

Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jörg Schipper

Retrovirale Komplementation durch *RAD51C*
– ein Kandidatengen aus dem *FA/BRCA-Pathway*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Verena Friemann
2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. Hanenberg

Korreferent: Prof. Dr. Gattermann

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V et al.
Mutation of the *RAD51C* gene in a Fanconi anemia-like disorder.
Nat Genet. 2010;42:406-409.

Inhalt

1. Einleitung 1

1.1. Einleitung Fanconi-Anämie 1

1.2. Historisches 1

1.3. Klinik der Fanconi-Anämie 2

1.4. Ätiologie/ Molekularpathologie der Fanconi-Anämie 3

 1.4.1. DNA-Instabilität 3

 1.4.2. Zellzyklus 4

 1.4.2.1. Darstellung des Zellzyklus in der Durchflusszytometrie 5

 1.4.2.2. G₂/ M-Arrest 6

1.5. Genetik 6

 1.5.1. FA-Gene und Proteine 6

 1.5.2. Der *FA/BRCA-Pathway* 7

 1.5.3. Fanconi-Anämie und DNA-Reparatur 10

 1.5.3.1. Homologe Rekombination 11

 1.5.3.2. Entstehung von *Interstrand Crosslinks* 14

 1.5.3.3. ICL-Reparatur 14

 1.5.3.4. Fanconi-Anämie und Bloom-Syndrom 16

 1.5.4. Kandidatengene 16

1.6. Epidemiologie 17

1.7. Fanconi-Anämie-Diagnostik 17

 1.7.1. Retrovirale Komplementationsanalyse 17

 1.7.2. Western-Blot 19

1.8. Mosaikbildung 19

1.9. Genotyp-Phänotyp-Korrelation 20

1.10. Therapie der Fanconi-Anämie 20

1.11. Aufgabenstellung 22

2. Material und Methoden 23

2.1. Material 23

 2.1.1. Chemikalien 23

 2.1.2. Lösungen und Puffer 23

 2.1.3. Antibiotika/ Zytostatika 25

 2.1.4. Sonstiges 25

 2.1.5. Plasmide 25

 2.1.5.1. In dieser Arbeit verwendete Plasmide 25

2.1.5.2.	In dieser Arbeit klonierte Plasmide.....	26
2.1.6.	Nukleinsäuren und Oligonukleotide.....	27
2.1.6.1.	Größen- und Molekulargewichtsstandards.....	27
2.1.6.2.	Oligonukleotide für Sequenzierungen.....	27
2.1.7.	Kits.....	28
2.1.8.	Antikörper.....	28
2.1.8.1.	Primärer Antikörper.....	28
2.1.8.2.	Sekundärer Antikörper.....	28
2.1.9.	Zellen.....	28
2.1.9.1.	Adhärent wachsende Zelllinien.....	28
2.1.9.2.	Primäre Zellen.....	29
2.2.	Methoden.....	30
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.1.1.	Restriktionsverdau.....	30
2.2.1.2.	Agarosegelelektrophorese.....	30
2.2.1.3.	DNA-Elution aus Agarosegelen und Aufreinigung.....	30
2.2.1.4.	Ligation.....	31
2.2.1.5.	Transformation von Bakterien.....	31
2.2.1.6.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	31
2.2.1.7.	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	32
2.2.1.8.	PCR und Sequenzierung.....	32
2.2.1.9.	Western-Blot.....	32
2.2.2.	Zellkultur.....	33
2.2.2.1.	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	33
2.2.2.2.	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	33
2.2.2.3.	Transiente Herstellung retrovirushaltiger Überstände.....	34
2.2.2.4.	Erzeugung virushaltiger Überstände mit stabilen Produzentenzelllinien.....	34
2.2.2.5.	Infektion und Selektion.....	35
2.2.2.6.	Behandlung der Zellen mit Mitomycin C.....	37
3.	Ergebnisse.....	39
3.1.	Klonierungen.....	39
3.2.	Titerbestimmung.....	41
3.3.	Retrovirale Komplementationsanalysen.....	42
3.4.	Problematik ABRAXAS.....	47
3.4.1.	Zellwachstum nach Transduktion.....	47
3.4.2.	Proteinexpression.....	47

3.5. Patient Nr. 8	49
3.5.1. Survival-Test.....	52
3.5.2. Retrovirale Komplementationsanalyse in IRS-3 Zellen	53
4. Diskussion	55
4.1. Komplementationsanalysen	55
4.2. Die Kandidatengene	59
4.2.1. Die mit <i>BRCA1</i> interagierenden Gene <i>RAP80</i> und <i>ABRAXAS</i>	59
4.2.2. Die RAD51 Paraloge	60
4.2.3. <i>RAD51C</i> als neuer FA-Subtyp.....	63
4.3. Fanconi-Anämie und die Entwicklung von Malignomen	64
5. Ausblick	68
6. Zusammenfassung	69
7. Literatur	70
8. Anhang	83
8.1. Abkürzungsverzeichnis	83
8.2. Abbildungsverzeichnis	85
8.3. Tabellenverzeichnis	85

1. Einleitung

1.1. Einleitung Fanconi-Anämie

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine seltene autosomal und x-chromosomal rezessive Erkrankung, die genetisch und klinisch sehr heterogen ist. Klinisch wird sie durch eine Trias aus kongenitalen Fehlbildungen, einem progressiven Versagen des Knochenmarks und einer erhöhten Inzidenz an Malignomen charakterisiert. Zellulär zeigen sich eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit und eine Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen. Molekulargenetisch sind bis zu Beginn dieser Arbeit 13 Komplementationsgruppen, die jeweils nach dem defekten Gen benannt sind (FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -M, und -N) und aus Keimzellmutationen in den korrespondierenden Genen hervorgehen, bekannt.

1.2. Historisches

Im Jahre 1927 beschrieb Guido Fanconi (1889-1979), ein Schweizer Kinderarzt, seine klinischen Beobachtungen bei 3 Brüdern einer Familie mit 5 Kindern¹⁻³. Die drei Brüder litten unter einer „perniciosaartigen Anämie“ und wiesen verschiedene Anomalien auf^{4,5}. 1931 schlug Otto Nägeli den Namen „Fanconi-Anämie“ für diese Erkrankung vor. Seitdem wurden bis 2001 über 1300 Fälle beschrieben⁶. Bei zwei betroffenen Brüdern stellten Forscher der Universität Heidelberg im Jahre 1964 eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit in Zellen von FA-Patienten fest⁷. Spätere Untersuchungen ergaben, dass die FA außerdem mit einer erhöhten Rate an induzierten Chromosomenaberrationen durch DNA-quervernetzende Agenzien assoziiert ist⁸. Zwei wichtige Meilensteine waren die Entdeckung des Zusammenhangs zwischen FA und dem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) und anderen Tumoren^{9,10}, sowie die Auswertung einer großen Sammlung von Stammbäumen der Familien von Patienten mit FA, die darauf hinwies, dass eine autosomal-rezessive Vererbung mit einer hohen Variabilität an klinischen Bildern vorliegt¹¹.

1982 wurde an der Rockefeller University das IFAR (International Fanconi Anemia Registry) gegründet, in dem klinische und genetische Informationen sowie biologisches Material von FA-Patienten gesammelt werden. Darüber hinaus besitzen viele Länder eigenständige Elterninitiativen.

1.3. Klinik der Fanconi-Anämie

Angeborene Anomalien, die alle Organsysteme betreffen können, gehören zu den klinischen Manifestationen der FA und treten in zwei Drittel der Fälle auf. Zu den häufigsten Fehlbildungen gehören Veränderungen des Skelettsystems, bei denen vor allem der radiäre Strang betroffen ist. So kommt es zu Hypo- oder Aplasie der Daumen mit konsekutiver Funktionseinschränkung (siehe auch Abbildung 1). In vielen Fällen ist die einzige angeborene Veränderung eine Pigmentstörung der Haut im Sinne von Café-au-lait-Flecken, einer generalisierten Hyperpigmentierung oder einzelnen hypopigmentierten Stellen^{12,13}. Die häufig zu beobachtende Wachstumsretardierung zeigt sich sowohl prä- als auch postnatal. Die mediane Größe von FA-Patienten liegt um die 5. Perzentile, was zumindest bei einem Teil der Patienten auf einen Mangel an Wachstumshormonen zurückzuführen ist¹⁴.

Tabelle 1: Häufigkeit von kongenitalen Dysplasien bzw. Auffälligkeiten bei FA

FA-Patienten können kongenitale Dysplasien an nahezu jedem Organsystem aufweisen. Bei einigen Patienten liegen mehrere Auffälligkeiten gleichzeitig vor, andere sind klinisch komplett unauffällig. Nach Tischkowitz et al.¹⁵.

Fehlbildungen/ Auffälligkeiten	Häufigkeit (%)
Skelett (radiärer Strang, Hüfte, Skoliose, Rippen)	71
Haut (Café-au-lait-Flecken, Hypo-/Hyperpigmentierung)	64
Wachstumsretardierung	63
Augen (Mikroophthalmie)	38
Niere und Harntrakt	34
Männliches Genital	20
Mentale Retardierung	16
Gastrointestinal (Anal-/ Duodealatresie)	14
Herz	13
Akustisches System	11
Zentrales Nervensystem (z.B. Hydrozephalus)	8
Keine Fehlbildungen	30

Charakteristisch für die FA sind außerdem hämatologische Manifestationen, in deren Mittelpunkt das progrediente Knochenmarkversagen steht. Dabei können alle 3 Zellreihen in unterschiedlichem Ausmaß und in unterschiedlicher Reihenfolge betroffen sein. Ein erhöhtes mittleres korpuskuläres Volumen der Erythrozyten (MCV) kann ein erster Hinweis auf die Erkrankung FA sein. Bei 50 % der Patienten werden erste hämatologische Auffälligkeiten im Alter von 7,6 Jahren festgestellt¹⁶, wobei klinisch vor allem das gehäufte Auftreten von Hämatomen und Petechien, rezidivierenden bakteriellen Infekten, sowie Leistungsminderung und Abgeschlagenheit im Rahmen der Anämie im Vordergrund

stehen. Die kumulative Inzidenz für die Entwicklung eines Knochenmarkversagens beträgt 90% im Alter von 40 Jahren ¹⁰.

In einer Untersuchung von 75 FA-Patienten zeigte sich, dass das Risiko, eine akute myeloische Leukämie (AML) oder ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS) zu entwickeln, bei FA-Patienten im Alter von 40 Jahren bei 52% liegt ¹⁷. Hämatologische Tumore machen insgesamt 60% aller Tumoren bei FA-Patienten aus.

Die meisten nicht-hämatologischen Tumore sind Plattenepithelkarzinome des oberen aerodigestiven und des anogenitalen Traktes ^{6,18}, wobei bei FA-Patienten eine 500- bis 700-fach höhere Inzidenz für Kopf-/ Halstumore im Vergleich zur Normalbevölkerung beobachtet wird ^{10,19}.

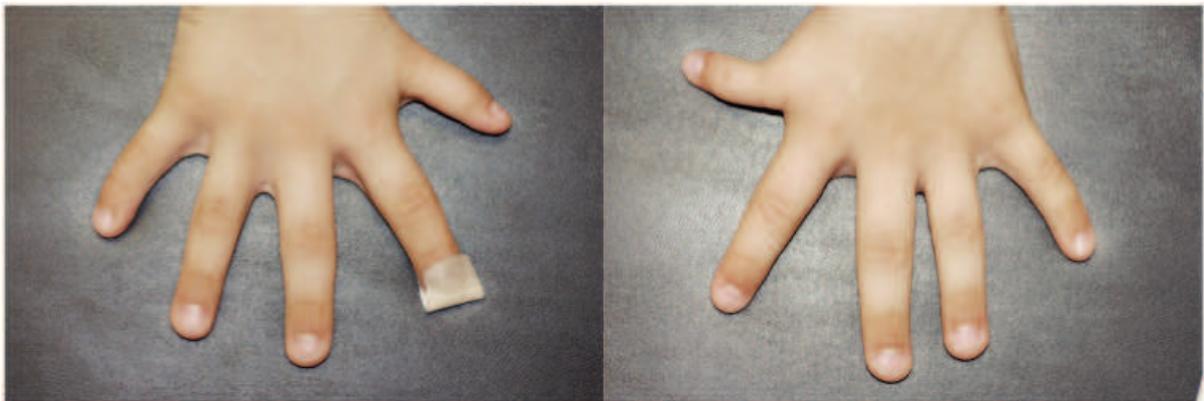


Abb. 1: Daumenfehlbildung bei FA

Rechte und linke Hand eines Jungen mit FA, Komplementationsgruppe A. Hypoplasie der Daumen. Mit freundlicher Genehmigung der Eltern.

