterwirft, Voraussetzung. Einerseits werden dabei *Protoonkogene* zu Onkogenen aktiviert, welche dann ihren außer Kontrolle geratenen Proliferationsdruck auf die Zelle ausüben. Andererseits werden *Tumorsuppressorgene* deaktiviert, wodurch sie ihrer Funktion, der Verhinderung ungesteuerten Wachstums, nicht mehr nachkommen können. Für die Protoonkogenaktivierung ist eine einzelne (aktivierende) Mutation auf einem Allel des Gens ausreichend. Die Ausschaltung eines Tumorsuppressorgens hingegen benötigt die Veränderung oder Deletion beider Allele (*Zwei-Treffer-Hypothese*, Knudson, Jr. 1985). Oftmals werden Tumorsuppressorgene mitsamt größeren Chromosomenabschnitten verändert oder deletiert, weshalb Chromosomenveränderungen, die häufig in Krebsgewebe gefunden werden, auf die Lokalisation von Tumorsuppressorgen im Genom hinweisen können (Knudson, Jr. 1985).

Die grundlegende Ursache der Krebsentstehung sind Veränderungen der Erbinformation. Die Langsamkeit, mit der sich normalerweise solche Veränderungen im Genom ansammeln, ist wahrscheinlich der Grund, weshalb Krebs vor allem eine Erkrankung des hohen Lebensalters darstellt. Wird die Ansammlung von Veränderungen im Genom stark beschleunigt, wird der Entartung Vorschub geleistet. Neben exogenen Noxen, die die Erbinformation schädigen (Karzinogene, Strahlen) ist es vor allem der Ausfall endogener Systeme, die dem Schutz und der Reparatur von DNA und der Sicherstellung der Replikationstreue dienen, der für die beschleunigte Entstehung von Veränderungen im Genom ursächlich ist. Im letzteren Falle spricht man von *genetischer Instabilität* einer Zelle.

Gene, deren Proteinprodukte als "Wächter des Genoms" (*genome guardians, caretaker genes*) für die *genetische Stabilität* verantwortlich sind und deren Ausfall zu einer erhöhten Mutationsrate führt, werden *Antimutatorgene* genannt und bilden eine

Untergruppe der Tumorsuppressorgene. Ihre Wirkung ist meist nur mittelbar, da sie primär nicht selbst in das zelluläre Wachstumsregelwerk eingreifen. Stattdessen forciert die beim Ausfall eines Antimutatorgens auftretende genetische Instabilität die Veränderung von Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen (wie auch die Veränderung des gesamten restlichen Genoms). Tatsächlich zeigen praktisch alle entarteten Zellen eine Form genetischer Instabilität.

Antimutatorgene können somatisch durch Mutation oder Deletion beider Allele deaktiviert werden. Menschen, die eine Keimbahnmutation in einem Antimutatorgen tragen, haben ein deutlich erhöhtes Risiko, daß genetische Instabilität in einer Zelle auftritt, da der erste "Treffer", also die Ausschaltung des ersten Alleles, bereits vorweggenommen ist. Eine Reihe von Erbkrankheiten, die für Krebsentstehung prädisponieren, sind auf Keimbahnmutationen in Antimutatorgenen zurückzuführen. Hierzu gehören *Xeroderma pigmentosum* (Ausfall der Nukleotidexcisionsreparatur), *Ataxia telangiectasia* (Ausfall von ATM), das *Nijmweggen breakage syndrome* (Ausfall von NBS1), das *Bloom's syndrome* (Ausfall von BLM), das *Li-Fraumeni-Syndrom* (Ausfall von p53), das *Werner-Syndrom* (Ausfall von RecQL2) und die Brustkrebsprädisposition, die durch Mutationen in BRCA1 und BRCA2 verursacht wird.

Das Thema dieser Arbeit ist die Mismatch-Reparatur (MMR), ein DNA-Reparatursystem, dessen Ausfall zu einer umfassenden genetischen Instabilität führt. Keimbahnmutationen in Mismatch-Reparaturgenen sind verantwortlich für HNPCC (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer*), eine Erbkrankheit, die mit einer stark gesteigerten Inzidenz von kolorektalen und verschiedenen anderen Karzinomen einhergeht. Zwischen drei und fünf Prozent aller jährlich auftretenden Kolontumore sind auf HNPCC zurückzuführen, ein weiterer großer Teil (15%) aller Kolonkarzinome weist einen somatischen Funktionsausfall der Mismatch-Reparatur auf.

Obwohl durch alle Organismen stark konserviert und in Bakterien, Hefen und menschlichen Zellsystemen bereits intensiv erforscht, liegt der genaue biochemische Ablauf des Reparaturprozesses der Mismatch-Reparatur noch im Dunkeln. Ziel dieser Arbeit war es, die Proteininteraktionen, die am Beginn des Reparaturprozesses stehen, genauer zu charakterisieren, um damit zum Verständnis der Reparaturinitiation der MMR beizutragen.

5.2. Die Mismatch-Reparatur (MMR)

Der Erhalt und die fehlerfreie Weitergabe der Erbinformation sind für alle Lebewesen von essentieller Bedeutung. Zur Bewerkstelligung dieser Aufgabe stehen der Zelle

ausgefeilte Systeme zur Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden oder Replikationsfehlern zur Verfügung, und der außerordentlich hohe Grad der Konservierung dieser Systeme durch die Evolution spiegelt ihre essentielle Bedeutung für den Weiterbestand des Lebens wider.

Die meisten bisher charakterisierten DNA-Reparatursysteme (Basenexzisionsreparatur, Nukleotid-Exzisionsreparatur, rekombinative Reparatur) sind für die Korrektur von Schäden zuständig, die durch endogenen chemischen Zerfall von DNA oder durch exogene Noxen wie energiereiche Strahlung und chemische Agentien entstehen. Hingegen liegt die Hauptaufgabe der Mismatch-Reparatur in der Korrektur von Fehlern, welche im Rahmen der Zellteilung bei der Replikation der DNA entstehen (*postreplikative Reparatur*), obwohl die MMR auch bei der Reparatur bestimmter chemischer DNA-Schäden (Cisplatinaddukte, O⁶-Methylguanine) eine Rolle spielt (Drummond et al., 1996; Duckett et al., 1996; Mello et al., 1996; Aebi et al., 1996).

Die für die Replikation zuständigen DNA-Polymerasen arbeiten bereits bei der Synthese des Zweitstranges sehr genau (nur etwa ein Paarungsfehler pro 10⁸-10¹⁰ Basenpaare). Die geringe Fehlerrate wird durch eine im gleichen Enzym lokalisierte 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche Fehlpaarungen im neusynthetisierten Strang erkennt und hydrolysiert (die sogenannte *Proofreading*-Aktivität), garantiert: diese innere Qualitätskontrolle der Polymerase verbessert die Kopiertreue bereits um den Faktor hundert bis zweihundert. Die Mismatch-Reparatur, welche übrigbleibende Fehler erkennt und behebt, senkt die Fehlerrate nochmals um den Faktor hundert bis tausend und stellt damit eine weitere elementare Korrekturinstanz für die Replikationstreue dar.

Die Mismatch-Reparatur behebt sowohl Basenpaarungsfehler als auch Fehler, die durch Verrutschen des neusynthetisierten Stranges gegen die Matrix entstehen. Von den acht möglichen Basenpaarungsfehlern werden sieben effizient erkannt und repariert, lediglich die Fehlpaarung C:C, welche am seltensten bei der Replikation entsteht, wird nicht von der Mismatch-Reparatur erkannt.

Eine besondere Neigung zum Verrutschen des bei der Replikation neusynthetisierten Stranges gegen die Matrix besteht in Bereichen mit repetitiver Sequenz, da sich nur hier das (verrutschte) Strangende wieder korrekt an die Matrix anlagern kann, was eine Grundvoraussetzung für die Fortsetzung der Replikation ist. Hierbei entstehen ausgeschleifte Strukturen, sogenannte Insertions-Deletions-Schleifen (IDL, *insertion-deletion-loop*) (Abbildung 1). Wenn das Ende des sich in der Synthese befindlichen Stranges wieder fehlerfrei an den Matrixstrang hybridisiert ist, wird der nun (mehr oder weniger weit) hinter der Replikationsgabel liegende ausgeschleifte Bereich von der

Replikationsmaschinerie nicht mehr als fehlerhaft erkannt und die Replikation fortgesetzt.

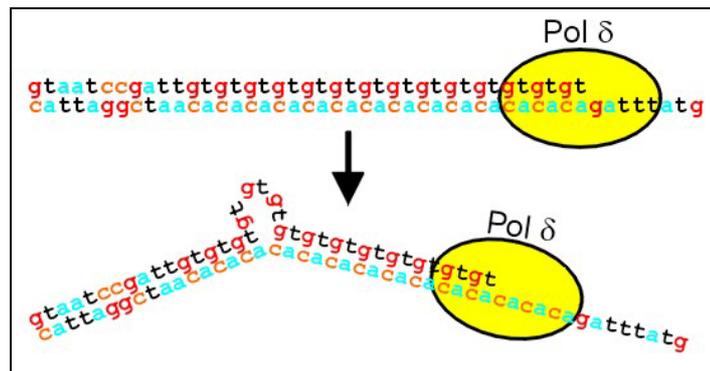


Abbildung 1: Entstehung von Insertions-Deletions-Schleifen (IDL)

Insertions-Deletions-Schleifen entstehen durch das Verrutschen des neusynthetisierten Stranges gegen die Matrix während der Replikation repetitiver Sequenzen, wie hier an diesem Mikrosatelliten-Locus schematisch dargestellt. In diesem Beispiel wird der neue Strang fälschlicherweise 6 bp länger.

5.3. Die Mikrosatelliteninstabilität

Beim Ausfall eines DNA-Korrektursystems häufen sich die Fehler an, die normalerweise von diesem System repariert werden. Die entstehende genetische Instabilität zeigt dabei eine typische Ausprägung, die die ausgefallene Reparaturfunktion widerspiegelt. Da die Mismatch-Reparatur hauptsächlich Basenfehlpaarungen und kleinere Insertions-Deletionsschleifen (in repetitiven Sequenzen) repariert, resultieren als augenfälligste Änderung der ausgefallenen Reparatur Längenveränderungen in eben solchen Wiederholungssequenzen. Repetitive Bereiche erzeugen durch ihren oftmals vom Standard (40%) abweichenden GC-Gehalt bei der Dichtegradientenzentrifugation humaner DNA charakteristische Nebenbanden, die Satelliten genannt werden. Daher leitete man den Begriff der Mikrosatelliten ab, der relativ kurze (<150 bp) repetitive Bereiche bezeichnet, die aus wiederholten Motiven von einem oder wenigen Nukleotiden bestehen, und die durch ihre Kürze leicht analytisch (mittels PCR) erfassbar sind. Werden sie beim Ausfall der MMR in ihrer Länge variabel, spricht man von Mikrosatelliteninstabilität (MSI), welche das hervorstechendste Merkmal einer ausgefallenen Mismatch-Reparatur ist. Mikrosatelliteninstabile Zellen werden daher als MSI+ oder gelegentlich auch als RER+ (*Replication error +*) beschrieben.

5.4. Das erbliche nicht-polypöse kolorektale Karzinom (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC*)

Seine Näherin berichtete dem berühmten amerikanischen Pathologen Aldred Scott Warthin im Jahre 1895, sie wäre überzeugt davon, in jungen Jahren an einem

Krebsleiden der weiblichen Geschlechtsorgane oder des Gastrointestinaltraktes zu sterben, da dies in ihrer Familie verbreitet sei. Tatsächlich verstarb sie jung an einem Endometrialkarzinom. Warthin berichtete 1913 von dieser Familie („*Cancer family G*“, Warthin 1913; Marra et al., 1995; Lynch 1999), in der offenbar eine erbliche Disposition zur Entwicklung von Krebsleiden vorlag. Diese wurde als „Familiäres Krebsyndrom“ (*Cancer family syndrome, CFS*) bezeichnet.

Nach dieser Veröffentlichung lag die Erforschung erblicher Krebs syndrome lange Zeit brach, bis Henry T. Lynch, ein amerikanischer Internist, in den sechziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts einen Alkoholiker behandelte. Dieser antwortete ihm auf die Frage nach dem Grund seiner Trinksucht, er würde sowieso an Krebs sterben, da alle Mitglieder seiner Familie dieses Schicksal erlitten. Erst Lynchs Beschreibung dieser neuen Krebsfamilie (*Cancer family N*) und einer weiteren großen Krebsfamilie (Lynch et al., 1966) erbrachte dem Phänomen des erblichen Krebsleidens die notwendige Aufmerksamkeit und löste internationale Forschungsanstrengungen aus.

Die nähere Charakterisierung der fortan „Lynch-Syndrom“ genannten Erkrankung zeigte, daß bei diesem erblichen Krebsleiden, welches vornehmlich das Kolon betraf, typischerweise Tumorstufen wie Adenome oder Polypen fehlten. Diese sind bei sporadischen Kolonkarzinomen meist Vorläufer des eigentlichen Tumors. Daher erhielt das Syndrom den Namen "Erbliches nicht-polypöses kolorektales Karzinom" (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC, OMIM-Nummer: #114500*).

Trotz des Nachweises der Erblichkeit dieses Syndroms blieb die genetische Ursache der Erkrankung noch viele Jahre ungeklärt. Um weitere HNPCC-Familien für Forschungszwecke zu rekrutieren, wurden 1991 (noch in Unkenntnis der genetischen Grundlagen der Erkrankung) klinische Kriterien erarbeitet (Vasen et al., 1991), anhand derer HNPCC-verdächtige Patienten identifiziert werden können (Amsterdam-Kriterien, Tabelle 1).

Amsterdam-Kriterien (Klassische ICG-HNPCC Kriterien, 1990)

Die klinische Diagnose eines HNPCC erfordert mindestens drei Verwandte, die am kolorektalen Karzinom erkrankt sind, plus der folgenden Bedingungen:

- Ein Erkrankter ist ersten Grades mit den anderen beiden verwandt
- Zwei oder mehr aufeinanderfolgende Generationen sind betroffen
- Bei mindestens einem Erkrankten wurde CRC vor dem 50. Lebensjahr diagnostiziert
- FAP ausgeschlossen
- Tumor histologisch verifiziert

Amsterdam II-Kriterien (Revidierte ICG-HNPCC Kriterien, 1998)

Die klinische Diagnose eines HNPCC erfordert mindestens drei Verwandte mit einem HNPCC-assoziierten Krebsleiden (kolorektaler oder endometrialer Krebs, Krebsleiden des Dünndarms, der Harnröhre oder der Nierenbecken), plus der folgenden Bedingungen:

Ein Erkrankter ist ersten Grades mit den anderen beiden Betroffenen verwandt
 Zwei oder mehr aufeinanderfolgende Generationen sind betroffen
 Bei mindestens einem Erkrankten wurde Krebs vor dem 50. Lebensjahr diagnostiziert
 FAP bei allen kolorektalen Karzinomen ausgeschlossen
 Tumor histologisch verifiziert

Tabelle 1: Amsterdam-Kriterien

Zur Identifizierung von HNPCC-verdächtigen Familien anhand klinischer Kriterien.

Den molekularen Grundlagen der Erkrankung kam man erst Anfang der neunziger Jahre näher, als die Untersuchung dreier großer HNPCC-Familien in Nordamerika, Europa und Neuseeland auf eine Assoziation der Erkrankung zu den Chromosomenabschnitten 2p15-16 (Peltomaki et al., 1993) und 3p21-23 (Lindblom et al., 1993) hinwies. Der zweite wichtige Hinweis auf die Ursache des Syndroms ergab sich zufällig, als man versuchte, mittels Mikrosatellitenanalyse den Allelverlust dieser Chromosomenbereiche im Tumorgewebe von HNPCC-Patienten nachzuweisen. Es stellte sich heraus, daß die Tumoren nicht etwa, wie erwartet, einen Allelverlust (LOH) aufwiesen, sondern im Vergleich mit dem Normalgewebe stattdessen scheinbar einen Allel-Hinzugewinn zeigten (Thibodeau et al., 1993; Aaltonen et al., 1993). Dieses Phänomen wurde auf einen Fehler in der DNA-Synthese zurückgeführt. Damit war der wesentliche Hinweis auf die mögliche Funktion der beim HNPCC ausgefallenen Proteine gegeben, denn eine entsprechende, repetitive Sequenzen betreffende genetische Instabilität war aus Untersuchungen der DNA-Replikationstreue und des Mismatch-Reparaturgen-Systems in *Escherichia coli* bereits seit 1954 bekannt (Treffers et al., 1954). Es war in den 1980er Jahren ausführlicher charakterisiert worden (Lu et al., 1983) und war auch schon in der Hefe nachgewiesen worden (Strand et al., 1993). Daher begann die Suche nach menschlichen Homologen der bakteriellen *Mut*-Gene. 1993 wurde mit *hMSH2* (**human** *Escherichia coli* **mutator phenotype protein S** **homologue 2**), einem humanen Homologen von *MutS* aus *Escherichia coli*, das erste humane Mismatch-Reparaturgen kloniert und gleichzeitig menschliche Keimbahnmutationen in diesem Gen mit HNPCC in Verbindung gebracht (Fishel et al., 1993). Ein Jahr später folgten mit *hMLH1*, *hPMS1* und *hPMS2* die Klonierungen weiterer Mismatch-Reparaturgene (Nicolaidis et al., 1994; Papadopoulos et al., 1994). Mittlerweile sind sieben humane Mismatch-Reparaturgene bekannt, die in unterschiedlichem Ausmaß für HNPCC ursächlich zu sein scheinen (Tabelle 2):

Gen	Jahr der Klonierung	Lokalisation	Originalliteratur	Ursächlichkeit für HNPCC
<i>hMSH2</i>	1993	2p16	1	38 %
<i>hMLH1</i>	1994	3p21-23	2	58 %
<i>hPMS1</i>	1994	2q31-33	3	1 Fall
<i>hPMS2</i>	1994	7p22	3	2 Fälle
<i>hMSH6</i>	1995	2p16	4	3 Fälle
<i>hMSH3</i>	1996	5q11-12	5	-
<i>hMLH3</i>	2001		6	10 Fälle

Tabelle 2: Bisher identifizierte Mismatch-Reparaturgene beim Menschen

1: Fishel et al., 1993. 2: Nicolaides et al., 1994. 3: Papadopoulos et al., 1994. 4: Palombo et al., 1995. 5: Palombo et al., 1996. 6: Flores-Rozas et al., 1998. Inzidenz für HNPCC nach Lynch et al., 1999

Nachdem klar war, daß die Mikrosatelliteninstabilität ein phänotypisches Merkmal von HNPCC-Tumoren ist, wurde diese auch klinisch für die Suche nach HNPCC-Patienten bei Dickdarmkrebserkrankten verwendet, da sich die Amsterdam-Kriterien als zu streng für die Erfassung aller HNPCC-Fälle erwiesen. Bei diesem Verfahren stieß man jedoch auf zwei Probleme. Einerseits sind zwar alle HNPCC-Tumoren mikrosatelliteninstabil, jedoch kann diese Instabilität auch ohne Keimbahnmutation durch somatische Mutation oder epigenetische Einflüsse (*hMLH1*-Promoterhypermethylierung) entstehen. Andererseits wäre die Untersuchung aller Patienten aufgrund der relativ aufwendigen Diagnostik unrentabel. Deshalb wurden 1996 die *Bethesda-Kriterien* ausgearbeitet, welche diejenigen Patienten selektieren, bei denen eine MSI-Diagnostik sinnvoll ist (Rodriguez-Bigas et al., 1997). Diese Kriterien beruhen auf der Erkenntnis, daß sich MSI-positive Tumoren typischerweise in einigen Details von MSI-negativen Tumoren unterscheiden.

Mittlerweile ist die Suche nach HNPCC-Patienten durch die Auswertung von Patientendaten und Mikrosatellitendiagnostik wesentlich verfeinert worden (Raedle et al., 2001).

5.5. Modellvorstellungen des Reparaturablaufes

5.5.1. Übersicht über den generellen Reparaturablauf

Die prokaryontische und eukaryontische Mismatch-Reparatur läßt sich *in vitro* nachstellen. Hierbei wird ein Plasmid, welches eine Basenfehlpaarung enthält, mit den bakteriellen MMR-Proteinen (oder MMR-profizienten humanen Zellextrakten) inkubiert und anschließend der Reparatur Erfolg im Plasmid über die Wiederherstellung einer Restriktionsschnittstelle oder eines Reportergens detektiert (Lu et al., 1984). Im Falle des bakteriellen Systems ist es sogar gelungen, den Reparaturprozeß *in vitro*

ausschließlich mit den rekombinant hergestellten Proteinen von *E. coli* (MutS, MutL, MutH, DNA Helicase II, DNA-Polymerase III Holoenzym, Exonuklease I, DNA Ligase, *Single-strand binding protein*) nachzustellen, so daß alle unmittelbar beteiligten Proteine hier bekannt sind (Lahue et al., 1989).

Obwohl also die Möglichkeiten für eine biochemische Analyse des Reparaturvorganges günstig sind, ist der Mechanismus der Mismatch-Reparatur nach wie vor unverstanden. Grundsätzlich besteht er aus folgenden Teilschritten (Tabelle 3):

1. Erkennung des Fehlers durch das MutS-Protein
2. Suche nach einem Signal zur Strangunterscheidung
3. Aktivierung einer Endonuklease unter Beachtung der Strangorientierung
4. Hydrolyse des fehlerhaften Stranges durch eine Exonuklease
5. Neusynthese des Zweitstranges durch die Replikationsmaschinerie
6. Ligation des neuen Teilstückes in den Strang

Tabelle 3: Einzelschritte der Mismatch-Reparatur

Zur Zeit ist jedoch lediglich die Rolle des MutS-Proteins (bzw. seiner eukaryontischen Homologen) gesichert: diese erkennen initial den Fehler in der DNA. Unklarheit besteht darüber, wie MutS im Anschluß an die Erkennung des Fehlers die stromabwärts arbeitenden Proteine alarmiert und damit letztendlich den eigentlichen Inzisions- und Reparaturvorgang durch Aktivierung einer Endonuklease auslöst.

5.5.2. Die Strangunterscheidung bei der Endonukleaseaktivierung

Die Aktivierung der Endonuklease ist im Reparaturvorgang von zentraler Bedeutung, da hier in einem geeigneten Abstand zum Fehler ausschließlich der neusynthetisierte Strang (der die "falsche" Sequenz enthält) geschnitten werden darf. Es muß also vor der Durchführung des Schnittes sichergestellt werden, daß die Endonuklease in der richtigen Orientierung sitzt, da sonst die fehlerhafte Sequenz konserviert wird. In der prokaryontischen Reparatur wird diese Aufgabe durch die Endonuklease MutH selbst wahrgenommen. Dieses Protein besitzt die Fähigkeit, so an hemimethylierte GATC-Sequenzen zu binden, daß der Endonuklease-Schnitt im nicht-methylierten Strang erfolgt (Welsh et al., 1987). Dieser Strang ist der neusynthetisierte, da die Methylierung von GATC-Sequenzen der Replikation des Bakteriengenoms hinterherhinkt.

Bei Eukaryonten existiert nach bisherigem Wissen kein Mechanismus, der mit der Methylierung der bakteriellen DNA nach der Replikation direkt vergleichbar wäre, und es wurde bisher auch kein homologes Protein für MutH gefunden. Auch die epigenetische Methylierung von CpG-Inseln dient nicht der Strangunterscheidung

(Drummond et al., 2001). Die Strangunterscheidung erfolgt hier wahrscheinlich nach einem gänzlich anderen Mechanismus, und die eukaryontische Endonuklease weist daher vermutlich nur eine geringe Homologie zu MutH auf. Ein möglicher Kandidat für die Strangunterscheidung in Eukaryonten ist PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). Hierbei handelt es sich um eine "Gleitende Klammer" (*sliding clamp*), um ein homotrimeres Protein, welches einen Ring um die DNA bilden kann, welcher dann auf der DNA beweglich ist. Der Ladevorgang erfolgt unter ATP-Verbrauch durch den Replikationsfaktor C (*Replication factor C*, RfC). PCNA ist von zentraler Bedeutung bei der DNA-Replikation, wo es einen Anker und Aktivator für die Polymerase bildet, als auch für zahlreiche andere Vorgänge, die mit der Kontrolle und Reparatur von DNA zu tun haben (Warbrick 2000). PCNA wurde im Zweihybridsystem als ein Interaktionspartner des humanen MLH1-Proteins identifiziert (Umar et al., 1996). Außerdem enthalten die eukaryontischen MutS-Untereinheiten MSH6 und MSH3 Bindungsstellen für PCNA und binden ebenfalls an das Protein (Clark et al., 2000; Flores-Rozas et al., 2000; Kleczkowska et al., 2001).

Somit könnte eine Strangunterscheidung bei der eukaryontischen Mismatch-Reparatur erfolgen, indem entweder die Reparaturmaschinerie via PCNA direkten Kontakt mit der Replikationsmaschinerie aufnimmt oder dadurch, daß PCNA immer in einer bestimmten Orientierung, die die Seite des neusynthetisierten Stranges markiert, auf die DNA geladen wird.

5.5.3. Die Modelle zum Reparaturablauf

Ein wesentliches Problem beim Verständnis der Reparaturinitiation ist das scheinbar widersinnige biochemische Wechselspiel, welches das MutS-Protein in Gegenwart von fehlerhaften DNA-Oligoduplices und ATP zeigt. Zahlreiche Untersuchungen haben nahegelegt, daß MutS-Proteine an DNA-Fehler effizient binden, wenn kein ATP anwesend ist. Darüber hinaus steigert die Bindung an einen Fehler die Bereitschaft des Proteins, ATP aufzunehmen und zu hydrolysieren (Su et al., 1986; Jiricny et al., 1988; Fishel et al., 1994; Alani et al., 1995; Palombo et al., 1995; Iaccarino et al., 1996; Palombo et al., 1996; Alani 1996; Gradia et al., 1997; Blackwell et al., 1998a; Blackwell et al., 1998b). Dies legt den Schluß nahe, daß die Aufnahme von ATP ein Folgeschritt der Fehlererkennung ist. Andererseits führt die Bindung von ATP zu einer drastischen Abnahme der Affinität von MutS zum DNA-Fehler. Dies führt zu dem Dilemma, daß der scheinbar auf die Fehlererkennung folgende Schritt, die ATP-Aufnahme, zu einer unmittelbaren Abdiffusion des Proteins vom Fehler führt. Hiermit

geht die Information über die Lokalisation des Fehlers verloren, und dies steht in einem offensichtlichen Widerspruch zu der Aufgabe von MutS, die Reparatur des zunächst gebundenen Fehlers auszulösen.

Um dieses Dilemma aufzulösen, postulieren zwei Modelle (das *Translocation model* und das *Sliding clamp model*), daß die Stranginzision an die Endonuklease signalisiert wird (also die Reparatur begonnen wird), indem MutS nach Fehlererkennung entlang der DNA zur Endonucelase wandert. In diesen Modellen erhält die Abdiffusion einen mechanistischen Zweck und wird zu einem essentiellen Bestandteil des Reparaturprozesses gemacht (Allen et al., 1997; Gradia et al., 1997).

Eine alternative Hypothese zur Mismatch-Reparatur wurde durch neue Experimente aufgebracht, die demonstrierten, daß die Bewegung von MutS entlang einer DNA-Helix kein essentieller Schritt für die Aktivierung der MutH-Endonuklease ist. Hiernach kann MutH auch in *trans* von MutS aktiviert werden, also von einem DNA-Molekül auf ein anderes, so daß das Wandern entlang eines DNA-Doppelstranges als mechanistische Notwendigkeit entfällt. Dieses *DNA bending model* Junop et al., 2001 geht davon aus, daß MutS während der Initiation der Reparatur (also auch während der Aktivierung der Endonuklease) an den Fehler gebunden bleibt.

5.5.3.1. Das *Translocation model*

Das *Translocation model* wurde unter anderem aufgrund der Auswertung elektronenmikroskopischer Bilder von Plasmiden mit bakteriellen Mismatch-Reparaturproteinen entwickelt (Allen et al., 1997). Bei diesen Bildern war eine Schleifenbildung der DNA sichtbar, wobei die Proteine an der Basis dieser Schleife zu sitzen schienen. Es wurde postuliert, daß nach der Erkennung des DNA-Fehlers der Doppelstrang solange unter ATP-Verbrauch durch das MutS-Protein hindurchgeschlauft wird, bis das (an anderer Stelle auf der DNA sitzende) Signal zur Strangunterscheidung aufgefunden ist und die Endonuklease aktiviert werden kann (Abbildung 2). In diesem Modell stellt das MutS-Protein somit eine Art Motorprotein dar, das die Doppelhelix zweiseitig durch das Dimer hindurchzieht. Obwohl MutS über eine zentrale Pore und eine schließbare Klammerstruktur (siehe 5.6.1.1) verfügt, ist allerdings nach röntgenkristallographischen Erkenntnissen nur die Klammerstruktur in der Lage, eine Doppelhelix aufzunehmen, weshalb ein MutS-Protein alleine kaum in der Lage wäre, die beobachtete Schlaufenbildung zu unterstützen (Obmolova et al., 2000). Jedoch wurde auch eine Tetramerisierung von MutS-Proteinen in konzentrierten Lösungen beobachtet, weshalb eine Schlaufenbildung durch oligomerisierte MutS-Proteine denkbar wäre (Biswas et al., 1999).

Weiterhin ist in diesem Modell problematisch, daß die geringe ATPase-Aktivität des MutS-Proteins nicht auf ein klassisches Motorprotein schließen läßt. Es wurde daher vermutet, daß die Bewegung der Doppelhelix durch MutS eher durch einen “inline-skaterartigen” Gleitmechanismus durch wechselseitige, ATP-induzierte Konformationsänderungen im Sinne einer gerichteten Diffusion realisiert wird (Blackwell et al., 1998a; Blackwell et al., 1998b).

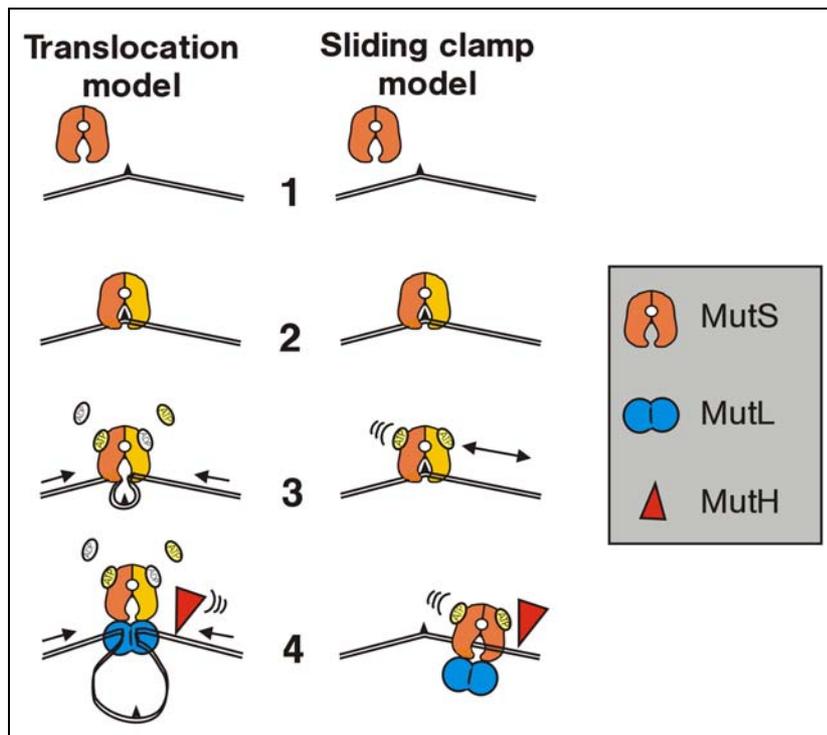


Abbildung 2: Das Translocation model und das Sliding clamp model

Erläuterung: MutS bindet an den Replikationsfehler (1) wobei es zu einer Konformationsänderung kommt (2), die wahrscheinlich Auslöser für darauffolgende Prozesse ist. Im **Translocation model** bildet MutS mit der fehlerhaften DNA unter ATP-Verbrauch eine Schleife, wobei MutS (und MutL) an der Basis dieser Schleife lokalisiert sind (3). Sobald MutS auf ein an die DNA gebundenes Strangunterscheidungsmerkmal (MutH) trifft (4), wird die Endonuklease über MutL aktiviert. Im **Sliding clamp model** löst die Fehlererkennung die Aufnahme von ATP aus. MutS^{ATP} gleitet dann die DNA entlang (3), bis es auf weitere Reparaturproteine (MutL, MutH) trifft (4), an die es dann das Signal zur Reparaturinitiation überträgt.

5.5.3.2. Das Sliding clamp model

Das *Sliding clamp model* (Gradia et al., 1997; Fishel 1998) nimmt sich ebenfalls der Beobachtung an, daß MutS in Gegenwart von ATP scheinbar eine Gleitfähigkeit auf einer DNA-Doppelhelix erhält. Zusätzlich wurde hier die geringe katalytische Aktivität der MutS-ATPase in das Modell mit einbezogen.

Das *Sliding clamp model* ordnet ATP die Rolle eines Signalmoleküls zu, welches in Analogie zu GTP bei den G-Proteinen MutS in einen “angeschalteten” Zustand bringt. Das Signal lautet "DNA-Fehler erkannt, Reparatur beginnen" und MutS^{ATP} gleitet

entlang der DNA vom Fehler weg, bis es die anderen Komponenten der Mismatch-Reparaturmaschinerie gefunden hat, denen sie das Signal übermittelt. Anschließend hydrolysiert es das Triphosphat und kehrt somit zu seinem ADP-gebundenen oder nukleotidfreien Zustand zurück. In diesem Zustand ist MutS in der Lage, erneut einen DNA-Fehler zu erkennen (Abbildung 2).

5.5.3.3. Das DNA bending model

Das *DNA bending model* (Junop et al., 2001) wurde aufgrund verschiedener schwer lösbarer Widersprüche, die mit den beiden vorangegangenen Modellen auftraten, entwickelt. Einer dieser Widersprüche besteht darin, daß die Affinität des MutS-Proteins für fehlgepaarte Basen nur geringfügig höher ist als die für fehlerfreie DNA, nämlich nur etwa um den Faktor 10-20. Da jedoch die Inzidenz von Fehlern bei der Replikation wesentlich geringer ist (ein Fehler pro 10.000 Basenpaare), würde es demzufolge zu einer großen Zahl sinnloser Reparaturvorgänge kommen, da die primäre Unterscheidungsfähigkeit zwischen fehlerhafter und korrekt gepaarter DNA zu gering ist. Darüber hinaus argumentieren die Vertreter, daß die Entfernung des MutS-Proteins nach der Fehlererkennung und vor der Reparatur widersinnig sei, da dadurch das Wissen um die Lokalisation des Fehlers verloren geht. Außerdem wäre es dem MutS-Protein unmöglich, die Information "Fehler erkannt" nach dem Verlassen des Fehlers in seiner Konformation zu konservieren, da diese spezifischen Änderungen der Konformation ohne den Fehler instabil wären.

Daher wird im *DNA bending model* postuliert, daß MutS *in vivo* den Fehler auch nach Aufnahme von ATP nicht verläßt, sondern daran gebunden bleibt und simultan die Aktivierung der Endonuklease via MutL vermittelt, wobei die DNA entsprechend gebogen wird, um den Kontakt zu diesen (an anderer Stelle auf der DNA lokalisierten) Proteinen zu vermitteln (Abbildung 3).

ATP übernimmt in diesem Szenario die Kontrolle, ob tatsächlich eine Fehlpaarung vorliegt. Dies ist möglich, da ATP zwar die Affinität von MutS zu DNA-Fehlern schwächt, aber in noch deutlich stärkerem Ausmaß die Affinität zu Homoduplex-DNA verringert. Hierdurch wird die Initiierung sinnloser Reparaturvorgänge auf korrekt gepaarter DNA verhindert. Dieser Schritt wird von den Autoren des Modells als "Fehler-Verifizierung" bezeichnet.

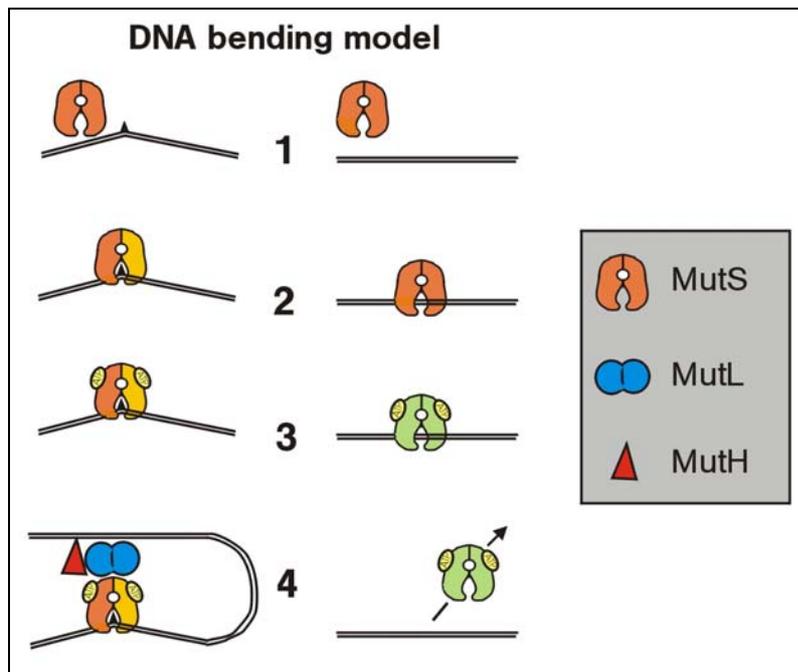


Abbildung 3: Das DNA bending model

Erläuterung: MutS bindet mit hoher Affinität an DNA-Fehler (1 und 2 links), aber nicht viel schlechter an Homoduplex-DNA (1 und 2 rechts). Bindet MutS dann zusätzlich ATP (3), so kommt es zu einer starken Reduzierung der Affinität zum Substrat. MutS^{ATP} ist dann nicht in der Lage, die Bindung an Homoduplex-DNA aufrechtzuerhalten (4 rechts), während das an einen DNA-Fehler gebundene MutS^{ATP} nach wie vor (wenn auch mit verminderter Stärke) binden kann (*Fehler-Verifizierung*). Nach dieser Kontrolle kann es beim tatsächlichen Vorliegen eines Fehlers über MutL zur strangspezifischen Endonukleaseaktivierung kommen (4 links).

5.6. Struktur und Biochemie der an der MMR beteiligten Proteine

5.6.1 MutS

5.6.1.1. Struktur des bakteriellen MutS Proteins

Alle MutS-Proteine bestehen aus einem konservierten, N-terminalen Bereich, der die DNA-Bindungsdomäne beinhaltet, einem konservierten C-terminalen Bereich, der die ATPase Domäne beinhaltet, sowie zwei nicht konservierten Bereichen, die die Interaktion zum Dimer vermitteln (Guerrette et al., 1998). Die eukaryontischen MSH3- und MSH6-Proteine verfügen zusätzlich im N-Terminus noch über eine PWWP-Domäne (mutmaßliche Interaktionsdomäne nukleärer Proteine mit unbekannter Funktion, (Stec et al., 2000)) sowie über eine Bindungsstelle für PCNA (Clark et al., 2000; Flores-Rozas et al., 2000), (Abbildung 4).