1.4. Ätiologie/ Molekularpathologie der Fanconi-Anämie

1.4.1. DNA-Instabilität

Schon Guido Fanconi vermutete eine genetische Ursache hinter dem Krankheitsbild, das er bei drei Brüdern einer Familie beschrieb ^{1,3}. Seine Annahme, dass numerische Aberrationen für die Krankheit verantwortlich sind, bestätigte sich jedoch nicht. Vielmehr stellte sich heraus, dass ein veränderter zellulärer Phänotyp der FA zugrunde liegt ⁷⁻⁹. Schröder et al. beschrieben 1964 bei kultivierten Lymphozyten eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit. Dabei kommt es zur Ausbildung von Tetrameren, Quadrimeren und anderen Reunionsfiguren, die bei der fehlerhaften Reparatur von Doppelstrangbrüchen entstehen ⁷.

Diese Eigenschaft zeigte sich in weiteren Studien als nicht reproduzierbar. Die Induktion von Chromosomenbrüchen durch Exposition mit DNA-quervernetzenden Substanzen wie

Mitomycin C (MMC) und Diepoxybutan (DEB) erwies sich jedoch als zuverlässiger diagnostischer Test^{20,21}.

Neben der erhöhten Chromosomeninstabilität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen zeigen FA-Zellen Auffälligkeiten im Zellzyklusverhalten^{22,23}. Es kommt zum Arrest der Zellen in der G₂-Phase, was als Resultat der mangelnden Reparatur von DNA-Schäden in der S-Phase interpretiert wird²⁴. In hämatopoetischen Stammzellen bei FA-Patienten ist außerdem eine erhöhte Apoptoserate nachweisbar²⁵. Im Zusammenhang mit der erhöhten Chromosomeninstabilität und der damit verbundenen vermehrten Proliferation wird eine schnellere Telomerverkürzung diskutiert^{26,27}.

1.4.2. Zellzyklus

In Abbildung 2 sind beispielhaft die 4 Phasen des Zellzyklus dargestellt. Die G₁-Phase ist durch Zellwachstum und die Synthese von Proteinen, die für die DNA-Synthese notwendig sind, charakterisiert. Vor Ende der G₁-Phase wird die Größe der Zelle, die Integrität der DNA und die Verfügbarkeit von Substraten für die Protein- und Nukleinsäuresynthese kontrolliert. In der S-Phase erfolgt die DNA-Replikation. Der Kontrollpunkt am Übergang von der G₂- zur M-Phase gewährleistet vor allem die genomische Integrität. Verfügt die Zelle zu diesem Zeitpunkt über DNA-Schäden, so wird der Zellzyklus in der G₂-Phase angehalten und der Schaden zunächst repariert. Ist der Schaden zu groß oder kann er aus anderen Gründen nicht repariert werden, leitet die Zelle den programmierten Zelltod, die Apoptose, ein. Reguliert wird der Zellzyklus durch verschiedene Cycline, cyclinabhängige Kinasen und diverse intrazelluläre und intranukleäre Signalkaskaden²⁸.

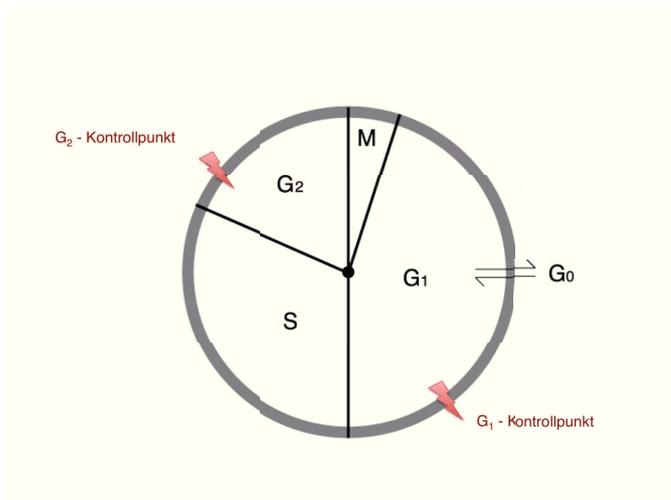


Abb. 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus

Nach jeder Zellteilung (Mitose) geht die Zelle entweder in die G₀-Phase (ruhender Zustand) oder in die G₁-Phase über. Die Dauer der G₀-Phase kann bei verschiedenen Zellarten unterschiedlich lang sein und wird durch An- oder Abwesenheit von Wachstumsfaktoren beeinflusst. Auch die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen variiert je nach Zellart und Umgebungsfaktoren. Modifiziert nach Löffler et al.²⁹.

Betrachtet man den DNA-Gehalt der Zelle, so liegt in der G_0 - und G_1 -Phase ein diploider Chromosomensatz ($2n\ 2C$) vor. In der S-Phase wird die DNA verdoppelt, sodass die Zelle in der G_2 -Phase einen diploiden Chromosomensatz mit verdoppeltem DNA-Gehalt ($2n\ 4C$) enthält.

1.4.2.1. Darstellung des Zellzyklus in der Durchflusszytometrie

Die meisten Zellen befinden sich in der G_1/G_0 -Phase und nur wenige in der G_2/M - und S-Phase. Dies liegt daran, dass die G_2/M -Phase zeitlich gesehen kürzer als die G_1/G_0 -Phase ist und sich nicht alle Zellen ständig teilen, sodass mehr Zellen in der G_1/G_0 -Phase detektiert werden. Werden Zellen von FA-Patienten mit einer DNA-quervernetzenden Substanz wie MMC inkubiert, kommt es zum Arrest der Zellen in der G_2 -Phase. Dieses Phänomen ist in Abbildung 3B dargestellt. Vor der durchflusszytometrischen Messung werden die Zellen mit Propidiumiodid (PI), einer Substanz, die sich zwischen die DNA-Stränge einlagert, gefärbt.

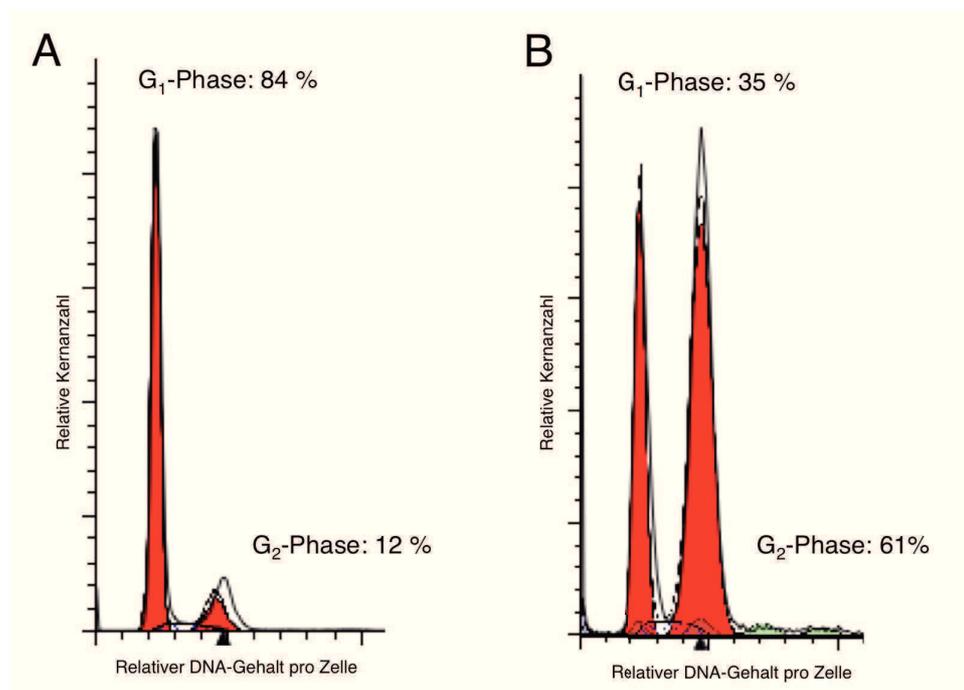


Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus

Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung des DNA-Gehaltes von menschlichen Hautfibroblasten nach Exposition mit MMC und Propidiumiodid-Färbung (PI-Färbung), sowie anschließender Bearbeitung mit dem Programm ModFit LTTM. A: gesunde Zellen nach MMC-Exposition. Es befinden sich deutlich mehr Zellen in der G_0/G_1 - als in der G_2/M -Phase. B: Zellen eines FA-Patienten nach MMC-Exposition. Durch die Hypersensitivität gegenüber MMC und dem damit verbundenen Arrest in der G_2/M -Phase befinden sich hier mehr Zellen in der G_2/M - als in der G_0/G_1 -Phase. Bei der grün markierte Fläche in Abbildung B handelt es sich um in der Durchflusszytometrie detektierte Zelltrümmer.

1.4.2.2. G₂/ M-Arrest

Der G₂/M-Arrest wird durch Doppelstrangbrüche der DNA induziert³⁰. Werden Zellen eines Normalprobanden mit geringen Dosen einer DNA-quervernetzenden Substanz, wie MMC, Cisplatin oder DEB behandelt, so können diese aufgrund ihres intakten DNA-Reparatursystems den Schaden während der G₂-Phase reparieren und die Zellen treten in die Mitose über ohne einen Schaden an ihre Tochtergeneration weiterzugeben. Bei entsprechend hohen Dosen können allerdings auch normale Zellen so stark geschädigt werden, dass sie im G₂/M-Arrest verharren. FA-Zellen hingegen arretieren schon bei geringen Konzentrationen dieser Agenzien in der G₂-Phase²⁴. Ursache hierfür sind funktionell relevante Gendefekte, der am DNA-Reparaturmechanismus beteiligten Gene, in FA-Zellen.

1.5. Genetik

1.5.1. FA-Gene und Proteine

Bis zu Beginn dieser Arbeit waren 13 FA-Gene bekannt, die über das gesamte menschliche Genom verteilt sind und erheblich in Größe und Struktur variieren. Bis auf *FANCB*, das auf dem X-Chromosom liegt, sind alle FA-Gene auf autosomalen Chromosomen zu finden³¹. Einige FA-Gene sind hoch konserviert und haben Orthologe in niedrigeren Organismen, wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* und *Saccharomyces*³², andere haben ihren Ursprung in jüngerer Zeit. Die folgende Tabelle soll vorab einen Überblick über die FA-Gene und die Position der zugehörigen Proteine im *FA/BRCA-Pathway* geben:

Tabelle 2: FA-Gene. Platzierung und Funktion im *FA/BRCA-Pathway*

Übersicht über die bis Ende 2010 bekannten FA-Gene und ihre Platzierung und Funktion in *FA/BRCA-Pathway*. Modifiziert nach Taniguchi et al.³¹.