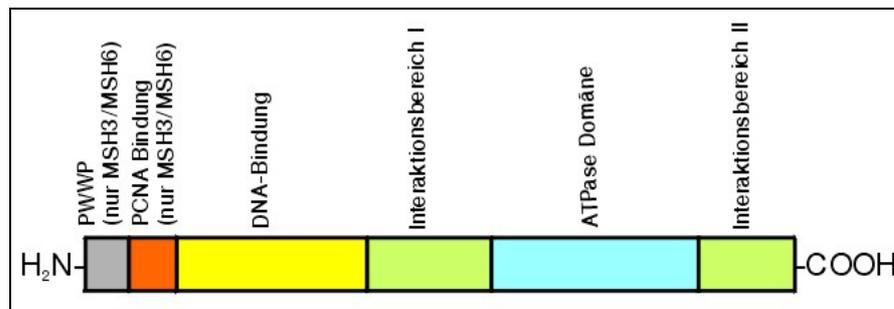


Abbildung 4: Genereller Aufbau von MutS-Proteinen

Zwei Arbeitsgruppen haben die Röntgenkristallstrukturen bakterieller MutS Proteine an fehlerhaften DNA-Substraten bestimmt, indem sie die Moleküle kokristallisierten (Lamers et al., 2000; Obmolova et al., 2000):

Kristall	PDB Identifier
<i>Escherichia coli</i> MutS mit 30mer Oligoduplex mit GT-Fehlpaarung	1E3M
<i>Thermus aquaticus</i> MutS mit 21mer Oligoduplex mit 1bp-IDL	1EWQ
<i>Thermus aquaticus</i> MutS im ternären Komplex mit ADP und DNA	1FW6

In der Proteinstruktur des Monomers (Abbildung 5) lassen sich zunächst fünf funktionelle Domänen unterscheiden: die Mismatch-Bindungsdomäne (I, aminoterminal), die Verbindungsdomäne (*Connector*, II), die Kerndomäne mit den Hebeln (*Core*, *Levers*, III), die Klammerdomäne (*Clamp*, IV) und die ATPase-Domäne (V, carboxyterminal).

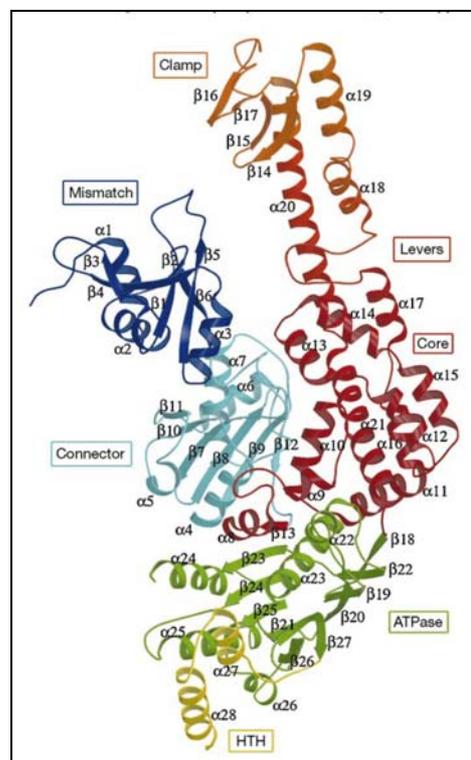


Abbildung 5: Die Domänen eines MutS-Monomers in der Kristallstruktur
Abbildung aus: Lamers et al., 2000

Obwohl die ATPase-Domäne und die Mismatch-Bindungsdomäne räumlich weit auseinander liegen (70 Å), sind sie durch zwei α -Helices mechanisch miteinander verbunden, was die starke Reaktionsfähigkeit der DNA- und Mismatch-Bindungsfähigkeit des Dimers auf Nukleotidzugabe erklärt.

Die Gesamtstruktur des an den Fehler gebundenen MutS-Dimers ähnelt einem Diskus mit zwei zentralen Öffnungen, wobei die fehlerhafte DNA durch die eine Öffnung hindurchgeschlauft ist (Abbildung 6). Die B-DNA-Helix wird hierbei durch das MutS-Protein im Bereich der Fehlpaarung abgeknickt.

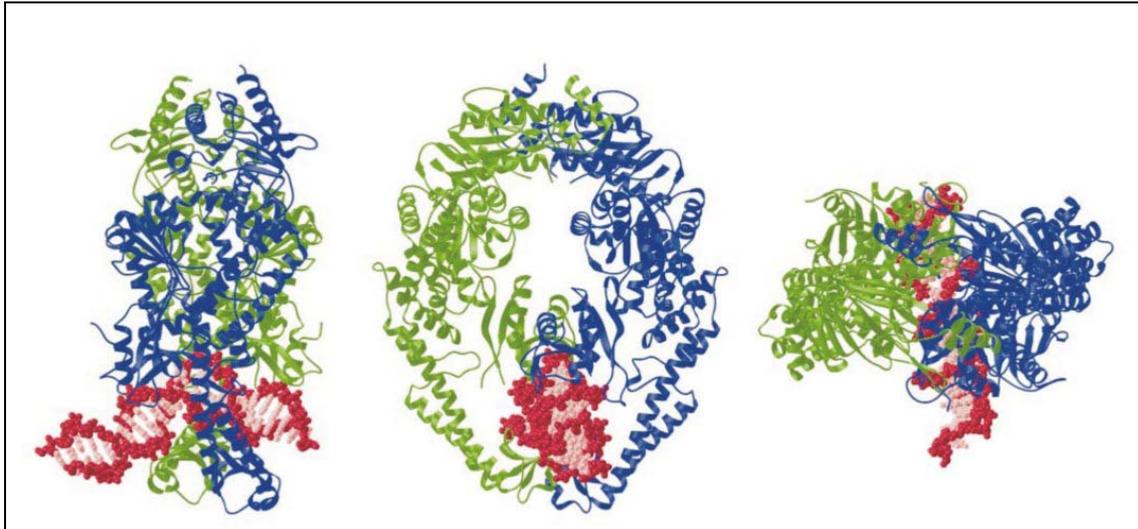


Abbildung 6: An eine fehlerhafte DNA-Oligoduplex gebundenes MutS-Dimer

Die beiden Untereinheiten des MutS-Dimers sind unterschiedlich hell dargestellt. Links: Darstellung von der Seite, die DNA-Duplex liegt unten und ist von der Seite zu sehen. Mitte: Darstellung von vorne, die obere Pore zwischen den Untereinheiten ist ebenso deutlich zu sehen wie die untere, die von der DNA belegt ist. Rechts: Darstellung von oben. Abbildung aus Obmolova et al., 2000.

Der Knick wird dadurch stabilisiert, daß das hochkonservierte Phenylalanin 39 der fehlerbindenden Untereinheit des MutS-Dimers bei der fehlerhaften Base in die DNA interkaliert (Abbildung 7). Zusätzlich bildet Glutamin 41 eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem fehlerhaften Nukleotid. Die Doppelhelix wird in Richtung der großen Furche (*major groove*) abgewinkelt, wodurch sich die kleine Furche (*minor groove*) stark weitet und Interaktionen des Phosphat-Rückgrates der DNA mit einem positiv geladenen Bereich in der oberen Höhlung der Pore von MutS ermöglicht werden. Dieser Bereich wird auch für die generelle DNA-Bindungsfähigkeit von MutS verantwortlich gemacht. Da die Wechselwirkungen somit auf die hydrophobe Interaktion zwischen den Aromaten und die hydrophile Interaktion des Proteins mit dem Phosphatrückgrat beschränkt bleibt, ist die Fehlerbindungsfähigkeit des MutS-Proteins sequenzunspezifisch. Die abgewinkelte Konformation der DNA in MutS entspricht dabei einem *induced fit*. MutS verdankt seine Fähigkeit, an zahlreiche sehr verschiedene

Paarungsfehler zu binden, der Strategie, die Duplex nach Stellen erhöhter Knickbarkeit, die durch die Fehlpaarungen erzeugt wird, abzusuchen.

Bei der Kristallstruktur fällt auf, daß das homodimere MutS in einer asymmetrischen Konformation an die Fehler bindet, so daß es zu einer Konformations-Heterodimerisierung kommt.

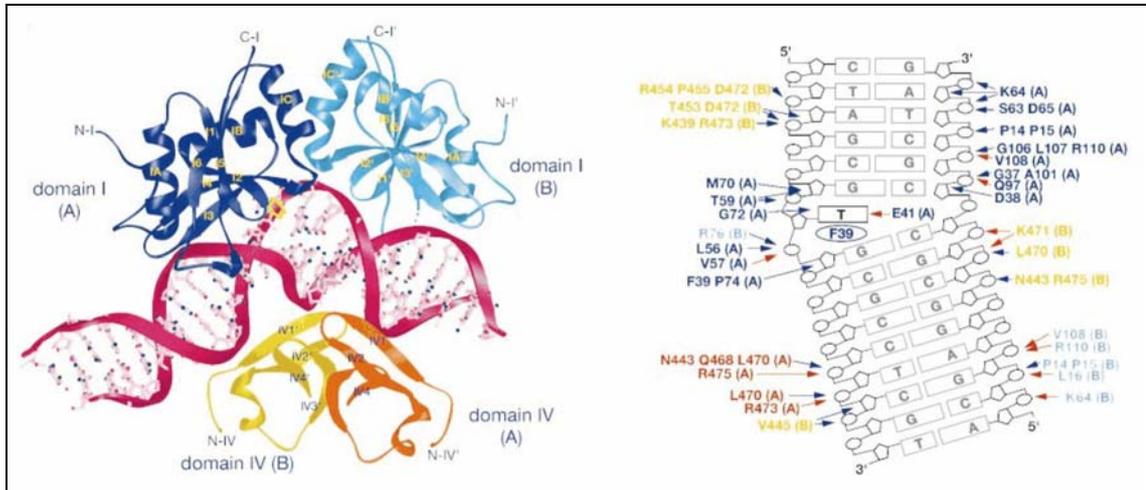


Abbildung 7: Bindung einer extrahelikalen Base durch MutS

Links: Die DNA-bindenden Domänen (Domänen I und IV der Untereinheiten A und B) des Dimers sind in Banddiagramme dargestellt, die DNA mit einer extrahelikalen Base als Banddiagramm mit den Zuckern und Basen in "ball and stick"-Darstellung. Phe39 der fehlerbindenden Untereinheit A ist als "ball and stick"-Darstellung hervorgehoben. **Rechts:** Schematische Darstellung der Oligoduplex mit Bezeichnung der Aminosäuren des Dimers, die die Oligoduplex an den jeweils markierten Stellen kontaktieren. Abbildungen aus Obmolova et al., 2000.

Die beiden Untereinheiten des MutS-Dimers besitzen zwei Dimerisierungsbereiche. Eine große Zone von 3000 \AA^2 , die für die generelle Dimerisierung verantwortlich ist, und eine kleinere von 450 \AA^2 unterhalb der Doppelhelix. Dieser letztere Bereich dimerisiert wahrscheinlich erst, wenn DNA gebunden ist, da die Interaktionsenergie schwach ist und die positiven Ladungen beider Seiten sich abstoßen. Werden diese Ladungen jedoch durch das negative Phosphatrückgrat von DNA neutralisiert, ist der Ringschluß möglich.

Die ATPase von MutS gehört zur Großfamilie der ABC (*ATP binding cassette*) ATPasen. Hierbei handelt es sich um die größte bekannte ATPase-Familie, die vor allem im Membrantransport verschiedenster Substanzen eine große Rolle spielt. Ein besonderes Merkmal dieser ATPasen ist, daß die Hydrolysefunktion von einer Dimerisierung abhängig ist. Die Analyse der Kristallstruktur und Mutagenese-Experimente haben gezeigt, daß ATP jeweils von dem einen Monomer gebunden wird, während das andere Monomer das γ -Phosphat abspaltet. Somit handelt es sich um eine "zusammengesetzte" (*composite*) ATPase.

5.6.1.2. Die eukaryontische MutS Familie

Bei den eukaryontischen Homologen von MutS finden sich anstelle des Homodimers mehreren Heterodimere. Diese übernehmen verschiedene, aber sich teils überlappende Aufgaben in der Fehlererkennung. Die Entwicklung zu Heterodimeren ist nachvollziehbar, wenn man sich vor Augen hält, daß schon das bakterielle Homodimer am Fehler gebunden eine asymmetrische Konformation einnimmt und somit dort schon in funktionaler Hinsicht ein Heterodimer darstellt. Beim bakteriellen MutS interagiert nur eine der beiden Untereinheiten direkt mit der fehlerhaften Base, und bei den heterodimeren eukaryontischen Proteinen ist nur noch eine Untereinheit hierzu in der Lage, da die für diese Interaktion nötigen Aminosäuren bei der anderen Untereinheit deletiert oder verändert sind (Bowers et al., 1999; Dufner et al., 2000).

Bisher wurden zwei funktionelle Homologe des bakteriellen MutS Proteins in Eukaryonten identifiziert. Dies sind MutS α (ein Heterodimer, bestehend aus MSH2 und MSH6) und MutS β (bestehend aus MSH2 und MSH3). Während bei MSH2 die Aminosäuren, die zur Bindung des Paarungsfehlers benötigt werden, im Rahmen der Evolution deletiert wurden, verfügen MSH3 und MSH6 nach wie vor über diese Bereiche und ermöglichen somit die Fehlererkennung durch das Heterodimer. Untersuchungen haben gezeigt, daß darüber hinaus teilweise eine Spezialisierung der beiden verschiedenen Heterodimere entstanden ist: während MutS α primär an fehlgepaarte Basen und an kleine Insertions-Deletions-Schleifen bindet, zeigt MutS β hauptsächlich eine Affinität zu kleinen und größeren Schleifen.

5.6.1.3. Biochemie der MutS Proteine

Die MutS Proteine in Prokaryonten und Eukaryonten besitzen alle die Fähigkeit, an doppelsträngige DNA zu binden (Homoduplex-Affinität), binden aber noch intensiver an fehlgepaarte DNA (Heteroduplex-Affinität). Der Unterschied zwischen Homoduplex- und Heteroduplexaffinität ist zunächst nicht sehr groß, er liegt bei Faktor 10-20.

Desweiteren bestehen Unterschiede in der Affinität gegenüber verschiedenen DNA-Paarungsfehlern:

<i>Escherichia coli</i> MutS:	GT > GG > AC > CC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MutS β :	+4 > +2 > +1 > GT
<i>Homo sapiens</i> MutS β :	+(CA) ₅ > +CA > +T /GT
<i>Homo sapiens</i> MutS α :	GT > +G = +T

Tabelle 4: Substratspezifitäten der MutS-Proteine

Nach Acharya et al., 1996; Palombo et al., 1996; Genschel et al., 1998; Umar et al., 1998

Aus den Daten läßt sich ablesen, daß hMutS α , welches in Zellextrakten der vorherrschende Faktor ist (Genschel et al., 1998), hauptsächlich fehlgepaarte Basen und einzelne extrahelikale Basen erkennt, während hMutS β eine Präferenz für größere Insertions-Deletions-Schleifen hat. Die so gewonnenen Affinitätsdaten korrelieren gut mit den Ergebnissen der *in vitro*-Reparatur dieser Fehler.

Über die Fähigkeit zur DNA-Bindung hinaus besitzen alle MutS Proteine ATPase-Funktionen, und zwar zwei pro Dimer. Es besteht dabei eine innige Beziehung zwischen der ATPase-Funktion und der DNA-Bindungsfähigkeit. Bei hMutS α wurde eine Zunahme der ATPase-Aktivität des Proteins in der Anwesenheit von DNA belegt. Dieser Effekt war nochmals um den Faktor acht erhöht, wenn Heteroduplices anstelle von Homoduplices verwendet wurden (Blackwell et al., 1998b). Insgesamt sind die MutS-Proteine jedoch auch in der Gegenwart von Heteroduplices keine sehr starken ATPasen.

Eine Eigenschaft der MutS-Proteine, die zu intensiven Diskussionen geführt hat (5.5.3), ist die Reaktion auf ATP, das die Fehlerbindungsfähigkeit der Proteine aufzuheben scheint. *Gel-Shift*-Experimente, welche die Reaktion von MutS auf "offenen" Oligoduplices mit der auf "endgeblockten" Oligoduplices verglichen, legten nahe, daß MutS Proteine nach der Aufnahme von ATP den Fehler durch eine Wanderung entlang der DNA verlassen, und nicht durch unmittelbare Abdiffusion. Im Falle der "offenen" Oligoduplices führte dies zum Verlust des gebundenen Proteins, während "endgeblockte" noch einen Teil auf dem Substrat zu halten vermochten, Blackwell et al., 1998a; Gradia et al., 1999; Iaccarino et al., 2000). Es ist jedoch noch offen, ob diese scheinbare Wanderung auf der DNA tatsächlich einen im Reparaturablauf essentiellen Schritt widerspiegelt.

5.6.2 MutL

5.6.2.1. Struktur der MutL-Proteine

Der N-terminale Bereich der MutL-Proteine ist stark konserviert und enthält eine ATPase-Domäne. Im variablen C-terminalen Bereich befindet sich die Interaktionsdomäne, die für die Dimerisierung verantwortlich zeichnet (Guerrette et al., 1999).



Abbildung 8: Struktur der MutL-Proteine

Die konservierte ATPase-Domäne gehört einer neuen Klasse von ATPasen an, die 1997 entdeckt wurden und zu denen außer den MutL-Proteinen auch NGyrkB (eine bakterielle Gyrase) und Hsp90 (*Heat-Shock-protein 90*) gehören (Mushegian et al., 1997; Bergerat et al., 1997). Kennzeichnend sind vier aufeinanderfolgende Sequenzmotive (EXXXNXXD, DXGXG, GXXGXG/A und GT). Die als GHKL-Superfamilie bezeichnete Gruppe von ATPasen (Dutta et al., 2000) ist nicht mit den schon länger bekannten Walker-ATPasen, zu denen auch die MutS-Proteine gehören, verwandt. Die offensichtliche funktionelle Verschiedenheit der namensgebenden Vertreter dieser Klasse zeigt, daß von deren Funktion schwer auf ein typisches Aufgabengebiet dieser ATPase-Klasse geschlossen werden kann. Die hervorstechendste Gemeinsamkeit der Proteine liegt wohl darin, daß sie wahrscheinlich unter ATP-Einfluß einen Ringschluß zu einer Art Klammer ausführen. Dieser Ringschluß ist im Falle der Topoisomerase zur Klammerung eines Stückes Doppelstrang-DNA von Nutzen (Baird et al., 1999), während Hsp90 auf diese Weise wahrscheinlich einen Peptidstrang bei der Proteinsynthese umfaßt (Prodromou et al., 1997).

Der konservierte N-terminale Bereich des Proteins wurde sowohl im Falle von bakteriellem MutL (LN40, für *MutL N-terminal 40 kDa*) als auch beim humanen PMS2 kristallisiert und die Struktur in Abwesenheit oder Anwesenheit von Nukleotiden analysiert (Ban et al., 1998; Ban et al., 1999; Guarne et al., 2001):

Protein	Protein Database Identifier
LN40 (N-terminales Fragment von <i>E. coli</i> MutL)	1BKN
mit ADPNP	1B63
mit ADP	1B62
hPMS2 (N-terminales Fragment von hMutL α)	1H7S
mit ATP γ S	1H7U
mit ADP	1EA6

Das humane wie das bakterielle Apoprotein zeigen zwei jeweils aus α -Helices und β -Faltblättern bestehende Domänen, die über zwei α -Helices (F,G) miteinander verbunden sind (Abbildung 9). Die erste Domäne enthält alle vier konservierten Bereiche der ATPase. In der zweiten Domäne stechen zwei nicht-variante Aminosäuren hervor: Arginin 265 (R265) im Faltblatt 12 und Lysin 307 (K307) in der Schleife L3 (zwischen den Faltblättern 14 und 15). R265 kontaktiert das γ -Phosphat von ATP, während K307 wahrscheinlich einen Sensor darstellt, der die Bindung eines Nukleotides in der ersten Domäne registriert. Beide Domänen stehen ellbogenartig in einem Winkel zueinander, wobei eine etwa 1000 Å² große Innenfläche entsteht. Diese besteht hauptsächlich aus aliphatischen und aromatischen Aminosäuren, und die konservierten

Aminosäuren des Peptids finden sich in zwei Bereichen dieser Innenflächen, auch wenn sie in der Primärstruktur nicht beieinander liegen.

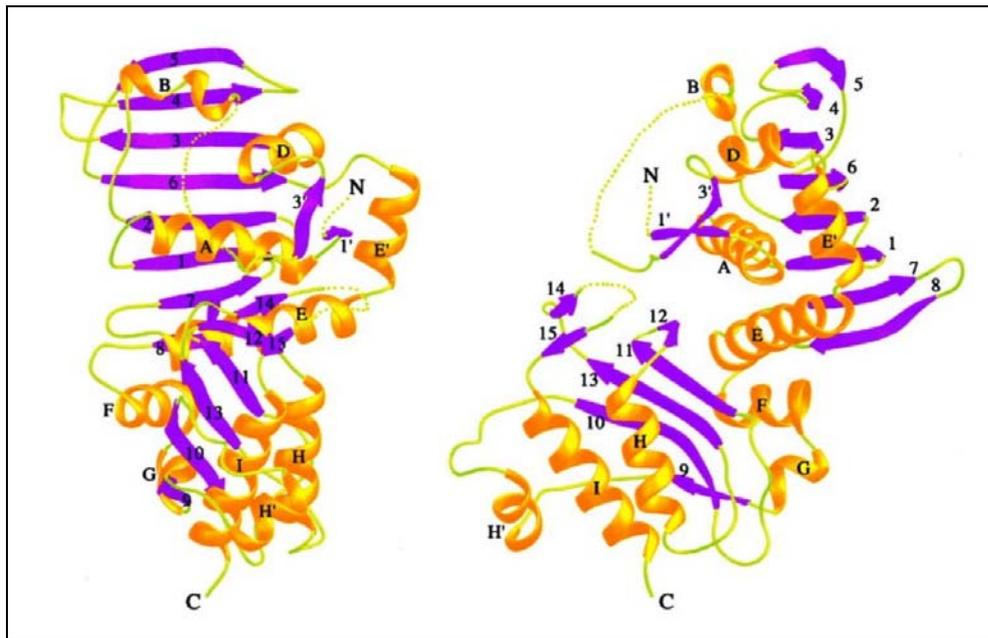


Abbildung 9: Röntgenkristallstruktur des N-terminalen Teils von hPMS2

Zwei Domänen des Proteins werden durch die Helices F und G (rechts) miteinander verbunden. Die im Bild oben liegende N-terminale Domäne enthält die ATPase, die C-terminale Domäne die Bindungsstelle zum γ -Phosphat (Faltblatt 12, R265) und den mutmaßlichen Detektor der Nukleotidbindung in Schleife L3 (zwischen Faltblatt 14 und 15, K307). Abbildung aus Guarne et al., 2001

Die Bindung von ATP (simuliert durch die Kokristallisation des Proteins mit AMPPNP bzw. ATP γ S) führt zu umfangreichen Veränderungen im Protein. Die beiden Domänen rotieren 18° gegeneinander, wodurch sich die Innenflächen nähern. Während das freie Protein, wie die ADP-gebundene Variante, zwar im Kristall, aber nicht in Lösung Dimere bilden, ist das Triphosphat-gebundene MutL auch in Lösung dimerisiert. Dies läßt vermuten, daß diese Dimerisierung eine biologische Reaktion auf ATP-Bindung ist. Da den untersuchten Proteinen die C-terminale Hälfte fehlt, welche normalerweise die nukleotid-unabhängige Dimerisierung vermittelt (Guerrette et al., 1999), würde die triphosphat-induzierte Dimerisierung beim Gesamtprotein wahrscheinlich einen Ringschluß bewirken.

5.6.2.2. Die eukaryontische MutL Familie

Wie beim MutS Protein hat auch das MutL-Protein sich in Eukaryonten zu Heterodimeren entwickelt. Hierbei paart sich jeweils MLH1 mit einem Dimerisierungspartner. Bisher sind drei humane Genprodukte bekannt, die in dieser Weise Heterodimere mit hMLH1 bilden, nämlich hPMS2, hPMS1 und hMLH3. Die Nomenklatur ist bei den Eukaryonten irreführend, da das Hefeprotein yPMS1 die größte Homologie zum humanen PMS2 hat.

Eine Beteiligung am Reparaturprozeß ist unbestritten für das MutL α -Protein (yMLH1/yPMS1 bzw. hMLH1/hPMS2), dessen Fehlen die Mismatch-Reparatur lahmlegt. Die Beteiligung von hPMS1 und MLH3 beim Reparaturprozeß ist schwieriger zu bewerten. hPMS1 wurde als verwandtes Gen zu hPMS2 gleichzeitig mit diesem identifiziert, und Reparaturbeteiligung wurde angenommen, da einerseits eine Keimbahnmutation in einer HNPCC-Familie in diesem Gen gefunden worden war (Nicolaidis et al., 1994) und andererseits eine schwache, auf Mononukleotid-Wiederholungen beschränkte Mikrosatelliteninstabilität bei PMS1-defizienten Mäusen gefunden worden war (Prolla et al., 1998). Jedoch ist hPMS1 offenbar nicht in der Lage, hPMS2 in der Mismatch-Reparatur zu ersetzen (Raschle et al., 1999).

5.6.2.3. Biochemie der MutL Proteine

Die Funktion des MutL Proteins ist schwieriger zu entschlüsseln als die der MutS-Proteine, deren Fehlerbindungsfähigkeit schon früh klar auf ihren biologischen Nutzen hinwies. MutL-Proteine besitzen keine Fehlerbindungsfähigkeit, jedoch eine schwache Fähigkeit, einzelsträngige DNA zu binden, was am bakteriellen MutL demonstriert wurde (Bende et al., 1991; Ban et al., 1999). Die ATPase-Funktion ist essentiell für die Funktion von MutL im Reparaturprozeß (Spampinato et al., 2000), und DNA moduliert die Fähigkeit von MutL, ATP zu binden oder zu hydrolysieren (Ban et al., 1999). Der Effekt von DNA auf die ATP-Hydrolyse konnte jedoch beim humanen hMutL α nicht nachgewiesen werden (Raschle et al., 2002). Aufgrund der Kristallstruktur von MutL sowie biochemischer Resultate wurde ein Modell der Funktion von MutL als ATP-regulierte Einzelstrang-DNA-Klammer entwickelt (Ban et al., 1999):

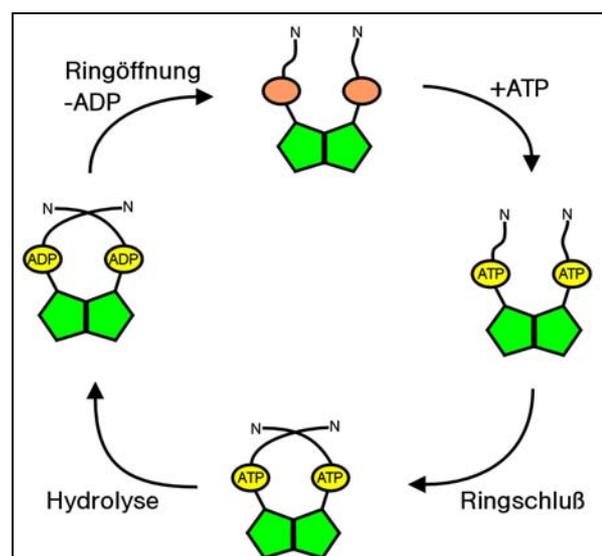


Abbildung 10: Postulierter ATPase-Zyklus für MutL

Das geöffnete MutL-Dimer (oben, mit leeren ATPase-Taschen) führt nach ATP-Aufnahme einen Schluß zu einem Ring aus, der nach der Hydrolyse wieder geöffnet wird. Abbildung nach Ban et al., 1999.

In diesem Modell führt die Bindung von MutL an Einzelstrang-DNA zur Aufnahme von ATP und dies zum Schließen der Klammer. Nachdem die Funktion erfüllt ist, kann MutL ATP hydrolysieren und den Einzelstrang wieder freigeben.

Bei den bakteriellen Proteinen wurde festgestellt, daß die Endonuklease MutH von MutS über MutL aktiviert wird (Au et al., 1992; Hall et al., 1999). Außerdem lädt und aktiviert MutL die DNA Helicase (Dao et al., 1998; Mechanic et al., 2000).

MutL scheint somit eine zentrale Rolle als Vermittler des Fehlererkennungs-Signals von MutS an die Reparaturmaschinerie zu besitzen. Des weiteren könnte MutL den falschen, von der Endonuklease geschnittenen Strang durch seine Einzelstrang-Bindungs-fähigkeit an die Exonuklease "weiterreichen" und diese aktivieren (Mechanic et al., 2000).

Vor kurzem wurde das DNA-Bindungsverhalten von MutL genauer untersucht und festgestellt, daß MutL eine hohe koordinative Bindungsfähigkeit an längere einzel- sowie doppelsträngige DNA zeigt, wobei pro MutL-Dimer zwei DNA-Bindungsstellen vorhanden zu sein scheinen (Hall et al., 2001).

5.7. Proteininteraktionen

Um die Reparatur eines Replikationsfehlers initiieren und durchführen zu können, müssen zahlreiche Interaktionen zwischen den beteiligten Proteinen eingegangen werden. Deshalb kommt der Untersuchung solcher Interaktionen für die Aufklärung des Mechanismus der Mismatch-Reparatur eine zentrale Bedeutung zu. Für MLH1, MutS α und MutS β liegen Beweise für eine Interaktion mit PCNA vor (Umar et al., 1996; Gu et al., 1998; Flores-Rozas et al., 2000; Kleczkowska et al., 2001; Bowers et al., 2001), ebenso für MutL mit MutH (Hall et al., 1999) und MutL mit Helicase II (Dao et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998; Mechanic et al., 2000). Es scheint, als ob die Mismatch-Reparaturproteine in der Zelle sogar innerhalb von Proteingroßkomplexen fungieren, genannt BASC (*BRCAl associated genome surveillance complex*, Wang et al., 2000). Außerdem wurden direkte Interaktionen mit der Nukleotidexzisionsreparatur berichtet (Bertrand et al., 1998).

Von zentralem Interesse für die Initiation der Mismatch-Reparatur ist die wahrscheinlich früh im Reparaturprozeß stattfindende Interaktion zwischen MutS- und MutL-Proteinen. Diese Interaktion vermittelt das Signal "Fehler erkannt" von MutS an MutL, welches dieses Signal wiederum an die Reparaturmaschinerie weiterleitet, die dann nach Strangzuordnung den richtig orientierten Einzelstrangschnitt durchführt.

Die Interaktion beider Proteindimere (von Bakterien, Hefe und Mensch) wurde bisher durch Koimmunopräzipitation, *Gelshift*-Experimente und durch Oberflächenplasmon-

resonanz nachgewiesen und untersucht (Prolla et al., 1994; Habraken et al., 1997; Gu et al., 1998; Habraken et al., 1998; Drotschmann et al., 1998; Galio et al., 1999; Matton et al., 2000; Bowers et al., 2000; Blackwell et al., 2001; Bowers et al., 2001; Schofield et al., 2001). Trotz der Vielzahl der Veröffentlichungen sind die genauen Bedingungen wie auch der mechanistische Hintergrund dieser Interaktion noch weitgehend ungeklärt. Speziell über die Interaktion zwischen den humanen Proteinen hMutS α und hMutL α /hMutL β lagen zu Beginn dieser Arbeit widersprüchliche Daten vor.

5.8. Ternäre Komplexe und Nukleotidphosphate

Das Verständnis der Mismatch-Reparatur wird noch zusätzlich dadurch erschwert, daß 54 verschiedene Konformationen alleine dadurch denkbar sind, daß MutS in verschiedenen Adenosinphosphatkonstellationen mit Homoduplex- und Heteroduplex-DNA und MutL komplexiert sein kann (Abbildung 11, Sixma 2001).

Komponente	MutS α		DNA	MutL α
	MSH2	MSH6		
Status	ATP	ATP	Heteroduplex	Gebunden
	ADP	ADP	Homoduplex	Nicht gebunden
	∅	∅	Keine DNA	

Abbildung 11: Mögliche Zustände eines ternären Komplexes aus MutS α , DNA und MutL α
Abbildung nach Sixma 2001

Rechnet man mit ein, daß der gebundene Zustand von MutL α über weitere zehn verschiedene Konformationen verfügt (durch die Möglichkeit, in den asymmetrischen Untereinheiten MLH1 und PMS2 wiederum verschiedene Nukleotidbindungszustände zu bewerkstelligen), kommt man sogar auf 270 mögliche Kombinationsmöglichkeiten im ternären Komplex. Es ist nicht bekannt, ob tatsächlich alle diese denkbaren Kombinationen existieren und inwiefern sie eine biologische Relevanz haben, jedoch kompliziert diese Vielfalt an Möglichkeiten die experimentelle Erfassung der Einzelschritte der Reparatur erheblich.

6. Fragestellung und Zielsetzung

Der Mechanismus der Mismatch-Reparatur im Anschluß an die zunächst erfolgende Erkennung des DNA-Fehlers durch das *MutS*-Genprodukt ist ein wesentlicher und bislang ungeklärter Schritt beim Reparaturvorgang. Die Signalisierung der Fehlererkennung erfolgt vermutlich unter ATP-Aufnahme/Hydrolyse vom MutS-

Protein über ein MutL-Protein an die Reparaturmaschinerie, weshalb eine physikalische Interaktion zwischen diesen zwei zentralen Protein-Heterodimeren wahrscheinlich ist. Zur Klärung der initialen Schritte der Mismatch-Reparatur und der Bedeutung der daran beteiligten Proteine sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- . Läßt sich eine Interaktion zwischen den humanen Mismatch-Reparaturproteinen hMutS α und hMutL α nachweisen, und wenn ja, unter welchen Bedingungen findet diese Interaktion statt?
- . Geht auch das hMutL α -Verwandte hMutL β , über dessen Bedeutung in der Mismatch-Reparatur widersprüchliche Berichte vorliegen, eine Interaktion mit hMutS α ein?
- . Welcher Bereich des hMutL α -Proteins ist für die Interaktion mit hMutS α zuständig?
- . Lassen sich Hinweise darauf finden, daß das humane MutS α Protein auch in Gegenwart von ATP am Paarungsfehler gebunden bleiben könnte?
- . Verfügt das hMutL α -Protein über eine DNA-Bindungsfähigkeit?

Um diese Fragen zu beantworten, sollte eine neuartige Methodik entwickelt werden, mit deren Hilfe sich die Interaktionen der Proteine sowohl untereinander als auch mit DNA unter weitgehend physiologischen Bedingungen untersuchen läßt. Diese Methodik sollte einerseits die Verwendung von Zellextrakten erlauben, um (unbekannten) akzessorischen Proteinen die Möglichkeit zu geben, an der Komplexbildung teilzunehmen, als auch zügig durchzuführen sein, um schwache und kurzzeitige Interaktionen nachweisen zu können. Darüber hinaus sollte nach einem Weg gesucht werden, eine eventuell darstellbare Interaktion der Proteine durch Herstellung gezielt veränderter Varianten genauer zu charakterisieren.

7. Material

7.1. Geräte

Agarose-Gelapparaturen	Gibco BRL, Karlsruhe
Analysenwaage	Sartorius, R 160P-D1, Göttingen
Autoklav	Integra Biosciences, Technomara
Automatische Pipettierhilfe	FALCON Express, Heidelberg
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank, CO ₂ -begast	Heraeus Instruments, Hanau
Centricon Filtereinheiten	Amicon, Witten
Chemikalienwaage	Sartorius, Göttingen
Computer	Gateway 2000, Frankfurt
Datenbank, EMBL	EMBL, Heidelberg
EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Nürmbrecht
Einmalküvetten	Sarstedt, Nürmbrecht
Elektroblotapparatur, Multiphor II	Pharmacia Biotech Nova Blot
Elektrophorese-Transformator, ST 606	Gibco BRL, Karlsruhe
Elektrophorese-Blot power Pack P23	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer Horizon 11.14	Gibco, Eggenstein
Entwicklerautomat Cronex T5A	DuPont, Bad Homburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Filmentwicklermaschine	Fuji, Frankfurt
Filterpapier 3 M	Munktell, Schweden
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Foto-Apparatur	Polaroid, Cambridge
Hypercasette TM	Amersham, Braunschweig
Hyperfilm TM MP	Amersham, Braunschweig
Kühlzentrifuge Micro 22 R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Rotanta TRC	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S	DuPont, Dreieich
Mikrowellenofen	Hettachi, Eschborn
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Petrischalen (Ø 10 cm)	Falcon, Heidelberg
pH-Meßgerät	Knick Calimatic 761, Essen
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage Basic MCBB100	Sartorius, Göttingen
Quarzküvetten	Heraeus, Hanau
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Perkin Elmer, Weiterstadt
Schüttelinkubator	Certomat U, B. Braun, Berlin
Schüttler, Vortex REAX 2000	Heidolph
Semi-dry-Blotter	Pharmacia, Freiburg
Sequenzierautomat, 310	Applied Biosystems, Weiterstadt
Spektralphotometer U-2000	Hitachi, Tokio, Japan
Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter Pipetten-Spitzen	Molecular Bio-Products, Canlifornia
Thermocycler 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, 5415c / 5402	Eppendorf, Hamburg

Ultraschall Sonoplus HD-70	Bandelin, Berlin
UV-Lampe FluoLink	Biometra, Göttingen
Vertikal-Gelelektrophoresekammer	Protean II, Biorad, München
Wasserbad	Heraeus, Hanau
Wipptisch WT 12	Biometra, Göttingen
Zentrifugenröhrchen	Nalge Company, New York

7.2. Datenbanken und Sequenzdaten

7.2.1. Verwendete Datenbanken

National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)
 Human Gene Mutation Database (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>)
 Protein Database (www.rcsb.org/pdb/)
 HNPCC Mutationstabellen (www.nfdht.net)
 Online Mendelian Inheritance of Man
 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)

7.2.2. Zugriffsnummern verwendeter Sequenzen

hMLH1 mRNA	U07418
hPMS2 mRNA	NM_000535
hPMS1 mRNA	NM_000534
hMLH1 Protein	S43085
hPMS2 Protein	P54278
hPMS1 Protein	P54277
PTEN genomische Sequenz	AF000726 bis AF000734 AF143312 bis AF143315
PTEN Sequenz der mRNA	NM_000314
PTEN Pseudogen	AF040103

7.3. Allgemeine Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, liegt die Reinheit der verwendeten Chemikalien bei >98 % (pro Analyse).