	Defektes Gen	Lokalisation	Frequenz in FA (%)	<i>FA/BRCA-Pathway</i>	Ref.
FA-A	<i>FANCA</i>	16q24.3	66	FA-Kernkomplex	33,34
FA-B	<i>FANCB</i>	Xp22.31	< 1	FA-Kernkomplex	35,36
FA-C	<i>FANCC</i>	9q22.3	15	FA-Kernkomplex	37-39
FA-D1	<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12-13	4	RAD51-Rekrutierung	39,40
FA-D2	<i>FANCD2</i>	3p25.3	3	monoubiquitiniertes Protein	41
FA-E	<i>FANCE</i>	6p21-22	1	FA-Kernkomplex	42-44
FA-F	<i>FANCF</i>	11p15	2	FA-Kernkomplex	45,46
FA-G	<i>FANCG/XRCC9</i>	9p13	9	FA-Kernkomplex	47,48
FA-I	<i>FANCI/ KIAA1794</i>	15q25-26	< 1	monoubiquitiniertes Protein	49,50
FA-J	<i>FANCI/BRIP1</i>	17q22-q24	1,6	5'-3' DNA-Helikase/ ATPase	51,52
FA-L	<i>FANCL/PHF9/POG</i>	2p16.1	< 1	FA-Kernkomplex, Ubiquitin-Ligase	53
FA-M	<i>FANCM/hef</i>	14q21.3	1 Patient	FA-Kernkomplex, ATPase	54
FA-N	<i>FANCN/PALB2</i>	16p12	selten	Regulierung der BRCA2-Lokalisation	55,56

1.5.2. Der FA/BRCA-Pathway

Da alle Zellen von FA-Patienten, unabhängig von ihrer Komplementationsgruppe, die gleichen zellulären Auffälligkeiten aufweisen, geht man davon aus, dass alle FA-Proteine in einem gemeinsamen DNA-Reparaturweg, dem *FA-Pathway*, untereinander und mit anderen Proteinen interagieren. Aufgrund der Interaktion mit den Brustkrebsgenen *BRCA1* und *BRCA2* wird der *FA-Pathway* auch als *FA/BRCA-Pathway* oder *FA/BRCA-Network* bezeichnet^{57,58}. FA-Proteine, die dem Kernkomplex angehören, werden auch als *upstream-Proteine*, FA-Proteine, deren Funktion nach der FANCD2-/FANCI-Monoubiquitinierung liegt, werden als *downstream-Proteine*, bezeichnet.

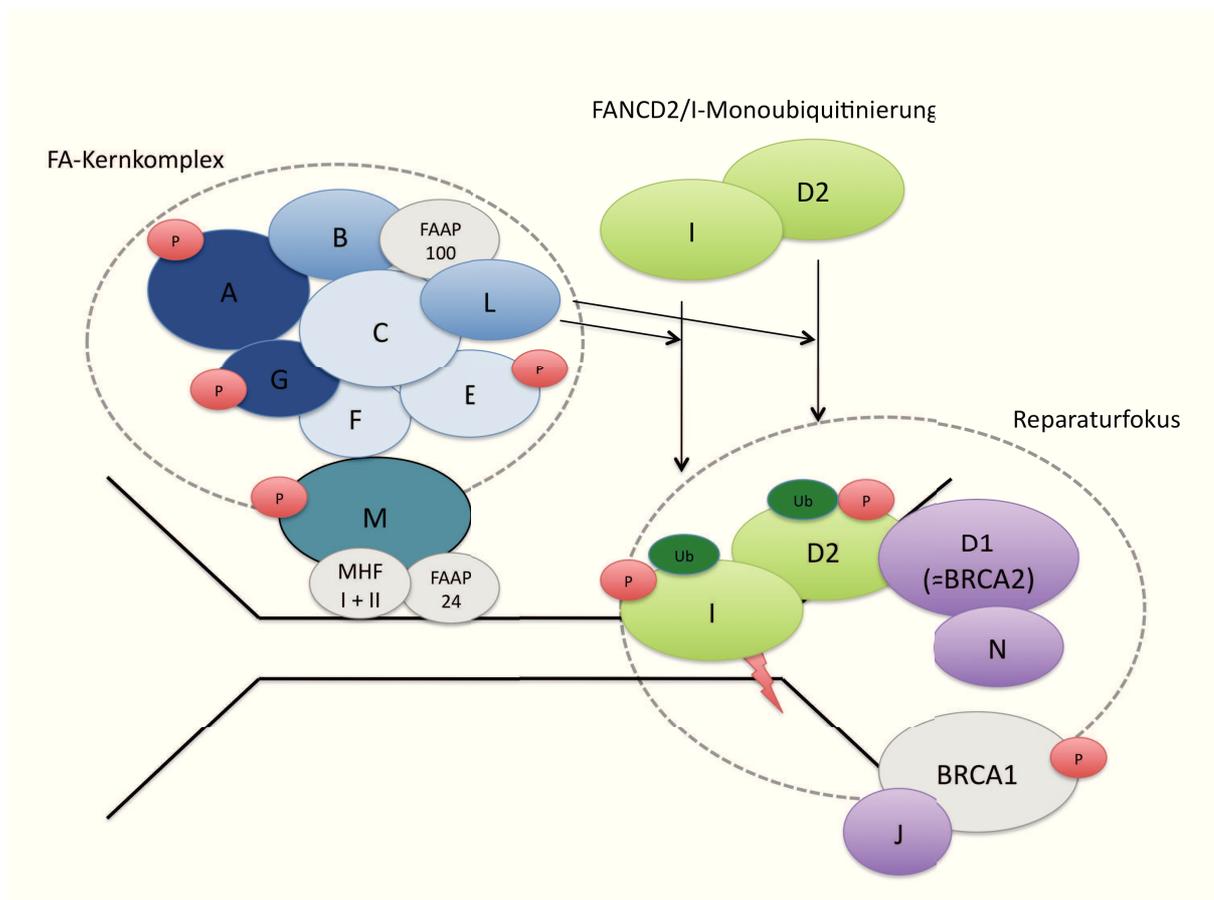


Abb. 4: Interaktion der bisher bekannten FA-Proteine

FA/BRCA-Pathway mit den bis zu Beginn dieser Arbeit bekannten FA-Proteinen. Die Proteine des *FA/BRCA-Pathway* lassen sich unter Berücksichtigung des aktuellen Forschungsstandes grob in 3 Gruppen unterteilen: 1. Der FA-Kernkomplex, in blau dargestellt, 2. Die FANCD2/FANCI-Monoubiquitinierung, in grün dargestellt und 3. der eigentliche Reparaturfokus an der beschädigten DNA, in lila dargestellt. Viele weitere Proteine, wie zum Beispiel die hier grau dargestellten, interagieren mit den FA-Proteinen und qualifizieren sich damit als mögliche FA-Kandidatengene, sind bisher aber nicht als FA-Gene definiert. Modifiziert nach Kee und D'Andrea⁵⁹.

Die *upstream* FA-Proteine FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L und -M bilden den FA-Kernkomplex⁶⁰, der für die Monoubiquitinierung der Proteine FANCD2 und FANCI erforderlich ist. Zum FA-Kernkomplex gehören außerdem vier weitere Peptide, die FANCM-assozierten *Histone Fold Proteins* I und II (MHF I und II) und die Proteine FAAP24, FAAP100, zu denen aber noch kein Mensch mit biallelischen Mutationen identifiziert wurde⁶¹⁻⁶³. FAAP ist die Abkürzung für FA-assozierte Polypeptide, die Zahl steht für das Molekulargewicht.

Innerhalb des FA-Kernkomplexes bilden die einzelnen Proteine wiederum Untergruppen.

Eine Funktion des FA-Kernkomplexes besteht in der Interaktion mit anderen Proteinen, die einen modulierenden Einfluss auf die DNA-Reparatur haben. So ist der FA-Kernkomplex unter anderem ein Substrat von ATR (*Ataxia teleangiectasia and RAD3 related Protein*), einem Enzym, das zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen gehört^{64,65}.

Die wesentlichen Aufgaben des *FA/BRCA-Pathway* werden über FANCM koordiniert. Dazu gehören vor allem die initiale Erkennung von *Interstrand Crosslinks* (ICL) der DNA, die Stabilisierung stillstehender Replikationsgabeln und die Vermittlung von Signalen an andere DNA-Reparatur-Signalkaskaden (z.B. ATR/CHK1). Ursprünglich wurde FANCM als Untereinheit des FA-Kernkomplex identifiziert⁵⁴, doch die Funktion unterscheidet sich von denen der anderen FA-Kernkomplex-Proteine. FANCM bildet einen heterodimeren Komplex mit FAAP24, das eine hohe Affinität zum C-Terminus von FANCM hat, und beinhaltet eine Endonuklease-⁶¹, sowie eine Helicase-/ATPase-Aktivität. Damit ist FANCM neben ERCC4 (XPF) das einzige bekannte Protein im menschlichen Genom, das über eine Helicase-/ATPase-Aktivität und eine Endonuklease-Aktivität verfügt⁶⁶. Das FANCM-Protein ist komplexer als bisher angenommen. 2010 wurden zwei weitere an FANCM gebundene Proteine entdeckt: MHF1 und MHF2⁶⁷. Die Hauptaufgabe dieses Komplexes scheint die Stabilisierung von FANCM an ICL zu sein⁶³. Über die Proteine FANCM, MHF und FAAP24 werden DNA-ICLs direkt erkannt. *In vitro*-Experimente haben gezeigt, dass der FANCM/FAAP24-Komplex direkt an geschädigte DNA bindet, die angehaltenen Replikationsgabeln ähneln. Im Gegensatz zu den anderen Kernproteinen ist der Komplex FANCM/FAAP24 immer an die DNA assoziiert⁶⁸. Ein weiterer Unterschied ist, dass FANCM-defiziente Zellen eine erhöhte Frequenz an Schwester-Chromatid-Austausch (SCE) aufweisen⁶⁹.

FANCD2/FANCI-Monoubiquitinierung

Ein zentraler Schritt des *FA/BRCA-Pathway* ist die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI^{49,70,71}. Die Ubiquitinierungsreaktionen werden durch eine Kaskade von Enzymen katalysiert, einem Ubiquitin(Ub)-aktivierendem Enzym (E1), einem Ub-konjugierenden

Enzym (E2) und einer Ub-Ligase (E3). Die Monoubiquitinierung findet während der S-Phase des Zellzyklus an Lysin K561 des FANCD2-Proteins und an Lysin K523 des FANCI-Proteins statt. Zunächst war unklar, welches Protein für die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI verantwortlich ist. Inzwischen fanden verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander heraus, dass die Vereinigung aller Bestandteile des FA-Kernkomplex für die Monoubiquitinierung von FANCD2 unabdingbar ist^{35,38,61,62,72}, eine besondere Rolle jedoch FANCL zukommt, das eine Ringfingertyp-Ubiquitin-Ligase mit E3-Ligase-Aktivität besitzt⁷². Neben FANCL, so fanden Longerich et al. 2009 heraus, spielt das Enzym UBE₂T eine Rolle bei der Monoubiquitinierung von FANCI und FANCD2⁷³⁻⁷⁵.

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass FANCD2 und FANCI in Abhängigkeit voneinander reguliert werden und zusammen im ID2-Komplex arbeiten^{70,49,71}. Beide werden von ein und demselben Enzym, USP1-Protease⁷⁶, deubiquitiniert und können sowohl von ATR als auch ATM (*Ataxia teleangiectasia mutated*) phosphoryliert werden^{77,65}. Werden Zellen DNA-schädigenden Substanzen ausgesetzt, so wird sowohl das FANCD2-Protein als auch das FANCI-Protein in den Kern transportiert um dort an der Bildung nukleärer Foci, im Sinne von DNA-Reparaturstellen, mitzuwirken^{38,70,71}. Die Rekrutierung von FANCD2/FANCI an Stellen geschädigter DNA ist nicht nur vom FA-Kernkomplex, sondern auch von BRCA1, ATR und γ H2AX⁷⁸ abhängig. Shigechi et al. Berichteten kürzlich, dass das ATR bindende Protein ATRIP für die DNA-Schaden induzierte Phosphorylierung von FANCI und die Monoubiquitinierung von FANCD2 über die Untereinheit RPA verantwortlich ist⁷⁹. Für die Aktivierung der CHK1 ist nicht nur die RPA-Untereinheit, sondern eine weitere Untereinheit (TopBP1) notwendig⁷⁹.