36 DIN Sofortbildfilm, Typ 667	Polaroid, Cambridge
Acrylamid/ Bisacrylamid (30:1)	Sigma, Deisenhofen
Agarose (FMC Seakem LE)	Biozym Diagnostik, Oldendorf,
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
dNTP (10 mM)	Applied Biosystems
Dodecylsulfat, Natrium-Salz (SDS)	ICN Biomedicals, Eschwege
DTT	Boehringer, Mannheim

ECL-Detektionsreagenz	Amersham, Braunschweig
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Riedel de Haen, Hannover
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hydrochinon	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
LB-Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Luria Broth Base (LB)	Gibco BRL, Karlsruhe
Lysis-Puffer (10x)	Biolabs, New England
Magnesiumchlorid 25 mM	Perkin Elmer, Weiterstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Haen, Hannover
Milchpulver, fettfrei	Biorad, München
Natriumbisulfit	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck, Darmstadt
Nukleotid-Mix (250 μ M of dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Invitrogen, Groningen
PCR-Puffer (5x Konz.)	Invitrogen, Groningen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Reinstwasser	Braun, Melsungen
Roti [®] -Load1 (4x Konz.)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Riedel de Haen, Hannover
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	United States Biochemical, Cleveland
Tween 20	ICN Biomedicals, Eschwege
Vacutainer [®] -CPT- Röhrchen	Becton Dickonson, Heidelberg
X-Gal	Roth, Karlsruhe

7.4. Molekularbiologische Chemikalien

7.4.1. Restriktionsendonukleasen

BamHI	Boehringer, Mannheim
EcoRI	Boehringer, Mannheim

7.4.2. Weitere Enzyme

<i>Ampli Taq Gold</i> -Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
Pfu-Turbo DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RNase Inhibitor	Boehringer, Mannheim

Kontrolle:

PMS1-contr1	5'-gag aag cct tgg ggt caa ttt g-3'
PMS1-contr2	5'-tgg gga ctg ctg tta tga ac-3'
PMS1-contr3	5'-caa tcc ctg aac aaa tga atc-3'
PMS1-contr4	5'-taa aac cca cca gcg cat gg-3'
PMS1-contr5	5'-aaa tga cag cag atg acc aaa g-3'

Zusätzlich wurden die unter 7.6.2.4 genannten Primer verwendet.

7.6.2.4. Primer für die Kontrolle des Plasmides pSGV

pSG5-Vektor-S 5'-tgc ttt att tgt gaa att tgt g-3'
 pSG5-Vektor-AS 5'-ctg ggc aac gtg ctg gtt at-3'

7.6.2.5. Primer für die Mutagenese von Vektoren

Produkt	Sense-Primer (5'-3')	Antisense-Primer (5'-3')
MLH1 E34A	cca gct aat gct atc aaa gcg atg att gag aac	gtt ctg aat cat cgc ttt gat agc att agc tgg
MLH1 R265H	ctc ttc atc aac cat cat ctg gta gaa tc	gattc tac cag atg atg gtt gat gaa gag
PMS2 E41A	gcact gcg gta aag gcg tta gta gaa aac agt c	gact gtt ttc tac taa cgc ctt tac cgc agt gc
PMS2 R295H	cttt atc aac cgg cat cct tgt gac cca gc	gc tgg gtc aca agg atg ccg gtt gat aaa g

7.6.2.6. Primer für die Herstellung von hMLH1-cDNA-Fragmenten

Fragment	Sense-Primer (5'-3')	Antisense-Primer (5'-3')
LN56	GTGGATCC ATG tcggttcgtggcaggggttat	GTGGATCC TCA actagtgagggttaatgatcc
LM42	GTGGATCC ATG agcatcctggagcgg gtgcag	GTGGATCC TCA acacctctcaaagactttgt
LC49	GTGGATCC ATG gtagctgatgtaggacact	GTGGATCC TCA aaaattggcaaaatcataaa
LN34	GTGGATCC ATG tcggttcgtggcaggggttat	GTGGATCC TCA aacatccacattctggggactg

7.6.2.7. Primer für die Herstellung der 200bp-Homoduplex

200bpSense 5'-gcg agc tga gag ctc gag tac-3' (5'-biotinmarkiert)
 200bpASHomo 5'-gaa act tca ata aga tcc act cca tag tcc-3'

7.6.2.8. Oligonukleotid-Substrate für die MMR-Bindungsversuche**7.6.2.8.1. 32mer Substrate**

Die 32mer Substrate wurden entsprechend einer vorausgegangenen Veröffentlichung verwendet (Matton et al., 2000); ihre Sequenz entspricht einem Bereich des HRAS-Gens, für den die Reparaturaktivität des Mismatch-Reparatursystems nachgewiesen wurde (Matton et al., 1999) (Abbildung 12).

1	ggcaggagac cctgtaggag gaccccgggc cgcaggcccc tgaggagcga tg acggaata
61	taagctggtg gt ggtggg cg ccggcggtgt gggcaagagt g cgctgacca tccagctgat
121	ccagaaccat tttgtggaag aatac

Abbildung 12: Teilsequenz des HRAS-Gens

(GenBank Accession M19990.1). Die für die Bindungsversuche mit 32mer DNA verwendete Sequenz ist unterstrichen.

7.6.2.8.2. 81mer Substrate

Das 81mer Substrat wies folgende Sequenz auf:

Biotin-5'-AAA GCT GGA GCA GAA GCT TAG CTT AGG TAC ATC GAG **GAT** GGA CCT CGG
 AGC AAT TCT GCG GTA CCC TAT TCG CCC TAT AGT-3'

Die GT-Fehlpaarung lag an der fett und kursiv markierten Stelle.

7.6.2.8.3. 200mer Substrat

Das 200mer Homoduplex-Substrat war ein Fragment aus der hPMS2-cDNA, welches mit einem 5'-biotinyliertem Primer (7.6.2.7) vom Vektor pSG5-hPMS2 mittels PCR erzeugt wurde und nach der Standardprozedur (8.3.1.1.2) aufgereinigt wurde.

7.7. Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende *E.coli* K-12 Stämme verwendet:

Stamm	Genotyp	Referenz
JM109	<i>endA1, gyrA96, thi, hsdR17(r^{-k}, m^{+k}), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qZΔ M15]</i>	Messing <i>et al.</i> , 1981
INVαF'	<i>endA1, recA1, hsdR17(r^{-k}, m^{+k}), supE44, λ⁻, thi-1, gyrA, relA1, φ80lacZαΔM15Δ(lacZYA-argF), deoR+, F'</i>	Invitrogen, Groningen (Stamm ist abgeleitet von DH5α)

Die beiden *E. coli* Stämme (JM109 bzw. INVαF') wurden kompetent von der Firma Invitrogen (Groningen) bezogen.

Wahlweise wurden auch superkompetente Zellen (NovaBlue Singles™ Competent Cells) von der Firma Novagene, Heidelberg bezogen.

7.8. Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet:

Plasmid	Größe	Funktion	Selektion	Herkunft / Referenz
pCR® 2.1	3932 bp	Klonierung von PCR-Produkten	<i>amp^r, km^r</i>	Gahm <i>et al.</i> , 1991
pSGV	4100 bp	Eukaryontische Expression	<i>amp^r</i>	Green <i>et al.</i> , 1988
pcDNA3.1(+)	5400 bp	Eukaryontische Expression	<i>amp^r, neo^r</i>	Boshart <i>et al.</i> , 1985

7.8.1. Prokaryontischer Klonierungsvektor (pCR 2.1)

Dieser Vektor ist im Topo TA Cloning Kit, Invitrogen, enthalten. Der Vektor (Abbildung 13) liegt linearisiert vor und besitzt an den freien 3'-Enden ein überhängendes Thymidin, welches mit den 3'-überhängenden Adeninen des Amplifikates Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann.

Der Vektor besitzt zusätzlich die Möglichkeit, den Einbau eines PCR-Produktes durch den Verlust der *LacZ*-Genfunktion zu erkennen. Bakterienkolonien, welche einen Vektor mit Insert enthalten, erscheinen auf IPTG/X-Gal-haltigen Agarplatten weiß.

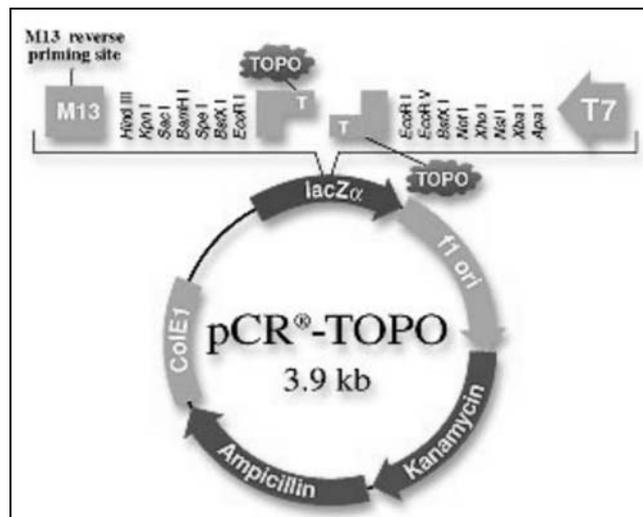


Abbildung 13: Aufbau des Topo-TA-Cloning Vektors pCR 2.1

7.8.2. Eukaryontische Expressionsvektoren (pcDNA3.1(+) und pSG5)

Für die eukaryontische Expression wurden die Vektoren pSG5 und pcDNA3.1 verwendet. Beide verfügen über einen *fl-ori* zur Replikationsinitiation in *E. coli*. Zur Selektion transformierter *E. coli*-Klone haben beide Plasmide einen Ampicillin-Resistenzmarker, pcDNA3.1 zusätzlich noch eine Neomycin-Resistenz. Außerdem enthält pSG5 einen frühen *SV40* Promotor, welcher die starke Expression in Zellen, welche mit dem großen T-Antigen stabil transfiziert sind, bewirkt. Die *SV40 ori*-Sequenzen erhöhen die episodale Replikation. Die Polyadenylierungssignale (*SV40 pA*) erhöhen weiterhin das Expressionsniveau.

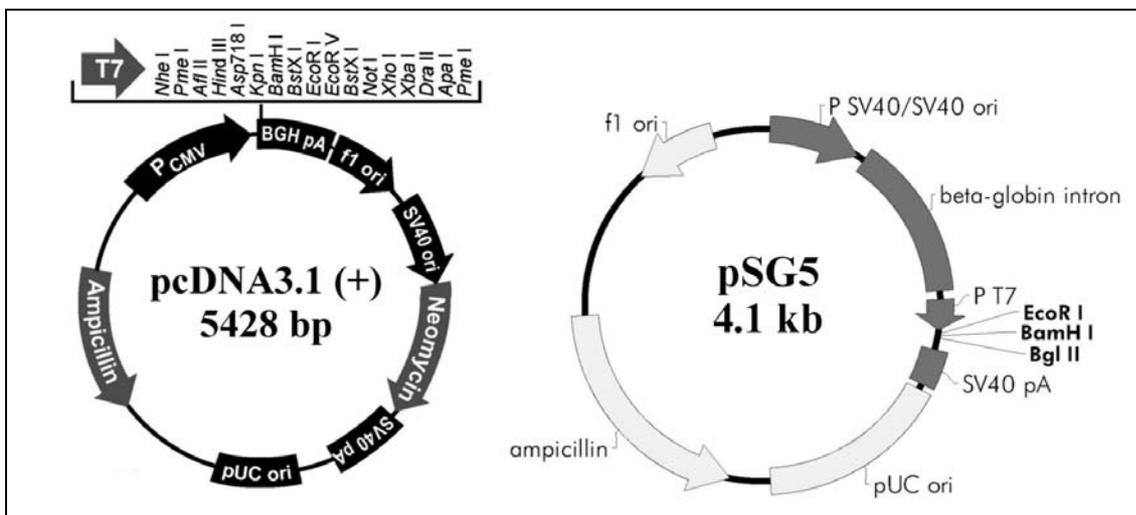


Abbildung 14: Aufbau der eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNA3.1 und pSG5

7.9. Medien für die Bakterienkultur

Die aufgeführten Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. In sterilem Zustand benötigte Lösungen wurden 30 Minuten, Medien für 20 Minuten bei 1.3 bar autoklaviert.

LB-Medium: Fertigpulver der Firma Gibco BRL, Karlsruhe 25 g ad 1 l
Zusammensetzung: 10 g Pepton aus Fleisch, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro l

LB-Agar: Fertigpulver der Firma Gibco BRL, Karlsruhe 37 g ad 1 l
Zusammensetzung: 10 g Pepton aus Fleisch, 5g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 12 g Agar pro l

SOC-Medium: Fertigmedium der Firma Invitrogen, Groningen
Zusammensetzung: 20 g Pepton aus Fleisch, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, 2,4 g MgSO₄ Heptahydrat, 20 mM Glucose pro l

LB-Selektionsmedien:

Zur Herstellung von Selektionsmedien wurden den entsprechenden LB-Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C Antibiotika zugesetzt (Ampicillin: 50 µg/ml, Kanamycin 40 µg/ml). Die Antibiotika wurden als Stammlösungen in tausendfacher Konzentration mit Wasser angesetzt, steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt.

Um die Unterbrechung der lacZ-Produktion durch Inserts in Plasmiden zu detektieren, wurden die Agaroseplatten zusätzlich mit X-Gal behandelt (40 µl einer 2%igen Stammlösung von X-Gal in DMF pro Platte).

7.10. Patienten

Die Indexpatientin (Abbildung 15 , II.1) war zum Zeitpunkt der Untersuchung 73 Jahre alt. Sie wurde der Medizinischen Klinik II der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt aufgrund familiär auftretender Polyposis, die sowohl bei der Tochter der Patientin als auch bei ihrem Sohn festgestellt wurde (III.1-2), zur Endoskopie überwiesen. Die Tochter (III. 1) verstarb im Alter von 28 Jahren an einem Sarkom, der Vater der Patientin (I.1) erlag im Alter von 55 Jahren einem Hirntumor. Bei der Patientin selbst wurde eine moderate Macrocephalie, Akanthome, ein Fibrom und Trichielemmnom festgestellt. Aufgrund der Symptomkonstellation lag der Verdacht auf ein Cowdensyndrom nahe.

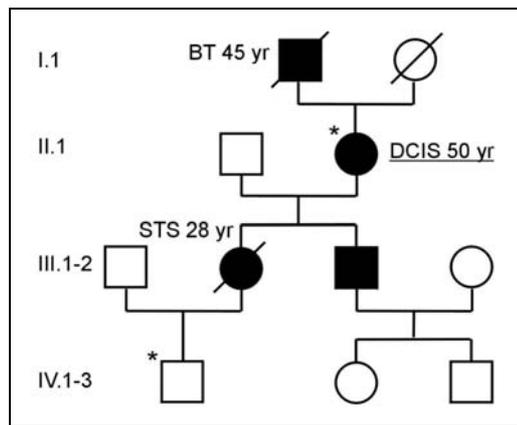


Abbildung 15: Familienstammbaum der Patientin mit Verdacht auf das Cowden-Syndrom

Familienstammbaum über vier Generationen. Phänotypisch betroffene Mitglieder sind durch schwarz gefüllte Symbole dargestellt, Frauen durch Kreise, Männer durch Quadrate. Durchgestrichene Symbole: Personen sind verstorben. BT:Gehirntumor, STS:Weichteilsarkom, DCIS:Brustkarzinom, yr: Alter bei Diagnose in Jahren. Familienmitglieder, von denen die Einwilligung für die Untersuchungen in dieser Arbeit zur Verfügung standen, sind durch ein Asterix (*) markiert. Die Indexpatientin (II.1) ist unterstrichen.

7.11. Material und Medien für die eukaryontische Zellkultur

7.11.1. Allgemein verwendete Zellkulturmaterialien

Antibiotik / Antimykotik-Lsg. (Penicillin, Streptomycin, Fungizone)	Gibco BRL, Karlsruhe
Auslaufpipetten, Kunststoff (2, 5, 10 und 25 ml)	Falcon, Heidelberg
Calciumphosphat	Invitrogen, Groningen
Dulbeccos PBS	Gibco BRL, Karlsruhe
Einfrierröhrchen, 1,8 ml	Nunc, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Gekammerter Objektträger, 8 Kammern	Lab Tek, Nunc, Heidelberg
Gewebekulturschalen (Ø 35 mm, 94 mm)	Falcon, Heidelberg
Mc Coy's 5A Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Mikrotiterplatten, 6 und 96 Vertiefungen	Falcon, Heidelberg
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen (Ø 3 cm)	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 14 und 50 ml	Falcon, Heidelberg
RPMI-1640 Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Sterile Pipettenspitzen 10, 20, 200, 1000µl	Molecular Bio-Products
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Zählkammer	Greiner, Solingen
Zellkulturflaschen (25, 75 und 175cm ²)	Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Costar, Wiesbaden

7.11.2. Material und Medien für die Transfektion

Calciumchlorid-Lösung 2M
2* HEPES-Puffer, pH 7,07

7.12. Allgemein verwendete Puffer

TE: Tris-HCl, pH 8,0 10 mM

EDTA, pH 8,0	1 mM
TBE: 5-fach konzentriert	
Tris-HCl, pH 8,0	445 mM
EDTA, pH 8,0	10 mM
Borsäure	445 mM
DNA-Proben-Puffer:	
Bromphenolblau	30 mM
Saccharose	1750 mM
EDTA, pH 8,0	20 mM
Harnstoff	6000 mM

7.13. Puffer für die DISC-Elektrophorese und Western Blotting

Laufpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 1 % [w/v] SDS in Aqua dest.

Trenngelösung (6 ml pro Gel) für eine Acrylamidkonzentration von 10 %:

10 % [v/v] 30% Acrylamid-0,8 % Bisacrylamid, 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,01 % [w/v] SDS, 0,01 % [v/v] TEMED, 0,002 % [w/v] APS in Aqua dest.

Sammelgelösung (2 ml pro Gel) für ein 5 %iges Gel:

5 % [v/v] 30 % Acrylamid-0,8 % Bisacrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,01 % [w/v] SDS, 0,01 % [v/v] TEMED, 0,002 % [w/v] APS in Aqua dest.

10x TBS: 1,0 M NaCl, 0,1 M Tris-Base pH 7,5 in H₂O

TBST: 10% 10x TBS, 0,05 % [v/v] Tween-20 in H₂O

Blockpuffer: 3% Milchpulver in TBST-Puffer

Strip-Puffer: 100 mM Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7

Blot-Puffer: 50 mM Tris-Base, 40 mM L-Glycin, 20% [v/v] Methanol, 0,0375% [w/v] SDS, pH 8,3 in Aqua dest.

7.14. Puffer für die Proteinextraktion aus humanen Zelllinien

7.14.1. Puffer für die Kernextraktion nach Dignam

Puffer A (hypotoner Puffer):

10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 5 mM NaF

Puffer C (hypertoner Puffer):

20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 5 mM NaF, 0.32 mM EDTA, 25 % (v/v) Glycerol

7.14.2. Puffer für die native Gesamtextraktion von Proteinen

Puffer A (hypotoner Puffer):

10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 mM NaF

Puffer C (hypertoner Puffer):

10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 830 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 mM NaF, Glycerin 34%

7.15. Puffer für die DNA-Interaktionsversuche

PMSF (21,75 mg/ml) in Isopropanol

DTT (19,25 mg/ml) in H₂O

Poly [d(I*C)] (1 µg/µl)

NaCl 1 M
 MgCl₂ 100 mM
 ATP Stammlösung A: 100 mg/ml
 ATP Stammlösung C: 4 mg/ml in Inkubationspuffer aliquotiert –80°C aliquotiert
 ATP Stammlösung C: 4 mg/ml ohne MgCl₂ in Inkubationspuffer –80°C aliquotiert

Vorwaschpuffer Dynabeads: 20 mM Tris-HCl pH=7,9, 50 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol (100%), 1 mM EDTA.

Inkubationspuffer 10X 200 mM Tris-HCl pH=7,9, 50 % (v/v) Glycerol (100%), 10 mM EDTA.

ATP-Stammlösung C: 20 mM Tris-HCl pH=7,9, 5% (v/v) Glycerol (100%), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF.

Waschpuffer: X mM NaCl (50, 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 1300, 1500 mM) 20 mM Tris-HCl pH=7,9, 5 % (v/v) Glycerol (100%), 1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT

Für Versuche unter Mg²⁺-freien Bedingungen wurde Magnesiumchlorid weggelassen, für einige Versuche wurden den jeweiligen Waschpuffern 250 µM ATP hinzugefügt.

7.16. Antikörper

hMSH6/GTBP Klon 44 monokl.	Transduction Laboratories, Lexington
hMSH2 Klon 27 monokl.	Transduction Laboratories, Lexington
hPCNA Klon 24 monokl.	Transduction Laboratories, Lexington
hMSH3 Klon 52 monokl.	Transduction Laboratories, Lexington
hMSH2 Ab-2 monokl.	Oncogen, Boston
hMLH1 Klon A16-4 monokl.	BD Biosciences, Erembodegem
hPMS2 Ab-1	BD Biosciences, Erembodegem
hPMS2 Ab-2	BD Biosciences, Erembodegem
hPMS1 rabbit polyklonal	zur Verfügung gestellt von J.Jiricny, Zürich

7.17. Kit-Systeme

ABI Prism BigDye Terminator	
Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Clonables Ligation/Transformation Kit	Novogene, Heidelberg
Jetstar Maxi-Plasmid-Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Mycoplasma Detection Kit	Roche, Heidelberg
PCR Optimizer Kit	Invitrogen, Groningen
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen

7.18. Proteinmarker

Protein Standard	
10-15-25-37-50-75-100-150-250 kDa prestained und unstained	BioRad

7.19. Membranen

Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
Filterpapier	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala

8. Methoden

8.1. Allgemeine Methoden

Die Methoden wurden nach Sambrock *et al.* durchgeführt. Abweichungen werden aufgeführt.

8.1.1 Sterilisation von Lösungen und Gebrauchsmaterialien

Lösungen, Puffer und Nährmedien, sowie unsterile Gebrauchsmaterialien wurden in feuchter Hitze bei 1-2 bar/120°C, 20 Minuten autoklaviert. Thermolabile Lösungen wurden durch Sterilfiltration (0,45 µm Filter) entkeimt. Die Sterilisation von Glasgeräten erfolgte in trockener Hitze für mindestens 3 Stunden bei 180-200°C.

8.1.2 Spektralphotometrische Messungen

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden Absorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten durchgeführt. Für die Konzentrationsermittlung wurde von folgenden Richtwerten ausgegangen:

dsDNA:	1 A ₂₆₀	≈	50 µg/ml
RNA:	1 A ₂₆₀	≈	40 µg/ml

Als Reinheitskriterium diente der Quotient (A_{260nm} / A_{280nm}), der möglichst gegen 2,0 gehen soll. Die Konzentrationsbestimmung einzelsträngiger Oligonukleotide erfolgte nach folgender Gleichung:

$$c [\mu\text{M}] = 100 O V / (0,92 n(\text{T}) + 1,54 n(\text{A}) + 0,75 n(\text{C}) + 1,17 n(\text{G}))$$

O:	Optische Dichte
V:	Verdünnungsfaktor
n():	Zahl der jeweiligen Nukleotide T, A, C und G im Oligonukelotid

8.2. Mikrobiologische Methoden

8.2.1 Kulturbedingungen

E. coli-Stämme wurden in Flüssigmedium auf einem Schüttler bei 170 rpm bzw. auf Agarplatten bei 37°C über Nacht kultiviert.

8.2.2 Herstellung einer Vorkultur

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 5 ml LB-Selektionsmedium mit einer Kolonie des entsprechenden *E.coli*-Stammes beimpft und bei 37°C über Nacht bei 200 rpm geschüttelt. Diese Vorkulturen dienten als Ausgangsmaterial zur Plasmidanalyse, zur

Beimpfung größerer Volumina von Flüssig-Medien oder zum Anlegen von Dauerkulturen.

8.2.3 Dauerkulturen von *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung der Dauerkulturen von *E.coli*-Zellen wurden Aliquote einer Vorkultur mit Glycerin auf eine Endkonzentration von 15% (v/v) eingestellt und bei -20°C gelagert.

8.2.4 Selektion rekombinanter Klone

Weißer Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze in jeweils 5 ml Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (40 µg/ml) enthaltendes LB-Medium transferiert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Analyse der Klone erfolgte durch eine Schnellisolation der Plasmide und anschließende PCR. Bei positiven Klonen folgte eine Plasmid-Minipräparation mit anschließender Sequenzierung zur Verifizierung der positiv detektierten Zellen.

8.2.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

Transformationen von kompetenten Bakterienzellen wurden unter Verwendung des Novagen-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Je nach Menge des in die Ligation eingesetzten PCR- oder Restriktions-Fragmentes wurden 1-5 µl Ligationsansatz verwendet. Die ausplattierten Bakterien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend analysiert.

8.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden

8.3.1 Allgemeine molekularbiologische und biochemische Methoden

8.3.1.1. Präparation und Reinigung von DNA aus Leukozyten

8.3.1.1.1. DNA Extraktion aus Leukozyten und Plasma

10 ml Vollblut wurden mittels Vacutainer-CPT-Röhrchen abgenommen und zentrifugiert (20 min, 20 °C, 2730 U/min). Der Überstand (Plasma+Leukozyten) wurde leicht geschüttelt, um die am Zwischenboden der Röhrchen haftenden Leukozyten zu lösen, in 50 mL-Falcon-Röhrchen dekantiert und erneut zentrifugiert (10 min, 20°C, 2000 U/min).

Der Überstand (Plasma) wurde abgenommen (ca. 10 ml), die pelletierten Leukozyten 2x mit PBS gewaschen und anschließend in insgesamt 400 µl PBS resuspendiert. Die DNA wurde aus den Leukozyten mittels Qiagen Blood Mini-Kit nach Herstellerangaben

isoliert und nach Konzentrationsbestimmung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die DNA-Menge aus 10^7 Leukozyten lag bei $1\text{-}3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

8.3.1.1.2. Reinigung von DNA mittels Centricon 100-Säulen

Für die Reinigung von PCR-Amplifikaten oder anderen DNA-Duplices einer Größe zwischen 100 bp und 10 kbp wurden entweder Centricon 100-Säulen oder der Qiagen PCR Purification Kit entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Im Falle der Centricon 100-Säulen wurden $40\text{ }\mu\text{l}$ der zu reinigenden Probe in $1,5\text{ ml}$ Wasser gegeben und komplett auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das untere Auffanggefäß entfernt, der Filter umgedreht, auf ein frisches Auffanggefäß aufgesetzt und erneut zentrifugiert (5 min , 2500 rpm). Das so aufgereinigte Produkt konnte nun direkt weiter verwendet werden.

8.3.1.2. Isolierung und Reinigung von Plasmiden

8.3.1.2.1. Schnellisolation von Plasmiden

Hierzu wurde jeweils ein Bakterienklon mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze direkt in $50\text{ }\mu\text{l}$ eines PCR-Ansatzes mit den geeigneten Primern gegeben und dieser in der PCR verwendet. Durch die initiale Erhitzung auf 95°C werden die Zellen lysiert.

8.3.1.2.2. Plasmid-Mini-Präparation

Für die Aufreinigung von bis zu $20\text{ }\mu\text{g}$ Plasmid-DNA wurde der Qiagen Spin Miniprep Kit verwendet. Hierfür wurde eine *E. coli*-Übernachtskultur bei $15000\text{ U}/\text{min}$ sedimentiert. Die anschließende Plasmidpräparation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Konzentration der eluierten Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

8.3.1.2.3. Plasmid-Maxi-Präparation

Zur Isolation von Plasmiden im Miligramm-Bereich wurde eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Hierfür wurde die entsprechende Dauerkultur bei Raumtemperatur aufgetaut und 250 ml LB Medium (mit Antibiotikum) mit $500\text{ }\mu\text{l}$ dieser Kultur oder einer Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden am nächsten Tag sedimentiert, 1x mit PBS gewaschen und die Plasmide mittels des Jetstar Maxi-Plasmid-Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und die DNA bei -20°C aufbewahrt.

8.3.1.3. Präparation von RNA

8.3.1.3.1. Extraktion von Gesamt-RNA mittels Tristar

Gesamt-RNA aus Leukozyten oder eukaryontischen Zellen wurde mit Hilfe des Tristar-Reagenzes gewonnen. Leukozyten wurden aus 10 ml Vollblut mittels Vacutainer-CPT-Röhrchen isoliert, ausgezählt und für einen Extraktionsansatz 10^7 Zellen eingesetzt. Zur

Aufreinigung der RNA wurde das Tristar-Reagenz nach Herstellerangaben verwendet. Das RNA-Pellet wurde getrocknet und in 20 μ l RNase-freiem Formamid resuspendiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA anschließend in 20 μ l Aliquoten bei -80°C eingefroren.

8.3.1.4. Konzentrieren von Nukleinsäuren

8.3.1.4.1. Ethanol-Fällung

Nukleinsäurehaltige Lösungen wurden nach Zugabe des 2,5- bis 3-fachen Volumens EtOH (100%) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden für 15 Minuten bei 15000 U/min sedimentiert und anschließend zweimal in 70% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in H_2O aufgenommen.

8.3.1.4.2. Isopropanol-Fällung

Die Isopropanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Zugabe von 0,7 bis 1 Volumenanteilen Isopropanol. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die gefällte DNA sedimentiert, zweimal mit 70% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und nach dem Trocknen in H_2O resuspendiert.

8.3.1.5. Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

8.3.1.5.1. Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihren Molekulargewichten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zur Auftrennung von kleineren PCR-Produkten (ca. 200 bis 600 bp) wurden 2%ige Agarosegele eingesetzt. Zur Auftrennung von größeren PCR-Produkten und Plasmiden wurden 1%ige Gele verwendet.

Für ein 2 %iges Agarosegel wurden 1,4 g Agarose in 70 ml 0,5x TBE-Puffer in einem Mikrowellengerät geschmolzen, Ethidiumbromid (230 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und nach dem Abkühlen auf etwa 60°C in eine Gießkammer eingefüllt. Anschließend wurden ein bis zwei Probenkämme mit 14 bzw. 20 Zähnen eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die mit 0,5x TBE-Puffer befüllte Horizontal-Gelapparatur gelegt und die mit DNA-Proben-Puffer versetzten Proben (2 μ l Probenpuffer + 10 μ l Probe) in die Geltaschen gegeben. Die DNA-Fragmente wurden ca. 1 Stunde mit einer Feldstärke von etwa 1 bis 5 V / cm^2 aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden mit UV-Licht (305 nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera durch einen orange-rot Filter fotografiert. Die Fragmentgrößen wurden durch gleichzeitiges Auftrennen von DNA-Längenstandards (7.3.3) bekannter Größe bestimmt.

8.3.1.5.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten (z.B. Plasmide oder DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau) erfolgte mittels des Qiagen Gel-Extraction Kit. Die Methode basiert auf einer aus Silika-Gel bestehenden Membran-Matrix, die in Kombination mit einem speziellen Bindepuffer bis zu 10 µg DNA binden kann. Diese kann dann mit TE-Puffer oder Wasser wieder vom Säulenmaterial eluieren werden. Für die Isolierung spezieller DNA-Fragmente wurde das DNA-Gemisch nach dem Restriktionsverdau je nach Größe des Fragmentes in einem 1 bzw. 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten. Der so erhaltene Gelblock mit der zu isolierenden DNA wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und die DNA nach Herstellerangaben eluiert. Die Reinheit der isolierten DNA wurde abschließend auf einem weiteren Agarosegel überprüft.

8.3.1.6. Herstellung von Oligoduplices aus DNA-Oligomeren

Zur Herstellung von korrekt gepaarten sowie über eine GT-Fehlpaarung verfügenden, einseitig an einem Strangende (5') biotinylierten Oligoduplices wurden die entsprechenden synthetisch hergestellten Oligomere (7.6.2.8) miteinander hybridisiert. Dies geschah durch 5-minütiges Erhitzen beider Oligomere in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) Puffer in 100 µl Gesamtvolumen auf 95°C. Anschließend wurde der Ansatz über einen Zeitraum von zwei Stunden langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und bei -20°C gelagert (Protokoll nach Matton et al., 2000).

8.3.1.7. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

8.3.1.7.1. Restriktionsschnitt von Plasmid-DNA

Restriktionsschnitte in Plasmid-DNA wurden sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke und zur Gewinnung linearer DNA-Fragmente durchgeführt. Ein Ansatz enthält den empfohlenen Reaktionspuffer, Plasmid-DNA (etwa 1 bis 10 µg) und 1-10 U Enzym/µg DNA (maximal 10 % des Endvolumens). Der Restriktionsschnitt erfolgte in der Regel über 60 min bei 37°C.

8.3.1.7.2. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen 5'-, 3'-überhängenden oder glatten Enden wurde der Clonables Ligation/Transformation Kit verwendet. Zur Konstruktion von rekombinanten Plasmiden wurde die geschnittene Vektor-DNA (20-100 ng) mit einem Überschuß des zu inserierenden DNA-Fragmentes (Volumen insgesamt 5 µl) mit 5 µl des Ligationsmixes entsprechend den Herstellerangaben versetzt. Anschließend konnte der Ligationsansatz direkt zur Transformation von *E. coli*-Zellen eingesetzt werden.

8.3.1.7.3. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Mullis und Saiki (Mullis et al., 1986) entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische Vermehrung von DNA-Sequenzen *in vitro*. Sie basiert auf der Hybridisierung zweier Oligonukleotid-Primer, die die jeweilige Zielsequenz flankieren, mit der denaturierten Ausgangs-DNA. Diese durch die Anlagerung der Primer gebildeten kurzen, doppelsträngigen Bereiche dienen als Initiationsstellen der Replikation für die hitzestabile *Thermus aquaticus*-Polymerase bzw. die von dieser Polymerase abgeleiteten kommerziell erhältlichen Polymerasen. Nach Aktivierung der in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen *Ampli Taq Gold*-Polymerase durch eine Vorinkubation von 10-12 min bei 95°C folgen eine Reihe sich wiederholender Zyklen, bestehend aus der Denaturierung der synthetisierten DNA-Stränge, der Hybridisierung der Oligonukleotide und ihrer Elongation durch die Polymerase. Dies führt zur exponentiellen Akkumulation des spezifischen DNA-Fragmentes. Das Pipettierschema einer Standard-PCR ist in Tabelle 5 angegeben.

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
5x-Optimierter PCR-Puffer A,B,C, oder D (Invitrogen)	10 µl	(siehe Hersteller)
dNTP-Mix (jedes dNTP 2,5 mM)	5 µl	je 250 µM
Sense Primer (10 µM)	5 µl	1 µM
Antisense Primer (10 µM)	5 µl	1 µM
<i>Ampli Taq Gold</i> Polymerase	1 µl	0,1 U/µl
DNA Substrat	wie benötigt	
mit Wasser auf	50 µl	

Tabelle 5: Standard-Pipettierschema einer PCR

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem PE 9600, 9700, oder 2400 Cycler durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden als Standard-PCR-Bedingungen folgende Parameter verwendet: 10 min 95°C; dann 35 Zyklen: 30 s 95°C, 30 s 55°C, 1 min 72°C; dann 10 min 72°C. Für die Optimierung der PCR-Bedingungen (MgCl₂-Konzentration und pH-Wert) wurden die Puffer A, B, C und D des Optimized Buffer-Kits von Invitrogen verwendet. Die erhaltenen Amplifikate konnten anschließend auf Agarosegelen analysiert und durch Sequenzierung überprüft werden.

8.3.1.7.4. Reverse Transkription (RT)

Die Umschreibung von RNA in cDNA wurde mit Hilfe der Reversen Transcriptase *Superscript II* durchgeführt. Die RNA wurde zu Beginn 5 Minuten bei 65°C denaturiert, 5 Minuten auf Eis inkubiert und dann mittels Zufalls-Hexameren, Oligo-dT oder einem spezifischen Primer in folgendem Ansatz eingesetzt (Tabelle 6):

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
5xFirst Strand Buffer (Gibco)	4 µl	

DTT (Gibco)	2 μ l	0,1 M
dNTP-Mix (jedes dNTP 10 mM)	1 μ l	500 mM
Oligo dT oder Antisense Primer (10 μ M)	1 μ l	0,5 μ M
Reverse Transkriptase (<i>Superscript II</i>)	1 μ l	0,5 U/ μ l
Template-RNA	2 μ l	~250 ng Gesamt-RNA
Mit Wasser auf	20 μ l	

Tabelle 6: Pipettierschema für eine reverse Transkription

Der Ansatz wurde 1 h bei 42° C inkubiert, die Reaktion durch 15-minütige Inkubation bei 75°C gestoppt und dann auf Eis gestellt. Bis zur weiteren Verwendung konnte die so hergestellte cDNA bei -20° C gelagert werden.

8.3.1.7.5. Klonierung von PCR-Produkten

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mittels des Topo-TA-Cloning-Kits. Dieser Kit macht sich die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase zunutze, an das 3'-Ende des Amplifikates ein zusätzliches Adenin anzuhängen. Das einzuklonierende PCR-Fragment wurde nach Herstellerangaben mit dem Ligasemix und dem darin enthaltenen Vektor (pCR 2.1, siehe 7.8.1) inkubiert und anschließend transformiert (TOP 10 Zellen, Invitrogen). Nach Ausstreichen auf Agarplatten (Ampicillin, X-Gal) und Inkubation über Nacht konnten am nächsten Tag inserttragende Klone aufgrund ihrer weißen Färbung identifiziert werden.

8.3.1.7.6. Einführen von Mutationen (Site-directed mutagenesis)

Zur Einführung von Punktmutationen in die Reparaturgene wurde der Site-directed mutagenesis Kit verwendet. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Mutagenese-Reaktion wurden 10 Klone mittels Plasmid-Schnellisolierung und PCR analysiert. Nach der Mini-Preparation der Plasmid-DNA wurde dann der mutierte Bereich im Gen durch Sequenzierung überprüft. Die Effizienz der Mutagenese-Reaktion lag dabei über 95%. Um Fehler der Polymerase ausschließen zu können, wurde das komplette Reparaturgen eines positiven Klons vollständig sequenziert. Von fehlerfreien Klonen wurde dann mittels Maxi-Präparation DNA für weitere Transfektionsversuche angefertigt.

8.3.1.8. Sequenzierung

Die Vollängen-cDNA des hMLH1-*wt* Gens, des hMSH2-*wt* Gens, aller Mutationskonstrukte, klonierter PCR-Fragmente und einzelner Exons wurden durch Sequenzieren auf ihre Richtigkeit überprüft.

8.3.1.8.1. Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem AbiPrism BigDye-System durchgeführt. Das System beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Hierbei werden zu den Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Dideoxy-Nukleotid-5'-

Triphosphate (ddNTPs) in die Sequenzreaktion eingesetzt. Der Einbau der markierten ddNTPs in den Zweitstrang bewirkt den Abbruch der Synthese. Man erhält so an jeder Base farbmarkierte Abbrüche.

Zu 8 µl Sequenziermix wurden 1 µl Primer (10 µM) und 4 bis 9 µl aufgereinigtes Amplifikat gegeben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Sequenzierungs-PCR wurde wie folgt durchgeführt: 2 min 95°C, dann 30 Zyklen mit 30 sec 95°C (Denaturierung), 15 sec 55°C (Annealing), 4 min 60°C (Elongation), anschließend Abkühlen auf 4°C.

8.3.1.8.2. Direktsequenzierung aus Plasmid-DNA

Bei der direkten Sequenzierung aus Plasmid-DNA entfällt die Erst-PCR, die bei der DNA Sequenzierung aus genomischer DNA vorangeht. Stattdessen werden in die Sequenzierungs-PCR direkt 5 µl Miniprep-Plasmid-DNA (ca. 1 µg) zusammen mit 8 µl Sequenziermix und 1 µl Primer (10 µM) eingesetzt. Die Amplifikationsbedingungen entsprechen ansonsten der beschriebenen Sequenzreaktion.

8.3.1.8.3. Aufreinigen der Sequenzreaktion

20 µl Sequenzieransatz wurden mit 52 µl H₂O und 128 µl Ethanol (100%) vermischt und 15 Minuten inkubiert. Die DNA wurde dann mittels Zentrifugation (15000 U/min, 15 Minuten) pelletiert und mit 70% Ethanol (-20°C) einmal gewaschen. Die DNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet.

8.3.1.8.4. Elektrophorese und Detektion

Die gereinigten Proben wurden in 15 µl Wasser gelöst und auf dem Sequenziergerät ABI 310 analysiert. Aufgrund der jeweils unterschiedlichen Markierung der vier Didesoxynukleotide kann die Basenabfolge in einem einzigen Elektrophoreselauf detektiert werden. Hierbei werden die Markierungen durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt und diese von einem Detektionsgerät empfangen. Anschließend werden die so erhaltenen Daten verrechnet und analysiert.

8.3.1.9. Bindung biotinylierter DNA-Stränge an Dynabeads Streptavidin

Die DNA-Stränge (einzelsträngig oder doppelsträngig) wurden entsprechend den Herstellerangaben an Dynabeads Streptavidin M-280 gebunden. Zur Parallelbearbeitung von sechs Proben wurden 400 µl Dynabeads Streptavidin mit 100 pmol biotinyliertem DNA-Substrat in der Kopplungsreaktion eingesetzt (bei Verwendung von zwei verschiedenen Substraten wurden je 200 µl mit 50 pmol eingesetzt). Die Dynabeads wurden vier Mal mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 M NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen und dann im halben Originalvolumen Waschpuffer resuspendiert. Die entsprechende Menge DNA wurde hinzugefügt und 20 Minuten unter gelegentlichem

Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und zweimal mit Waschpuffer gewaschen.

8.3.1.10. Isolierung von Proteinen aus humanen Zellen

8.3.1.10.1. Gesamtproteinisolierung

Das Medium wurde von den Zellen entfernt. Die Zellen wurden dann einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer geeigneten Menge Lysispuffer versetzt mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst. Die Zellsuspensionen wurden in Eppendorfgefäße überführt und mittels Ultraschallsonde auf Eis aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden bei 1000 U/min für 5 Minuten abzentrifugiert (4°C) und die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

8.3.1.10.2. Native Kernextraktion

Die Kernextraktion erfolgte weitgehend nach dem Protokoll von Dignam *et al.* (Dignam *et al.*, 1983). Die Zellen wurden geerntet (im Falle adhärenter Zellen wurden diese nach Waschen mit PBS mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst) zweimal mit PBS gewaschen, abzentrifugiert (2000 rpm, 5 Minuten) und der Überstand vollständig abgenommen. Die Zellen wurden im dreifachen Volumen eiskaltem Puffer A (7.14.1) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. 5 µl der Suspension wurden auf einen Objektträger aufgetragen und mit Trypanblaulösung (0,5% in PBS) gemischt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei +4°C durchgeführt. Der Zellaufschluß erfolgte durch 5-15 Schläge mit einem Dounce-Homogenisator (Pistill B), bis >80% aller Zellen lysiert war (kontrolliert durch Trypanblaufärbung der Zellen im Vergleich mit der vorher entnommenen Probe). Anschließend wurde der Trümmerhaufen zentrifugiert (5 Minuten, 5000 rpm) und der Überstand (cytoplasmatischer Extrakt) abgenommen. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert (2 Minuten, 14000 rpm) und restlicher Cytoplasmaextrakt abgenommen. Das Pellet, bestehend aus Zelltrümmern und intakten Nuklei, wurde im doppelten Zellvolumen Puffer C (7.14.1) resuspendiert, 30 Minuten auf Eis geschüttelt und zentrifugiert (10 Minuten, 14000 rpm). Nach Bestimmung des Proteingehaltes des Überstandes (Kernextrakt) wurde dieser in kleinen Aliquoten bei -80°C gelagert. Es ergab sich, je nach Zelllinie, ein Gehalt von 12-22% Kernproteinanteil am Gesamtproteingehalt beider Extrakte.

8.3.1.10.3. Native Gesamtproteinextraktion

293T-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber gelöst und abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min). Sie wurden im dreifachen gepackten Zellvolumen eiskaltem Puffer A (7.14.2) aufgenommen und zum Zellaufschluß bei -80°C gefroren. Anschließend wurden sie zum Auftauen wieder auf Eis gestellt und dann mit dem

gleichen Volumen Puffer C (7.14.2) gemischt. Die Suspension wurde 30 min auf Eis geschüttelt und dann zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm). Der Proteingehalt des Überstandes (nativer Gesamtproteinextrakt) wurde gemessen und der Extrakt bei -80°C gelagert.

8.3.1.11. Proteindetektion

8.3.1.11.1. Western-Blot

20-50 μg der zu analysierenden Proteine wurden mit Roti-Load-Puffer vermischt, eine Minute auf 95°C erhitzt und in einem SDS-Disc-Polyacrylamidtrenngel (7,5%, 10% oder 12,5%) getrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA. Anschließend wurde das Gel für 1 Stunde bei 55 mA in einem Semidry-Blotter auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde zur Transferkontrolle mit Ponceaurot angefärbt und die Farbe nach der Kontrolle mit Wasser wieder ausgewaschen.

8.3.1.11.2. Immunchemische Detektion mittels ECL-Detektionsreagenz

Die Membran wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde oder bei 4°C über Nacht in Blockierungspuffer, anschließend mit den jeweiligen Primär-Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primär-Antikörper wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen in der Blockierungspuffer verdünnt eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen in TBST (je 5 Minuten) wurde der passende Sekundär-Antikörper (anti-Maus oder anti-Hase IgG, Peroxidase-konjugiert, in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockierungspuffer) für 30 Minuten auf die Membran gegeben. Anschließend wurden dreimal mit TBST gewaschen und der Peroxidasegekoppelte Antikörper mit ECL-Detektionsreagenz behandelt. Die entstehende Chemilumineszenz wurde mit einem HyperfilmTM MP in der Dunkelkammer detektiert.

8.3.1.11.3. Entfernen der auf Nitrocellulosemembran gebundenen Antikörper.

Um die Antikörper für eine weitere Detektion wieder komplett von der Nitrocellulosemembran zu entfernen, wurde die Membran mit dem Strip-Puffer überschichtet und 30 min bei 50°C inkubiert. Es folgten zwei zehnmütige Waschschrirte in einem großen Volumen TBST-Puffer unter beständigem Schütteln der Membran. Danach wurde die Membran erneut wie unter 8.3.1.11.1 beschrieben behandelt.

8.3.1.12. Transfektion

8.3.1.12.1. Calciumphosphat-Präzipitation

Für die Transfektion von 293T-Zellen eignet sich die billige und schnell durchführbare Calciumphosphat-Präzipitation. Hierbei wird durch Mischen einer DNA- und calciumchloridhaltigen Lösung mit einem phosphathaltigen Puffer passenden pHs

Calciumphosphat so ausgefällt, daß die DNA kopräzipitiert wird und in den entstehenden Kristallen enthalten ist. Die so entstandene Kristallsuspension wird über einige Zeit im Kulturmedium mit den Zellen in Kontakt gebracht, die die Partikel mitsamt der DNA aufnehmen und das Plasmid zur Expression bringen können. Ein wichtiger Vorteil der Methodik ist die Möglichkeit, zwei oder mehrere Plasmide in stöchiometrischen Mengen kotransfizieren zu können.

8.3.1.12.1.1. Herstellung der Kristallsuspension

Für eine Transfektion wurde 1/10 des auf den Zellen liegenden Mediumvolumens als Endvolumen der Transfektionskristallsuspension benötigt. Da die meisten Transfektionen in 75 cm²-Kulturschalen mit 10 ml Medium durchgeführt wurden, wurde pro Schale 1 ml Kristallsuspension hergestellt.

500 µl 2x HBS-Puffer (7.11.2) wurden in einem 1,5 ml Cup bei Raumtemperatur vorgelegt. In einem zweiten Cup wurden 500 µl der DNA-Calciumchloridlösung mit Endkonzentrationen von 40 µg/ml Plasmid-DNA und 248 mM CaCl₂ angesetzt. Diese Lösung wurde mit einer 200 µl-Pipette tropfenweise in die 2x HBS-Lösung eingebracht, wobei diese langsam durch Aufziehen und Ausdrücken mit einer weiteren 200 µl-Pipette in Bewegung gehalten wurde, um die Lösungen zu mischen.

Anschließend wurde die Mischung für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Drei µl der Suspension wurden dann mikroskopiert, um die erfolgreiche Kristallbildung sicherzustellen. Nach insgesamt 30 min Inkubation wurde die Suspension zur Transfektion verwendet.

8.3.1.12.1.2. Vorbereitung und Transfektion der Zellen

12-24 Stunden vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von etwa 30-40% Konfluenz neu ausgesät. Eine Stunde vor der Transfektion wurden die Zellen mit vorgewärmtem frischen Medium versetzt. Die Kristallsuspension wurde zur Transfektion eingebracht, indem die Kulturschalen auf die Seite gehalten wurden, damit sich das Medium dort sammelt, und dann die Suspension unter sanftem Schütteln hinzugefügt wurde. Anschließend wurde die Schale einige Male leicht in der Waagerechten geschwenkt, um die Kristalle homogen zu verteilen. Nach 3-5 h wurde das Medium gegen Frisches ausgetauscht und die Zellen nach 24 h geerntet und native Gesamtzellextrakte (8.3.1.10.3) hergestellt.

8.3.2. Spezielle molekularbiologische und biochemische Methodik

8.3.2.1. Klonierung der hPMS1-Vollängen-cDNA

Die hPMS1-Vollängen-cDNA wurde hergestellt, indem zunächst mRNA aus Lymphozyten extrahiert wurde (8.3.1.3) und diese dann mit einem spezifischem Primer

in cDNA umgeschrieben wurde (7.6.2.3). Die cDNA wurde mit RNase H behandelt und danach via PCR amplifiziert (7.6.2.3, 8.3.1.7.3). Das Amplifikat wurde auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen und die Banden, deren Größe dem des erwarteten Vollängenprodukte entsprachen, ausgeschnitten und aufgereinigt (8.3.1.5). Das Produkt wurde in einen Topo-TA-Cloning Vektor (7.8.1) einkloniert und mehrere Klone sequenziert. Ein korrekter Klon wurde mit BamHI geschnitten, das Insert über Gelextraktion gereinigt und in den ebenfalls BamHI-geschnittenen, dephosphorylierten pSG5-Vektor (7.8.2) einkloniert. Einige Klone wurden mittels Miniprep und Sequenzierung auf die korrekte Insertion getestet und von einem richtigen Klon eine Maxiprep zur Gewinnung ausreichender Mengen Plasmid gemacht.

8.3.2.2. Herstellung von hMutL α -ATPase-Mutanten

Zur Herstellung von ATP-Hydrolyse- und Bindungsmutanten von hMutL α wurden folgende Punktmutationen mittels Site-directed mutagenesis in die Plasmide eingeführt:

hMLH1

Mutante	Nukleotidsequenz original	Nukleotidsequenz mutiert	Aminosäuresequenz original	Aminosäuresequenz mutiert
hMLH1 E34A (Hydrolyse -)	gct atc aaa gag atg att gag	gct atc aaa gcg atg att gag	AIK E MIE	AIK A MIE
hMLH1 R265H (Bindung -)	atc aac cat cgt ctg gta gaa	atc aac cat cat ctg gta gaa	INH R LVE	INH H LVE

hPMS2

Mutante	Nukleotidsequenz original	Nukleotidsequenz mutiert	Aminosäuresequenz original	Aminosäuresequenz mutiert
hPMS2 E41A (Hydrolyse -)	gcg gta aag gag tta gta gaa	gcg gta aag gcg tta gta gaa	AVK E LVE	AVK A LVE
hPMS2 R295H (Bindung -)	atc aac cgg cgg cct tgt gac	atc aac cgg cat cct tgt gac	INR R PCD	INR H PCD

Der Erfolg der Mutationen wurde mittels Sequenzierung überprüft (Abbildung 16).

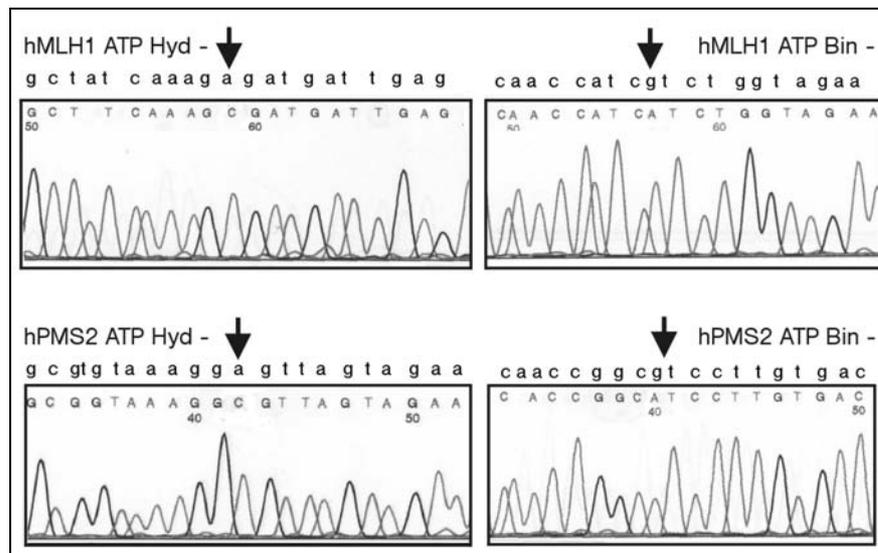


Abbildung 16: Sequenzkontrolle der ATPase-Mutanten von hMLH1 und hPMS2

8.3.2.3. Herstellung von hMLH1-Fragment-cDNAs im Vektor pSG5

Die gewünschten Fragmente der hMLH1-cDNA wurden via PCR von der im pcDNA3.1-Vektor vorliegenden Vollängen-cDNA amplifiziert. Hierzu wurden Primer verwendet, die an ihren 5'-Enden Start- und Stopcodons in korrektem Leseraster als auch eine BamHI-Schnittstelle enthielten (7.6.2.6).

Die PCR-Produkte wurden direkt in den Topo-TA-Cloning Vektor inkloniert und in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Mittels *Blue-/White-Screenings* wurden insertragende Kolonien identifiziert und jeweils drei Klone zu einer Miniprep verwendet.

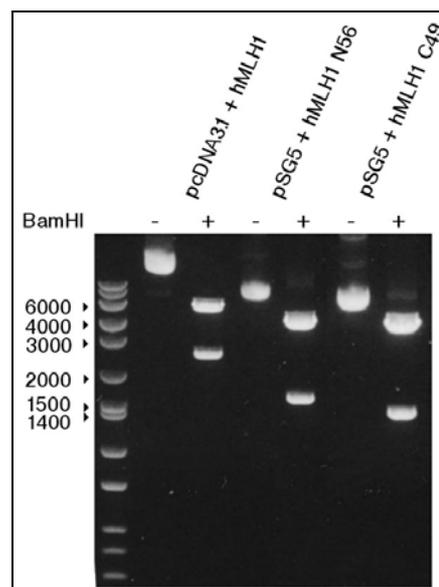


Abbildung 17: Größenkontrolle der Fragmente der hMLH1-cDNA

Links: Größenmarker, Werte entsprechen Basenpaaren. Die Vektoren sind jeweils vor und nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym BamHI aufgetragen worden.

Die Klone wurden mit BamHI geschnitten (Abbildung 17) und die Inserte aus dem Agarosegel eluiert. Anschließend wurden die Inserte in den BamHI-geschnittenen, dephosphorylierten pSG5-Vektor einligiert und transformiert. Klone mit korrekter Orientierung des Inserts und korrekten Anfangs- und Endsequenzen wurden zur Herstellung ausreichender Mengen Plasmid mittels Maxiprep verwendet.

8.3.2.4. PCR des PTEN-Gens

Die neun Exons des PTEN-Gens wurden in einzelnen PCRs unter Standardbedingungen (8.3.1.7.3) amplifiziert (Primer siehe 7.6.2.1). Die zur Amplifikation verwendete genomische DNA wurde aus Lymphozyten gewonnen (8.3.1.1).

8.3.2.5. Reverse Transkription und Amplifikation der PTEN-mRNA

PTEN wurde aus Lymphozyten-RNA (8.3.1.3) mittels eines PTEN-mRNA-spezifischen Primers (7.6.2.2) revers transkribiert und die cDNA ebenfalls mit mRNA-spezifischen Primern amplifiziert.

8.3.2.6. Proteinbindungsexperiment

8.3.2.6.1. Inkubationsbedingungen und Pipettierschema

Beim Proteinbindungsexperiment wurden die Proteine (aus Extrakten stammend oder in Form von gereinigtem Protein) in 300 µl Gesamtvolumen in einem 1,5 ml Cup unter definierten Bedingungen (Tabelle 7) mit DNA-gekoppelten Dynabeads Streptavidin inkubiert. Das an die DNA-Dynabeads gebundene Protein wurde anschließend entsprechend dem unten aufgezeigten Protokoll eluiert und detektiert.

<u>Inkubationsbedingungen (Standard):</u>		
20	mM	Tris-HCl pH=7,9
5	% (v/v)	Glycerol (100%)
1	mM	EDTA
1,5	mM	Magnesiumchlorid
0,5	mM	DTT
0,5	mM	PMSF
1	µg	Poly [d(I*C)]

Für magnesiumfreie Versuche wurden kein Magnesiumchlorid hinzugefügt.

Tabelle 7: Inkubationsbedingungen bei den Proteinbindungsversuchen

Zum Ansetzen der verschiedenen Versuche wurden die zusammenzufügenden Mengen der Einzelsubstanzen zunächst in folgendem Pipettierschema (Tabelle 8) berechnet und dies dann als Grundlage für die Durchführung des Experimentes verwendet.

	1	2	3	4	5	6	Endkonzentration
10xInkubationspuffer							1/10
Kernextrakt							

Dynabeads							
ATP Stmlsg							
NaCl 1M							50 mM
EDTA 100 mM							
MgCl ₂ 100 mM							1,5 mM
Poly [d(I*C)]							1 µg
PMSF							0,5 mM
DTT							0,5 mM
Wasser							auf 300 µl

Tabelle 8: Pipettierschema für die Proteinbindungsversuche

Angleichung Salzkonzentration: Da im 300 µl-Inkubationsansatz eine fest vorgegebene Zusammensetzung von Salzen bestehen sollte, wurde die Änderung, die durch Zugabe des Kernextraktes hervorgerufen wurde, jeweils berechnet und die weiteren hinzugegebenen Komponenten entsprechend reduziert. Für die Berechnung galt, daß pro µl zugegebenem Kernextrakt (8.3.1.10.2 und 8.3.1.10.3) folgende Konzentrationen erzeugt wurden: 1,4 mM NaCl, 0,005 mM MgCl₂.

8.3.2.6.2. Durchführung:

1. Benötigte Menge Dynabeads in ein Cup vorlegen und 3x mit 200 µl Vorwaschpuffer waschen. In Inkubationscups aliquotieren.
2. In Inkubationscup zusammenpipettieren nach dem Pipettierschema (Tabelle 8) in folgender Reihenfolge:
10x Puffer Inkubation, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, Wasser, DTT, PMSF, Poly [d(I*C)]-Lösung, Kernextrakt.
3. Inkubationsansatz 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
4. Für 5 Minuten auf Eis stellen.
5. Puffer von Dynabeads abnehmen, auf Eis stellen.
6. Inkubationsansatz zu Dynabeads hinzufügen, zentrifugieren, mit Pipette mischen und 20 min auf Eis inkubieren.
7. Gegebenenfalls ATP-Lösung hinzufügen, mischen und weitere 5 Minuten inkubieren.
8. 20 µl Elutionspuffer zu Dynabeads geben, mit Pipette mischen, 5 Minuten inkubieren.
9. Separieren, Überstand fürs Gel aufbewahren.
10. Gegebenenfalls bei Schritt 8 mit weiterem Elutionspuffer fortfahren.

8.4. Zellbiologische Methoden

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Plastikmaterial und Lösungen, soweit nicht steril vom Hersteller bezogen, wurden 30 Minuten bei 1,3 bar und 121°C autoklaviert. Glaswaren wurden 8 Stunden bei 220°C hitzesterilisiert.

8.4.1. Kultivierung von eukaryontischen Zellen

8.4.1.1. Kulturbedingungen

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ (v/v) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% in einem Zellkulturbrutschrank inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in den folgenden Medien kultiviert:

Zelllinie	Medium
HeLa	RPMI 1640, 10% FCS
TK6	RPMI 1640, 10% FCS
MT1	RPMI 1640, 10% FCS
HCT-116	DMEM F-12, 10% FCS
HCT-116+ch3	DMEM F-12, 10% FCS, 0.4 mg/ml G-418
LoVo	RPMI 1640, 10% FCS
Hec59	40 % DMEM F-12, 40 % DMEM, 20 % FCS, 1 % L-Glutamin
293	DMEM, 10% FCS
293T	DMEM, 10% FCS

8.4.1.2. Zellpassage

Bei Erreichen einer ca. 70%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA-PBS-Lösung (1-3 ml), bei 37°C (2-15 Minuten) im Zellkulturschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Die trypsinisierten Zellen wurden mit Medium gewaschen, in frischem Kulturmedium resuspendiert, ausgezählt und in einer Konzentration von 10⁵/ml ausgesät.

8.4.1.3. Tiefrieren und Auftauen

Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in Medium gewaschen, in frischem Kulturmedium aufgenommen, ausgezählt und auf eine Konzentration von ca. 10⁷ Zellen/ml eingestellt. Eine Lösung aus 80% Kulturmedium und 20% DMSO (v/v) wurde ebenso wie die Zellsuspension auf Eis gekühlt und im Verhältnis 1 : 1 mit der Zellsuspension gemischt. Die Zellen wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Drehen des Gefäßes stehen gelassen, bis die Suspension verflüssigt war. Anschließend wurden sie dann 1x mit 10 ml Kulturmedium gewaschen, bevor sie in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) ausgebracht wurden.

8.4.1.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS in 2-10 ml PBS resuspendiert. 20 µl der Suspension wurden, falls nötig, verdünnt, mit Trypanblaulösung versetzt und in der Neubauerzählkammer ausgezählt. Die Zelldichte Z wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$Z = nV / (Sq)$$

n: gezählte Zellen
V: Verdünnungsfaktor
S: Volumen Suspension
q: Anzahl der Quadrate

Die gewünschte Zellzahl konnte danach eingestellt werden.

8.4.1.5. Mycoplasmen-Test

Mycoplasmen sind weit verbreitete und schwerwiegende Kontaminationen von Zellkulturen. Sie sind eines der Hauptprobleme bei der Verwendung von Zellkulturen. Es wurde gezeigt, daß bis zu 30% aller Zellkulturen mit Mycoplasmen infiziert sein können, wobei die Spezies *M. orale*, *A. laidlawii*, *M. arginini* und *M. hyorhina* als Hauptkontaminationen gelten. Sie üben eine Vielzahl von Effekten auf infizierte Zellen in der Kultur aus, wie z.B. Veränderungen des Stoffwechsels, des Wachstums und der Lebensfähigkeit. Als Hauptquellen der Infektionen mit Mycoplasmen sind Rinderserum, das Laborpersonal selbst und Mycoplasmen-infizierte Kulturen beschrieben. Lichtmikroskopisch sind Mycoplasmen-Infektionen nicht zu entdecken. Für die Identifikation von Kontaminationen dieser Art wurde der Mycoplasma Detection Kit alle drei Monate nach Herstellerangaben verwendet.

9. Ergebnisse

9.1. Etablierung der Methodik

9.1.1. Kontrolle der Zelllinien und Kernextraktion

Von den verwendeten Zelllinien, die ausnahmslos humanen Ursprungs sind, sind drei profizient in der Mismatch-Reparatur (HeLa, TK6 und 293). Mehrere haben eine Reparaturdefizienz in verschiedenen MMR-Proteinen (MT1, HCT-116, LoVo, Hec59, 293T) während eine durch einen Chromosomentransfer eine eingeschränkte sekundäre Profizienz erhalten hat (HCT-116+ch3, Koi et al., 1994) (Tabelle 9, Abbildung 18).

Zelllinie	Herkunft	MMR-Status	Defizienz, Merkmale
HeLa	Cervixkarzinom	Profizient	-
TK6	Lymphoblastom	Profizient	-
MT1	TK6-Klon	Teil-Defizient	Zwei Missense-Mutationen in beiden Allelen des hMSH6-Gens. Protein wird exprimiert, ist aber funktionsuntüchtig.
HCT-116	Kolonkarzinom	Defizient	hMLH1 defizient, dadurch auch in hPMS2 und hPMS1. hMSH3 defizient.
HCT-116+ch3	HCT-116-Klon	Teil-Profizient	Durch Chromosomentransfer (Chromosom 3) sekundär profizient in hMutL Proteinen. hMSH3 defizient.
LoVo	Kolonkarzinom	Defizient	hMSH2 defizient.
Hec59	Endometrial-karzinom	Defizient	hMSH2 defizient.
293	Transformierte embryonale Nierenzelllinie	Profizient	-
293T	293-Klon	Defizient	hMLH1 Promoter hypermethyliert, dadurch keine Expression von hMutL Proteinen. Stabil transfiziert mit dem großen T-Antigen.

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien mit Herkunft und MMR-Status.

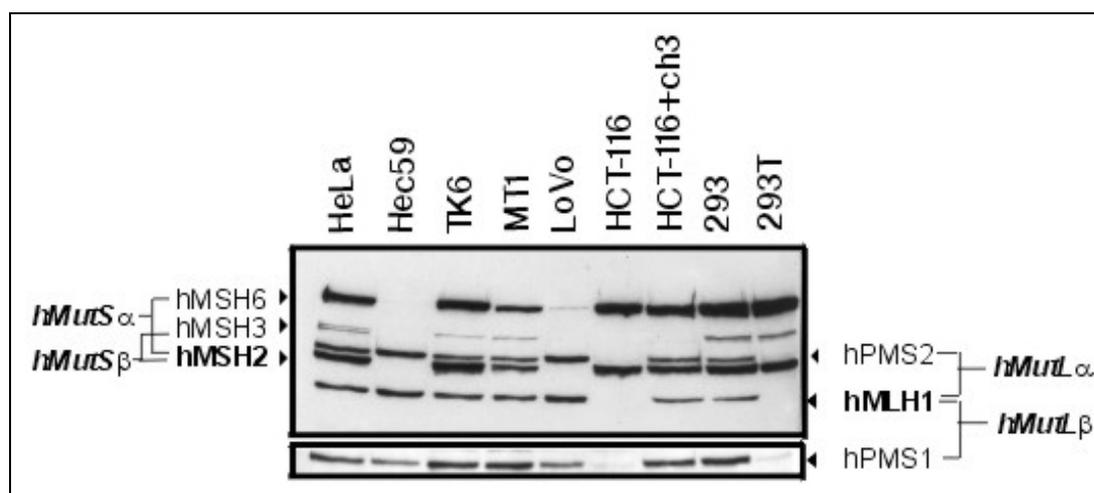


Abbildung 18: Western Blot der MMR-Proteine von Kernextrakten der verwendeten Zelllinien. Jeweils 50 μ g der Extrakte wurden in einem 10% Polyacrylamidgel getrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen die MMR-Proteine detektiert.

Für die Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften der humanen Mismatch-Reparaturproteine sollten Kernextrakte verwendet werden, da diese die zu untersuchenden Proteine in höherer Konzentration enthalten als die cytoplasmatischen Fraktionen. Außerdem sollte hierdurch ermöglicht werden, daß weitere nukleäre Proteine gegebenenfalls am Bindungsprozeß teilnehmen.

Die Kerne der kultivierten Zellen wurden nach der Methodik von Dignam *et al.* extrahiert (Dignam et al., 1983, 8.3.1.10.2). Die Proteinspektren der Kernfraktion unterschieden sich im *Coomassie*-Gel deutlich von denen der Cytoplasmafraktion, wodurch sichergestellt wurde, daß tatsächlich verschiedene Zellkompartimente extrahiert wurden (Abbildung 19).

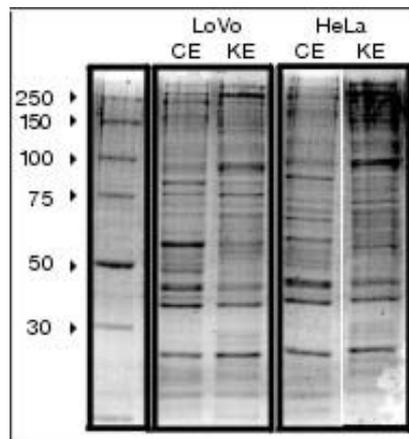


Abbildung 19: Cytoplasmatische und Kernextrakte von LoVo- und HeLa-Zellen

Links: Molekulargewichtsmarker, Angaben in kDa. CE: Cytoplasmatischer Extrakt; KE: Kernextrakt. 50 µg Protein der jeweiligen Extrakte von LoVo- und HeLa-Zellen wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel getrennt und die Proteine mittels *Coomassie*-Färbung visualisiert.

9.1.2. Überlegungen zur Verwendung von DNA-gekoppelten Dynabeads

Um erfolgreiche Bindungsexperimente mit DNA-gekoppelten Dynabeads und Mismatch-Reparaturproteinen durchführen zu können, müssen die DNA-Substrate über eine ausreichende Länge verfügen und einen ausreichenden Abstand zueinander haben, damit die Proteine genügend Platz auf den Substraten besitzen und die Interaktionen nicht durch sterische Behinderungen abgeschwächt werden. Um eine Abschätzung der sterischen Verhältnisse auf den Beads zu erhalten, sollte mittels der vom Hersteller angegebenen technischen Daten der Beads die DNA-Dichte berechnet werden:

Herstellerangaben zu Dynabeads Streptavidin M-280

Durchmesser der Beads:	2,8 µm
Streptavidin-Anteil:	$7 \cdot 10^5$ Moleküle/Bead
Oberfläche:	4-8 m ² /g Beads
Zahl Beads nach Masse:	$6,7 \cdot 10^7$ Beads/mg

Bei einem laut Hersteller gemessenen Streptavidin-Anteil von $7 \cdot 10^5$ Molekülen pro Bead ergibt sich eine durchschnittliche Streptavidin-Dichte von $11.725 \text{ Moleküle}/\mu\text{m}^2$ oder $85 \text{ nm}^2/\text{Molekül}$.

Somit stehen bei einer theoretisch maximalen Beladung der Beads jeder DNA-Duplex durchschnittlich 85 nm^2 Fläche zur Verfügung, entsprechend einem Kreis von $10,4 \text{ nm}$ Durchmesser. Die Länge der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Substrate betrug bei 10 Basenpaaren pro Windung und einer Steigung von $0,34 \text{ nm}$ pro Base (Doppelhelix in B-Konformation):

32mer:	10,9 nm
81mer:	27,5 nm
200mer:	68,0 nm

Die sterische Behinderung der DNA-Duplices untereinander ist bei den kurzen 32mer Oligoduplices vernachlässigbar und nähme mit den längeren Substraten zu, wenn von einer vollständigen Beladung der Beads ausgegangen würde. Da diese jedoch nicht erreicht wird und die längeren Substrate sogar noch zusätzlich eine unvollständige Bindung an den Beads zeigen (9.1.3) ist nicht von schweren sterischen Problemen bei der Proteinbindung auszugehen.

Aus *DNA-fingerprinting*-Experimenten geht hervor, daß das humane MutS α -Protein bei Bindung an eine Fehlpaarung etwa 25 Basenpaare auf der Duplex belegt (Gradia et al., 1997). Demzufolge könnte die 32mer Oligoduplex ein, die 81mer Oligoduplex maximal drei hMutS α -Proteine gleichzeitig binden. Demnach steht also auch in der Länge genügend Platz für die Proteinbindung zur Verfügung.

9.1.3. Herstellung der substratgekoppelten Dynabeads

Die Duplices mit korrekter Paarung oder einer GT-Fehlpaarung wurden entsprechend dem Protokoll (8.3.1.6) aus einem biotinylierten Oligomer und dem entsprechenden nichtbiotinylierten Antisensestrang hergestellt. Diese Substrate wurden dann an die Dynabeads entsprechend dem Protokoll des Herstellers gebunden (8.3.1.9). Es wurden jeweils 25 pmol Substrat pro mg Beads inkubiert, was unterhalb der vom Hersteller angegebenen Bindungskapazität der Beads für einzelsträngige DNA-Oligomere liegt ($200 \text{ pmol}/\text{mg}$). Zur Kontrolle der Bindungseffizienz wurden von dem Inkubationsansatz vor und nach der Bindungsreaktion Proben genommen und mittels Gelelektrophorese auf den DNA-Gehalt geprüft (Abbildung 20).

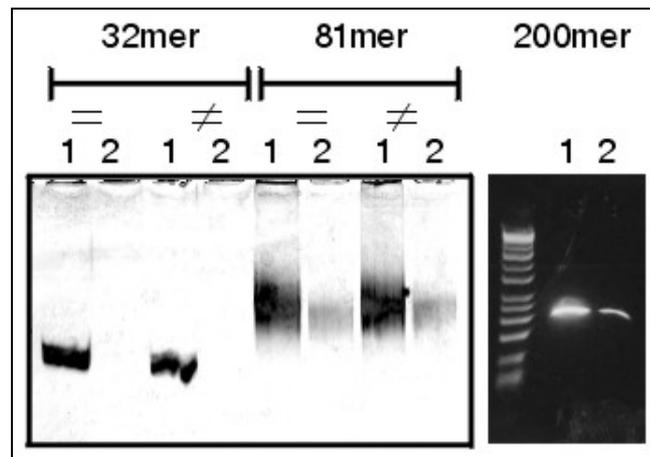


Abbildung 20: Bindungseffizienz biotinylierter Oligoduplices an Dynabeads Streptavidin

Proben der DNA-substrathaltigen Lösung vor (1) und nach (2) Inkubation mit den Dynabeads wurden aufgetragen (links: Polyacrylamidgel, rechts: Agarosegel). Die Effizienz wurde sowohl für die jeweiligen Homoduplices (=) als auch für die Heteroduplices (≠) überprüft.

Es zeigte sich, daß kein quantitativer Unterschied besteht zwischen der Kopplungseffizienz von Homoduplex versus Heteroduplex-Substraten. Während die kurzen 32mer Oligoduplices eine vollständige Bindung an die Dynabeads aufwiesen, koppelten die 81mer und 200mer Substrate nicht vollständig, was auf die größere sterische Behinderung bei der Kopplung längerer DNA-Substrate zurückzuführen ist.

9.1.4. Bindung der MMR-Proteine an 32mer DNA-Dynabeads

Um zu überprüfen, ob Mismatch-Reparaturproteine an die DNA-gekoppelten Dynabeads binden, wurden diese entsprechend dem selbstentwickelten Protokoll (8.3.2.6) mit HeLa-Kernextrakten inkubiert und die gebundenen Proteine anschließend mit Hilfe einer Kochsalzlösung (1500 mM) in einem kleinen Volumen, welches für die Analyse mittels Western Blot geeignet ist (20µl), eluiert. Wenn nach dieser Elution die DNA-Beads in SDS-Auftragepuffer aufgekocht wurden, wurde keine weiteren MMR-Proteine in dieser Fraktion gefunden. Dadurch war sichergestellt, daß alle untersuchten Proteine durch die verwendete Salzlösung eluiert worden waren.

9.1.1.1. Bindung von hMutSα

hMutSα band in diesem Experiment effizient an Doppelstrang-DNA, wobei bei der Verwendung von 32mer Heteroduplices im Vergleich zu Homoduplices geringfügig mehr Protein eluiert werden konnte (Abbildung 21). Bei 81mer Substraten war dieser Unterschied zwischen Homo- und Heteroduplex nicht mehr erkennbar.

In dem Versuch, eine Spezifität der Bindung an die Heteroduplex zu zeigen, wurde zur Kompetition Homoduplex-DNA hinzugegeben, um die nichtspezifische Homoduplex-DNA-Bindung zu verringern. Hierzu wurden entweder Poly[d(I*C)] oder Oligoduplices verwendet. Jedoch führte keiner der beiden Ansätze zu dem gewünschten Erfolg. Im

Falle von Poly[d(I*C)] zeigte stieg die Bindung von hMutS α sowohl bei Homo- als auch bei Heteroduplices, während die Kompetitoroligoduplices ohne deutliche Erhöhung der Spezifität zu einer drastischen Abnahme der Bindung an beide Substrate führte. Im Falle von Poly[d(I*C)] könnte die Zunahme der Bindung auf das Abfangen anderer DNA-bindender Proteine zurückzuführen sein, die mit den MMR-Proteinen konkurrieren. Die Abnahme der Bindung im zweiten Fall erklärt sich wahrscheinlich durch die nicht genauer charakterisierte Interaktion von hMutS α mit den Enden von DNA-Duplices (Blackwell et al., 2001), die hier zu der beobachteten drastischen Reduktion der Bindung geführt haben könnte.

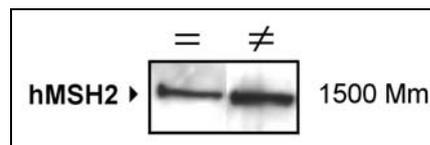


Abbildung 21: hMutS α -Bindung an Homoduplex- und Heteroduplex-DNA

HeLa-Kernextrakte wurden mit Beads inkubiert, die entweder mit Homoduplex (=)- oder mit Heteroduplex (\neq)-DNA gekoppelt wurden. Gebundenes hMutS α wurde mit 1.5 M NaCl quantitativ eluiert und im Western Blot detektiert. Nur hMSH2 ist abgebildet.