Zum Reparaturfokus gehören bisher die FA-Proteine FANCD1 (BRCA2), -J (BRIP1) und -N (PALB2). Bei Patienten mit Defekt in einem dieser Gene finden sich normale Mengen von monoubiquitiniertem FANCD2, da der FA-Kernkomplex intakt ist.

Kürzlich wurde von 4 verschiedenen Forschungsgruppen⁸⁰⁻⁸³ ein weiteres Protein gefunden, das mit FA-Proteinen interagiert: FAN1. Es wurde postuliert, dass FAN1 eine Nukleaseaktivität besitzt, die für eine zelluläre Resistenz gegenüber DNA-quervernetzenden Agenzien sorgt, außerdem an beschädigte DNA-Stränge rekrutiert wird und ein Interaktionspartner von monoubiquitiniertem FANCD2 ist. FAN1-defiziente Zellen zeigen eine verminderte Effektivität der Homologen Rekombination (HR) im Rahmen der DNA-Reparatur⁸².

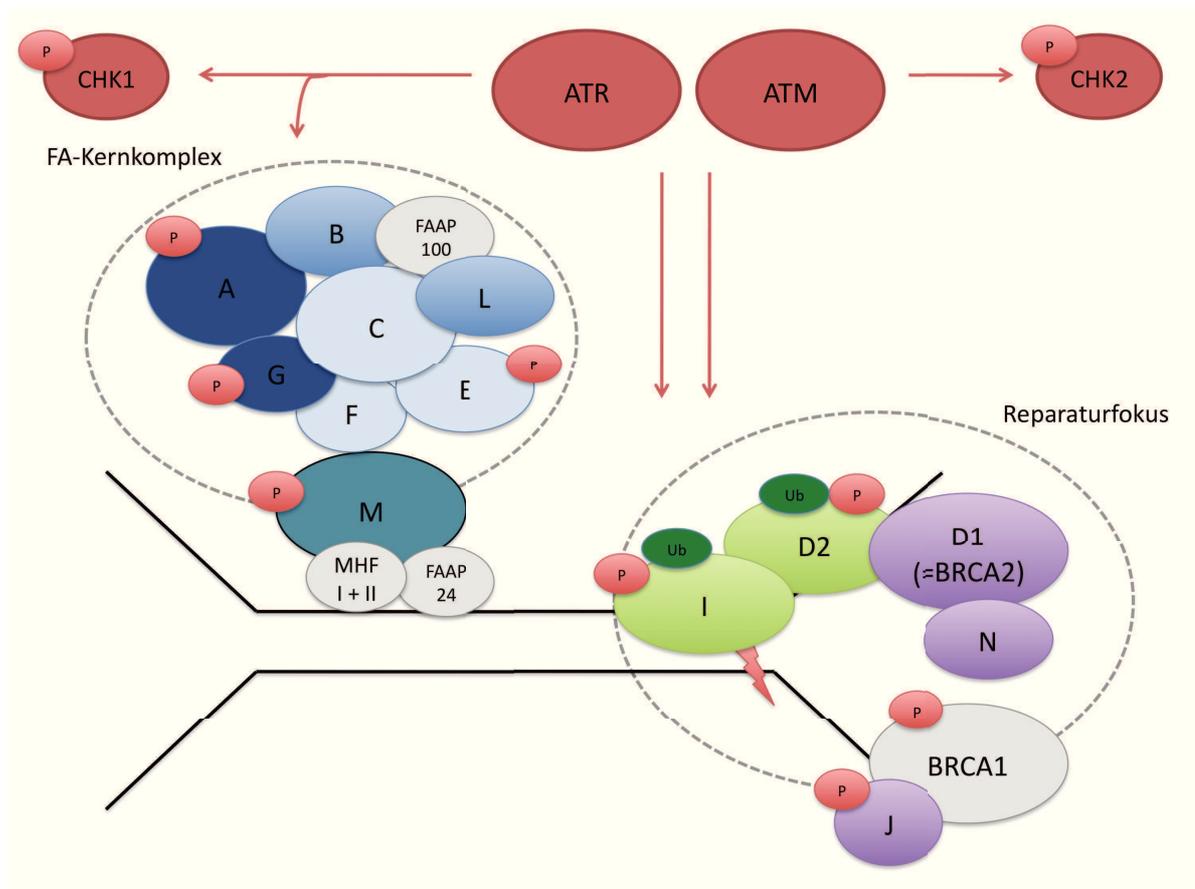


Abb. 5: Aktivierung von FA-Proteinen durch Phosphorylierung

Der *FA/BRCA-Pathway* wird unter anderem über die Kinasen ATR/CHK1 und ATM/CHK2 aktiviert. Durch ICL entstehen Fehler in der Replikation, die wiederum von der Kinase ATR erkannt werden. Über die Phosphorylierung verschiedener Proteine, wie CHK1 und FANCI, wird zum einen der S-Phase -Checkpoint des Zellzyklus aktiviert und zum anderen über die Monoubiquitinierung von FANCI und D2 der Komplex aus den FA-Proteinen an das Chromatin gebunden. Die eigentliche DNA-Reparatur läuft dann über verschiedene andere Proteine (u.a. den hier lila dargestellten FA-Proteinen). Modifiziert nach ^{59,84}.

1.5.3. Fanconi-Anämie und DNA-Reparatur

Schäden, die nur einen Strang betreffen, werden relativ unproblematisch über Basen- (BER) oder Nukleotidexzisionsreparatur (NER) behoben. Dabei wird die beschädigte Base erkannt und durch eine Endonuklease entfernt. Die Entfernung von Desoxyribose und Phosphat erfolgt dann durch eine Phosphodiesterase. Mit Hilfe von DNA-Polymerasen und DNA-Ligasen wird die Lücke aufgefüllt und der Strang wieder geschlossen ⁸⁵. Betrifft der Schaden beide Stränge der DNA, so hat die Zelle zwei verschiedene Möglichkeiten, die Integrität der DNA wieder herzustellen, die nicht-homologe End-zu-end-Verknüpfung (NHEJ, *non homologous end-joining*) oder die homologe Rekombination (HR). Um für die Reparatur mehr Zeit zu gewinnen, kann die Zelle in den Zellzyklusarrest gehen, oder aber, wenn die DNA-Schäden zu schwerwiegend sind, die Apoptose einleiten ^{86,87}. Noch ist

unklar, welche Faktoren entscheiden, ob die Schäden über nicht-homologe End-zu-end-Verknüpfung oder über die homologe Rekombination behoben werden. Doppelstrangbrüche (DSB) treten als Ergebnis endo- oder exogener DNA-Schädigungen auf und sind Teil des Prozesses der meiotischen Rekombination⁸⁸.

1.5.3.1. Homologe Rekombination

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über die HR kann nur in der S- und G₂-Phase stattfinden. Diese Art der Reparatur ist wesentlich genauer als die End-zu-End-Verknüpfung des NHEJ, jedoch erfordert sie das Vorhandensein homologer DNA-Sequenzen in unmittelbarer Nähe des zu reparierenden Strangs, zum Beispiel durch ein Schwesterchromatid. Außerdem spielt die HR eine Rolle bei der Reparatur von kollabierten Replikationsgabeln und dem Schwester-Chromatid-Austausch (SCE)⁵⁷.

Wie Svendsen und Harper 2010 zusammenfassten⁸⁹, gibt es im Rahmen der HR drei mögliche Reparaturwege. Der erste Weg kann eingeschlagen werden, wenn beide Enden der gebrochenen DNA-Stränge vorhanden sind. Treten DSB in hoch-repetitiven Regionen auf, wird der Schaden im Sinne eines *Single Strand Annealing* (SSA) repariert. Ist nur ein Ende des DSB vorhanden findet die *Break Induced Replication* (BIR) statt.

In Abbildung 6 wird der Weg der HR, veranschaulicht, der auf das Vorhandensein von beiden Enden der gebrochenen DNA-Stränge angewiesen ist. Dieser lässt sich grundsätzlich in drei Abschnitte gliedern. Im ersten Schritt wird der DSB erkannt und die DNA-Enden werden prozessiert. Dabei entstehen einzelsträngige 3'-Überhänge. Im nächsten Schritt kommt es zur homologen Paarung und zur Neusynthese der DNA an den freien Enden anhand der homologen Matrize. Im letzten Schritt werden die bei der Ligation entstandenen Verbindungen (*Holliday Junctions*, HJ) wieder gelöst.

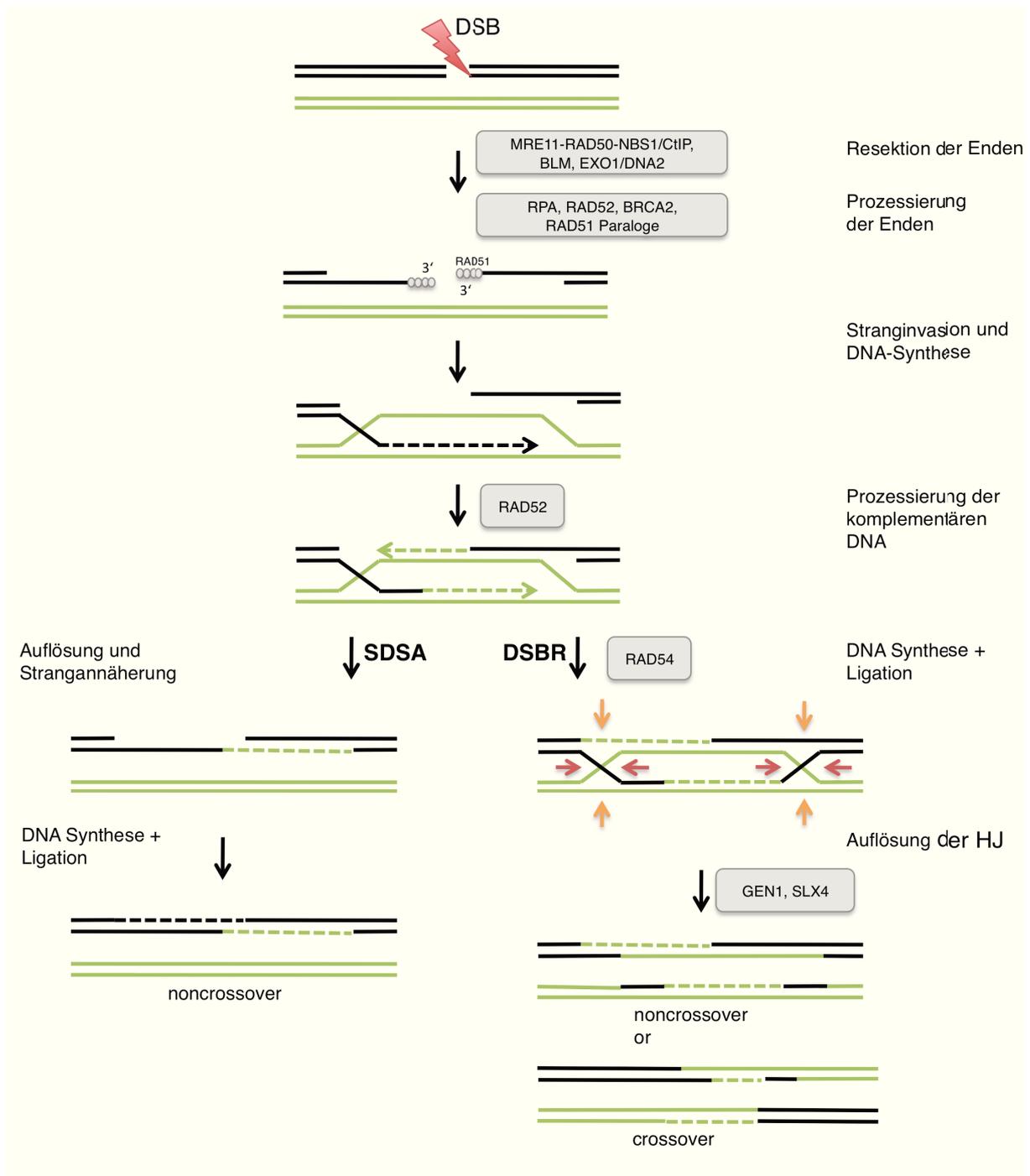


Abb. 6: Doppelstrangbruchreparatur durch Homologe Rekombination

Dargestellt sind die Reparaturmöglichkeiten von Doppelstrangbrüchen, sofern beide DNA-Stränge vorhanden sind. Sind die entstandenen DNA-Enden prozessiert und der komplementäre Strang invadiert, kann der klassische Weg der Doppelstrangbruchreparatur (*Double Strand Break Repair*, DSBR) über die Bildung und Auflösung von HJ eingeleitet werden. Je nach dem welche DNA-Stränge geschnitten werden, entstehen dabei *crossover* oder *noncrossover* Produkte. Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Auflösung der entstandenen Verbindungen - ohne Bildung und Auflösung von HJ - mit der Ausbildung von ausschließlich *noncrossover* Produkten (*Synthesis Dependent Strand Annealing*, SDSA). Modifiziert nach ⁸⁹ und ⁹⁰.

In der Frühphase der HR werden die Enden des Doppelstrangbruches von einem Komplex aus RAD50, MRE11 und NBS1 und dem Protein CtIP erkannt^{91,92}. Dabei werden MRE11 und NBS1 von der Kinase ATM phosphoryliert, was wahrscheinlich eine Änderung der Nukleaseaktivität von MRE11 bewirkt⁹³, sodass überhängende 3'-Enden entstehen. Die 5'-Enden werden von der Helikase BLM und den Nukleasen DNA2 und EXO1 reseziert^{92,94,95}. Daran bindet im nächsten Schritt das Einzelstrangbindeprotein RPA mit hoher Affinität und löst Sekundärstrukturen auf.

RAD51 bindet an die entstandenen 3'-DNA-Einzelsträngen, verdrängt RPA und polymerisiert zu helikalen Nukleoproteinfilamenten, die mit vorhandenen, homologen DNA-Abschnitten interagieren^{96,97}. Es kommt zur Invasion des homologen Stranges. Dieser Vorgang ist von verschiedenen anderen Proteinen abhängig: RAD52 scheint dabei an die komplementäre Einzelstrang-DNA zu binden und somit die Bindung von RAD51 zu erleichtern⁹⁸. Unterstützt wird RAD51 außerdem durch seine Paraloge RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3, sowie deren Interaktion mit BRCA1, FANCD1 und FANCD2⁹⁹. An der Identifikation der homologen Matrize scheint RAD54 beteiligt zu sein^{100,101}.

Holliday Junctions

Durch Prozessierung der Enden des anderen DNA-Strangs durch RAD52 kommt es zur Bildung von *Holliday Junctions*. Sie erhielten ihren Namen durch den Erstbeschreiber Robin Holliday, der im Jahre 1964 die meiotische Genkonversion in Pilzen erklärte¹⁰². HJ sind 4-strängige Strukturen, die zwei homologe DNA-Duplikate enthalten. Diese müssen zu linearen Duplexen gelöst werden, um die Meiose bzw. die Reparatur von DSB abzuschließen. Der Mechanismus der Auflösung dieser HJ ist noch nicht abschließend geklärt¹⁰³.

Für die Reparatur von DSB und insbesondere die Auflösung der HJ sind strukturspezifische Endonukleasen erforderlich, die sich biochemisch in 3 Klassen, benannt nach der jeweiligen funktionellen Domäne (ERCC1, UvrC und XPG), einteilen lassen. Die ersten Kandidaten für die Prozessierung und Auflösung von HJ waren MUS81 und EME1¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Beide enthalten eine ERCC1-Domäne, die sich jedoch in Einzelheiten unterscheidet^{107,108}, und ein HhH-Muster (*C-terminal helix-hairpin-helix* Muster), das an der DNA-Bindung beteiligt ist¹⁰⁸. Es stellte sich jedoch heraus, dass MUS81 und EME1 nicht die typischen Resolvase-Aktivitäten besitzen¹⁰⁹ und ihre eigentliche Funktion wahrscheinlich das Schneiden von Vorläuferstrukturen der HJ, den sogenannten *D-loop*-Strukturen, und anderen Zwischenprodukten ist¹⁰⁶. 2008 identifizierte die Gruppe um Stephen Ip GEN1 als klassische Resolvase mit XPG-Domäne, die symmetrisch statische HJ am 3'-Ende

schneidet und wieder religiert ¹¹⁰. Kürzlich wurde das Enzym des SLX4-Proteinkomplex beschrieben ^{111,112}, das sowohl Replikationsgabeln, 3'- und 5'-Enden, sowie statische und mobile HJ schneiden kann ¹¹²⁻¹¹⁴.

1.5.3.2. Entstehung von Interstrand Crosslinks

ICLs gehören zu den schwersten DNA-Schäden, die in DNA-Reparatur-defizienten Organismen schon in geringer Anzahl zum Zelltod führen können, da wichtige Prozesse wie die DNA-Replikation und Translation gestört werden ^{115,116}. Substanzen, die eine Quervernetzung der DNA und damit die Bildung von ICL bewirken sind unter anderem Mitomycin C, Diepoxybutan und Cisplatin ¹¹⁷. Aber auch in der täglichen Umgebung ist der Mensch Substanzen ausgesetzt, die ICLs verursachen können, wie zum Beispiel Furocumarine in Pflanzen und Kosmetika ¹¹⁸. Außerdem führt UVA-Exposition bei Patienten, die mit 6-Thioguanin (6-TG) behandelt werden, vermehrt zu ICLs, die zwischen eng benachbarten 6-TG-Basen oder normalen Basenabschnitten auf den gegenüberliegenden Strängen entstehen. Für die Reparatur der ICLs wird ein funktionierender *FA/BRCA-Pathway* benötigt ¹¹⁹.

Hier soll der Schwerpunkt auf die in dieser Arbeit verwendete DNA-quervernetzende Substanz MMC gelegt werden:

Mitomycin C ist ein natürlich vorkommendes Antibiotikum, das seine Anwendung als Zytostatikum vor allem in der palliativen Therapie von weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen findet. MMC bildet Addukte an N-2 und N-7 am Guanin der DNA. Die Deformation der DNA durch MMC ist jedoch relativ gering ¹²⁰. Außerdem können im Rahmen des Metabolismus von MMC DNA-Schäden durch freie Radikale entstehen ^{121,122}.

1.5.3.3. ICL-Reparatur

Durch die ICLs kommt es zur Blockade der weiteren DNA-Synthese an den Replikationsgabeln, was wiederum Checkpointproteine wie ATR und ATM, sowie die Monoubiquitinierung von FANCD2/FANCI aktiviert ⁵⁹.

Zunächst wird der ICL von FANCM identifiziert und die gestoppte Replikationsgabel über die Proteine des FA-Kernkomplex stabilisiert ¹²³. FANCM aktiviert die Kinase ATR, die wiederum weitere Proteine des *FA/BRCA-Pathway* phosphoryliert (siehe Abb. 5). ATR defiziente Zellen reagieren ebenfalls hypersensitiv auf DNA-quervernetzende Agenzien ⁶⁵. Neuere Studien haben ergeben, dass ATR von einem weiteren FA-Protein, FANCI, reguliert wird ¹²⁴ und sind ein weiterer Beweis dafür, dass der *FA/BRCA-Pathway* eng mit anderen Signalkaskaden im Rahmen der DNA-Reparatur verbunden ist.

Wurde der DNA-Schaden über die oben beschriebenen Mechanismen erkannt und das Signal weitergeleitet, wird zunächst die DNA-Quervernetzung, der ICL, herausgeschnitten. Daran beteiligt sind die Endonukleasen MUS81-EME1 und XPF-ERCC1^{125,126}. Anschließend muss die entstandene Lücke im DNA-Einzelstrang mit Hilfe einer Polymerase überbrückt werden. Diese wird vermutlich von FANCD2 rekrutiert^{127,128}. An dieser Stelle der ICL-Reparatur entsteht ein Doppelstrangbruch, der mittels HR repariert wird^{60,129}.

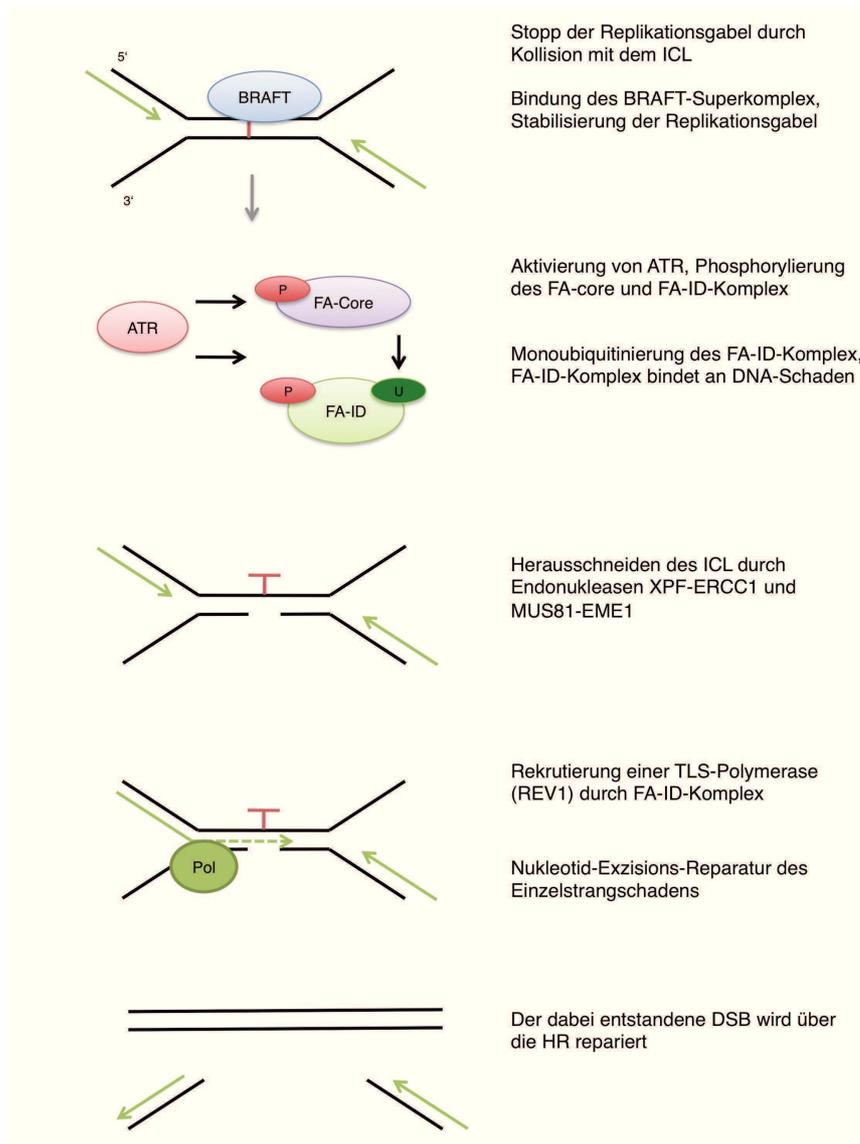


Abb. 7: Vereinfachte Darstellung der ICL-Reparatur

An die durch den ICL gestoppte Replikationsgabel bindet zur Stabilisierung der BRAFT-Superkomplex, bestehend aus den Proteinen des FA-Kernkomplex und den Proteinen des Bloom-Syndrom-Komplex. Eine besondere Rolle spielt hier, wie schon oben erwähnt, FANCM. Über ATR werden die Proteine FANCA, FANCE, FANCG und FANCM des FA-Kernkomplex phosphoryliert und die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI eingeleitet, sodass der FA-ID-Komplex an den entstandenen Schaden bindet. Der ICL wird mit Hilfe von Endonukleasen entfernt. Einzelstrangschäden können über die NER, DSB über die HR oder NHEJ repariert werden. Modifiziert nach¹³⁰ und⁵⁹.