Zusätzlich wurde die Reaktion der Homoduplex- und Einzelstrangbindung von hMutS α auf verschiedene Nukleotide (ATP, ADP, AMPNP und ATP γ S) untersucht. Es zeigte sich, daß ATP und, in einem deutlich geringeren Ausmaß, ATP γ S eine Reduktion der Bindung des Dimers an das Substrat hervorriefen, während ein anderes Adeninnukleotidtriphosphat-Analogon, das AMP-PNP, keine Reaktion des Dimers erbrachte (Abbildung 22). Diese Beobachtung wurde bereits vorher mit dem humanen MutS α Protein gemacht (Gradia et al., 1997). Zwei Erklärungen für diese Beobachtung bieten sich an. Einerseits könnte eine Inkompatibilität von hMutS α mit AMP-PNP, die beispielsweise auf das fehlende Elektronenpaar am Stickstoff des β - γ -Phosphatübergangs zurückzuführen sein könnte, Ursache sein. Beim ATP γ S liegt eine Schwefelbrücke vor, die eine identische Elektronenkonfiguration wie der normalerweise vorhandene Estersauerstoff hat. Andererseits besitzt ATP γ S eine schwache Hydrolysierbarkeit, die bei AMP-PNP nicht möglich ist.

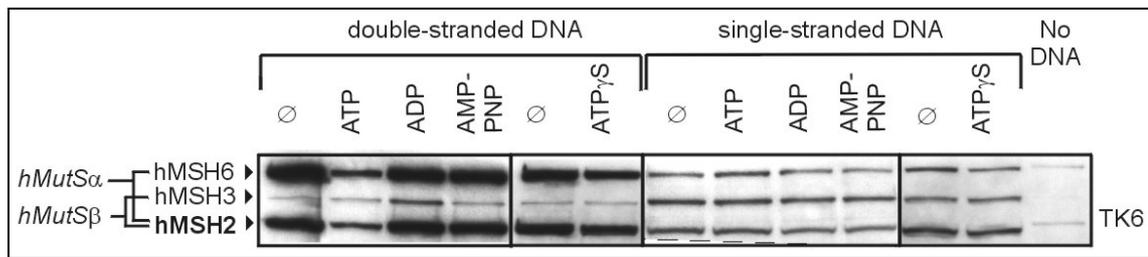


Abbildung 22: Bindung von hMutS-Proteinen an DNA und Einfluß von Nucleotiden.

TK6-Kernextrakte wurden mit Beads inkubiert, die mit Einzel- bzw. Homoduplex- 32mer Oligonucleotiden gekoppelt oder "nackt" waren, der Überstand abgenommen und gebundene Proteine mit 700 mM NaCl quantitativ eluiert und im Western Blot detektiert.

9.1.1.2. Bindung von hMutSβ

Die Bindung von hMutSβ an die verwendeten Oligoduplices war sehr gering und damit die Veränderungen des hMSH2-Signals auch vorrangig durch die Bindungsveränderungen des hMutSα Proteins beeinflusst. Jedoch wurde bei hMutSα eine verstärkte Bindung an einzelsträngige DNA beobachtet (Abbildung 22), die sich wahrscheinlich mit der Präferenz dieses Proteins für extrahelikale Schleifen erklärt. Darüber hinaus zeigte sich eine deutlich ansteigende Bindung des Heterodimers an Doppelstrang-DNA in der Anwesenheit von ADP. Dieses Nucleotid scheint hingegen die Affinität von hMutSα zum gleichen Substrat nicht ähnlich drastisch zu beeinflussen. Insgesamt ist bei der vorliegenden Methodik nicht von einer Störung des hMutSα-Signals durch die Bindung von hMutSβ auszugehen.

9.1.1.3. Bindung von hMutLα

Beim bakteriellen MutL-Homodimer wurde schon früh eine Bindungsfähigkeit für Einzelstrang-DNA beschrieben, und eine Nucleotidabhängigkeit dieser Bindung wurde ebenfalls gemessen (siehe 5.6.2.3). Bei den humanen MutL-Homologen ist über eine derartige Eigenschaft noch nicht berichtet worden.

Wie die Untersuchungsergebnisse zeigen, besitzt das humane MutLα Protein tatsächlich eine DNA-Bindungsfähigkeit (Abbildung 23). Diese ist in der Anwesenheit anderer Proteine (Verwendung von Zellextrakten) nicht sonderlich ausgeprägt, und es ist kein Unterschied in den Affinitäten zu Einzel- oder Doppelstrang-DNA sichtbar. Bei der Inkubation der DNA-Beads mit gereinigtem, rekombinanten hMutLα zeigte sich jedoch, daß das humane Dimer (wie das bakterielle MutL) eine dreimal stärkere Affinität zum Einzelstrang-Substrat aufweist. Dieser Unterschied war bei der Verwendung von Zellextrakten nicht sichtbar, was wahrscheinlich von der Anwesenheit konkurrierender Proteine, die noch stärker an das Einzelstrang-Substrat binden, herrührt.

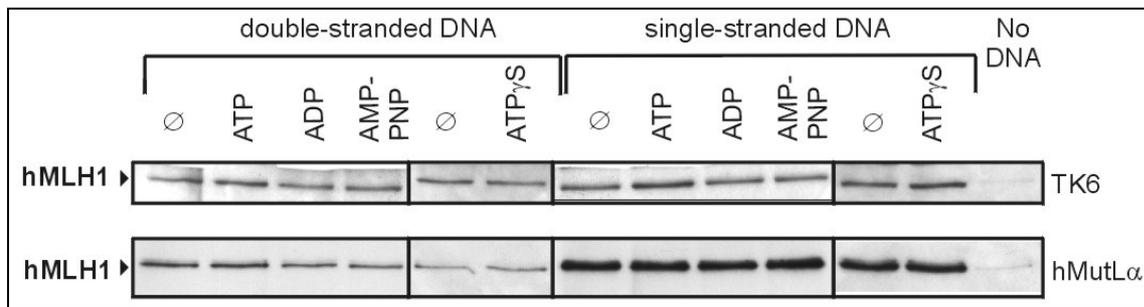


Abbildung 23: Bindung von hMutL α an DNA und Reaktion auf Nukleotide

TK6-Kernextrakte (oben) oder gereinigtes hMutL α (unten) wurden analog zu dem Experiment in Abbildung 19 bearbeitet. Nur das hMLH1-Signal ist abgebildet.

9.2. Untersuchung der hMutS α -Bindung an 32mer Duplices

9.2.2. Gradientenelution

Um eine spezifische Bindung von hMutS α an DNA-Fehler nachzuweisen, wurden die proteingebundenen DNA-Beads einer sequentiellen Elution unterworfen. Hierfür wurden sie mit steigenden Kochsalzkonzentrationen von 100 bis 1500 mM NaCl behandelt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels Western Blot untersucht. Es ergaben sich verschiedene Elutionsprofile von hMutS α von Homo- und Heteroduplices (Abbildung 24).

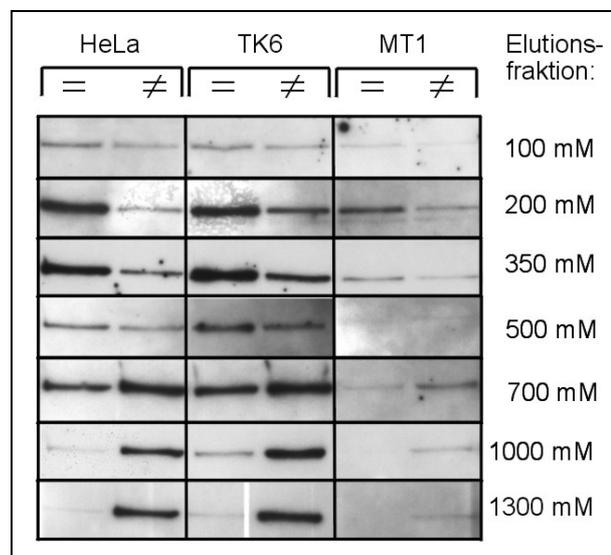


Abbildung 24: Sequentielle Elution von hMutS α mit steigender Salzkonzentration

DNA-Beads mit Homo- (=) oder Hetero- (≠) 32mer-Substraten wurden mit Kernextrakten von HeLa-, TK6- und MT1-Zellen inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen und nacheinander mit Elutionspuffern mit steigendem Salzgehalt eluiert. Die Fraktionen wurden im Western Blot detektiert. Nur hMSH2 ist dargestellt.

Während das an Homoduplex-DNA gebundene Dimer sich mit Salzkonzentrationen zwischen 200 mM und 700 mM komplett eluieren ließ, wurden 700 mM bis 1300 mM NaCl benötigt, um das Dimer von Heteroduplex-DNA zu eluieren. Dies beweist, daß die Bindung des Dimers an beide Substrate verschieden ist. Die Affinität zu

Heteroduplices ist, wie die höhere Salzresistenz zeigt, stärker. Diese erhöhte Bindungsstärke reflektiert wahrscheinlich die intensivere Wechselwirkung des Dimers mit fehlgepaarter DNA im Vergleich zu Homoduplex-DNA.

Die Elutionsprofile waren identisch für Extrakte von den beiden MMR-profizienten Zelllinien HeLa und TK6. Parallel wurden noch Extrakte von MT1-Zellen analysiert. Diese haben zwei *Missense*-Mutationen in den ATPase-Regionen beider Allele von *hMSH6*. Während die eine Mutation zur Instabilität des Proteins führt, wird das andere, welches die Mutation in einer konservierten Sequenz der ATP-Bindungsstelle enthält, exprimiert. Die Proteinkonzentration im Extrakt ist etwa halbiert im Vergleich zur elterlichen Zelllinie TK6 (Abbildung 18). Das mutierte Protein reagiert qualitativ ähnlich wie das Wildtyp-Protein, zeigt aber eine abgeschwächte Gesamtbindung, was entweder auf eine verringerte DNA-Bindungsfähigkeit oder auf die generell geringere Proteinkonzentration zurückzuführen ist. Jedenfalls scheint die MMR-Defizienz von MT1 nicht von einem Verlust der Fehlererkennung durch hMutS α herzurühren.

9.2.3. Einfluß von ATP

9.2.3.1. Affinitätsherabsetzung zur Duplex

Um den Einfluß von ATP auf die Bindung des hMutS α -Heterodimers an 32mer DNA (Homoduplex und Heteroduplex) genauer zu untersuchen, wurde zunächst eine sequentielle Elution wie bei dem vorangegangenen Experiment (Abbildung 24) durchgeführt, dies jedoch in ununterbrochener Anwesenheit von 250 μ M ATP. Es zeigte sich, daß ATP die Affinität zu beiden DNA-Substraten so stark reduziert, daß hMutS α mit 350 mM NaCl vollständig zu eluieren ist (Abbildung 25). Dabei war eine leichte Präferenz für das fehlerhafte Substrat feststellbar. In diesem Experiment konnte keine Bindung von hMLH1 nachgewiesen werden.

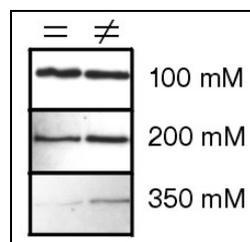


Abbildung 25: Reaktion des Elutionsverhaltens von hMutS α auf 250 μ M ATP

Das Experiment wurde analog zu dem in Abbildung 24 durchgeführt, wobei jedoch 250 μ M ATP hinzugefügt wurden. Nur hMSH2 und die Elutionsfraktionen 100-350 mM sind abgebildet.

9.2.3.2. Effektive ATP-Konzentration

Um festzustellen, welche ATP-Konzentration die Herabsetzung der Affinität von hMutS α zur DNA bewirkt, wurden verschiedene Konzentration getestet. Dabei wurde

sequentiell erst mit 700 mM NaCl, dann mit 1000 mM NaCl eluiert. Die Reaktion von hMutS α zeigte sich dadurch, daß das Signal in der 1000 mM-Fraktion verschwand und ein größerer Anteil mit 700 mM NaCl eluierte. Der Effekt trat zwischen 1 und 10 μ M ATP auf (Abbildung 26). Dies stimmt überein mit einem früheren Bericht, bei dem eine IC₅₀ von 3 μ M für die Reaktion von rekombinantem hMutS α auf ATP ermittelt wurde (Gradia et al., 1997).

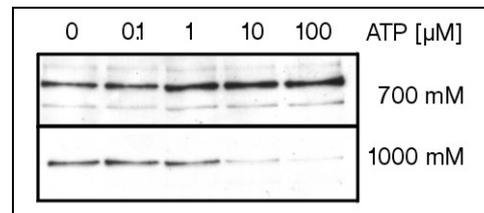


Abbildung 26: Nötige ATP-Konzentration zur hMutS α -Reaktion

32mer Heteroduplex-gekoppelte Beads wurden mit HeLa-Kernextrakten inkubiert und nacheinander mit 700 mM und 1000 mM NaCl eluiert. Die 1000 mM Fraktion zeigt spezifisch fehlergebundenes hMutS α . Ab 10 μ M ATP verliert hMutS α diese spezifische Fehlerbindungsfähigkeit. Nur das Signal von hMSH2 ist gezeigt.

Eine stärkere Erhöhung der ATP-Konzentration auf bis zu 1000 μ M brachte keinen weiteren Effekt. Für nachfolgende Experimente wurde mit 250 μ M ATP gearbeitet.

9.2.3.3. Effekt auf Homoduplex- versus Heteroduplexbindung

Um die Präferenz von hMutS α zu Heteroduplices, die auch in Anwesenheit von ATP beobachtet wurde (9.2.3.1), genauer zu analysieren, wurde die Inkubationszeit mit ATP auf zehn Minuten verlängert. Anschließend wurde in fortwährender Gegenwart von 250 μ M ATP erst mit 100 mM, dann mit 500 mM NaCl eluiert. Die erste Elution erzeugte dadurch eine Salzkonzentration, die näher an den physiologischen Bedingungen liegt (160 mM), während mit 500 mM eine vollständige Elution von hMutS α bewirkt wurde.

Es zeigte sich, daß hMutS α nach einer zehnmütigen Inkubation in Gegenwart von ATP immer noch stärker an das fehlerhafte Substrat band. Dieser Effekt wurde nur in der 500 mM NaCl-Fraktion sichtbar. Hingegen wurden mit 100 mM NaCl ähnliche Mengen Protein von beiden Substraten eluiert (Abbildung 27, HeLa 1). Um auszuschließen, daß die stärkere Bindung an Heteroduplices dadurch zustande kam, daß schon vor Zugabe von ATP mehr hMutS α an den Fehler gebunden war, wurde parallel ein Experiment gemacht, in dem ATP vor der Inkubation mit den DNA-Beads zugegeben wurde (Abbildung 27, HeLa 2). In diesem Experiment reagierte hMutS α identisch, abgesehen davon, daß weniger "unspezifisch gebundenes" hMutS α in der 100 mM Fraktion eluierte.

Vereinzelte Berichte in der Literatur weisen darauf hin, daß MutL-Proteine die Affinität von MutS-Proteinen zu Homoduplex- und Heteroduplex-DNA in Anwesenheit von ATP verbessern können (Habracken et al., 1997; Schofield et al., 2001). Daher wurde die Reaktion von hMutS α in HCT-116 Extrakten (MutL-defizient) mit der in HCT-116+ch3 Extrakten (MutL-profizient) verglichen. Da die Reaktion in beiden Extrakten identisch war (Abbildung 27), ist nicht von einer Beeinflussung der hMutS α -Bindung durch hMutL in diesem Experiment auszugehen.

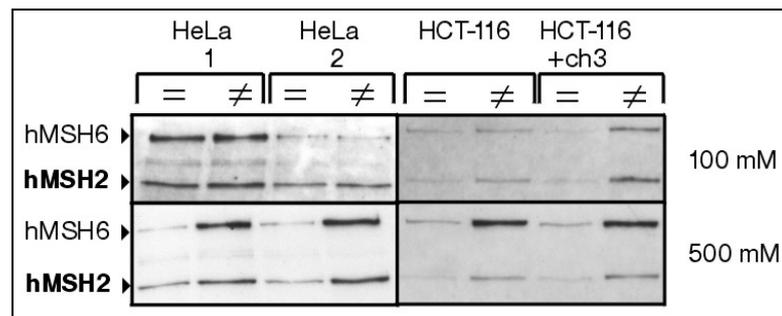


Abbildung 27: Effekt von ATP auf hMutS α -Mismatch-Bindung

Linke Seite: HeLa-Extrakte wurden nach der Standardprozedur mit 32mer Homo- oder Heteroduplexgekoppelten Dynabeads inkubiert, wobei entweder am Ende der Inkubation (HeLa 1) oder schon vor der Inkubation mit den Beads (HeLa 2) ATP hinzugefügt wurde. Rechte Seite: Entsprechend der Prozedur mit HeLa 1 wurden Extrakte von HCT-116 (hMLH1-defizient) und HCT-116+ch3 (hMLH1 profizient) verwendet. In allen Experimenten wurde hMutS α mit 100 mM und 500 mM NaCl quantitativ eluiert.

9.3. Bindung von hMutL-Proteinen an längere DNA-Duplex-Substrate

9.3.1. Bindung von hMutL-Proteinen

Als nächstes sollte der Einfluß der Art (doppelsträngig oder teilweise einzelsträngig) und Länge (81mer, 200mer) des DNA-Substrates auf die Bindung von hMutS α und hMutL-Proteinen analysiert werden. Hierzu kamen zunächst 81mer Substrate zum Einsatz, die entweder komplett doppelsträngig waren oder einen einzelsträngigen Bereich über die Hälfte des Substrates aufwiesen und entweder korrekt gepaart waren oder über einen GT-Paarungsfehler verfügten.

Mittels der sequentiellen Elution (analog Abbildung 24) wurde zunächst sichergestellt, daß hMutS α auch an Paarungsfehler von 81mer Oligoduplices spezifisch bindet (Daten nicht gezeigt). Obwohl dies bestätigt werden konnte, war doch die Auflösung zwischen beiden Substraten weniger scharf. Dies ist wahrscheinlich auf die größere Menge an unspezifisch gebundenem hMutS α an der längeren DNA zurückzuführen. Anschließend wurde die Reaktion der Mismatch-Reparaturproteine auf ATP getestet, wobei nacheinander mit 700 mM und 1000 mM NaCl eluiert wurde.

ATP bewirkte bei allen Substraten eine deutliche Bindung von hMutL α und hMutL β (Abbildung 28). Diese Bindung war in Anwesenheit eines Fehlers etwas stärker, aber

der Fehler war nicht Voraussetzung für die Bindung. Die Anwesenheit von einzelsträngigen DNA-Abschnitten verbesserte die MutL-Bindung nicht, obwohl dieses eine stärkere Affinität zu einzelsträngiger als zu doppelsträngiger DNA besitzt (9.1.1.3). Beads ohne DNA banden MutL-Proteine nicht, so daß eine ATP-induzierte unspezifische Bindung an die Oberfläche ausgeschlossen werden kann. MutL-Proteine eluierten generell unter 500 mM NaCl von den Substraten, so daß sie komplett in der 700 mM NaCl-Fraktion auftauchten.

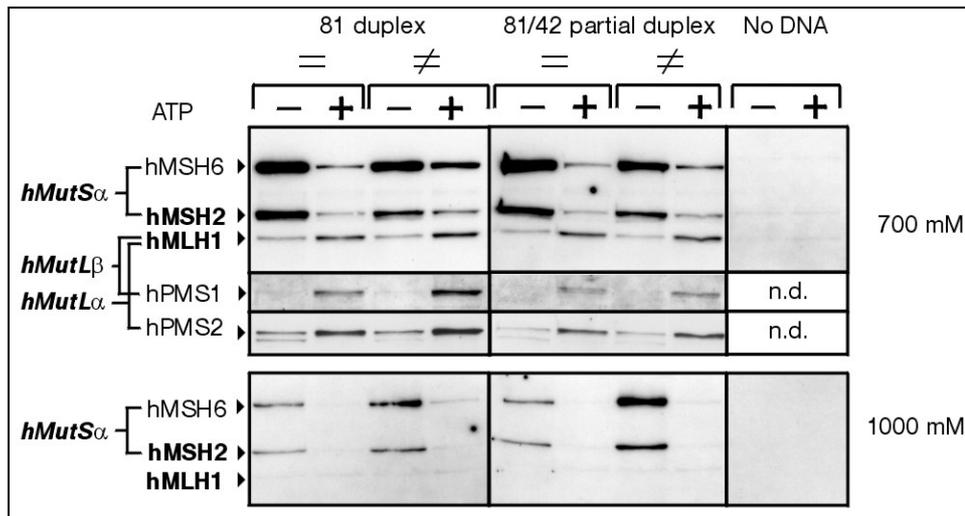


Abbildung 28: Bindung von hMutL α und hMutL β an längere DNA-Substrate

HeLa Kernextrakte wurden mit Dynabeads inkubiert, die entweder mit Homo- oder Heteroduplex-DNA (81 duplex) oder mit einem teilweise duplexierten Homo- bzw. Heterosubstrat (81/42 partial duplex) gekoppelt waren oder ungekoppelt blieben (No DNA). Elution und Detektion erfolgten nach Standardprotokoll.

Um den Einfluß einer weiteren Verlängerung des DNA-Substrates festzustellen, wurde die Bindung an 81mer-Homoduplices mit der an 200mer-Homoduplices verglichen. Letztere banden die hMutL-Proteine nochmals etwas besser, und zeigten (wie schon bei dem Sprung von 32mer- auf 81mer-Oligoduplices gesehen) einen noch stärkeren Anteil von hMutS α in der 1000 mM-NaCl-Fraktion (Abbildung 29).

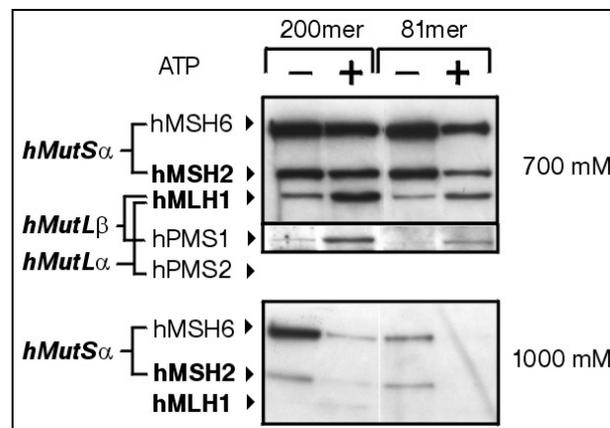


Abbildung 29: hMutL α -Bindung an 81mer und 200mer Homoduplex-DNA

9.3.2. hMutL-Bindung ist abhängig von hMutS α

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Bindung der hMutL-Dimere an die DNA-Beads um eine Komplexbildung mit hMutS α handelt, oder ob es sich um einen hMutS α -unabhängigen Prozeß handelt, wurde zunächst die Fähigkeit von hMLH1 aus LoVo-Extrakten (die defizient in hMutS-Proteinen sind) an die DNA-Beads zu binden, untersucht. Es stellte sich heraus, daß hMLH1 in LoVo-Extrakten tatsächlich nicht die sonst beobachtete Zunahme des hMLH1-Signals als Reaktion auf ATP zeigt. Wurden die Extrakte von LoVo jedoch 1:1 mit solchen von HCT-116 (defizient in MutL-Proteinen) gemischt und so die Profizienz in der Mismatch-Reparatur wiederhergestellt, so zeigte sich auch wieder die ATP-abhängige Bindungszunahme von LoVo-MLH1 (Abbildung 30). Das gleiche war mit Extrakten aus Hec59-Zellen zu beobachten, die wie LoVo defizient in hMutS-Proteinen sind.

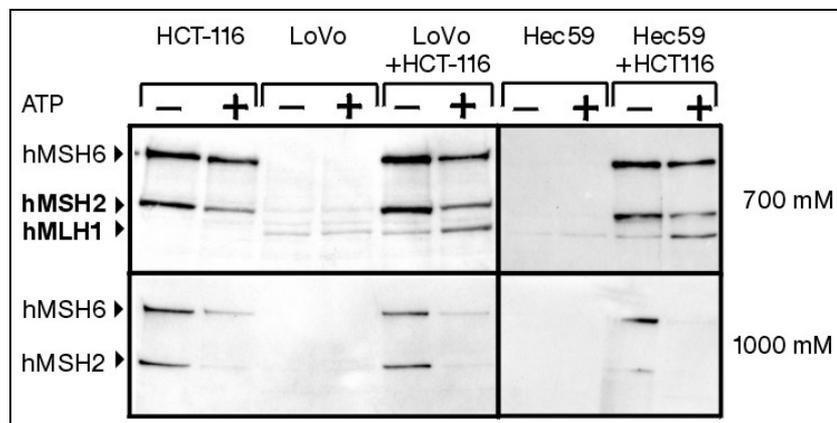


Abbildung 30: HCT-116-Extrakte machen hMLH1 aus LoVo- und Hec59-Zellextrakten für ATP empfindlich.

Experimentelle Durchführung wie bei Abbildung 28. Die Experimente wurden entweder mit reinen HCT-116-, LoVo- oder Hec59-Kernextrakten (jeweils 100 μ g) oder mit 1:1-Mischungen (jeweils 50 μ g) der Extrakte durchgeführt.

Um endgültig zu klären, daß die Wiederherstellung der MutL-Reaktivität in LoVo- und Hec59-Extrakten auf das hMutS α -Protein (und nicht ein anderes in diesen Zellen fehlendes und in HCT-116-Zellen vorhandenes Protein) zurückzuführen ist, wurden die LoVo-Zellextrakte mit gereinigtem rekombinanten humanen MutS α versetzt. Dieses war allein in der Lage, die Reaktivität von hMutL α als auch hMutL β wiederherzustellen (Abbildung 31).

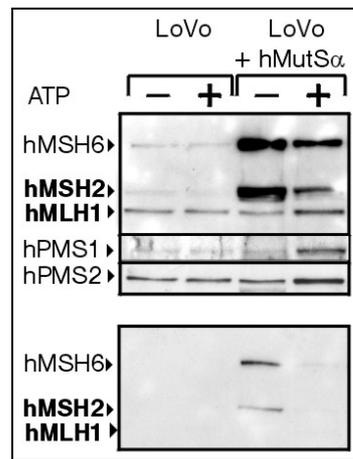


Abbildung 31: Reines hMutS α macht LoVo-hMLH1 wieder für ATP empfindlich

Experimentelle Durchführung nach Standardprozedur. Im rechten Teil der Abbildung waren 100 μ g LoVo-Kernextrakt 250 ng gereinigtes rekombinantes hMutS α zugefügt worden.

Um des weiteren zu untersuchen, ob die Reaktivität von hMutL α von der Anwesenheit von hMutL β abhängig ist, wurde gereinigtes rekombinantes hMutL α zu HCT-116-Extrakten hinzugefügt. Es zeigte sich, daß hMutL α alleine auf die Zugabe von ATP reagiert, daß also hMutL β nicht essentiell für die Interaktion ist (Abbildung 32).

Des weiteren war es möglich, unter leicht veränderten Versuchsbedingungen (siehe Methoden) ausschließlich mit den rekombinanten Proteinen hMutL α und hMutS α die Komplexbildung nachzuweisen. Jedoch war das Signal bindender Proteine trotz Verwendung gleicher Mengen Protein wie in den Zellexperimenten deutlich geringer als bei diesen.

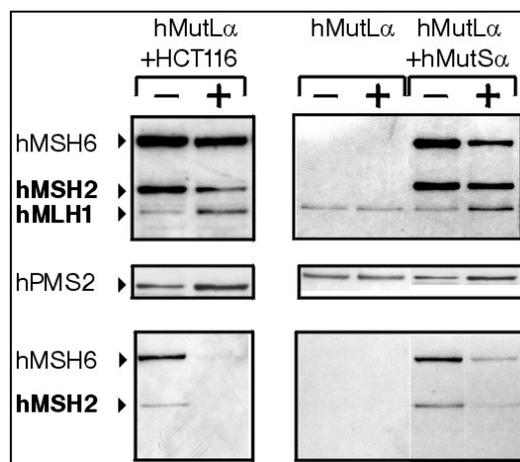


Abbildung 32: Genauere Charakterisierung der hMutS α -hMutL α -Interaktion

Standarddurchführung. Links: 100 μ g HCT-116-Kernextrakt wurden mit 300 ng gereinigtem rekombinanten hMutL α versetzt. Rechts: die gereinigten rekombinanten Proteine wurden alleine im Bindungsexperiment verwendet. Hierbei wurde die Kompetitor-DNA (Poly [d(I*C)]) im Experiment weggelassen.

9.3.3. Eine hMSH6-ATPase-Mutante bindet auch hMutL-Proteine

Die Proteine aus Extrakten der MMR-profizienten Zelllinie TK6 reagierten in dem Bindungsexperiment identisch wie die anderen profizienten Extrakte mit einer Bindung der hMutL-Proteine. MT1-Extrakte jedoch enthalten ein hMutS α , welches eine *Missense*-Mutation in der ATPase Region des hMSH6-Proteins hat (s.u.). Dieses ist auf der hMSH6-Seite des hMutS α -Heterodimers nicht in der Lage, ATP zu hydrolysieren. Dennoch wird auch in MT1-Extrakten die Bindung von hMutL α -Proteinen verstärkt, wenn ATP zugegeben wird, obwohl das hMutS α -Protein nicht vergleichbar effizient an das DNA-Substrat bindet. Die hMutS α -Bindung wird verbessert, wenn die MT1-Extrakte mit gereinigtem Wildtyp-hMutS α komplementiert werden, während die Bindung von hMutL-Proteinen unbeeinflusst bleibt (Abbildung 33).

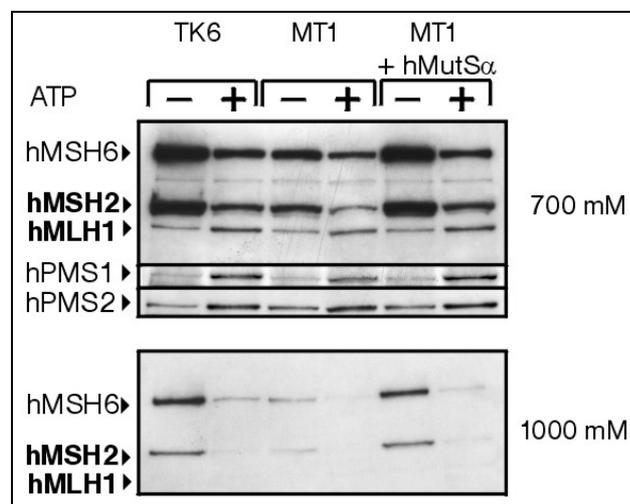


Abbildung 33: Bindungsexperiment mit TK6- und MT1-Extrakten

Experimentelle Durchführung nach Standardprotokoll. Zu 100 μ g MT1-Kernextrakt wurden 300 ng gereinigtes rekombinantes hMutS α gegeben.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Störung der ATPase-Funktion der hMSH6-Untereinheit von hMutS α nicht relevant ist für die Interaktion mit hMutL-Proteinen, oder daß die Störung durch die Mutation nicht ausreichend ist, um die ATP-Funktion zu beeinträchtigen. Die beiden fehlerhaften *hMSH6*-Allele von MT1 codieren für die Mutationen V1260I und D1213V, jedoch ist die V1260I-Mutante instabil und nur das hMSH6D1213V-hMutS α ist in den MT1-Extrakten präsent (Swadlowski et al., noch nicht veröffentlicht). Diese Mutante verändert ein konserviertes Aspartat der hMSH6-ATPase zu Valin und inaktiviert dadurch die hMutS α -abhängige Mismatch-Reparatur (Iaccarino et al., 2000). Die Mutante kann ATP zwar noch binden, es aber nicht mehr hydrolysieren. Da die Hydrolyse von ATP aber auch kein essentieller Schritt in der Interaktion zu sein scheint (siehe 9.3.6), kann dennoch keine endgültige Aussage

getroffen werden, über welche Untereinheit von hMutS α die Interaktion stattfindet, auch wenn die Deutlichkeit des Ergebnisses auf hMSH2 hinweist.

9.3.4. Zeitreihe der Bindung der hMutL-Proteine

Um die Geschwindigkeit abschätzen zu können, mit denen die Proteine in diesem *Assay* auf ATP reagieren, wurde eine Zeitreihe gemacht, bei der in 20 bis 360 Sekunden nach der Zugabe von ATP der Überstand abgenommen wurde und somit keine weitere Proteinbindung oder -dissoziation möglich war.

Es zeigte sich, daß der größte Teil gebundenen MutS α -Proteins nach ATP-Zugabe augenblicklich auf die Anwesenheit des Nukleotids reagiert und nicht mehr in der 1000 mM-NaCl-Fraktion nachweisbar ist. Hingegen verringert sich der hMutS α -Anteil in der 700 mM-Fraktion langsamer im Verlauf der drei Minuten, was auf eine entsprechend verzögerte Abdiffusion von ATP-gebundenem hMutS α hinweist (Abbildung 34).

Die hMLH1-Bindung ist ebenfalls bereits nach 20 Sekunden detektierbar, jedoch nimmt sie im Verlauf der ersten Minuten nach ATP-Zugabe noch deutlich zu. Längere Inkubationszeiten als drei Minuten führen jedoch nicht zu einer weiteren Zunahme der hMLH1-Bindung.

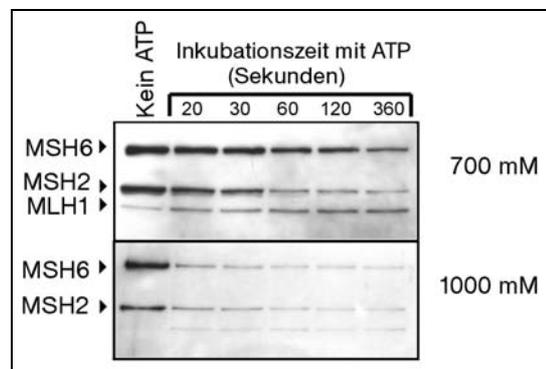


Abbildung 34: Zeitreihe der Reaktion von hMutS α und hMutL α nach ATP-Zugabe

Experiment mit 100 μ g HeLa-Kernextrakt nach Standardprotokoll. Die Bindungsreaktion wurde nach ATP-Zugabe (250 μ M) in verschiedenen Zeitabständen (20-360s) durch Abnehmen des Überstandes abgebrochen.

9.3.5. ATP-Konzentration der Komplexbildung

Eine Titration der ATP-Konzentration, die für die Bindung der hMutL-Dimere nötig ist, zeigte, daß die Reaktion von hMutS α auf ATP mit der Bindung von MutL-Proteinen einhergeht. In beiden Fällen sind 1-10 μ M ATP ausreichend, um eine vollständige Reaktion der Proteine zu erreichen. Es fällt jedoch ins Auge, daß bei hMutL α (hMLH1-hPMS2) bereits 1 μ M ATP zur vollständigen Bindung führt, während für hMutL β

(hMLH1-hPMS1) eine weitere Verstärkung der Bindung beim Erhöhen auf 10 μM ATP zu beobachten ist (Abbildung 35).

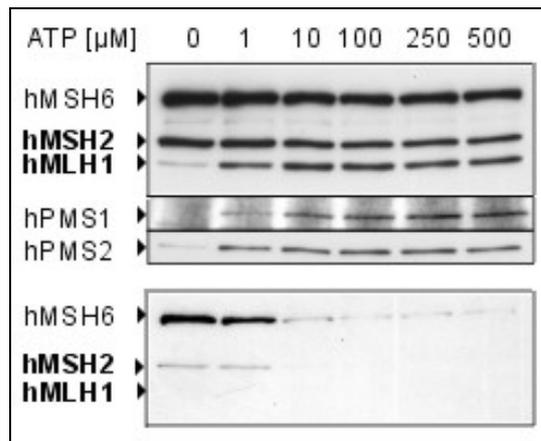


Abbildung 35: ATP-Konzentrationsreihe der hMutL-Bindung

Experiment mit 100 μg HeLa-Kernextrakt nach Standardprotokoll. Es wurden verschiedene ATP-Konzentrationen (0-500 μM) erzeugt.

9.3.6. Notwendigkeit der ATP-Hydrolyse für die hMutL-Bindung

Der Effekt von ATP auf die Komplexbildung von hMutS α mit hMutL-Proteinen kann entweder durch die bloße Bindung von ATP oder durch dessen Hydrolyse erreicht werden. Um dies zu klären, wurden die ATP-Analoga ATP γ S und AMPPNP in den Bindungsexperimenten verwendet. Ersteres ist schwer hydrolysierbar, zweites unhydrolysierbar.

AMPPNP führte zu keiner Bindung von MutL-Proteinen, jedoch zeigte auch hMutS α keine Reaktion auf dieses Nukleotid. Diese Beobachtung wurde bereits früher gemacht (Gradia et al., 1997). ATP γ S hingegen löste in früheren Experimenten eine Reaktion des humanen MutS α aus, weshalb eine Interaktion des Proteins mit dem β - γ -überbrückenden Sauerstoff vermutet wurde. Dieser ist bei ATP γ S gegen eine isostere Schwefeldiesterbrücke ausgetauscht, während die andere Elektronenkonfiguration der Stickstoffbrücke in AMPPNP womöglich keine ähnliche Interaktionsmöglichkeit bietet. ATP γ S zeigte in den Bindungsexperimenten eine ähnliche Reaktion wie ATP, jedoch war sie deutlich schwächer und auch stark verzögert. Da ATP γ S eine schwache restliche Hydrolysierbarkeit besitzt, war es nicht genau zuzuordnen, ob die Reaktion von einer verminderten Bindung oder der erschwerten Hydrolyse des Nukleotids herrührt (Abbildung 36 A).

Als das gleiche Experiment mit ATP in Abwesenheit von Magnesium (welches ein essentieller Kofaktor für die Hydrolyse ist) durchgeführt wurde, zeigte sich bereits ohne ATP-Zugabe eine deutlich stärkere Bindung von hMLH1 an das DNA-Substrat. Der gleiche Effekt wurde auch bei DNA-Bindungsstudien des Hefe-MutL-Proteins

beobachtet (Hall et al., 2001) und ist wahrscheinlich auf eine intensivere Interaktion des Proteins mit dem Phosphatrückgrat der DNA in Abwesenheit divalenter Kationen zurückzuführen. Dennoch ist eine Zunahme der hMLH1-Bindung als Reaktion auf ATP unter diesen nicht-hydrolysierenden Bedingungen sichtbar (Abbildung 36 B).

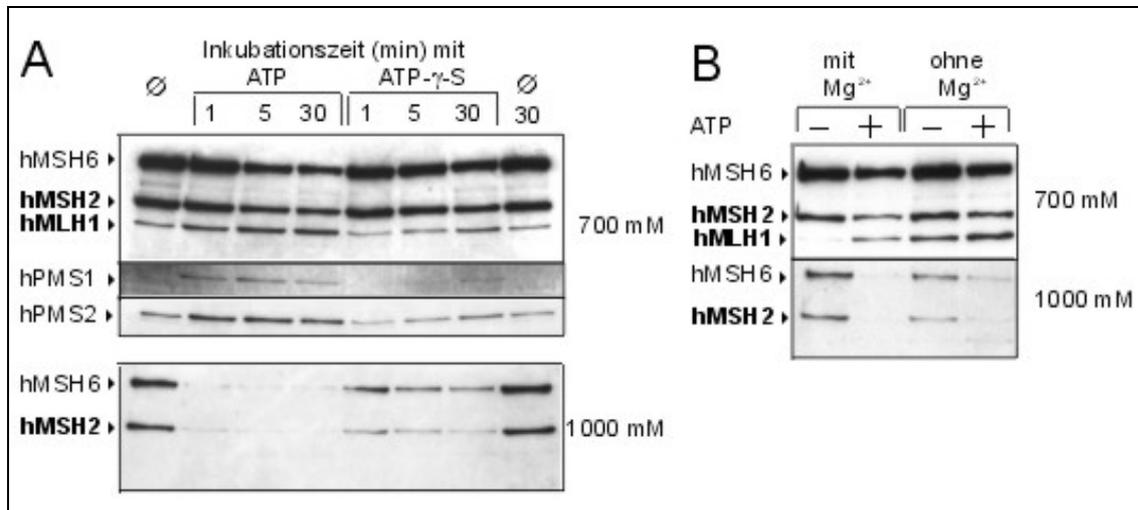


Abbildung 36: Notwendigkeit der ATP-Hydrolyse für die hMutS α -hMutL-Interaktion

Experiment nach Standardprozedur mit HeLa-Kernextrakt. **Links:** die Reaktionen auf ATP und ATP γ S (jeweils 250 μ M) nach 1, 5 und 30 Minuten Inkubation wurden verglichen. **Rechts:** der Effekt der von ATP unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen (Abwesenheit von exogenem Magnesiumchlorid) wurde getestet.