1.5.3.4. Fanconi-Anämie und Bloom-Syndrom

Das Phänomen des erhöhten Schwester-Chromatid-Austauschs (SCE) lässt sich außer in FANCM-defizienten Zellen auch bei einer anderen seltenen genetischen Erkrankung, dem Bloom-Syndrom, das durch eine biallelische bzw. heterozygote Mutation in der *RecQ family helicase* BLM verursacht wird, feststellen. Phänotypisch findet man beim Bloom Syndrom, wie bei der FA, eine Wachstumsretardierung, reduzierte Fertilität, genomische Instabilität und eine erhöhte Inzidenz für hämatologische Malignome¹³¹. Meetei et al. zeigten 2003, dass die Parallelen der Klinik der beiden Erkrankungen mit den molekularen Aspekten in Zusammenhang gebracht werden können. Erst kürzlich haben Untersuchungen ergeben, dass FANCM als ein Adapter zwischen den Proteinen des FA-Kernkomplex und dem BLM-Komplex fungiert¹²³. Der BLM-Komplex besteht aus den Proteinen RMI1, RMI2, BLM und der Topoisomerase III α ^{123,132} und scheint ebenfalls an der Stabilisierung der durch ICL gestoppten Replikationsgabeln beteiligt zu sein.

1.5.4. Kandidatengene

Bisher ist der zugrundeliegende Defekt nicht bei allen FA-Patienten bekannt, sodass die Entdeckung weiterer FA-Gene auch in Zukunft Gegenstand der Forschung ist. Besonders interessant sind dabei die Gene und deren zugehörige Proteine, die mit bekannten FA-Proteinen während der Reparatur von DNA-Schäden interagieren. Die „verdächtigen“ Gene bleiben so lange Kandidaten, bis ein FA-Patient mit entsprechender, zum zellulären und klinischen Phänotyp führenden Mutation identifiziert wurde. Ein Beispiel dafür sind die *FANCA* assoziierten Gene *FAAP43*, *FAAP95* und *FAAP250*, die nun als *FANCL*⁵³, *FANCB*³⁵ und *FANCM*⁵⁴ bezeichnet werden.

RAD51 ist ein Homolog des bakteriellen RecA-Proteins¹³³ und in Eukaryoten das zentrale Protein der HR^{96,134}. Es katalysiert den Strangaustausch zwischen dem gebrochenen DNA-Strang und dem unbeschädigten homologen Strang. In menschlichen Zellen sind die Paralogen *RAD51A*, *RAD51B*¹³⁵, *RAD51C*^{136,137}, *RAD51D*¹³⁸, *XRCC2* und *XRCC3*¹³⁹ als FA-Kandidatengene bekannt. Sie wurden in dieser Arbeit in Zellen von 14 FA-Patienten mit bisher unbekanntem Gendefekt getestet.

Eines der bekanntesten Tumorsuppressorgene ist *BRCA1*, dessen heterozygote Keimbahnmutationen zur Prädisposition für Mamma- und/ oder Ovarialkarzinome führen. *BRCA1* ist essentiell für die Erhaltung der genomischen Integrität^{140,141}. Bisher wurde kein Patient mit einer biallelischen Mutationen in *BRCA1* identifiziert, sodass es kein klassisches FA-Gen ist, jedoch eine Rolle im *FA/BRCA-Pathway* im Rahmen der Interaktion mit *FANCI*

spielt. Viele der Mutationen in *BRCA1* liegen im Bereich der zwei C-terminalen (BRCT) Repeats von *BRCA1*, die obligat für die Tumorsuppressoraktivität von *BRCA1* sind ¹⁴². Die Proteine CCDC98 (ABRAXAS) und RAP80 interagieren mit *BRCA1*, sodass sie für die Suche nach Mutationen in Zellen von FA-Patienten mit Defekt im Bereich der *downstream*-Proteine als Kandidatengene besonders interessant sind und im Rahmen der vorliegenden Arbeit an 14 FA-Patienten mit unbekanntem Gendefekt getestet wurden.

1.6. Epidemiologie

Die Fanconi-Anämie kommt in allen ethnischen Gruppen vor, ist aber insgesamt eine sehr seltene Erkrankung. Die Prävalenz wird auf 1-5/1.000.000 geschätzt, die Heterozygotenfrequenz auf etwa eins zu 300 ^{10,143,144}. In einigen ethnischen Gruppen wurden jedoch Mutationen mit einer erhöhten Heterozygotenfrequenz beschrieben, wie zum Beispiel bei Ashkenazi-Juden im *FANCC*-Gen ^{145,146}, bei Afrikanern im *FANCG*-Gen ^{147,148}, bei Japanern im *FANCG*-Gen ¹⁴⁹ und einer spanischen Bevölkerungsgruppe im *FANCA*-Gen ¹⁵⁰. Nach dem International Fanconi Anemia Registry gehören die meisten Patienten der Komplementationgruppe FA-A an (66%), gefolgt von den Gruppen FA-C (15%) und FA-G (9%) ^{10,151}.

1.7. Fanconi-Anämie-Diagnostik

Für die Diagnose FA sind postnatal vor allem die charakteristischen Fehlbildungen wegweisend. Im weiteren Verlauf geben Panzytopenie und andere hämatologische Auffälligkeiten in der Zusammenschau mit klinischen Symptomen Anlass zur weiteren Diagnostik. Zellen von FA-Patienten sind hypersensitiv gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen ⁹. Diese Eigenschaft lässt sich im Rahmen der Diagnostik ausnutzen, wobei hauptsächlich die beiden Substanzen MMC und DEB eingesetzt werden ⁸.

1.7.1. Retrovirale Komplementationsanalyse

Retroviren zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihr Genom in das einer Zielzelle integrieren können. Sie besitzen meist ein einzelsträngiges RNA-Genom und sind von einer Proteinhülle, dem Kapsid, umgeben. Der Name "Retro" ist eine Kurzform für Reverse Transkriptase Qnkoviren und soll das onkogene Potential dieser Viren verdeutlichen, das sich durch die Reversetranskriptase-Aktivität ergibt ¹⁵². Die in dieser Arbeit verwendeten Viren gehören zur Familie der Orthoretroviridae.

Ein Beispiel für humanpathogene Retroviren ist das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) 1 und 2¹⁵³, das der Gattung Lentiviren zugeordnet wird.

Um das virale Genom in die Zielzelle zu integrieren, müssen zunächst Oberflächenproteine des Retrovirus mit Rezeptoren der Zielzelle interagieren. Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) ermöglicht es, aus den RNA-Strängen komplementäre DNA-Stränge zu synthetisieren, die dann mittels der Integrase (IN) stabil in die DNA der Zielzelle eingebaut werden^{154,155}.

Retrovirale Vektoren können also dazu genutzt werden, bestimmtes Genmaterial, im Sinne einer intakten (wildtypischen) Kopie des defekten Gens, in eine Zielzelle zu integrieren. Diese Fähigkeit lässt sich diagnostisch und therapeutisch nutzen. Dazu müssen zunächst retrovirale Vektoren produziert werden, die das gewünschte Gen enthalten. Die Herstellung von retroviralen Vektoren wird im Kapitel „Methoden“ näher beschrieben.

Bis zu Beginn dieser Dissertation wurden 13 Komplementationsgruppen definiert: FA-A, -B, -C, -D1, D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M, und -N. Bei jeder dieser Gruppen ist genau das Gen defekt, nach dem die entsprechende Komplementationsgruppe benannt ist, also FANCA, -B, C, -D1, D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M, und -N.

Es gibt zwei Methoden, um die Komplementationsgruppe eines Patienten zu ermitteln: Die erste ist die Fusion und anschließende Selektion somatischer Zellen^{44,34}. Das Prinzip der Komplementationsgruppenbestimmung durch Zellfusion beruht auf der Tatsache, dass bei der Fusion zweier Zellen unterschiedlicher Komplementationsgruppen der Defekt beider Zellen aufgehoben wird, da jeder Fusionspartner den Defekt des anderen komplementiert, d.h. eine Kopie des intakten (wildtypischen) Gens mit in die „neue Zelle“ bringt und damit zu einer „normalen“ Zelle führt, die keine Empfindlichkeit gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen mehr aufweist. Werden hingegen zwei Zellen der gleichen Komplementationsgruppe fusioniert, bleibt der Defekt auch in der neuen Zelle bestehen, da beide Zellen nur defekte Kopien des gleichen Gens besitzen.

Eine neuere und wesentlich einfachere Methode der Komplementationsanalyse ist die Verwendung retroviraler Vektoren, um jeweils spezifisch ein FA-Gen in die Zelle eines FA-Patienten mit noch nicht zugeordneter Komplementationsgruppe bzw. bekanntem Gendefekt zu bringen^{156,157}. Es wird also im Gegensatz zur Zellfusion immer nur ein Gen in die zu testende Zelle gebracht. Dabei wird der positive Fall gesucht, in dem dieses retroviral eingebrachte FA-Gen Komplementation vermittelt, d.h. die Hypersensitivität gegen über DNA-quervernetzenden Substanzen korrigiert¹⁵⁷. Nur eines der eingebrachten

FA-Gene kann den Defekt der Zellen phänotypisch korrigieren, nämlich die intakte (wildtypische) Kopie des Gens, welches beim Patienten Defekt ist.

Bei Patienten, die FA-assoziierte Anomalien, eine Aplastische Anämie unklarer Genese oder ein MDS mit komplex abnormen zytogenetischen Markern aufweisen, sollte unbedingt die Sensitivität von Zellen gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen aus dem peripheren Blut oder aus anderen Organen, wie zum Beispiele der Haut, getestet werden¹⁵⁸. Pränatal können auch Amnionzellen, Chorionzotten und fetales Blut zur FA-Diagnostik genutzt werden^{21,159,160}.

1.7.2. Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blots lässt sich feststellen, ob der Defekt bei Patienten mit bisher unbekannter Komplementationsgruppe *up-* oder *downstream* der FANCD2-Monoubiquitinierung liegt. Dabei wird untersucht, ob das FANCD2-Protein monoubiquitiniert werden kann, also in der langen Form (FANCD2-L) vorliegt, oder nicht. Ist das FANCD2-Protein nicht nachweisbar, gehört der Patient zur Komplementationsgruppe FA-D2 mit Defekt im *FANCD2*-Gen. Kann FANCD2 nicht monoubiquitiniert werden, so liegt der Defekt im *FANCD2*-Gen selbst oder im FA-Kernkomplex.

Für den Verlauf und die Prognose der Fanconi-Anämie ist nicht nur die Zuordnung zu einer Komplementationsgruppe von Bedeutung sondern auch die Art der zugrunde liegenden Mutation des jeweiligen Patienten sowie das Entstehen oder Ausbleiben eines somatischen Mosaiks in hämatopoetischen Zellen^{161,162}.

1.8. Mosaikbildung

Ein Mosaik wird durch das Vorliegen von zwei genetisch unterschiedlichen Populationen in einem Organismus definiert³³. Bei FA-Patienten wurde dieses Phänomen zum ersten mal von der Arbeitsgruppe um H. Joenje und Q. Waisfisz beschrieben¹⁶³. Ursächlich für die Ausbildung eines Mosaikstatus können neue DNA-Mutationen oder spontane Reversionen der angeborenen Mutation in somatischen Zellen sein^{33,164}, was zu einem Selektionsvorteil, wie dem Verlust der Sensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen, führt. Aus homozygoten bzw. *compound* heterozygoten Zellen entstehen wieder klassisch heterozygote Zellen, die eine funktionsfähige Kopie des FA-Gens haben. Die „selbst-korrigierten“ Zellen verhalten sich funktionell (z.B. MMC- Sensitivität, Zellzyklus-Verhalten, Chromosomenbrüchigkeit) wie die Zellen gesunder Individuen³³. Der Verdacht auf einen Mosaikstatus, d.h. die gleichzeitige Existenz von FA-Zellen als auch phänotypisch normalen

Zellen im Körper des Betroffenen, besteht bei der Zellzyklusanalyse, wenn sich die Höhe des G₂-Arrest zwischen Normalwerten und für FA-typischen Werten befindet. Klinisch kann eine graduelle Verbesserung der Blutwerte oder ein milder Krankheitsverlauf auf einen Mosaikstatus hinweisen. Ein milder Krankheitsverlauf muss aber vom Vorliegen einer hypomorphen Mutation mit Restfunktion des Proteins, z.B. durch einen Aminosäureaustausch, abgegrenzt werden. Besteht eine komplette Mosaikbildung (100% phänotypisch normale Zellen) im peripheren Blut eines Patienten, so kann, da die Mosaikbildung bisher nur in der Hämatopoese beschrieben ist, die Diagnostik gegebenenfalls mit Fibroblasten, die weiterhin eine Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen aufweisen, zum Erfolg führen.

1.9. Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Sowohl Genotyp als auch Phänotyp sind bei FA-Patienten sehr heterogen. Selbst innerhalb von Familien mit identischer Mutation zeigt sich eine große Variabilität in Anzahl und Schwere der Veränderungen^{136,165}. Die Zuordnung von Patienten einer Komplementationsgruppe zu einem bestimmten Phänotyp ist daher oft nicht möglich. Es gibt jedoch einige Komplementationsgruppen, die sich in bestimmten Bereichen ihrer klinischen Ausprägung von anderen unterscheiden. In einer vergleichenden Studie von Faivre et. al. (2000) wurde beobachtet, dass Patienten der Komplementationsgruppe FA-G einen schwereren hämatologischen Verlauf als Patienten der Gruppen FA-A und FA-C zeigten, wobei dies im IFAR nicht bestätigt werden konnte. Den schwersten Verlauf weisen Patienten der Gruppen FA-D1 und FA-N auf, bei denen Malignome besonders früh auftreten¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Man nimmt an, dass ein Teil der phänotypischen Vielfalt auf der Interaktion sogenannter *modifier genes* basiert¹⁶⁹. Darüber hinaus können epigenetische Effekte, wie DNA-Methylierung und genomisches Imprinting, die Regulation und Expression von Genen verändern und dadurch das phänotypische Erscheinungsbild der jeweiligen Mutation verändern. Dies wurde jedoch bisher im Zusammenhang mit FA nicht gezeigt. Schließlich sind auch genetische Prädisposition und stochastische Phänomene dabei zu berücksichtigen¹⁶¹.

1.10. Therapie der Fanconi-Anämie

Eine kausale Therapie der Fanconi-Anämie ist nicht möglich, da der Erkrankung eine Mutation auf Keimbahnebene zugrunde liegt. Im Rahmen der supportiven Therapie ist aufgrund der Granulozytopenie häufig eine gezielte antibiotische und antimykotische Prophylaxe erforderlich. Thrombozyten- und Erythrozytenkonzentrate müssen in Abhängigkeit der Laborparameter und des klinischen Allgemeinzustands des Patienten

verabreicht werden, stellen letztendlich aber nur eine Überbrückung zur einzigen kurativen Therapie für den Ausfall der Hämatopoese, der allogenen Knochenmark- oder Peripheren Blutstammzelltransplantation, dar. Solange kein HLA-identischer Spender gefunden ist, können nach Abwägung der Nebenwirkungen Therapieversuche mit Androgenen oder Wachstumsfaktoren zum Erhalt einer ausreichenden Hämatopoese eingeleitet werden¹⁷⁰. Chirurgische Maßnahmen sind ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Therapie. Insbesondere Präkanzerosen im Oropharynx und Genitalbereich können z.B. durch nicht-invasive Bürstenabstriche leicht diagnostiziert werden und so, früh erkannt, ohne ausgedehnte Operationen im Gesunden reseziert werden. Außerdem kommt die chirurgische Therapie im Rahmen der kongenitalen Fehlbildungen zum Einsatz.

1.11. Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden über einem Zeitraum von zwei Jahren Zellen von 14 FA-Patienten untersucht, die keine Mutation in einem der bis dahin bekannten 13 FA-Gene (*FANCA*, *-B*, *-C*, *-D1*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-I*, *-J*, *-M*, und *-N*) aufwiesen. Alle Patientenzellen zeigten eine Doppelbande im FANCD2- Westernblot, also eine normale Ubiquitinierung von FANCD2, sodass bereits bekannt war, dass der Defekt *downstream* der D2-Monoubiquitinierung liegen muss.

Ziel der Arbeit war es, Kandidatengene für FA anhand der noch nicht zugeordneten Patienten zu testen. Dafür wurden Kandidatengene gewählt, die eine Rolle in der DNA-Reparatur und insbesondere der Homologen Rekombination spielen: *RAD51A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* und *XRCC3*, sowie die mit *BRCA1* interagierenden Gene *ABRAXAS* und *RAP80*.

Die retroviralen Vektoren, die die oben genannten Kandidatengene exprimieren, lagen zum Teil bereits in der Arbeitsgruppe vor. Die Kandidatengene *ABRAXAS* und *RAP80* wurden eigenständig in einen Expressionsvektor kloniert.

Nach Infektion der Zielzellen (primäre Fibroblasten oder lymphoiden Zelllinie) mit retrovirushaltigem Überstand, wurden die Zellen zunächst selektioniert, mit der DNA-quervernetzenden Substanz MMC behandelt und anschließend ihr Zellzyklusverhalten in der Durchflusszytometrie analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle Lösungen und Puffer wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Millipore GmbH, Eschborn) angesetzt und für 20 Minuten bei 121°C und 2-3 bar autoklaviert, sofern sie für Bakterienkultivierung verwendet wurden. Nicht zu autoklavierende Lösungen wurden, wenn notwendig, steril filtriert.

Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden alle Produkte von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D), Roth (Karlsruhe, D) und Applichem (Darmstadt, D).

2.1.2. Lösungen und Puffer

Für die Analyse und Klonierung von DNA wurden folgende Lösungen und Puffer verwendet:

1x TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 + 1mM EDTA
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, pH 7,5 + 1 mM EDTA
Probenpuffer (10x) für 100 ml	250 mg Bromphenolblau + 250 mg Xylene Cyanol + 33 ml 150 mM Tris pH 7,6 aufgefüllt mit A. dest.
LB-Medium (flüssig) für 1000 ml	20g LB Broth Miller von Sigma-Aldrich, aufgefüllt mit A. dest.
LB-Agar (fest) für 1000 ml	37g LB Agar von Sigma-Aldrich, aufgefüllt mit A. dest.

Für den Proteinnachweis wurden die unten aufgeführten Lösungen und Puffer verwendet:

Protein- Lysepuffer (10x)	150 mM Tris, pH 7,5 50 mM NaCl 0,2 % Triton®X-100 0,3 % NP-40 2 mM EGTA 2 mM EDTA 25 mM Glycerol-2-Phosphat
Ladepuffer (4x)	NuPAGE® MLDS Sample Buffer (Invitrogen)
Laufpuffer (1x)	20x NuPAGE® MES SDS Running Buffer (Invitrogen), mit A. dest auf 1x verdünnt
Transferpuffer (1x)	50 ml 20x Transfer Buffer (Invitrogen), 100 ml Methanol, aufgefüllt mit A. dest auf 1 l
PBS-Tween (1x)	10x PBS-Stocklösung (Gibco), verdünnt auf 1x PBS, mit Tween®20 versetzt
Blocklösung	5 % Milchpulver (Roth) in PBS-Tween

Für die Kultur der eukaryotischen Zelllinien wurden die verwendeten Medien zuvor mit 10% fötalem Rinderserum (FBS, PAA Laboratories, Pasching/Linz), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 1% Glutamin (Gibco) versetzt.

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco), 4500 mg/l D-Glukose mit Natrium Pyruvat. Für die Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien und primärer Fibroblasten.
IMDM, Phenolrot	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Sigma). Für die Virusproduktion mit pg13-Zellen.
RPMI	ursprünglich vom Roswell Park Memorial Institute, (GIBCO). Für die Kultivierung von LCL.

Im Rahmen der Kultivierung von u.g. Zellen wurden außerdem eingesetzt:

PBS (1x)	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, ohne CaCl ₂ und MgCl ₂ (PAA Laboratories, Pasching/Linz)
Trypsin-EDTA (1x)	0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA (PAA Laboratories, Pasching/Linz)
0,1 % Gelatinelösung	1 g Gelatine (Sigma-Aldrich), aufgefüllt mit 1000 ml A. dest.

2.1.3. Antibiotika/ Zytostatika

Antibiotika/ Zytostatika	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Sigma)	50 mg/ml	100 µg/ml
Penicillin/Streptomycin (Gibco)	10 mg/ml	10 µg/ml
G418, Geneticin (Gibco)	50 mg/ml	0,8 mg/ml
Mitomycin C (Medac, Hamburg, D)	1 mM	1- 1000 nM
Puromycin (Gibco)	10 mg/ml	2-4 µg/ml

2.1.4. Sonstiges

Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Frankfurt am Main/ MBI-Fermentas St.Leon-Rot, D), BSA, Puffer 1/2/3/4 und T4 DNA Ligase, RNase (New England Biolabs, Frankfurt am Main), One shot® Top10 Competent cells (Invitrogen)

2.1.5. Plasmide

2.1.5.1. In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Alle Plasmide sind LTR-Promotor getrieben und enthalten eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und ein Ampicillinresistenz-Gen. Als Selektionsmarker enthalten die Plasmide das bakterielle Neomycinphosphotransferase-Resistenzgen *nptII* (NEO) und/ oder ein EGFP-Markergen (*enhanced green fluorescent protein*) oder ein Puromycin-N-Acetyltransferase-Resistenzgen (PURO).

Plasmid	Größe in bp	Vektor	1.Gen	IRES	2. Gen
S11IN	5707	S11	-	+	NEO
S11EGIN	6553	S11	EGFP	+	NEO
S91IEG3	5709	S91	-	+	EGFP
S91FGIN3	7702	S91	FANCG	+	NEO
S11RAIN	6868	S11	RAD51A	+	NEO
S11RBIN	6900	S11	RAD51B	+	NEO
S11RCIN	6978	S11	RAD51C,	+	NEO
S11RDIN	6844	S11	RAD51D	+	NEO
S11XRCC2IN	6688	S11	XRCC2	+	NEO
S11XRCC3IN	6876	S11	XRCC2	+	NEO
S11IP	5653	S11	-	+	PURO
S11RCIP	6792	S11	RAD51C	+	PURO
S11RCmut773IP	6792	S11	RAD51C(773G>A)	+	PURO

2.1.5.2. In dieser Arbeit klonierte Plasmide

Die S91-Plasmide unterscheiden sich von den S11-Plasmiden im Bereich *downstream* des 5'LTR. So ist in den S91-Plasmiden ein *splicedonor* (SD) und ein *spliceacceptor* (SA) vorhanden, was zu einer besseren Expression des folgenden Genabschnittes führen soll. Bei den S11-Plasmiden ist die Leadersequenz verkürzt, sodass der *spliceacceptor* deletiert ist und im ungünstigen Fall eine Sequenz des eingebrachten Gens als kryptischer *spliceacceptor* erkannt wird und das Gen damit nicht exprimiert wird. Um dieses mögliche Problem zu umgehen, wurden die zu testenden Gene im Rahmen dieser Arbeit in den S91IN-Expressionsvektor kloniert.