9.4. Genauere Charakterisierung der hMutS α -hMutL-Interaktion

9.4.1. Verwendung der Zelllinie 293T

Um die MutS-MutL-Interaktion mit dem entwickelten Bindungstest genauer charakterisieren zu können, wurde ein Transfektionssystem mit 293T-Zellen verwendet. Diese Zelllinie exprimiert kein hMLH1 aufgrund einer Promoterhypermethylierung von *hMLH1* (Trojan et al., 2002) und ist somit auch defizient in hPMS1 und hPMS2 (Abbildung 18). Die Zelllinie ist mittels Calciumchlorid-Präzipitation (8.3.1.12) leicht transfizierbar. Dadurch lassen sich hMutL-Konstrukte, die in die Vektoren pcDNA3.1 und pSG5 inkloniert werden (7.8.2), transient in die Zellen transfizieren und ihre Funktionalität studieren (Trojan et al., 2002).

Im Rahmen eines Vorversuchs wurde getestet, ob Extrakte der MMR-profizienten Mutterzelllinie von 293T, 293, ebenso gut im Bindungstest funktionieren wie die bisher verwendeten Extrakte. Die ATP-induzierte hMutL α -Bindungsverstärkung ist hier kaum sichtbar, da eine sehr starke Bindung des Dimers bereits in Abwesenheit von exogenem ATP zu verzeichnen ist (Abbildung 37 links).

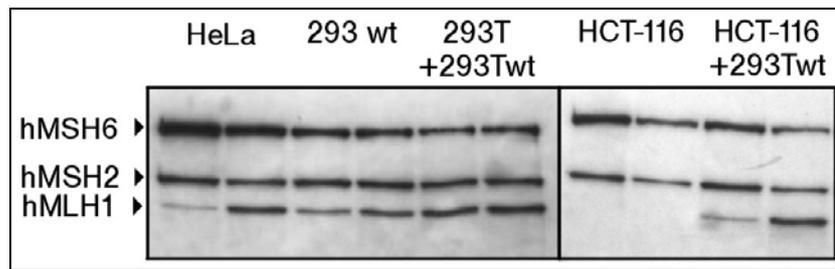


Abbildung 37: Brauchbarkeit von 293-Extrakten im Bindungsexperiment

Das Experiment wurde durchgeführt mit: HeLa-Kernextrakt, 293*wt*-Kernextrakt, 293T-Extrakt (untransfiziert) mit 1/20 hMutL α (*wt*) transfiziertem 293T-Extrakt, HCT-116-Extrakt und HCT-116-Extrakt mit 1/20 hMutL α (*wt*) transfiziertem 293T-Extrakt, jeweils 150 μ g Gesamtprotein.

Darüber hinaus zeigten Extrakte von 293T-Zellen, die mit *wt*-hMutL α transfiziert worden waren, eine immens höhere Konzentration des Dimers als die Extrakte aller anderen bisher verwendeten Zelllinien (siehe z.B. Abbildung 39). Ein direkter Einsatz dieser Extrakte resultierte in einer so hohen Basisbindung von hMutL α an die DNA-Beads, daß ATP keine detektierbare Bindungsverstärkung bewirkte. Daher wurde die Konzentration von hMutL α in den Extrakten transfizierter 293T-Zellen durch Zugabe von Extrakt untransfizierter 293T-Zellen verringert. Die so eingestellten Extrakte reagierten ähnlich wie die 293-Extrakte, ließen also in der Deutlichkeit des Signalanstieges zu wünschen übrig (Abbildung 37 links).

Daher wurde als alternativer Ansatz der hMutL-haltige 293T-Extrakt in geringer Menge (1/20) zu Kernextrakt von HCT-116-Zellen zugefügt, die wie 293T defizient in hMutL-Proteinen sind. Diese Extraktmischung zeigte einen Anstieg des hMutL α -Signals, der genauso deutlich ausfiel wie der von HeLa-Extrakten (Abbildung 37 rechts). Daher wurde für die folgenden Untersuchungen das gewünschte hMutL-Konstrukt in 293T-Zellen exprimiert und zusammen mit Kernextrakten von HCT-116 im Interaktionstest verwendet.

Zur genaueren Charakterisierung der hMutL α -hMutL-Interaktion sollten nun folgende Fragestellungen mit Hilfe des 293T-Transfektionssystems bearbeitet werden:

- Interagiert hMutL β auch in Abwesenheit von hMutL α mit hMutL α ?
- Ist die Hydrolyse von ATP durch hMutL α für die Interaktion nötig?
- Entsteht die Interaktion über beide Untereinheiten der hMutL-Heterodimere?
- Läßt sich der Proteinbereich, der die Interaktion vermittelt, eingrenzen?

9.4.2 Interaktion mit hMutL β

Wie bereits experimentell nachgewiesen, ist hMutL α allein (also ohne hMutL β) in der Lage, mit hMutS α eine Interaktion einzugehen (9.3.2, Abbildung 32). Für hMutL β war es nicht möglich, festzustellen, ob es ebenfalls allein an hMutS α binden kann, da es nicht gereinigt zur Verfügung stand. Daher wurde das 293T-System zur Bearbeitung dieser Fragestellung herangezogen.

9.4.2.1. Reverse Transkription und Klonierung der humanen *PMS1*-mRNA

Da kein Vektor mit der cDNA des humanen *PMS1* zur Verfügung stand, wurde diese aus Lymphozyten-RNA revers transkribiert und in den pSG5-Expressionsvektor inkloniert (8.3.2.1).

Bei der Analyse von mehreren Klonen wurde neben dem *wt*-Transkript eine Spleißvariante der *hPMS1*-mRNA entdeckt, bei der das Exon 2 (93 bp) fehlt. Dies führt zu einer Deletion von 31 Aminosäuren unter Beibehaltung des Leserasters im konservierten N-terminalen Bereich des Proteins, wobei zwei der hochkonservierten Nukleotidbindungssequenzen (N2, N3) verloren gehen. Da eine Funktionalität des entstehenden Proteins unwahrscheinlich ist, wurde das Transkript nicht weiter untersucht.

9.4.2.2. Expression

hMutL α wurde ebenso wie hMutL β stark in 293T-Zellen exprimiert (Abbildung 41, Spuren 1, 2 und 3). Mit hMutL α transfizierte Zellen zeigten kein PMS1-Signal in den Extrakten, so wie hMutL β -exprimierende Zellen kein PMS2-Signal zeigten, so daß jeweils nur das eine Heterodimer in den Extrakten in hoher Konzentration vorhanden war.

9.4.2.3. Interaktion

HCT-116-Extrakte wurden mit hMutL α - bzw. hMutL β -haltigen 293T-Extrakten supplementiert. In einem weiteren Experiment wurden beide Extrakte hinzugegeben (Abbildung 38).

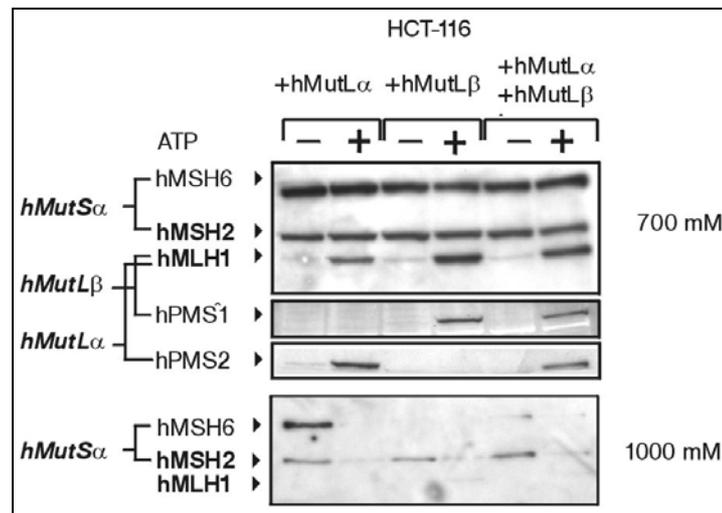


Abbildung 38: Bindung von hMutL α und hMutL β

HCT-116-Kernextrakt (150 μ g) wurde mit Extrakt von hMutL α - oder hMutL β -transfizierten 293T-Zellen versetzt (5 μ g), oder einer Mischung aus beiden (jeweils 2,5 μ g).

Es zeigte sich somit, daß beide Heterodimere sowohl alleine als auch in Kombination effizient binden.

9.4.3. Interaktion mit einer hMutL α -ATPase-Mutante

Die Interaktion zwischen hMutS α und den hMutL-Proteinen erfolgte bei einer Konzentration von 1-10 μ M ATP (9.3.5). Diese Konzentration ist identisch mit der, bei der das hMutS α -Protein mit Veränderung der Fehlerbindungsfähigkeit auf ATP reagierte (9.2.3.2). Da jedoch auch hMutL α bei 10 μ M eine ATP-induzierte Konformationsänderung zeigt (Raschle et al., 2002), stellt sich die Frage, ob die ATPase von hMutS α oder die des hMutL-Proteins für das Zustandekommen der Interaktion zuständig ist. Daher sollten die zwei ATPase-Funktionen von hMutL α beide so verändert werden, daß die ATP-Hydrolysefähigkeit oder die ATP-Bindungsfähigkeit vollständig verloren gehen.

9.4.3.1. Leitlinien für die Auswahl der Mutationen

Die Nukleotidbindungssequenzen wurden in beiden Proteinuntereinheiten von hMutL α durch Punktmutationen folgendermaßen verändert (siehe 8.3.2.2):

	hMLH1	hPMS2
Hydrolysemutante	E34A	E41A
Bindungsmutante	R265H	R295H

Bei hMLH1 E34A bzw. hPMS2 E41A ist in beiden Fällen ein hochkonserviertes Glutamat im Nukleotidbindungsbereich N-1 zu Alanin verändert. Dieses Glutamat bindet ein Wassermolekül und bringt es für einen nucleophilen Angriff auf das γ -

Phosphat des gebundenen ATPs in Stellung (Ban et al., 1999). Die Mutation zu Alanin blockierte bei *E. coli* MutL die ATP-Hydrolyse vollständig bei gleichzeitiger Reduktion der Affinität zu ATP (Ban et al., 1998). Auch für hPMS2 E41A wurde bereits die Blockade der ATP-Hydrolyse gezeigt (Guarne et al., 2001). Beide Mutationen wurden beim humanen hMutL α erst kürzlich intensiver untersucht. Es wurde kein Einfluß auf Expressionsniveau, Stabilität und Dimerbildung der Proteine bei gleichzeitigem Verlust der MMR-Aktivität festgestellt (Tomer et al., 2002; Raschle et al., 2002). Obwohl die ATP-Bindungsfähigkeit beim bakteriellen MutL durch diese Mutation auf 13% des Wildtyps abgesunken war (Ban et al., 1998), vollzog das humane Heterodimer trotz beidseitiger Mutation noch die gleichen ATP-induzierten Konformationsänderungen wie der humane Wildtyp (Raschle et al., 2002), so daß davon ausgegangen werden kann, daß diese Mutante als Modell für die Untersuchung der reinen ATP-Bindung gut geeignet ist.

In den Mutanten hMLH1 R265H bzw. hPMS2 R295H sind konservierte Arginine, welche in der P-Schleife der MutL-Proteine lokalisiert sind, in Histidine umgewandelt. Die Arginine binden normalerweise das α - und das γ -Phosphat von ATP koordinativ. Die Mutation dieses Arginins zu Histidin führte im bakteriellen MutL zu einem praktisch vollständigen Ausfall der Nukleotidbindungsfähigkeit (Ban et al., 1999).

9.4.3.2. Expression

Die Hydrolysemutante hMutL α mpEA (MLH1 E34A PMS2 E41A) und die Bindungsmutante hMutL α mpRH (MLH1 R265H PMS2 R295H) wurden genauso effizient exprimiert wie *wt*-hMutL α (Abbildung 39).

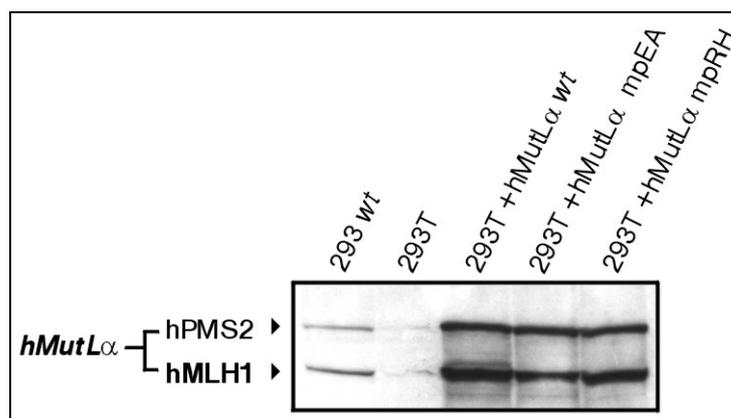


Abbildung 39: Expression der ATPase Mutanten in 293T-Zellen

9.4.3.3. Interaktion

Die hMutL α -ATP-Bindungsmutante mpRH wurde im Interaktionsversuch genauso effizient von hMutS α an die DNA gebunden wie die ATP-Hydrolysemutante mpEA

(Abbildung 40). Somit ist nicht von einer Beteiligung der hMutL α -ATPase bei der Interaktion beider Dimere auszugehen.

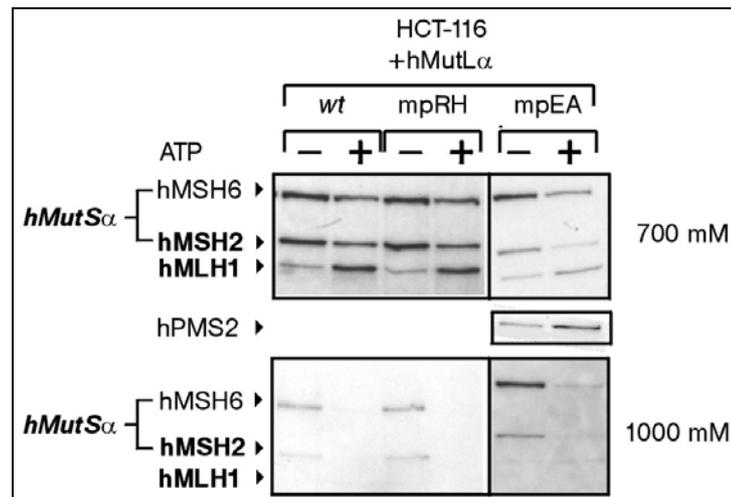


Abbildung 40: Interaktion der hMutL α -ATPase-Mutanten mit hMutS α

HCT-116-Kernextrakt (150 μ g) wurde mit Extrakt von hMutL α -transfizierten 293T-Zellen versetzt (5 μ g). Es wurde entweder der Wildtyp (+wt) oder die Bindungsmutante (+hMutL α mpEA) oder die Hydrolysemutante (+hMutL α mpRH) eingesetzt.

9.4.4. Interaktion mit den hMutL-Monomeren

Die Interaktion zwischen hMutS α und den hMutL-Heterodimeren könnte auf Seite der hMutL-Heterodimere entweder nur über hMLH1 oder nur über hPMS2/hPMS1 oder über beide Dimerkomponenten erfolgen. Um dies zu untersuchen, wurden die Untereinheiten einzeln in 293T-Zellen exprimiert.

9.4.4.1. Expression

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, daß zwar hMLH1, aber nicht hPMS2 alleine exprimiert stabil ist (Chang et al., 2000; Trojan et al., 2002).

Die Transfektion von **hMLH1** allein zeigte eine ebenso starke Expression der Untereinheit wie die Expression von hMutL α und hMutL β (Abbildung 41, Spuren 2-4). Während keine Bande von hPMS2 sichtbar wird, ist eine sehr schwache Koexpression von hPMS1 zu sehen, die von endogener *hPMS1*-mRNA stammen muß und wohl auf die Stabilisierung dieses Proteins durch das transfizierte hMLH1 zurückgeführt werden kann.

Auch **hPMS2** konnte, im Kontrast zu den o.g. vorherigen Experimenten, zur Expression gebracht werden (Abbildung 41, Spur 5). Jedoch zeigte sich hier eine Nebenbande (Abbildung 41, Bande "A"), die bei Koexpression von hPMS2 mit hMLH1 nicht so stark war. Die Bande befindet sich zwischen hMLH1 und hMSH2, repräsentiert also ein Protein von etwa 100 kDa. hPMS2 hat rechnerisch 94 kDa, läuft aber in Polyacrylamidgelen auf etwa 115 kDa, was eventuell auf eine posttranslationale

Modifikation zurückzuführen ist (Raschle et al., 1999). Die Nebenbande ist entweder auf einen Abbau des nicht durch hMLH1 stabilisierten hPMS2 zurückzuführen oder könnte auf eine verlangsamte posttranslationale Modifikation in Abwesenheit des Partnerproteins hinweisen. Keinerlei hMLH1 oder hPMS1 ist in diesem Extrakt sichtbar.

hPMS1 läßt sich ebenfalls stark exprimieren, wobei keine Nebenbanden sichtbar sind, die nicht in gleicher Stärke auch bei Koexpression mit hMLH1 entstehen. Die Extrakte sind frei von hMLH1 und hPMS2 (Abbildung 41, Spur 6).

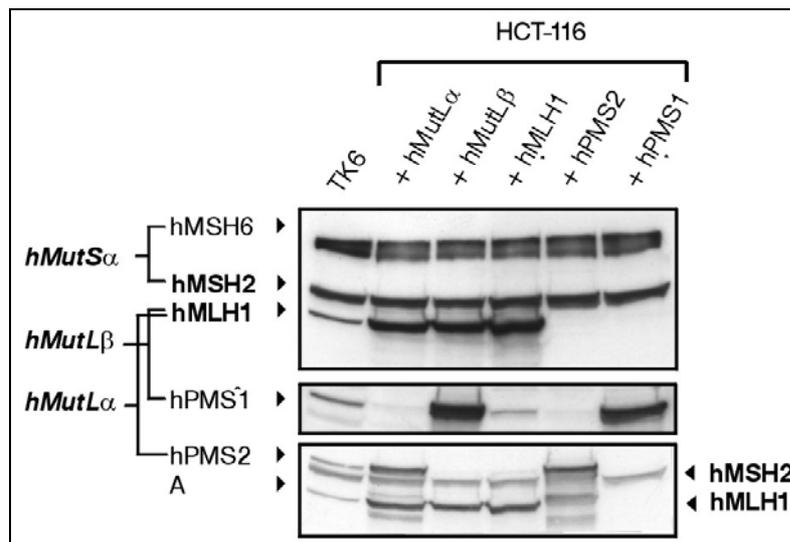


Abbildung 41: Expression von hMutL-Monomeren in 293T

Western Blot der Extrakte der transfizierten 293T-Zellen, jeweils 50 μ g Gesamtprotein. TK6-Extrakt ist zum Vergleich aufgetragen (ebenfalls 50 μ g).

9.4.4.2. Interaktion

Es zeigte sich, daß das monomere hMLH1 auch ohne seine Partnerproteine hPMS2 oder hPMS1 in der Lage ist, nach ATP-Zugabe an hMutS α zu binden (Abbildung 42, Spuren 1 und 2). Dieser ATP-induzierte Bindungsanstieg ist aber nicht mit monomerem hPMS2 zu beobachten, obwohl das Protein eine schwache Bindung an den hMutS α -DNA-Komplex aufweist (Abbildung 42, Spuren 3 und 4). Wurde getrennt voneinander exprimiertes hMLH1 und hPMS2 zusammen zugefügt, wurde auch die Reaktivität von hPMS2 wiederhergestellt (Abbildung 42, Spuren 5 und 6). Demgegenüber ließ sich beim monomeren hPMS1 auch ohne hMLH1 eine Bindungssteigerung durch ATP sehen (Abbildung 42, Spuren 7 und 8).

Die Beobachtungen mit alleine exprimierten hPMS1 und hPMS2 sind insofern mit Vorsicht zu betrachten, als daß die Protein-Monomere nicht durch ihren Partner hMLH1 stabilisiert worden sind und daher möglicherweise Faltungsfehler aufweisen. Diese

Möglichkeit wird aber aufgrund verschiedener weiterer Beobachtungen unwahrscheinlich (s.u.).

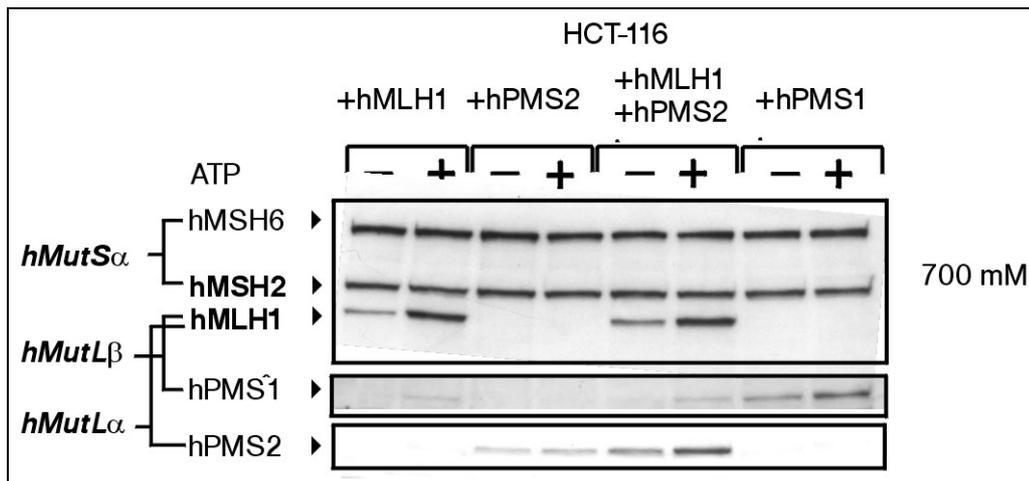


Abbildung 42: Interaktion von hMLH1, hPMS2 und hPMS1 mit hMutS α
Durchführung nach Standardprozedur, analog .Abbildung 40.

9.4.5. Interaktion mit hMLH1-Fragmenten und hMutL α MLH1 Δ 9/10

Um die hMutS α -hMutL α -Interaktionsregion beim humanen hMLH1 näher einzugrenzen, wurden Fragmente der cDNA in den humanen Expressionsvektor pSG5 inkliniert und in 293T-Zellen exprimiert (8.3.2.3). Vorbereitet wurden Vektoren mit cDNAs, die für die Fragmente LN56 (N-terminal, 56 kDa), LM42 (mittig, 42 kDa), LC49 (C-terminal, 49 kDa), LN34 (N-terminal, 34 kDa) kodierten.

Für das humane *MLH1* gibt es neben dem "korrekten" Spleißen des Primärtranskriptes, bei der alle 19 Exons im Transkript enthalten sind, noch verschiedene andere Spleißvarianten. Hierbei sticht die oft auftretende Variante hMLH1 Δ 9/10 heraus, bei der die Exons 9 und 10 deletiert sind. Diese Spleißvariante wurde als pathogen beschrieben (Liu et al., 1996; Kohonen-Corish et al., 1996; Hutter et al., 1998), aber auch in gesunden Probanden entdeckt (Charbonnier et al., 1995; Genuardi et al., 1998). Sie führt zu einem Verlust von 69 Aminosäuren am Ende der ATPase-Domäne (Domäne I) ohne Leserasterverschiebung. Wie von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, kann das verkürzte Protein seiner Reparaturaktivität nicht nachkommen (Trojan et al., 2002). Die Spleißvariante sollte ebenfalls exprimiert und in ihrem Bindungsverhalten untersucht werden, um gegebenenfalls einen Hinweis auf die Ursache der Inaktivität in der MMR oder die Lokalisation der Interaktionszone zu erhalten.

9.4.5.1. Expression

Nur das N-terminale große (LN56) und das C-terminale Fragment (LC49) konnten zur Expression gebracht werden, während LN34 und LM42 kein detektierbares Protein erzeugten (Abbildung 43 und unveröffentlichte Daten). Eine interessante Beobachtung ergab sich, als LN56 und LC49 zusammen mit hPMS2 exprimiert wurden: es zeigte sich, daß tatsächlich nur LC49 für eine umfassende Stabilisierung von hPMS2 sorgte (Abbildung 43, Spuren 5 und 6), was vorangegangene Untersuchungen, denen zufolge die Dimerisierungszone im C-Terminus residiert (5.6.2.1), bestätigt.

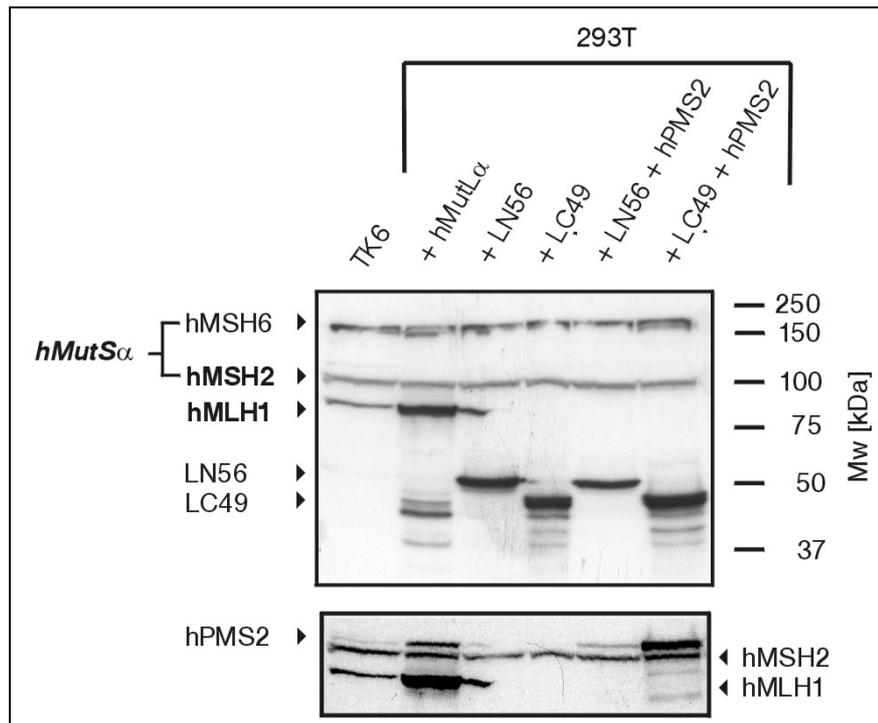


Abbildung 43: Expression der hMLH1-Fragmente
50 µg Gesamtprotein wurden jeweils aufgetragen.

Neben der hMutLα Δ9/10-Spleißvariante wurde zum Vergleich noch eine hMutLα Δ10-Variante transfiziert, in der das Exon 10 deletiert ist, was zu einer Leserasterverschiebung nach dem Exon 9 führt. Während diese Variante nicht exprimiert wurde, ergab hMutLα Δ9/10 das erwartete hMLH1-Protein mit reduziertem Molekulargewicht (Abbildung 44). Es wurde vergleichbar stark wie die einzelnen Untereinheiten exprimiert.

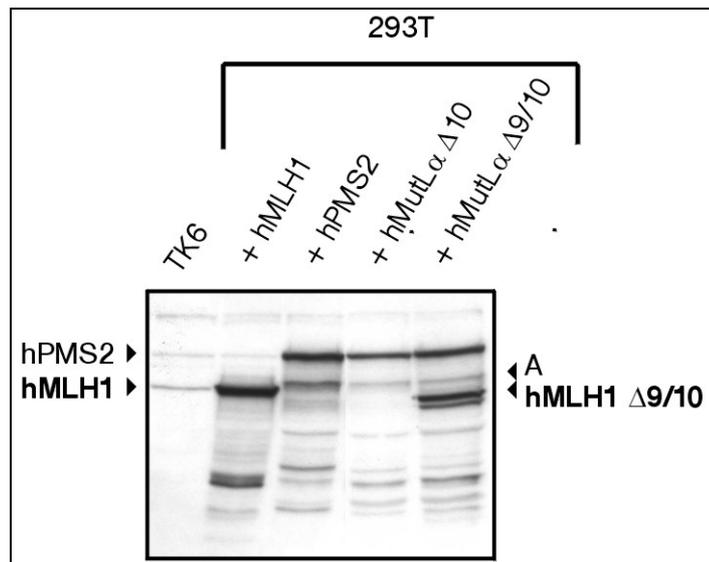


Abbildung 44: Expression von hMutL α Δ 9/10
50 μ g Gesamtprotein wurden jeweils aufgetragen.

9.4.5.2. Interaktion

Die exprimierten hMLH1-Fragmente wurden sowohl einzeln als auch, im Falle von LC49, als Dimer mit hPMS2 im Bindungstest eingesetzt. Während LN56 eine starke Reaktion auf ATP zeigte, reagierte LC49 überhaupt nicht und zeigte nur eine sehr schwache, ATP-unabhängige Basisbindung an das Substrat (Abbildung 45 B, Spuren 1 bis 4). Auch als Dimer mit hPMS2 reagierte LC49 nicht, was darauf schließen läßt, daß tatsächlich weder LC49 noch hPMS2 die hMutL α -Interaktion mit hMutS α veranlassen können (Abbildung 45 B, rechts). In diesem Experiment ist auch davon auszugehen, daß hPMS2 richtig gefaltet ist, da es in Anwesenheit des stabilisierenden C-Terminus von hMLH1 exprimiert wurde.

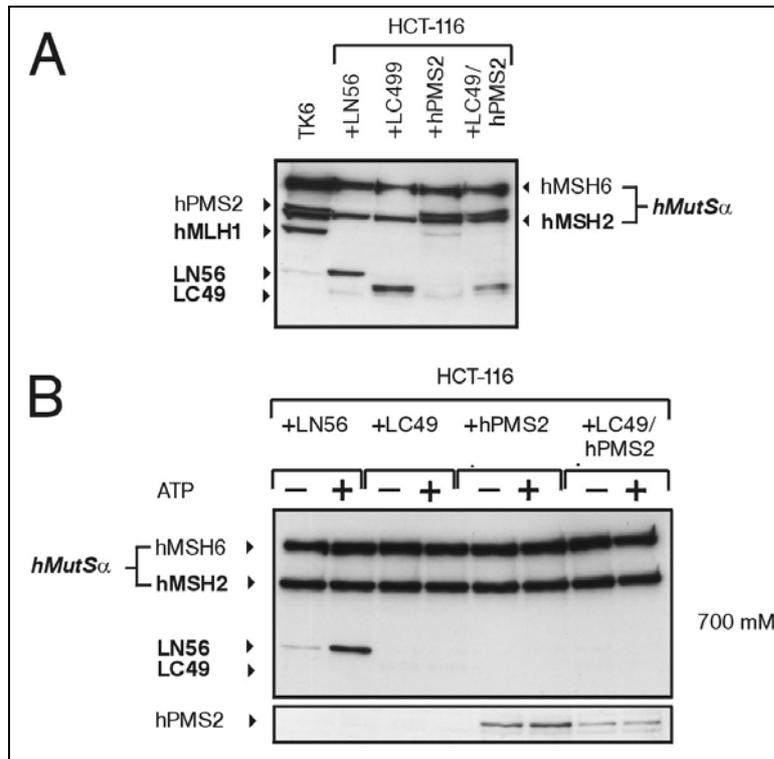


Abbildung 45: Bindung von MLH1-Fragmenten und hPMS2

HCT-116-Kernextrakt (150 μ g) wurde mit verschiedenen hMutL α -Fragmente versetzt. A: Western Blot der Inkubationsansätze des Experiments zur Kontrolle der Anwesenheit und passenden Konzentration der zugegebenen MMR-Proteine. B: Im Interaktionsexperiment gebundene Proteine, Durchführung entsprechend Abbildung 28. Es ist nur die 700 mM-NaCl-Fraktion gezeigt.

Auch die Spleißvariante des hMLH1-Proteins, welcher der Bereich fehlt, der von den Exons 9 und 10 codiert wird, reagiert nicht auf ATP und zeigt generell nur eine sehr schwache Bindung, was eine Deletion der für die Interaktion notwendigen Bereiche im hMLH1-Protein vermuten läßt.

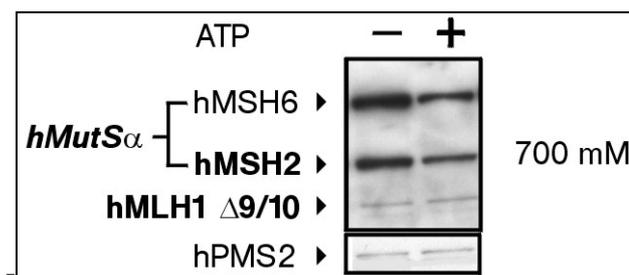


Abbildung 46: Bindung der Deletionsvariante hMutL α hMLH1 Δ 9/10

Durchführung des Interaktionsexperimentes entsprechend Abbildung 28. Nur die 700 mM-NaCl-Fraktion ist gezeigt.

10. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die am Anfang der humanen Mismatch-Reparatur stehenden Schritte, insbesondere die Interaktion der beteiligten Proteine, genauer zu charakterisieren, um zu einem verbesserten Verständnis des Reparaturprozesses zu kommen. Hierzu wurde eine neuartige Methodik entwickelt und etabliert, die einerseits zur Messung der Interaktion der Proteine mit der DNA und andererseits zur Charakterisierung der DNA-abhängigen Interaktion der Proteine untereinander geeignet war.

10.1. Eignung der etablierten Methodik für MMR-Untersuchungen

Verschiedene Parameter der hMutS α -DNA-Bindung waren bereits bekannt und konnten zur Kontrolle der neuen Methodik mit dieser nachvollzogen werden. Dazu gehören die Homoduplex- und Fehlerbindungsfähigkeit von hMutS α sowie die Reaktion auf ATP. Diese trat in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten bei der gleichen ATP-Konzentration ein, die schon früher für das humane MutS α bestimmt worden war. Die Methodik ist aufgrund ihrer Direktheit, schnellen Durchführbarkeit und Kompatibilität mit Proteinextrakten ebenso wie mit gereinigten Proteinen gut geeignet für MMR-Untersuchungen. Da die Interaktion von MutS- und MutL-Proteinen schwer analytisch erfaßbar ist, stellt die vorliegende Methodik zur Interaktionsmessung eine wertvolle Bereicherung des Methodenspektrums zur Untersuchung dieser Interaktion dar.

10.2. Bindung von hMutS α an DNA-Substrate und Reaktion auf ATP

Es konnte gezeigt werden, daß hMutS α in etwa gleicher Menge an doppelsträngige DNA-Substrate bindet, unabhängig davon, ob sie fehlerhaft gepaart sind oder nicht. Hingegen war das Vorliegen eines Fehlers im Substrat dadurch erkennbar, daß hMutS α stärker an die entsprechende DNA-Duplex band, da es hiervon schwerer durch einen Salzgradienten eluierbar war.

Ein Paarungsfehler ist also nicht Voraussetzung für die Bindung von hMutS α an DNA, vielmehr verändert ein Paarungsfehler die Art der Bindung dahingehend, daß hMutS α an der fehlerhaften Stelle eine festere Bindung eingeht. Dieser Prozeß ähnelt einem "Einrasten" des Proteins am DNA-Fehler.

Die Konformationsänderungen, die durch die Fehlerbindung vonstatten gehen, scheinen gleichzeitig die Aufnahme von ATP zu erleichtern. Die bisherige Ansicht war, daß MutS-Proteine als Reaktion auf die ATP-Aufnahme ihre Fähigkeit zur DNA-

Fehlerbindung verlieren, was zu einem Dilemma in der Erklärung des Reparaturmechanismus führte (5.5.3). Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, daß das humane MutS α als Reaktion auf ATP keineswegs einen vollständigen Verlust der Mismatch-Bindungsfähigkeit aufweist, sondern nach wie vor an einem fehlerhaften Substrat gebunden bleiben kann, während es von Homoduplex-DNA in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten tatsächlich vollständig abdiffundiert. Diese Beobachtung unterstützt das *DNA bending model*, welches von einer fortgesetzten Bindung an den DNA-Fehler während der Reparaturinitiation ausgeht.

10.3. Rekrutierung von hMutL-Dimeren an den hMutS α -DNA-Komplex

Die genaue Funktion der Aufnahme bzw. Hydrolyse von ATP nach der Fehlererkennung ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Reparaturinitiation der MMR. ATP verändert, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, einerseits die DNA-Bindung des MutS-Proteins und erzeugt andererseits Protein-Interaktionen zwischen reparaturbeteiligten Proteinen. Eine zentrale Interaktion, die am Beginn der Reparaturinitiation steht, ist die zwischen MutS und MutL. Obwohl mehrere Arbeiten diese Interaktion und ihre ATP-Abhängigkeit untersucht haben, ist der Kenntnisstand, speziell bei den humanen Proteinen, verworren und widersprüchlich (Gu et al., 1998; Matton et al., 2000, siehe auch 5.7).

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, ist die Interaktion von hMutS α und hMutL-Proteinen ATP-abhängig. Jedoch muß nur das hMutS α -Protein und nicht der Partner auf der MutL-Seite ATP aufnehmen, damit die Interaktion zustande kommt. Beim hMutS α -Protein ist wahrscheinlich nur die hMSH2-ATPase für die Interaktionsvermittlung verantwortlich. Die Hydrolyse von ATP ist offenbar nicht nötig für die Interaktion. Außerdem ist für das Zustandekommen der Interaktion eine ausreichende Länge des DNA-Substrates nötig, da sie zwar mit 81- und 200mer DNA, aber nicht mit 32mer Duplices nachweisbar war. Dies läßt darauf schließen, daß auch MutL parallel zu MutS eine Bindung mit DNA eingehen muß, damit der Komplex zustande kommt. Das 32mer Substrat ist hierfür wahrscheinlich zu kurz, da hMutS α allein bereits etwa 25 Nukleotide einer DNA bedeckt (Gradia et al., 1997). Die generelle DNA-Bindungsfähigkeit, die in dieser Arbeit beim humanen MutL α -Protein gefunden wurde, unterstützt das Konzept einer gleichzeitigen Bindung von MutL an DNA und MutS.

10.4. hMutL α versus hMutL β

Das humane *PMS1*-Gen wurde zusammen mit dem *hPMS2*-Gen und einigen *hPMS*-Pseudogenen 1994 kloniert (Horii et al., 1994) und aufgrund einer im gleichen Jahr gefundenen HNPCC-Patientenmutation zur Reihe der essentiellen MMR-Gene hinzugerechnet (Nicolaidis et al., 1994). Darüber hinaus wurde 1998 gezeigt, daß eine *PMS1*-defiziente Mauszelllinie eine schwache, auf Monowiederholungen beschränkte Mikrosatelliteninstabilität aufwies (Prolla et al., 1994). Dennoch konnte in der gleichen Studie kein Effekt einer *PMS1*-Defizienz auf die Mikrosatellitenstabilität bei Mäusen nachgewiesen werden, jedoch wurde die Expression des Proteins im untersuchten Gewebe bei *Wildtyp*-Mäusen nicht abgeklärt. Eine Beteiligung des hMutL β -Dimers, welches hPMS1 enthält, konnte in MMR-*Assays* nicht nachgewiesen werden, da es im Gegensatz zu hMutL α nicht in der Lage ist, in einem MutL-defizienten Kernextrakt MMR-Profizienz herzustellen (Raschle et al., 1999). Da PMS1 jedoch ubiquitär exprimiert wird, stellt sich die Frage nach seiner Funktionalität. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, daß hMutL β ebenso wie hMutL α von hMutS α als Reaktion auf ATP-Aufnahme zur DNA rekrutiert wird, wenn auch für hMutL α eine leichte Präferenz zu existieren scheint. Auffällig ist darüber hinaus die Feststellung, daß hPMS1 im Gegensatz zu hPMS2 eine eigene ATP-abhängige Bindungsfähigkeit an hMutS α besitzt, was auf eine mögliche Verschiedenheit in der Funktion hinweist. Eine Beteiligung von hMutL β an der Reparatur oder einem anderen Prozeß, der die Bindung an hMutS α erfordert, ist entsprechend den vorliegenden Ergebnissen sehr wahrscheinlich. Jedoch wird hMutL β , wenn seine Hauptfunktion in der Mismatch-Reparatur liegt, eine unterstützende oder modulierende Rolle übernehmen, welche dann weitgehend auch durch hMutL α alleine durchgeführt werden kann. Andererseits ist es möglich, daß eine essentielle Rolle für das hMutL β -Dimer in einer anderen Funktion existiert. Hier kommen z.B. die Reparatur anderer, noch nicht untersuchter Paarungsfehler oder eine Beteiligung bei der Rekombination in Frage.

10.5. Interaktionszone von hMutL-Proteinen mit hMutS α -Proteinen

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, festzustellen, welcher Proteinbereich auf Seiten der hMutL-Dimere den Kontakt zum hMutS α -Protein vermittelt. Wie Versuche mit den monomeren Untereinheiten hMLH1, hPMS1 und hPMS2 ergaben, zeigen nur die hMLH1- und die hPMS1-Untereinheiten eine ATP-Abhängigkeit der Bindung an hMutS α , wobei diese bei hMLH1 deutlich intensiver ausgeprägt ist als bei hPMS1.

PMS2 bindet auch nachweislich an das Substrat, jedoch nur schwach, und ohne eine Reaktion auf ATP zu zeigen.

Die hPMS-Untereinheiten sind in Abwesenheit des Partnerproteins hMLH1 instabil (Brieger A. *et al.*, siehe Publierte Daten), was auch an den Proteinsignalen bei der Expression in Form einer Abbau-Bande, die nur bei Abwesenheit von hMLH1 stärker auftrat, deutlich wurde. Es ist daher nicht auszuschließen, daß bei der Expression ein fehlerhaft gefaltetes PMS2-Protein entstand, welches aufgrund dieser Faltungsfehler nicht auf die ATP-Zugabe reagierte. Dies ist jedoch aus drei Gründen unwahrscheinlich: Erstens wird die Interaktion nur aufgrund der ATP-Aufnahme des hMutS α -Partners induziert, so daß der MutL-Partner zwar einen solvensexponierten Adapterbereich zur Bindung, aber keine ausgefeilte Proteinmechanik zur Verfügung stellen muß.

Zweitens zeigt die Tatsache, daß zwar keine ATP-abhängige, sehr wohl aber eine generelle Bindung des hPMS2-Monomers stattfindet, daß der besagte Bindungsbereich des Protein offenbar noch solvensexponiert und funktionstüchtig ist.

Drittens gelang es, eine stabilisierte (und somit höchstwahrscheinlich korrekt gefaltete) Form von hPMS2 durch Koexpression mit dem stabilisierenden C-Terminus von hMLH1 zu generieren. Auch dieses Heterodimer zeigte keine ATP-abhängige Bindung an hMutS α .

Aus diesen Versuchen läßt sich somit mit großer Sicherheit ableiten, daß die hMutS α -hMutL α -Interaktion über die hMLH1-Untereinheit zustande kommt. Auch für hMutL β wird weitgehend das Gleiche gelten, da hMLH1 drastisch stärker an hMutS α bindet als hPMS1, wenn auch die Entdeckung der eigenen Bindungsfähigkeit von hPMS1 womöglich auf einen funktionellen Unterschied der Proteine hinweist und dieser Aspekt daher näher untersucht werden sollte.

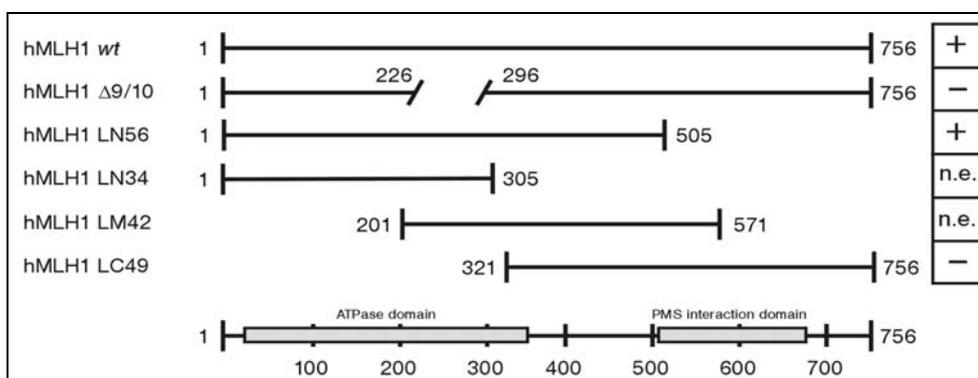


Abbildung 47: Übersicht über die hMLH1-Konstrukte zur Interaktionszonensuche

Links sind die Namen der verschiedenen Konstrukte aufgelistet. Die Strichdiagramme geben den Proteinbereich der Fragmente im Vergleich zum 756 Aminosäuren langen *wt*-Protein (oben) an. Unten eine Übersichtszeichnung mit den bisher bekannten Domänen von hMLH1. Rechte Spalte: Plus (“+”) bedeutet, daß das Protein eine Interaktion mit hMutS α eingeht. Minus (“-“) bedeutet, daß das Protein keine Interaktion eingeht. “n.e.” bedeutet “nicht exprimierbares Fragment”.

Von den vier Teil-cDNAs, die von hMLH1 hergestellt worden sind (Abbildung 47), ließen sich nur zwei zu stabilen Proteinen exprimieren, nämlich LN56 und LC49. Das aminoternale Fragment LN56 zeigt eine starke, dem Volllängen-Protein nicht nachstehende, ATP-abhängige Bindung an hMut α , aber keine Stabilisierung von hPMS2. Das carboxyterminale Fragment LC49 hingegen geht zwar keine ATP-abhängige Interaktion mit hMut α ein, kann dafür aber hPMS2 effizient stabilisieren. Diese Beobachtung unterstützt frühere Erkenntnisse, denen zufolge die Dimerisierungszone beider Proteine in deren C-Terminus zu finden ist (Guerrette et al., 1999). Auf der anderen Seite zeigt das Ergebnis, daß die Interaktionszone (genauso wie die ATPase des Proteins) im N-Terminus residiert. Es läßt sich spekulieren, daß durch die räumliche Nähe der Interaktionszone und der hMLH1-ATPase diese durch die Interaktion wiederum in ihrer Bindungsfähigkeit bzw. Hydrolysekinetik verändert wird. So könnte das Signal "Fehler erkannt und verifiziert" von hMut α auf hMut α übertragen werden.

Die Ergebnisse mit der hMLH1 Δ 9/10-Variante des hMut α -Dimers lassen darüber hinaus vermuten, daß die Interaktionszone womöglich im Bereich der Deletion oder an diesen angrenzend lokalisiert ist. Jedoch ist bei diesem Schluß wiederum zu bedenken, daß die Spleißvariante einen Faltungsfehler aufweisen könnte.

10.6. Modell der Initiation der humanen Mismatch-Reparatur

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich zusammen mit den Erkenntnissen anderer Gruppen zu einem präziseren Bild der ersten Schritte der Reparaturinitiation der MMR zusammenfügen.

Demzufolge bindet hMut α an Homoduplex-DNA ebenso wie an einen DNA-Fehler, nur daß bei letzterem eine Konformationsänderung ein "Einrasten" des Heterodimers an der fehlerhaften Stelle führt (Abbildung 48, 2): die DNA wird abgeknickt. Dies bildet das Signal, welches die ATP-Aufnahme durch hMut α induziert.

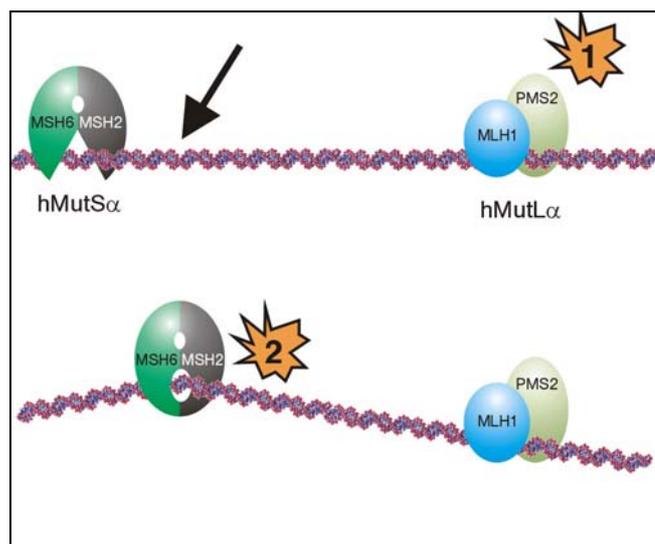
Die Aufnahme von ATP bewirkt zweierlei: einerseits hat es eine unmittelbare Wirkung auf die DNA-Bindung. Andererseits vermittelt es die Interaktion mit einem hMutL-Protein. Ob diese beiden Aufgaben zwischen den beiden ATPasen von hMut α getrennt sind oder ob dies eine konzertierte Aktion darstellt, ist derzeit noch unklar. Die ATPasen von hMut α fungieren asymmetrisch (Iaccarino et al., 1998), scheinen jedoch auch eine Überlappung in der Wirkung zu zeigen. Sollte eine funktionelle Arbeitsteilung existieren, wird wahrscheinlich die hMSH6-ATPase hauptsächlich die

DNA-Veränderung vermitteln, während die hMSH2-ATPase, wie die gefundenen Ergebnisse nahelegen (9.3.3), den Kontakt zum hMutL-Protein vermittelt.

Interessanterweise reagierte in den durchgeführten Experimenten hMutS α auf ATP nicht durch vollständige Abdissoziation von DNA-Fehlern, wohl aber von Homoduplex-DNA (Abbildung 48, 3). Dieses Ergebnis untermauert das *DNA bending*-Modell der MMR, welches von einer fortgesetzten Bindung von MutS während der Reparaturinitiation ausgeht, weshalb in Abbildung 48 auch dieses Modell als Grundlage für die Markierung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse dargestellt ist.

Die ATP-Aufnahme bewirkt auch die Exposition eines Bereiches von hMutS α (Abbildung 48, 3+4), an den hMutL-Proteine binden können (Abbildung 48, 4), und zwar mit einem Proteinbereich aus dem N-Terminus des hMLH1-Proteins (Abbildung 48, 5), möglicherweise im Bereich der Aminosäuren 226-296. Gleichzeitig bindet das hMutL-Protein, für das eine DNA-Bindungsfähigkeit bewiesen worden ist (Abbildung 48, 1), auch im Komplex mit hMutS α an DNA (Abbildung 48, 5).

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß auch hMutL β , ebenfalls in Abhängigkeit von ausreichend langer DNA, sowohl alleine als auch in Gegenwart von hMutL α , ATP-abhängig mit hMutS α interagiert (Abbildung 48, 6). Bei dieser Interaktion ist die hPMS1-Untereinheit möglicherweise intensiver in den Kontakt zu hMutS α eingebunden als die hPMS2-Untereinheit bei der Interaktion zwischen hMutS α und hMutL α .



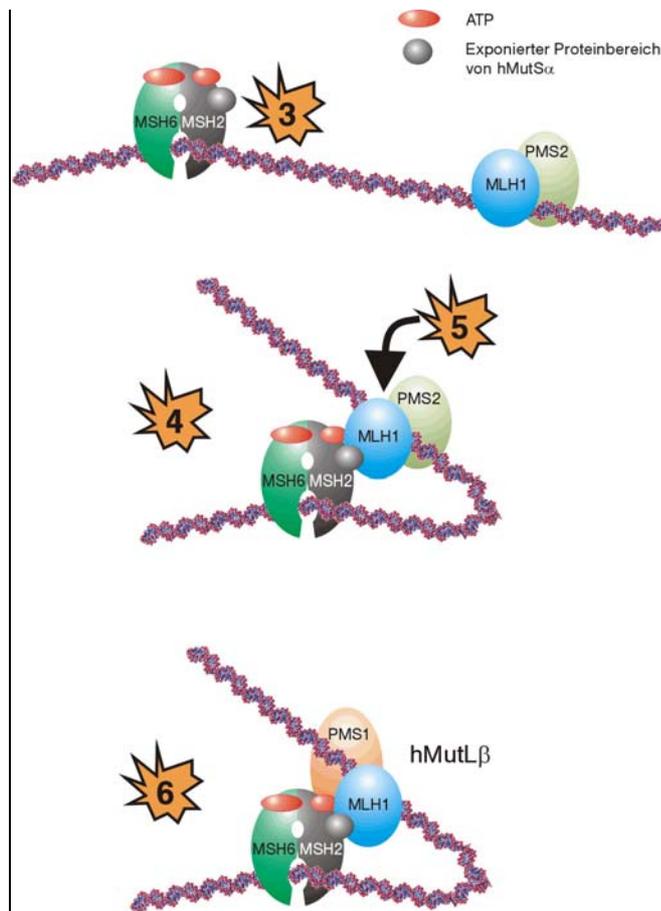


Abbildung 48: Erweitertes DNA bending model der MMR-Initiation

Das DNA bending model ist um die Erkenntnisse dieser Arbeit erweitert worden. Diese sind durch Sterne gekennzeichnet. Der Pfeil markiert eine Fehlpaarung in der DNA-Duplex. 1: hMutLα hat eine DNA-Bindungs-fähigkeit. 2: hMutSα sitzt fester an DNA, wenn diese eine Fehlpaarung enthält. 3: ATP führt zu einer Lockerung dieser Bindung, jedoch bleibt hMutSα am Fehler gebunden. 4: ATP führt darüber hinaus zu der Exposition eines Proteinbereiches von hMutSα, welcher das Andocken von hMutLα ermöglicht. 5: hMutLα dockt ohne Beteiligung der eigenen ATPasen mit dem N-terminalen Teil seiner hMLH1-Untereinheit an. 6: Auch hMutLβ kann einen analogen Komplex mit hMutSα bilden.

10.7. Ausblick

Nach wie vor steht eine endgültige Entscheidung aus, ob eines der drei zur Zeit vorgeschlagenen Modelle der Mismatch-Reparatur zutreffend ist. Darüber hinaus gibt es wahrscheinlich noch zahlreiche weitere Proteininteraktionen, die noch unentdeckt sind; auch muß die genauere mechanistische Rolle aller Proteine und Interaktionen im Reparaturprozeß noch aufgedeckt werden. Dies wird wesentlich erleichtert durch die Kenntnis der Bedingungen und Proteinbereiche, die die Interaktion der beteiligten Proteine ermöglichen. Dafür bietet sich die neuentwickelte Methodik zur Interaktionsmessung an, einerseits zur genaueren Charakterisierung der bereits erkannten Interaktionen, andererseits zur Untersuchung derjenigen, deren Relevanz noch gar nicht entdeckt ist.

Die Fragestellungen, die sich unmittelbar aus der vorliegenden Arbeit ergeben, sind folgende:

. *Welches genau ist der Proteinbereich von hMLH1, der die Interaktion vermittelt?*

Dies läßt sich durch weitere Fragmentsynthesen von hMLH1 und anschließend durch gezielte Missense-Mutationen beantworten.

. *Welcher Proteinbereich von hMutS α vermittelt die Interaktion?*

Dies läßt sich durch Transfektion geeigneter, hMutS α -defizienter Zellen mit hMutS α -Konstrukten und anschließendem Interaktionstest beantworten.

. *Ist die Bindung von ATP durch hMutL oder die Bindung / Hydrolyse von ATP durch hMutS α für die Interaktion essentiell?*

Dies läßt sich auch durch Einführung geeigneter Mutationen in die entsprechenden Konstrukte beantworten.

. *Gibt es HNPCC-Missense-Mutationen, welche eine Interaktionsdefizienz zwischen den Proteinen auslösen und dadurch pathogen sind?*

Die hMLH1 Δ 9/10 Deletionsmutation ist (wahrscheinlich nur unter anderem) aufgrund ihrer Unfähigkeit zur Interaktion MMR-defizient. Nicht vorbeschriebene Missense-Mutationen stellen nach wie vor ein großes Problem dar, da die Beurteilung ihrer Pathogenität schwierig ist. Der vorliegende Interaktionstest ermöglicht die schnelle Kontrolle, ob eine Missense-Mutation die Interaktion abschwächt.

11. Ergebnisse und Diskussion der genetischen Untersuchung des PTEN-Status bei einer Patientin mit dem Cowden-Syndrom

11.1. Einführung

11.1.1. Das *PTEN*-Gen

11.1.1.1. Identifizierung von *PTEN* als neuer Tumorsuppressor

Viele Jahre wurde auf dem humanen Chromosom 10 ein Tumorsuppressorgen vermutet, da in entarteten menschlichen Zellen oftmals Veränderungen dieses Chromosoms zu sehen waren (Simpson et al., 2001). Im Jahre 1996 zeigten zwei Untersuchungen, daß ein Bereich im Chromosom 10 (10q23) bei nahezu allen Prostatakarzinomen deletiert ist (Ittmann 1996), und daß auch die Ursache des Cowden-Syndroms im gleichen Bereich lokalisiert ist (Nelen et al., 1996). Diese Entdeckungen forcierten die Suche nach einem möglichen neuen Tumorsuppressorgen in diesem Areal des Humangenoms. Schon ein Jahr später wurde durch drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander das gleiche Gen isoliert, welches für ein 403 Aminosäuren langes Protein codierte und als *PTEN* (*Phosphatase and TENsin-like*), *MMAC* (*Mutated in Many Advanced Cancers*) und *TEP1* (*TGF-regulated and Epithelial cell-enriched Phosphatase*) bezeichnet wurde (Steck et al., 1997; Li et al., 1997a; Li et al., 1997b).

Untersuchungen von Tumormaterialien zeigten, daß viele sporadische Karzinome Mutationen im *PTEN* aufweisen. Besonders Glioblastome, Endometrialkarzinome, Prostatakarzinome, Melanome und Mammakarzinome stechen dabei hervor.

11.1.1.2. Die Cowden-Krankheit und das Bannayan-Zonana Syndrom

Die Cowden-Krankheit (OMIM-Nummer: #158350) ist ein seltenes, autosomal-dominant vererbtes Krebsyndrom, das mit einem stark erhöhten Risiko für Brustkrebs einhergeht. Ein besonderes phänotypisches Merkmal sind Hamartome der Haut, Brust, Schilddrüse, Mundschleimhaut und des Intestinalepithels. Nachdem *PTEN* im gleichen Bereich des Chromosoms 10 gefunden worden war, in dem ein Jahr zuvor die Ursache der Cowden-Erkrankung lokalisiert worden war, wurden bald Keimbahnmutationen in *PTEN* als Ursache des Cowden-Syndroms identifiziert.

Interessanterweise wurden *PTEN*-Mutationen ebenfalls als ursächlich für eine weitere erbliche Krankheit unterschiedlichen Phänotyps identifiziert, dem Bannayan-Zonana-Syndrom (auch Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom, OMIM-Nummer: #153480). Da teilweise die gleichen Mutationen in *PTEN* sowohl für das eine also auch das andere

Syndrom ursächlich zu sein scheinen, ist die Lokalisation oder Art der Mutation wahrscheinlich nicht verantwortlich für die Ausprägung zu verschiedenen Phänotypen, sondern der Einfluß weiterer, noch nicht identifizierter genetischer oder epigenetischer Faktoren.

11.1.1.3. Struktur und Mutationsverteilung von PTEN

PTEN verfügt über eine N-terminale Phosphatase-Domäne (PHD) mit einer zentralen Konsensussequenz, die im Exon 5 von *PTEN* lokalisiert ist. Die Phosphatasedomäne ähnelt denen von Proteinphosphatasen, besitzt jedoch eine vergrößerte Aktivitätszone, welche wahrscheinlich für die Hydrolyse der Lipidphosphate, die das Substrat von PTEN sind, geeigneter ist. Darüber hinaus verfügt PTEN über eine C2-Domäne, die für die Bindung an Lipidmembranen von Bedeutung ist, sowie einen C-terminal gelegenen "Schwanz", der eine PDZ-Bindungsdomäne enthält, über die es mit Proteinen interagieren kann, die diese Domäne enthalten.

Bis auf Exon 9, das am Ende des Gens gelegen ist, sind in allen Exons Keimbahnmutationen bei Erkrankten von Cowden- und Bannayan-Zonana-Syndrom gefunden worden. Besonders gehäuft treten Mutationen um das zentrale Phosphatasemotiv in Exon 5 auf (Abbildung 49).

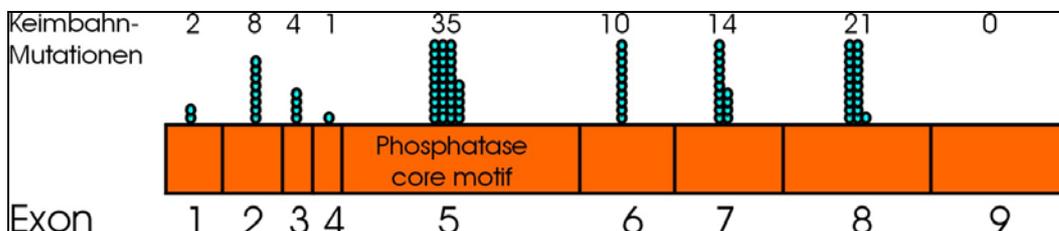


Abbildung 49: Mutationsverteilung von Cowden- und Bannayan-Zonana-Syndrom im *PTEN*-Gen

11.1.2. Funktion von PTEN

11.1.2.1. Biochemische Funktion von PTEN

Obwohl aus der Analyse der Primärstruktur des Proteins bereits schnell nach seiner Entdeckung bekannt war, daß es sich um eine Phosphatase handelte, blieb das zentrale Substrat dieser Phosphatase noch einige Zeit unbekannt. Zwar konnte schnell experimentell bestätigt werden, daß PTEN als Proteinphosphatase Phosphoserin, -threonin und -tyrosin dephosphorylieren konnte, also eine *dual-specificity* Phosphatase ist, doch zeigte eine *PTEN*-Mutante, die in einer Familie mit dem Cowden-Syndrom gefunden worden war, in vitro eine dem Wildtyp vergleichbare Proteinphosphatase-Aktivität. Das legte den Schluß nahe, daß diese Funktion nicht von zentraler Bedeutung für die Tumorsuppressoreigenschaften des Proteins ist. Als das tatsächliche Substrat von

PTEN wurde schließlich PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) identifiziert (Maehama et al., 1998), welches als *second messenger* im PI3K-Signalweg eine wichtige Rolle spielt. Somit handelt es sich bei *PTEN* um eine Lipid-Phosphatase.

11.1.2.2. *PTEN* im PI3K-Signalweg

Zahlreiche Wachstumsfaktoren wirken über den Insulinrezeptor, der nach Bindung eines Liganden die PI3-Kinase aktiviert, die Phosphatidylinositoldiphosphat zum Triphosphat phosphoryliert. Dieses Triphosphat ist als *second messenger* in der Lage, AKT zur Anlagerung an die Cytoplasmamembran zu bewegen, wo es aufgrund der Konformationsänderung, die mit dieser Anlagerung einhergeht, selbst durch PDK1 phosphoryliert und damit aktiviert wird. Anschließend entfaltet das aktivierte Phospho-AKT seine proliferationsfördernde und apoptosedämmende Wirkung in der Zelle.

PTEN ist in der Lage, den *second messenger* PIP₃ wieder zum PIP₂ zu dephosphorylieren und damit auch die AKT-Aktivierung zurückzudrängen. Fällt *PTEN* aufgrund einer Mutation aus, kommt es durch die verringerte Deaktivierung des *second messengers* PIP₃ zu einer Überstimulation des AKT-Weges und damit zu einem überschießenden Proliferationssignal (Abbildung 50).

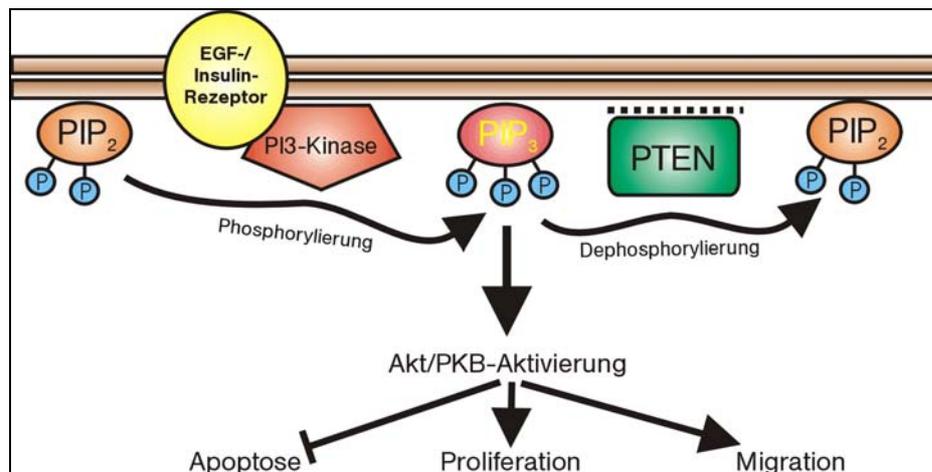


Abbildung 50: Zelluläre Funktion des *PTEN*-Proteins

Erläuterungen siehe Text.

11.2. Fragestellung und Zielsetzung

Bei einer Patientin (ausführliche Daten siehe 7.10), bei der aufgrund der klinischen Symptomatik der Verdacht auf ein Cowden-Syndrom festgestellt worden war, sollte *PTEN* aus genomischer Lymphozyten-DNA sequenziert und mit der veröffentlichten Wildtyp-Sequenz verglichen werden. Eine gefundene Veränderung sollte, falls nicht vorherbeschrieben, auf ihre Funktionalität überprüft werden, um die Pathogenität der Veränderung sicherzustellen.

11.3. Ergebnisse

11.3.1. Sequenzierung von *PTEN*

Die Sequenzierung von *PTEN* (aller neun Exons inklusive der Exon-Intron-Übergänge) ergab bei der Patientin nur eine Abweichung von der veröffentlichten Sequenz (7.2.2). Dabei handelt es sich um eine heterozygote Einzelbasensubstitution der ersten Base des zweiten Introns von G nach A (IVS2+1G>A, Abbildung 51). Diese Veränderung wurde in der Sequenz von 20 nicht verwandten, gesunden Individuen, die als Vergleich verwendet wurden, nicht gefunden.

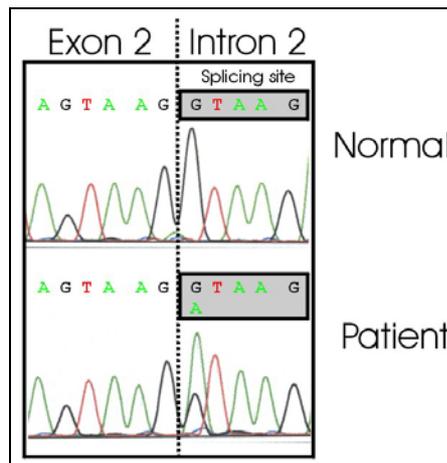


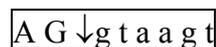
Abbildung 51: Sequenz der gDNA von *PTEN* an der Spleißstelle Exon 2 / Intron 2
Bei der Patientin ist eine heterozygote G>A Substitution der ersten Base des Introns 2 sichtbar.

11.3.2. Überlegungen zu der gefundenen Spleißmutation

Die gefundene Veränderung ist in der Literatur nicht vorbeschrieben (*Human Mutation Database*, 7.2.1). Obwohl sie nicht im Exon liegt, kommt ihr aufgrund der Tatsache, daß sie direkt in der Exon-Intron-Grenze liegt, eine große Relevanz zu, da durch diese Mutation der Spleißprozeß und damit die korrekte Erstellung einer mRNA aus dem Primärtranskript behindert sein könnte.

Der größte Teil aller Spleißvorgänge bei der Herstellung der mRNA in Eukaryonten geschieht mit Hilfe von AG-GT-Spleißstellen, die nach der typischen Nukleotidsequenz benannt sind, die unmittelbar vor dem Exon (AG) und unmittelbar nach dem Exon (GT) besteht. Diese Sequenzen sind das Signal für das Spleißosom, den RNA-Bereich zwischen diesen beiden Signalen aus dem Primärtranskript für die Herstellung der mRNA zu verwenden.

Nach einer ausführlichen Datenbankanalyse zahlreicher eukaryontischer Spleißstellen ergab sich folgende Konsensussequenz der Spleißakzeptorstelle (Shapiro et al., 1987):



Demzufolge sind A und G mit jeweils 62% und 77% Wahrscheinlichkeit die letzten zwei Nukleotide des Exons, dann folgen mit jeweils 100% (obligatorisches Auftreten) g und t als erste beide Nukleotide des Introns, dann mit wieder sinkender Inzidenz die Sequenz a a g t. Da das erste g-Nukleotid für die Erkennung der Spleißstelle somit obligatorisch ist, würde das Allel mit der g>a Mutation an dieser Stelle auf jeden Fall einen Spleißdefekt erzeugen.

Als Konsequenzen des Ausfalls einer Spleißstelle kommen zwei Möglichkeiten in Betracht:

- Deletion eines oder mehrere Exons vor der defekten Spleißstelle in der mRNA (*Exon skipping*)
- Verwendung einer nahe gelegenen, der Konsensussequenz ähnlichen Sequenz (*cryptic splicing site activation*) als neue Spleißstelle und dadurch Entstehung eines aberranten Transkriptes.

zu a):

Das Exon 1 geht ohne eine Spleiß-Startstelle direkt in die translatierte Region über, weshalb nur das Exon 2 durch die mutierte Spleißstelle deletiert sein könnte, was im Vergleich zum Wildtyp zu einem um 85 Basenpaare kürzeren Transkript führen würde. Dieses Transkript würde außerdem eine Leserasterverschiebung ab Codon 25 mit vorzeitigem Stop an Codon 69 aufweisen.

zu b):

Die Untersuchung der Sequenz im Bereich vor und nach der mutierten Spleißstelle zeigte, daß nur eine Stelle in der Nähe der Originalspleißstelle eine hohe Homologie mit einer tatsächlichen Spleißstelle besitzt (Abbildung 52). Diese Sequenz liegt unmittelbar vor der richtigen Spleißstelle innerhalb des Exons. Eine Verwendung würde ein um 5 bp verkürztes Transkript erzeugen.

```

3901 atagtgggga aagctttcct ttcataacta gctaagtgtt taaaaagtat tcttttagtt
3961 tgattgctgc atatttcaga tatttctttc cttaactaaa gtactcagAT ATTTATCCAA
4021 ACATTATTGC TATGGGATT CCTGCAGAAA GACTTGAAGG CGTATACAGG AACAAATATTG
4081 ATGATGTAGT AAGgtaagaa tgctttgatt ttctatttca aatattgatg tttatattca
4141 tgttggtgtt tcatttagaa aagatttcta agccacagaa aaagataact tgtgatgtaa
4201 actattattg tagtgctcta taatcatttt ttggcttacc gtacctaata gacttcaggg

```

Abbildung 52: Alternative Spleißstellen in *PTEN* im Bereich des Exons 2

Fette Großbuchstaben bezeichnen das Exon 2, die dunkel hinterlegte Sequenz die Original-Spleißstelle. Heller hinterlegt sind Sequenzen mit Ähnlichkeit zu einer Spleißstelle.

Auch dieses Transkript wäre durch eine Leserasterverschiebung, in diesem Fall erst ab Codon 55, verändert und enthielte einen vorzeitigen Stop bei Codon 60.

11.3.3. Analyse der PTEN-mRNA

11.3.3.1. Erstellung von PTEN-transkriptselektiven Primern

Für die Analyse der *PTEN*-mRNA war es zunächst notwendig, die mRNA revers zu transkribieren und dann zu amplifizieren. Da es auf Chromosom 9 ein Pseudogen von *PTEN* gibt, welches eine hohe Homologie mit der *PTEN*-mRNA aufweist, besteht mit Exon-Primern selbst bei einer kleinen Verunreinigung der RNA-Probe mit DNA die Gefahr, ungewollt das Pseudogen anstelle der mRNA zu polymerisieren bzw. sequenzieren. Der zunächst unternommene Versuch, mit einer weitgehend DNA-freien RNA-Probe ein Pseudogen-freies Amplifikat zu erhalten, war erfolglos, da das Amplifikat ausschließlich die Sequenz des Pseudogens zeigte. Daher wurden für die weitergehende Analyse Primer gesucht, die die geringen Sequenzunterschiede zwischen dem *PTEN*-Pseudogen und dem Transkript ausnutzen, um zu einem reinen Amplifikat des Transkriptes zu gelangen, welches den relevanten Bereich (3'-UTR bis nach dem Exon 3) abdeckt. Da aber über die 3'-UTR des Pseudogens keine Sequenzinformationen vorlagen, wurde dieser Bereich sequenziert und eine 4 bp große Deletion im Vergleich mit der Sequenz der mRNA gefunden (Abbildung 53). Diese neue Sequenz, mit deren Hilfe die Analyse von *PTEN*-Transkripten und dem Pseudogen erleichtert wird, wurde der *GenBank* zur Verfügung gestellt (Zugriffsnummer AF343912).

5'-atttccatcctgca ga agaa gccccgccaccagca-gcttctgccatctct-3'	PTEN mRNA
5'-atttccatcctgca ga gccccgccaccagca-gcttctgccatctct-3'	Pseudogen

Abbildung 53: Vergleich von *PTEN* mit dem *PTEN*-Pseudogen

Gezeigt ist die 5'-untranslatierte Region vor dem Exon 1 und der Beginn von Exon 1. 15 bp vor Exon 1 befindet sich eine 4 bp große Deletion im Pseudogen.

Es zeigte sich, daß 15 Basenpaare vor Exon 1 einer der insgesamt relativ wenigen Sequenzunterschiede zwischen der mRNA und dem Pseudogen besteht. Die Deletion von vier Basenpaaren, die im Pseudogen stattgefunden hat (Abbildung 53), wurde für die Konzeption eines mRNA-spezifischen Sense-Primers verwendet. Der Antisense-Primer wurde im Bereich eines weiteren, bereits vorgeschriebenen Sequenzunterschiedes (Dahia et al., 1998) zwischen Gen und Pseudogen plziert. Die Primer umfaßten einen genau 500 bp großen Bereich des *PTEN*-Transkriptes, der vom Bereich kurz vor Exon 1 bis in die Mitte des Exons 5 reichte und somit die durch die Mutation betroffene Stelle weit umfaßte. Die Verwendung dieser Primer resultierte mit einer cDNA-Präparation, jedoch nicht mit genomischer DNA, in einem Amplifikationsprodukt (Abbildung 54). Darüber hinaus zeigte die Sequenzierung des

Amplifikationsproduktes keine Signale aus dem Pseudogen (im Gegensatz zu Amplifikaten, die mit unselektiven Primern erzeugt wurden und ausschließlich die Sequenz des Pseudogens zeigten).

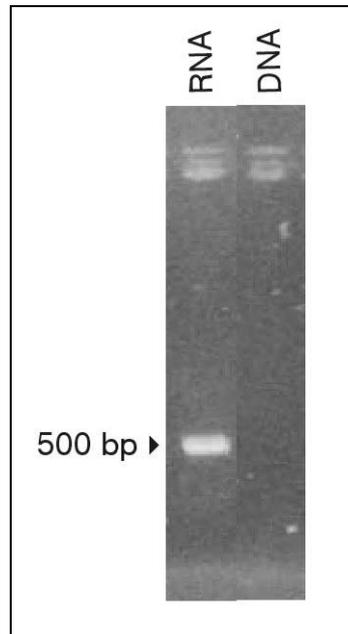


Abbildung 54: PCR mit transkript-spezifischen Primern

Nur mit der RNA-Präparation ergab sich das transkript-typische 500 bp-Fragment, während mit DNA-Präparationen kein Amplifikat zu erhalten war.

11.3.3.2. Klonierung des *PTEN*-Transkripts und Analyse der Klone

Das Amplifikat des Transkriptes zeigte ein einzelnes Signal bei einer Länge von 500 bp, was der zu erwartenden Länge des Amplifikates der Wildtyp-mRNA entspricht. Ein Nebenprodukt mit einer Größe von 415 bp, wie es bei einer Deletion des Exons 2 zu erwarten wäre, war nicht detektierbar. Auch zeigte die Sequenzierung des Amplifikates keine vom Wildtyp abweichenden oder zweifelhaften Stellen.

Wie viele Arbeiten auf dem Gebiet der Spleiß-Forschung gezeigt haben, gibt es bereits bei oder unmittelbar nach der Erstellung der mRNA aus dem Primärtranskript eine Qualitätskontrolle. Diese bewertet die Richtigkeit des gespleißten Produktes und sorgt gegebenenfalls für die schnelle Degradierung falsch gespleißter mRNA, um die Entstehung mutanter Proteine zu vermeiden. Dieser Prozeß wird als Nonsense-vermittelte RNA-Entsorgung (*Nonsense-mediated mRNA decay*, Lykke-Andersen 2001) bezeichnet, da er offenbar auf der Erkennung der vorzeitigen Stopcodons in der mRNA beruht, die durch das fehlerhafte Spleißen entstehen. Durch diesen Prozeß kommt es zu einer deutlichen Reduktion der mutierten mRNA, so daß das eigentlich zu erwartende 1:1-Verhältnis zwischen mutierter und Wildtyp-RNA bei heterozygoten Zellen nicht erreicht wird, sondern das mutierte Transkript typischerweise nur etwa zehn Prozent des Wildtyps ausmacht.

Da beide unter Punkt 11.3.2 aufgeführten Spleiß-Mutanten einen vorzeitigen Stop produzieren, könnte die Menge des Transkriptes unter der Nachweisgrenze eines Agarosegels mit Ethidiumbromidfärbung liegen. Außerdem wäre das um fünf Basenpaare kürzere Transkript neben dem 500 Basenpaar großen Wildtyp-Transkript kaum sichtbar, weshalb das PCR-Produkt kloniert wurde und einzelne Klone getrennt analysiert wurden.

Von sechzig der mittels Agarose-Gelelektrophorese analysierten Klonen war keiner sichtbar kleiner als 500 bp, während ein Klon mit einem größeren Fragment gefunden wurde (Abbildung 55). Zehn zufällig ausgewählte Klone sowie der Klon mit dem größeren Insert (Klon 7) wurden zur genaueren Analyse sequenziert.

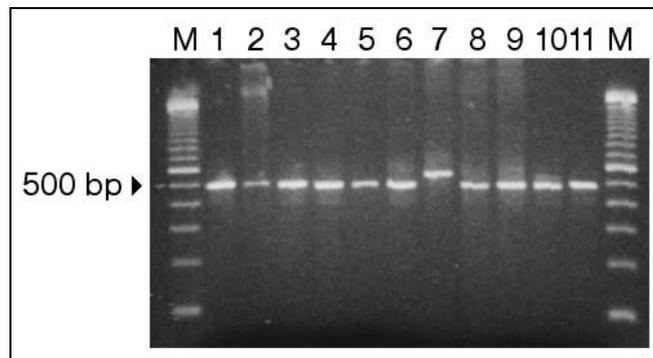


Abbildung 55: Analyse von Klonen mit dem *PTEN*-Transkript

Elf Klone, davon einer mit einer Größe von deutlich mehr als den erwarteten 500 bp, wurden einer genaueren Analyse unterworfen.

Bei der Sequenzierung zeigte sich, daß von den zehn Klonen acht die *Wildtyp*-Sequenz des *PTEN*-Transkriptes enthielten, während zwei tatsächlich die vorhergesagte 5 bp-Deletion am Übergang von Exon 2 zu Exon 3 aufwiesen, die aufgrund der Verwendung der verborgenen Spleißstelle zustande gekommen war (Abbildung 56).

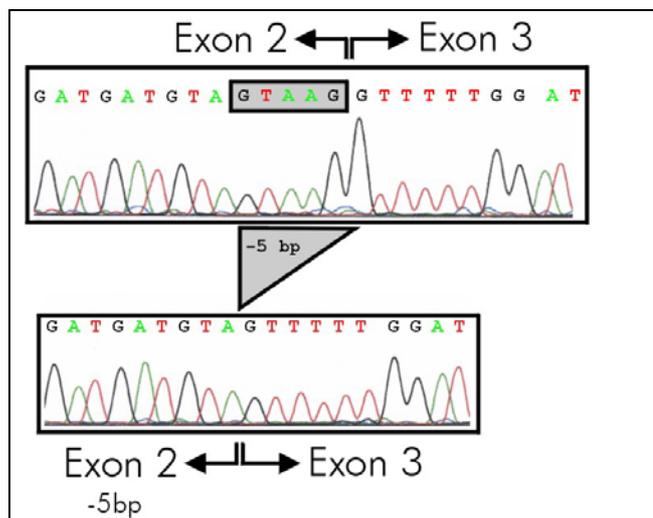


Abbildung 56: Deletion von 5 bp des Exons 2

Oben ist die Wildtyp-mRNA-Sequenz dargestellt, unten das aberrante Transkript.

Im oberen Bild ist die Wildtyp-Sequenz der mRNA im Bereich des Exon2-Exon3-Überganges zu sehen. Die am Ende des Exons 2 gelegene verborgene Spleißstelle ist grau hinterlegt. Im unteren Bild ist die mutierte mRNA-Sequenz abgebildet, bei der die fünf Basen der verborgenen Spleißstelle fehlen.

Die Analyse des Klons mit dem größeren Fragment deckte eine stark umarrangierte *PTEN*-mRNA auf, bei der zwar das Exon 2 deletiert war, aber dafür ein Teil des Introns 1 retardiert und eine neue, exonartige Sequenz ebenfalls aus dem Intron 1 eingespleißt war.

Exon 1	---> atg aca gccatcatca aagagatcgt tagcag aaacaaaagg agatatcaag aggatg gattcgactt agacttgacc t	Exon 1 (ab Startcodon gezeigt)
Intron 1 76 bp	gtatc c atttctgcgg ctgctcctct ttacct ttctgtcact ctcttagaac gtggga gtagacggat gcgaaaat [gtccg]	Das Intron wird über die eigent- liche Spleißseite retardiert
Intron 1 82 bp	[tcag] aaggag tatgggctta taatgatggt actggt cctgaagca tattttgaat gatacg gtttatattt gcacagttgc ccag [gtaat]	Exonartige Sequenz aus Intron 1
Exon 3	gttttt ggattcaaag cataaaaacc attaca agatatacaa tctttgtgct gaaaga catt---->	Exon 3

Abbildung 57: Komplexe Veränderung eines *PTEN*-Transkriptes

Gezeigt ist die Sequenz des Klons 7 der mRNA-Analyse. Grau hinterlegt und fett gedruckt ist die eigentliche Spleißstelle am Ende von Exon 1, die in diesem aberranten Transkript übergangen wurde. Grau hinterlegt und in Klammern geschrieben sind die anderen Spleißstellen, die stattdessen verwendet wurden (diese sind nicht in der Sequenz des Klones vorhanden).

11.4. Diskussion

Bei der Patientin konnte eine nicht vorbeschriebene Veränderung von *PTEN* in der Spleißakzeptorstelle des Introns 2 festgestellt werden (IVS2+1G>A). Diese Veränderung betrifft das G-Nukleotid der AG-GT-Spleißstelle, welches für die Erkennung durch das Spleißosom essentiell ist: die Veränderung führt damit obligatorisch zum Ausfall der Spleißstelle.

Es konnte gezeigt werden, daß die Zerstörung der ursprünglichen Spleißstelle zur Aktivierung einer verborgenen Spleißakzeptorstelle führt, die nur 5 bp stromaufwärts (5') gelegen ist. Das dadurch entstehende Transkript ist nur zu einem kleineren Anteil in der gesamten *PTEN*-mRNA-Population vorhanden, was auf einen Abbau dieses mutanten Transkriptes durch den *Nonsense-mediated RNA decay* hinweist. Tatsächlich führt die 5 bp-Deletion zu einem vorzeitigen Stop ab Codon 54, und vorzeitige

Stopcodons gelten als ein wesentliches, zum Abbau führendes Erkennungsmerkmal für fehlgespleißte mRNA.

Es fällt auf, daß es ausschließlich zur Verwendung der verborgenen Spleißstelle kommt und nicht zur Deletion von Exon 2. Dies läßt sich vermutlich damit erklären, daß die verborgene Spleißstelle eine Basenfolge hat, die der Originalspleißstelle sehr ähnlich ist und noch dazu unmittelbar benachbart gelegen ist.

Wenn das aberrante Transkript zur Translation kommt und ein stabiles Protein entsteht, würde diesem dennoch die notwendige Kerndomäne zur Dephosphorylierung fehlen, welche in Exon 5 lokalisiert ist. Das Protein wäre daher nicht in der Lage, seiner Funktion nachzukommen.

Die gefundene Veränderung in der genomischen Sequenz von *PTEN* führt also auf jeden Fall zu einem Ausfall des betroffenen Alleles bei der Patientin. Die dadurch entstehende Haploinsuffizienz oder ein "zweiter Treffer", also eine somatische Ausschaltung des verbliebenen gesunden Alleles in den entstehenden Tumoren, erklärt das Auftreten des Cowden-Syndromes in der betroffenen Familie. Durch die Beschreibung der Mutation ist eine genetische Diagnostik für die Angehörigen möglich.

12. Literatur

Aaltonen,L.A., Peltomaki,P., Leach,F.S., Sistonen,P., Pylkkanen,L., Mecklin,J.P., Jarvinen,H., Powell,S.M., Jen,J., Hamilton,S.R., and . (1993): *Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer*. **Science** (260), 812-816.

Acharya,S., Wilson,T., Gradia,S., Kane,M.F., Guerrette,S., Marsischky,G.T., Kolodner,R., and Fishel,R. (1996): *hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** (93), 13629-13634.

Aebi,S., Kurdi-Haidar,B., Gordon,R., Cenni,B., Zheng,H., Fink,D., Christen,R.D., Boland,C.R., Koi,M., Fishel,R., and Howell,S.B. (1996): *Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin*. **Cancer Res.** (56), 3087-3090.

Alani,E. (1996): *The Saccharomyces cerevisiae Msh2 and Msh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs*. **Mol. Cell Biol.** (16), 5604-5615.

Alani,E., Chi,N.W., and Kolodner,R. (1995): *The Saccharomyces cerevisiae Msh2 protein specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs and insertions*. **Genes Dev.** (9), 234-247.

Allen,D.J., Makhov,A., Grilley,M., Taylor,J., Thresher,R., Modrich,P., and Griffith,J.D. (1997): *MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism*. **EMBO J.** (16), 4467-4476.

Au,K.G., Welsh,K., and Modrich,P. (1992): *Initiation of methyl-directed mismatch repair*. **J. Biol. Chem.** (267), 12142-12148.

Baird,C.L., Harkins,T.T., Morris,S.K., and Lindsley,J.E. (1999): *Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** (96), 13685-13690.

Ban,C., Junop,M., and Yang,W. (1999): *Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair*. **Cell** (97), 85-97.

Ban,C. and Yang,W. (1998): *Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis*. **Cell** (95), 541-552.

Bende,S.M. and Grafstrom,R.H. (1991): *The DNA binding properties of the MutL protein isolated from Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.** (19), 1549-1555.

Bergerat,A., de Massy,B., Gadelle,D., Varoutas,P.C., Nicolas,A., and Forterre,P. (1997): *An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination*. **Nature** (386), 414-417.

Bertrand,P., Tishkoff,D.X., Filosi,N., Dasgupta,R., and Kolodner,R.D. (1998): *Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide excision repair*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** (95), 14278-14283.

Biswas,I., Ban,C., Fleming,K.G., Qin,J., Lary,J.W., Yphantis,D.A., Yang,W., and Hsieh,P. (1999): *Oligomerization of a MutS mismatch repair protein from Thermus aquaticus*. **J. Biol. Chem.** (274), 23673-23678.

- Blackwell,L.J., Bjornson,K.P., and Modrich,P. (1998b): *DNA-dependent activation of the hMutSalpha ATPase*. **J. Biol. Chem.** (273), 32049-32054.
- Blackwell,L.J., Martik,D., Bjornson,K.P., Bjornson,E.S., and Modrich,P. (1998a): *Nucleotide-promoted release of hMutSalpha from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism*. **J. Biol. Chem.** (273), 32055-32062.
- Blackwell,L.J., Wang,S., and Modrich,P. (2001): *DNA chain length dependence of formation and dynamics of hMutSalpha.hMutLalpha.heteroduplex complexes*. **J. Biol. Chem.** (276), 33233-33240.
- Bowers,J., Sokolsky,T., Quach,T., and Alani,E. (1999): *A mutation in the MSH6 subunit of the Saccharomyces cerevisiae MSH2- MSH6 complex disrupts mismatch recognition*. **J. Biol. Chem.** (274), 16115-16125.
- Bowers,J., Tran,P.T., Joshi,A., Liskay,R.M., and Alani,E. (2001): *MSH-MLH complexes formed at a DNA mismatch are disrupted by the PCNA sliding clamp*. **J. Mol. Biol.** (306), 957-968.
- Bowers,J., Tran,P.T., Liskay,R.M., and Alani,E. (2000): *Analysis of yeast MSH2-MSH6 suggests that the initiation of mismatch repair can be separated into discrete steps*. **J. Mol. Biol.** (302), 327-338.
- Chang,D.K., Ricciardiello,L., Goel,A., Chang,C.L., and Boland,C.R. (2000): *Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system*. **J. Biol. Chem.** (275), 18424-18431.
- Charbonnier,F., Martin,C., Scotte,M., Sibert,L., Moreau,V., and Frebourg,T. (1995): *Alternative splicing of MLH1 messenger RNA in human normal cells*. **Cancer Res.** (55), 1839-1841.
- Clark,A.B., Valle,F., Drotschmann,K., Gary,R.K., and Kunkel,T.A. (2000): *Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2- MSH6 and MSH2-MSH3 complexes*. **J. Biol. Chem.** (275), 36498-36501.
- Dahia,P.L., FitzGerald,M.G., Zhang,X., Marsh,D.J., Zheng,Z., Pietsch,T., von Deimling,A., Haluska,F.G., Haber,D.A., and Eng,C. (1998): *A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21*. **Oncogene** (16), 2403-2406.
- Dao,V. and Modrich,P. (1998): *Mismatch-, MutS-, MutL-, and helicase II-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex*. **J. Biol. Chem.** (273), 9202-9207.
- Dignam,J.D., Lebovitz,R.M., and Roeder,R.G. (1983): *Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei*. **Nucleic Acids Res.** (11), 1475-1489.
- Drotschmann,K., Aronshtam,A., Fritz,H.J., and Marinus,M.G. (1998): *The Escherichia coli MutL protein stimulates binding of Vsr and MutS to heteroduplex DNA*. **Nucleic Acids Res.** (26), 948-953.

- Drummond, J.T., Anthoney, A., Brown, R., and Modrich, P. (1996): *Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL α and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line.* **J. Biol. Chem.** (271), 19645-19648.
- Drummond, J.T. and Bellacosa, A. (2001): *Human DNA mismatch repair in vitro operates independently of methylation status at CpG sites.* **Nucleic Acids Res.** (29), 2234-2243.
- Duckett, D.R., Drummond, J.T., Murchie, A.I., Reardon, J.T., Sancar, A., Lilley, D.M., and Modrich, P. (1996): *Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** (93), 6443-6447.
- Dufner, P., Marra, G., Raschle, M., and Jiricny, J. (2000): *Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutS α is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit.* **J. Biol. Chem.** (275), 36550-36555.
- Dutta, R. and Inouye, M. (2000): *GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily.* **Trends Biochem. Sci.** (25), 24-28.
- Fishel, R. (1998): *Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction.* **Genes Dev.** (12), 2096-2101.
- Fishel, R., Ewel, A., and Lescoe, M.K. (1994): *Purified human MSH2 protein binds to DNA containing mismatched nucleotides.* **Cancer Res.** (54), 5539-5542.
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., and Kolodner, R. (1993): *The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer.* **Cell** (75), 1027-1038.
- Flores-Rozas, H., Clark, D., and Kolodner, R.D. (2000): *Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex.* **Nat. Genet.** (26), 375-378.
- Flores-Rozas, H. and Kolodner, R.D. (1998): *The Saccharomyces cerevisiae MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** (95), 12404-12409.
- Galio, L., Bouquet, C., and Brooks, P. (1999): *ATP hydrolysis-dependent formation of a dynamic ternary nucleoprotein complex with MutS and MutL.* **Nucleic Acids Res.** (27), 2325-2331.
- Genschel, J., Littman, S.J., Drummond, J.T., and Modrich, P. (1998): *Isolation of MutS β from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS β and MutS α .* **J. Biol. Chem.** (273), 19895-19901.
- Genuardi, M., Viel, A., Bonora, D., Capozzi, E., Bellacosa, A., Leonardi, F., Valle, R., Ventura, A., Pedroni, M., Boiocchi, M., and Neri, G. (1998): *Characterization of MLH1 and MSH2 alternative splicing and its relevance to molecular testing of colorectal cancer susceptibility.* **Hum. Genet.** (102), 15-20.
- Gradia, S., Acharya, S., and Fishel, R. (1997): *The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch.* **Cell** (91), 995-1005.

- Gradia,S., Subramanian,D., Wilson,T., Acharya,S., Makhov,A., Griffith,J., and Fishel,R. (1999): *hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA*. **Mol. Cell** (3), 255-261.
- Gu,L., Hong,Y., McCulloch,S., Watanabe,H., and Li,G.M. (1998): *ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair*. **Nucleic Acids Res.** (26), 1173-1178.
- Guarne,A., Junop,M.S., and Yang,W. (2001): *Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase*. **EMBO J.** (20), 5521-5531.
- Guerrette,S., Acharya,S., and Fishel,R. (1999): *The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer*. **J. Biol. Chem.** (274), 6336-6341.
- Guerrette,S., Wilson,T., Gradia,S., and Fishel,R. (1998): *Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. **Mol. Cell Biol.** (18), 6616-6623.
- Habraken,Y., Sung,P., Prakash,L., and Prakash,S. (1997): *Enhancement of MSH2-MSH3-mediated mismatch recognition by the yeast MLH1-PMS1 complex*. **Curr. Biol.** (7), 790-793.
- Habraken,Y., Sung,P., Prakash,L., and Prakash,S. (1998): *ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 protein complexes*. **J. Biol. Chem.** (273), 9837-9841.
- Hall,M.C. and Matson,S.W. (1999): *The Escherichia coli MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity*. **J. Biol. Chem.** (274), 1306-1312.
- Hall,M.C., Wang,H., Erie,D.A., and Kunkel,T.A. (2001): *High affinity cooperative DNA binding by the yeast Mlh1-Pms1 heterodimer*. **J. Mol. Biol.** (312), 637-647.
- Horii,A., Han,H.J., Sasaki,S., Shimada,M., and Nakamura,Y. (1994): *Cloning, characterization and chromosomal assignment of the human genes homologous to yeast PMS1, a member of mismatch repair genes*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (204), 1257-1264.
- Hutter,P., Couturier,A., Membrez,V., Joris,F., Sappino,A.P., and Chappuis,P.O. (1998): *Excess of hMLH1 germline mutations in Swiss families with hereditary non-polyposis colorectal cancer*. **Int. J. Cancer** (78), 680-684.
- Iaccarino,I., Marra,G., Dufner,P., and Jiricny,J. (2000): *Mutation in the magnesium binding site of hMSH6 disables the hMutSalpha sliding clamp from translocating along DNA*. **J. Biol. Chem.** (275), 2080-2086.
- Iaccarino,I., Marra,G., Palombo,F., and Jiricny,J. (1998): *hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutSalpha*. **EMBO J.** (17), 2677-2686.
- Iaccarino,I., Palombo,F., Drummond,J., Totty,N.F., Hsuan,J.J., Modrich,P., and Jiricny,J. (1996): *MSH6, a Saccharomyces cerevisiae protein that binds to mismatches as a heterodimer with MSH2*. **Curr. Biol.** (6), 484-486.

- Ittmann, M. (1996): *Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma*. **Cancer Res.** (56), 2143-2147.
- Jiricny, J., Su, S.S., Wood, S.G., and Modrich, P. (1988): *Mismatch-containing oligonucleotide duplexes bound by the E. coli mutS- encoded protein*. **Nucleic Acids Res.** (16), 7843-7853.
- Junop, M.S., Obmolova, G., Rausch, K., Hsieh, P., and Yang, W. (2001): *Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair*. **Mol. Cell** (7), 1-12.
- Kleczkowska, H.E., Marra, G., Lettieri, T., and Jiricny, J. (2001): *hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci*. **Genes Dev.** (15), 724-736.
- Knudson, A.G., Jr. (1985): *Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes*. **Cancer Res.** (45), 1437-1443.
- Kohonen-Corish, M., Ross, V.L., Doe, W.F., Kool, D.A., Edkins, E., Faragher, I., Wijnen, J., Khan, P.M., Macrae, F., and St John, D.J. (1996): *RNA-based mutation screening in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. **Am. J. Hum. Genet.** (59), 818-824.
- Koi, M., Umar, A., Chauhan, D.P., Cherian, S.P., Carethers, J.M., Kunkel, T.A., and Boland, C.R. (1994): *Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation*. **Cancer Res.** (54), 4308-4312.
- Lahue, R.S., Au, K.G., and Modrich, P. (1989): *DNA mismatch correction in a defined system*. **Science** (245), 160-164.
- Lamers, M.H., Perrakis, A., Enzlin, J.H., Winterwerp, H.H., de Wind, N., and Sixma, T.K. (2000): *The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch*. **Nature** (407), 711-717.
- Li, D.M. and Sun, H. (1997a): *TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta*. **Cancer Res.** (57), 2124-2129.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., and Parsons, R. (1997b): *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. **Science** (275), 1943-1947.
- Lindblom, A., Tannergard, P., Werelius, B., and Nordenskjold, M. (1993): *Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non- polyposis colon cancer*. **Nat. Genet.** (5), 279-282.
- Liu, B., Parsons, R., Papadopoulos, N., Nicolaidis, N.C., Lynch, H.T., Watson, P., Jass, J.R., Dunlop, M., Wyllie, A., Peltomaki, P., de la, C.A., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1996): *Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients*. **Nat. Med.** (2), 169-174.

- Lu,A.L., Clark,S., and Modrich,P. (1983): *Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** (80), 4639-4643.
- Lu,A.L., Welsh,K., Clark,S., Su,S.S., and Modrich,P. (1984): *Repair of DNA base-pair mismatches in extracts of Escherichia coli*. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** (49), 589-596.
- Lykke-Andersen,J. (2001): *mRNA quality control: Marking the message for life or death*. **Curr. Biol.** (11), R88-R91.
- Lynch,H.T. (1999): *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)*. **Cytogenet. Cell Genet.** (86), 130-135.
- Lynch,H.T. and de la,C.A. (1999): *Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer*. **J. Med. Genet.** (36), 801-818.
- Lynch,H.T., Shaw,M.W., Magnuson,C.W., Larsen,A.L., and Krush,A.J. (1966): *Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds*. **Arch. Intern. Med.** (117), 206-212.
- Maehama,T. and Dixon,J.E. (1998): *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. **J. Biol. Chem.** (273), 13375-13378.
- Marra,G. and Boland,C.R. (1995): *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives*. **J. Natl. Cancer Inst.** (87), 1114-1125.
- Matton,N., Simonetti,J., and Williams,K. (1999): *Inefficient in vivo repair of mismatches at an oncogenic hotspot correlated with lack of binding by mismatch repair proteins and with phase of the cell cycle*. **Carcinogenesis** (20), 1417-1424.
- Matton,N., Simonetti,J., and Williams,K. (2000): *Identification of mismatch repair protein complexes in HeLa nuclear extracts and their interaction with heteroduplex DNA*. **J. Biol. Chem.** (275), 17808-17813.
- Mechanic,L.E., Frankel,B.A., and Matson,S.W. (2000): *Escherichia coli MutL loads DNA helicase II onto DNA*. **J. Biol. Chem.** (275), 38337-38346.
- Mello,J.A., Acharya,S., Fishel,R., and Essigmann,J.M. (1996): *The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin*. **Chem. Biol.** (3), 579-589.
- Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., and Erlich,H. (1986): *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** (51 Pt 1), 263-273.
- Mushegian,A.R., Bassett,D.E., Jr., Boguski,M.S., Bork,P., and Koonin,E.V. (1997): *Positionally cloned human disease genes: patterns of evolutionary conservation and functional motifs*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** (94), 5831-5836.
- Nelen,M.R., Padberg,G.W., Peeters,E.A., Lin,A.Y., van den,H.B., Frants,R.R., Coulon,V., Goldstein,A.M., van Reen,M.M., Easton,D.F., Eeles,R.A., Hodgson,S., Mulvihill,J.J., Murday,V.A., Tucker,M.A., Mariman,E.C., Starink,T.M., Ponder,B.A.,

- Ropers,H.H., Kremer,H., Longy,M., and Eng,C. (1996): *Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23*. **Nat. Genet.** (13), 114-116.
- Nicolaides,N.C., Papadopoulos,N., Liu,B., Wei,Y.F., Carter,K.C., Ruben,S.M., Rosen,C.A., Haseltine,W.A., Fleischmann,R.D., Fraser,C.M., and . (1994): *Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer*. **Nature** (371), 75-80.
- Obmolova,G., Ban,C., Hsieh,P., and Yang,W. (2000): *Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA*. **Nature** (407), 703-710.
- Palombo,F., Gallinari,P., Iaccarino,I., Lettieri,T., Hughes,M., D'Arrigo,A., Truong,O., Hsuan,J.J., and Jiricny,J. (1995): *GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells*. **Science** (268), 1912-1914.
- Palombo,F., Iaccarino,I., Nakajima,E., Ikejima,M., Shimada,T., and Jiricny,J. (1996): *hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA*. **Curr. Biol.** (6), 1181-1184.
- Papadopoulos,N., Nicolaides,N.C., Wei,Y.F., Ruben,S.M., Carter,K.C., Rosen,C.A., Haseltine,W.A., Fleischmann,R.D., Fraser,C.M., Adams,M.D., and . (1994): *Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer* . **Science** (263), 1625-1629.
- Peltomaki,P., Aaltonen,L.A., Sistonen,P., Pylkkanen,L., Mecklin,J.P., Jarvinen,H., Green,J.S., Jass,J.R., Weber,J.L., Leach,F.S., and . (1993): *Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer*. **Science** (260), 810-812.
- Plotz, G., Raedle, J., Brieger, A., Trojan, J. und Zeuzem, S. (2002): *hMutS α forms an ATP-dependent complex with hMutL α and hMutL β on DNA*. **Nucleic Acids Res.** (30), 711-8.
- Plotz, G., Raedle, J., Brieger, A., Trojan, J. und Zeuzem, S. (2002): *N-Terminus of hMLH1 is responsible for ATP-dependent interaction of hMutS α with hMutL α and hMutL β* . Manuscript in preparation.
- Prodromou,C., Roe,S.M., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (1997): *Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone*. **Cell** (90), 65-75.
- Prolla,T.A., Baker,S.M., Harris,A.C., Tsao,J.L., Yao,X., Bronner,C.E., Zheng,B., Gordon,M., Reneker,J., Arnheim,N., Shibata,D., Bradley,A., and Liskay,R.M. (1998): *Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair*. **Nat. Genet.** (18), 276-279.
- Prolla,T.A., Pang,Q., Alani,E., Kolodner,R.D., and Liskay,R.M. (1994): *MLH1, PMS1, and MSH2 interactions during the initiation of DNA mismatch repair in yeast*. **Science** (265), 1091-1093.
- Raedle,J., Trojan,J., Brieger,A., Weber,N., Schafer,D., Plotz,G., Staib-Sebler,E., Kriener,S., Lorenz,M., and Zeuzem,S. (2001): *Bethesda guidelines: relation to microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in patients with colorectal cancer*. **Ann. Intern. Med.** (135), 566-576.

- Raschle, M., Dufner, P., Marra, G., and Jiricny, J. (2002): *Mutations within the hMLH1 and hPMS2 Subunits of the Human MutLalpha Mismatch Repair Factor Affect Its ATPase Activity, but Not Its Ability to Interact with hMutSalpha*. **J. Biol. Chem.** (277), 21810-21820.
- Raschle, M., Marra, G., Nystrom-Lahti, M., Schar, P., and Jiricny, J. (1999): *Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1*. **J. Biol. Chem.** (274), 32368-32375.
- Rodriguez-Bigas, M.A., Boland, C.R., Hamilton, S.R., Henson, D.E., Jass, J.R., Khan, P.M., Lynch, H., Perucho, M., Smyrk, T., Sobin, L., and Srivastava, S. (1997): *A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines*. **J. Natl. Cancer Inst.** (89), 1758-1762.
- Sambrook, J., Russel, W.D. (2001): *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. **Cold Spring Harbour Laboratory Press**.
- Schofield, M.J., Nayak, S., Scott, T.H., Du, C., and Hsieh, P. (2001): *Interaction of Escherichia coli MutS and MutL at a DNA mismatch*. **J. Biol. Chem.** (276), 28291-28299.
- Shapiro, M.B. and Senapathy, P. (1987): *RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression*. **Nucleic Acids Res.** (15), 7155-7174.
- Simpson, L. and Parsons, R. (2001): *PTEN: life as a tumor suppressor*. **Exp. Cell Res.** (264), 29-41.
- Sixma, T.K. (2001): *DNA mismatch repair: MutS structures bound to mismatches*. **Curr. Opin. Struct. Biol.** (11), 47-52.
- Spampinato, C. and Modrich, P. (2000): *The MutL ATPase is required for mismatch repair*. **J. Biol. Chem.** (275), 9863-9869.
- Stec, I., Nagl, S.B., van Ommen, G.J., and den Dunnen, J.T. (2000): *The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation?* **FEBS Lett.** (473), 1-5.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H., and Tavtigian, S.V. (1997): *Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers*. **Nat. Genet.** (15), 356-362.
- Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., and Petes, T.D. (1993): *Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair*. **Nature** (365), 274-276.
- Su, S.S. and Modrich, P. (1986): *Escherichia coli mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** (83), 5057-5061.
- Thibodeau, S.N., Bren, G., and Schaid, D. (1993): *Microsatellite instability in cancer of the proximal colon*. **Science** (260), 816-819.

- Tomer,G., Buermeyer,A.B., Nguyen,M.M., and Liskay,R.M. (2002): *Contribution of human mlh1 and pms2 ATPase activities to DNA mismatch repair. J. Biol. Chem.* (277), 21801-21809.
- Treffers,H.P., Spinelli,V., and Belser,N.O. (1954): *A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (40), 1064-1071.
- Trojan,J., Zeuzem,S., Randolph,A., Hemmerle,C., Brieger,A., Raedle,J., Plotz,G., Jiricny,J., and Marra,G. (2002): *Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. Gastroenterology* (122), 211-219.
- Umar,A., Buermeyer,A.B., Simon,J.A., Thomas,D.C., Clark,A.B., Liskay,R.M., and Kunkel,T.A. (1996): *Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. Cell* (87), 65-73.
- Umar,A., Risinger,J.I., Glaab,W.E., Tindall,K.R., Barrett,J.C., and Kunkel,T.A. (1998): *Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. Genetics* (148), 1637-1646.
- Vasen,H.F., Mecklin,J.P., Khan,P.M., and Lynch,H.T. (1991): *The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). Dis. Colon Rectum* (34), 424-425.
- Wang,Y., Cortez,D., Yazdi,P., Neff,N., Elledge,S.J., and Qin,J. (2000): *BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. Genes Dev.* (14), 927-939.
- Warbrick,E. (2000): *The puzzle of PCNA's many partners. Bioessays* (22), 997-1006.
- Warthin,A.S. (1913): *Heredity with reference to carcinoma. Arch. Intern. Med.* (12), 546-555.
- Welsh,K.M., Lu,A.L., Clark,S., and Modrich,P. (1987): *Isolation and characterization of the Escherichia coli mutH gene product. J. Biol. Chem.* (262), 15624-15629.
- Yamaguchi,M., Dao,V., and Modrich,P. (1998): *MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. J. Biol. Chem.* (273), 9197-9201.

13. Anhang

13.1. Abkürzungen

A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymidin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatöse Polyposis coli
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparagin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy-DNA
CFS	<i>Cancer family syndrome</i>
Cys	Cystein
ddNTP	2', 3'-Dideoxy-Nucleosid-5'Triphosphate
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds DNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Kälberserum
G-418	Geneticin
Glu	Glutamin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
hMutL	humanes Heterodimer aus hMLH1 und hPMS1 oder hPMS2
hMutL β	humanes Heterodimer, bestehend aus hMLH1/hMLH3
hMutL α	humanes Heterodimer, bestehend aus hMLH1/hPMS2
hMutS α	humanes Heterodimer, bestehend aus hMSH2/hMSH6
hMutS β	humanes Heterodimer, bestehend aus hMSH2/hMSH3
HNPCC	<i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> / Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
IDL	<i>Insertion/deletion loop</i> (Insertions-Deletions-Schleife)
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> / Allelverlust
Met	Methionin
min	Minute
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI+	mikrosatelliteninstabil
NaOH	Natriumhydroxid

Neo	Neomycin
OD	Optische Dichte
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance of Man</i> , siehe 7.2.1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Database</i>
PMS1/PMS2	<i>Post meiotic segregation protein 1 / 2</i>
RER+	<i>Replication error positive</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
Rt	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galaktosid

13.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung von Insertions-Deletions-Schleifen (IDL)	13
Abbildung 2: Das Translocation model und das Sliding clamp model	20
Abbildung 3: Das <i>DNA bending model</i>	22
Abbildung 4: Genereller Aufbau von MutS-Proteinen	23
Abbildung 5: Die Domänen eines MutS-Monomers in der Kristallstruktur	23
Abbildung 6: An eine fehlerhafte DNA-Oligoduplex gebundenes MutS-Dimer	24
Abbildung 7: Bindung einer extrahelikalen Base durch MutS	25
Abbildung 8: Struktur der MutL-Proteine	27
Abbildung 9: Röntgenkristallstruktur des N-terminalen Teils von hPMS2	29
Abbildung 10: Postulierter ATPase-Zyklus für MutL	30
Abbildung 11: Mögliche Zustände eines ternären Komplexes aus MutS α , DNA und MutL α	32
Abbildung 12: Teilsequenz des HRAS-Gens	38
Abbildung 13: Aufbau des Topo-TA-Cloning Vektors pCR 2.1	40
Abbildung 14: Aufbau der eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNA3.1 und pSG5	40
Abbildung 15: Familienstammbaum der Patientin mit Verdacht auf das Cowden- Syndrom	42
Abbildung 16: Sequenzkontrolle der ATPase-Mutanten von hMLH1 und hPMS2	57
Abbildung 17: Größenkontrolle der Fragmente der hMLH1-cDNA	57
Abbildung 18: Western Blot der MMR-Proteine von Kernextrakten der verwendeten Zelllinien	62
Abbildung 19: Cytoplasmatische und Kernextrakte von LoVo- und HeLa-Zellen	63
Abbildung 20: Bindungseffizienz biotinylierter Oligoduplices an Dynabeads Streptavidin	65

Abbildung 21: hMutS α -Bindung an Homoduplex- und Heteroduplex-DNA	66
Abbildung 22: Bindung von hMutS-Proteinen an DNA und Einfluß von Nucleotiden. 67	
Abbildung 23: Bindung von hMutL α an DNA und Reaktion auf Nukleotide	68
Abbildung 24: Sequentielle Elution von hMutS α mit steigender Salzkonzentration	68
Abbildung 25: Reaktion des Elutionsverhaltens von hMutS α auf 250 μ M ATP	69
Abbildung 26: Nötige ATP-Konzentration zur hMutS α -Reaktion.....	70
Abbildung 27: Effekt von ATP auf hMutS α -Mismatch-Bindung	71
Abbildung 28: Bindung von hMutL α und hMutL β an längere DNA-Substrate	72
Abbildung 29: hMutL α -Bindung an 81mer und 200mer Homoduplex-DNA.....	72
Abbildung 30: HCT-116-Extrakte machen hMLH1 aus LoVo- und Hec59-Zellextrakten für ATP empfindlich.	73
Abbildung 31: Reines hMutS α macht LoVo-hMLH1 wieder für ATP empfindlich.....	74
Abbildung 32: Genauere Charakterisierung der hMutS α -hMutL α -Interaktion	74
Abbildung 33: Bindungsexperiment mit TK6- und MT1-Extrakten	75
Abbildung 34: Zeitreihe der Reaktion von hMutS α und hMutL α nach ATP-Zugabe ...	76
Abbildung 35: ATP-Konzentrationsreihe der hMutL-Bindung	77
Abbildung 36: Notwendigkeit der ATP-Hydrolyse für die hMutS α -hMutL-Interaktion	78
Abbildung 37: Brauchbarkeit von 293-Extrakten im Bindungsexperiment.....	79
Abbildung 38: Bindung von hMutL α und hMutL β	81
Abbildung 39: Expression der ATPase Mutanten in 293T-Zellen.....	82
Abbildung 40: Interaktion der hMutL α -ATPase-Mutanten mit hMutS α	83
Abbildung 41: Expression von hMutL-Monomeren in 293T	84
Abbildung 42: Interaktion von hMLH1, hPMS2 und hPMS1 mit hMutS α	85
Abbildung 43: Expression der hMLH1-Fragmente	86
Abbildung 44: Expression von hMutL α Δ 9/10.....	87
Abbildung 45: Bindung von MLH1-Fragmenten und hPMS2.....	88
Abbildung 46: Bindung der Deletionsvariante hMutL α hMLH1 Δ 9/10	88
Abbildung 47: Übersicht über die hMLH1-Konstrukte zur Interaktionszonensuche	92
Abbildung 48: Erweitertes <i>DNA bending model</i> der MMR-Initiation.....	95
Abbildung 49: Mutationsverteilung von Cowden- und Bannayan-Zonana-Syndrom im PTEN-Gen.....	98
Abbildung 50: Zelluläre Funktion des PTEN-Proteins	99
Abbildung 51: Sequenz der gDNA von <i>PTEN</i> an der Spleißstelle Exon 2 / Intron 2... 100	
Abbildung 52: Alternative Spleißstellen in <i>PTEN</i> im Bereich des Exons 2	101
Abbildung 53: Vergleich von <i>PTEN</i> mit dem <i>PTEN</i> -Pseudogen	102
Abbildung 54: PCR mit transkript-spezifischen Primern	103
Abbildung 55: Analyse von Klonen mit dem PTEN-Transkript.....	104
Abbildung 56: Deletion von 5 bp des Exons 2.....	104
Abbildung 57: Komplexe Veränderung eines PTEN-Transkriptes.....	105

13.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Amsterdam-Kriterien Zur Identifizierung von HNPCC-verdächtigen Familien anhand klinischer Kriterien.	15
Tabelle 2: Bisher identifizierte Mismatch-Reparaturgene beim Menschen.....	16
Tabelle 3: Einzelschritte der Mismatch-Reparatur.....	17
Tabelle 4: Substratspezifitäten der MutS-Proteine.....	26
Tabelle 5: Standard-Pipettierschema einer PCR	50
Tabelle 6: Pipettierschema für eine reverse Transkription.....	51
Tabelle 7: Inkubationsbedingungen bei den Proteinbindungsversuchen	58

Tabelle 8: Pipettierschema für die Proteinbindungsversuche..... 59

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien mit Herkunft und MMR-Status..... 62

13.4. Lebenslauf

Guido Plotz

- 06.07.1973 Geboren in Kronberg/Taunus
- 1980-84 Besuch der Zentgrafenschule in Frankfurt/Seckbach
- 1984-93 Besuch der Musterschule in Frankfurt, Abschluß: Abitur
- 1993-94 Zivildienst im St. Katharinenkrankenhaus, Frankfurt
- 1994-98 Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt. Abschluß: Staatsexamen
- 1998-99 Praktisches Jahr bei der STADA AG, Bad Vilbel, und in der Eichwald-
Apotheke, Frankfurt. Abschluß: Staatsexamen und Approbation
- 2000-2002 Promotion bei Professor Dr. Zeuzem, AG HNPCC, in der Medizinischen
Klinik II des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt.

„Research is what I'm doing when I don't know what I'm doing.“ - Werner von Braun