Die Plasmide SFB-ABRAXAS-pIRES2-EGFP und SFB-RAP80-pIRES2-EGFP, aus denen die Gene *ABRAXAS* und *RAP80* im Rahmen der weiteren Klonierung herausgeschnitten wurden, lagen bereits in der Arbeitsgruppe vor.

Plasmid	Größe in bp	Vektor	1. Gen	IRES	2. Gen
S91IN	5846	S91	-	+	NEO
S91EGIN	6603	S91	EGFP	+	NEO
S91IEG	5759	S91	-	+	EGFP
S91ABRIEG	6985	S91	ABRAXAS	+	EGFP
S91RAPIEG	7893	S91	RAP80	+	EGFP
S91ABRIN	7115	S91	ABRAXAS	+	NEO
S91RAPIN	8025	S91	RAP80	+	NEO

2.1.6. Nukleinsäuren und Oligonukleotide

2.1.6.1. Größen- und Molekulargewichtsstandards

1 kb plus DNA Leiter (Invitrogen, Karlsruhe): 100 bp bis 12 kb

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (MBI-Fermentas (St.Leon-Rot, D))

2.1.6.2. Oligonukleotide für Sequenzierungen

Primer Nr.	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
257	CTAGGAATGCTCGTCAAGAAG	rückwärts Primer, bindet in der IRES-Kassette
256	TCCGCCACTGTCCGAGGG	rückwärts Primer, bindet in der <i>Multiclونingsite</i>
252	GGGACGTGGTTTTTCCTTTGAAA	vorwärts Primer, bindet in der IRES-Kassette
227	CTATGACTGGGCACAACAG	vorwärts Primer, bindet in der NEO-Kassette
732	CATCTGTTTCTGGGC	rückwärts Primer <i>ABRAXAS</i>
731	CTCTTGGTCTTGGCC	rückwärts Primer <i>RAP80</i>
735	CCCAAATGGATGATG	vorwärts Primer <i>ABRAXAS</i>
734	GCCACTCGGCTGAGC	vorwärts Primer <i>RAP80</i>

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) synthetisiert.

2.1.7. Kits

QIA Quick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, Katalognummer: 28706

QIA Quick PCR Purification Kit: QIAGEN, Hilden, Katalognummer: 28106

Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, Katalognummer: 4337451

Dye Ex 2.0 Spin Kit, QIAGEN, Hilden, Katalognummer: 63206

Maxiprep Kit, Invitrogen, Katalognummer: K2100-17

Fast Plasmid Minikit, Five prime, Katalognummer: 2300010

2.1.8. Antikörper

2.1.8.1. Primärer Antikörper

CCDC98, Polyklonaler Kaninchenantikörper (Prosci incorporated, Poway, USA), Katalognummer: 4321

2.1.8.2. Sekundärer Antikörper

Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Horseradish Peroxidase Konjugat (GE Healthcare, München, D) Katalognummer: RPN4301

2.1.9. Zellen

2.1.9.1. Adhärent wachsende Zelllinien

HT1080	humane Fibrosarkomzelllinie, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig).
V79-4	chinesische Hamsterfibroblastenzelllinie, (http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e1883/e2047/e1962/index_ger.html).
IRS-3	Chinesische Hamsterfibroblastenzelllinie mit einer „splice-site mutation in RAD51C ^{171,172} “.
293eFNX	retrovirale Verpackungszelllinie, humane Nierenzellen ¹⁷³ .
pg13	retrovirale Verpackungszelllinie, Mausfibroblasten ¹⁷⁴ .

2.1.9.2. Primäre Zellen

Die primären Fibroblasten und lymphoiden Zelllinien von FA-Patienten wurden von Prof. Schindler, Institut für Humangenetik, Würzburg, zur Verfügung gestellt. Alle Patienten bzw. deren Angehörigen haben eingewilligt, dass die Zellen für die Forschung genutzt werden dürfen.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde zum einen für die Herstellung der zu testenden Plasmide und zum anderen zur Kontrolle nach Klonierungen eingesetzt (Enzyme und Puffer von New England Biolaby, Frankfurt). Für Klonierungen wurden dabei jeweils 3 μg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 μl in dem entsprechenden Reaktionspuffer mittels Restriktionsenzymen 1-2 h lang inkubiert. Die Menge des Enzyms wurde so gewählt, dass die Aktivität im Ansatz 10 U betrug. Die Temperatur wurde abhängig vom jeweiligen Enzym gewählt. Zur Kontrolle der rekombinanten DNA nach der Klonierung wurde ein Enzym gewählt, dessen Schnittstelle im *Insert* lag und nur dann das Plasmid linearisierte, wenn es das *Insert* enthielt. Alternativ konnten mehrere Enzyme oder ein Enzym mit mehreren Schnittstellen gewählt werden, um eine Aussage über die Orientierung des *Inserts* zu machen. Die Enzyme wurden dabei so ausgesucht, dass der Restriktionsverdau je nach Orientierung des *Inserts* unterschiedlich große Fragmente lieferte. Die Beurteilung der Fragmentgrößen erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

2.2.1.2. Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde eine Agarosekonzentration zwischen 1 und 2 % gewählt. Die entsprechende Menge Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst, mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid versetzt und anschließend in einen dafür vorgesehenen Gelschlitten gegossen. Sobald das Gel erstarrt war, wurde es in eine Kammer mit TAE-Laufpuffer gelegt. Die zu analysierenden Proben wurden mit einem Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipetiert. Bei einer Spannung von ca. 100 mA erfolgte der Gellauf für 40-80 Minuten. Nach Anregung mit UV-Licht konnten die DNA-Banden aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsstrecke im Vergleich zu einem Längenstandard identifiziert werden. Sollten die DNA-Fragmente anschließend für eine Ligation Verwendung finden, so wurden diese mit einem Skalpell herausgeschnitten und aufgereinigt.

2.2.1.3. DNA-Elution aus Agarosegelen und Aufreinigung

Für die DNA-Elution aus Agarosegelen wurde das QIA Quick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN, Hilden, verwendet.

2.2.1.4. Ligation

Für die Ligation wurden Vektor und Insert nach der Aufreinigung in 30 μ l Elutionspuffer eluiert und anschließend in einem molaren Verhältnis von 1: 3 in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit T4 DNA-Ligase und Puffer (NEB, Frankfurt) für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5. Transformation von Bakterien

Für die Amplifikation der rekombinanten Plasmid-DNA wurden transformationskompetente Top10 E.coli verwendet. Zunächst wurden 45 μ l der Bakterienkultur auf Eis aufgetaut, 5 μ l des Ligationsansatzes hinzugegeben und diese Suspension 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock für die Aufnahme der Vektoren in die Bakterienzellen erfolgte für 45 Sekunden bei 42°C. Im Anschluss daran wurden sie zur Regeneration sofort auf Eis abgekühlt, 250 μ l S.O.C. Medium hinzu gegeben und bei 37°C und 180 *rounds per minute* (rpm) inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Ansatz auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit Ampicillin (100 μ g/ml, Sigma) als Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert bis deutlich sichtbare Einzelkolonien zu erkennen waren. Pro Platte wurden dann jeweils 10-20 Einzelkolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen, in vorbereitete Röhrchen mit 3 ml LB-Ampicillin-Medium gegeben und wiederum über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

2.2.1.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Wurde die Plasmid-DNA zur Identifizierung positiver Klone nach Transformation benötigt (Mini-Prep), so wurde für die Isolierung von Plasmid-DNA aus den Vorkulturen zunächst das Fast Plasmid Mini Kit der Firma Five Prime verwendet, wobei die eluierte DNA in 50 μ l Elutionspuffer aufgenommen wurde. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen und anschließender Gelelektrophorese oder einer Sequenzierung wurde im nächsten Schritt kontrolliert, ob die in den Bakterienzellen amplifizierte DNA das gewünschte Insert enthielt. War dies der Fall, wurde aus der entsprechenden Vorkultur ein Glycerinstock angelegt (300 μ l Glycerin + 700 μ l der Kultur) und bei -20°C gelagert. Mit dem Rest der Vorkultur wurde eine Hauptkultur in 100 ml LB-Ampicillin-Medium (100 mg/ml) angeimpft und für 12-24 Stunden bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Um nun größere Mengen *high-copy*-Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus der Hauptkultur mit dem Pure Link HiPure Plasmid Filter Purification Kit der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt und das DNA-Pellet in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.7. DNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration kam der NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 der Firma peQ Biotechnologie GmbH zur Anwendung. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Nanodrops® auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ TE Puffer eingestellt.

2.2.1.8. PCR und Sequenzierung

Um zu kontrollieren, ob die zuvor in den Bakterien amplifizierte und durch Plasmidpräparation gewonnene DNA die gewünschten Genabschnitte enthält, wurde die DNA zunächst per PCR mit Hilfe des Big Dye® Terminator v1.1 cycle sequencing kit vervielfacht. Die dazu benötigten Primer wurden bei der Firma MWG bestellt. Die Reaktion fand im PCR System 2700 Gene Amp® (AB, Applied Biosystems) statt.

Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wurde das Dye Ex 2.0 Spin Kit von QIAGEN verwendet. Anschließend wurden 15 μl des Produkts in 15 μl Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems) aufgenommen und auf eine Sequenzierplatte aufgetragen. Die Sequenzierung erfolgte mit dem 3130 Genetic Analyzer der Firma AB/Hitachi.

2.2.1.9. Western-Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine Methode zum Nachweis von Proteinen. Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis der Expression von ABRAXAS in Hamsterfibroblasten (V79-4) nach folgendem Protokoll angewendet:

Es wurden ca. 6×10^5 Zellen geerntet und durch mehrfaches Waschen mit PBS alle Trypsinreste eliminiert. Die Zellen wurden in ca. 300 μl PBS aufgenommen, zentrifugiert und das Zellpellet anschließend bei -20° oder -80° Celsius weggefroren.

Vor dem eigentlichen Blot müssen die Zellpellets mit Lysepuffer behandelt werden. Dazu wurden sie mit 20-60 μl Lysepuffer für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden bei 1400 rpm für 10 Minuten bei 4° Celsius die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden weiterhin auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe von Bradford Reagenz (Sigma-Aldrich) im NanoDrop® gemessen.

Für die Gelelektrophorese wurde das NuPAGE® Tris-Acetate System (Invitrogen) verwendet und jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen. Das Gel lief für 1 bis 2 Stunden bei 120-130 Volt. Geblottet wurde 1 Stunde bei 35 Volt auf eine Hybond-P PVDF Membran. Als Puffer wurde dazu NuPAGE® Transferpuffer (20x) verwendet und mit 5 % Methanol und 200 μl NuPAGE® Antioxidanz versetzt.

Im letzten Schritt wurde die Membran zunächst mit 5 % Blocklösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) geblockt und dann dreimal für 10 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Dann wurde der primäre Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml in 5 % Blocklösung aufgetragen und die Membran für 1,5 bis 3 Stunden bei RT inkubiert und anschließend wiederum dreimal für 10 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 auf die gleiche Art und Weise aufgetragen, bei einer Inkubationszeit von einer Stunde und RT. Zum Schluss wurde die Membran viermal für 15 Minuten mit PBS-Tween gewaschen.

Nach Zugabe des Substrates Standard-ECL-Reagenz (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) wurde dieses durch die im sekundären Antikörper enthaltene *Horseradish*peroxidase enzymatisch umgesetzt. Dabei wurden Lichtsignale freigesetzt, die nach 2 minütiger Inkubation im Fuji LAS 3000 Imager detektiert und sichtbar gemacht werden konnten.

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Zellen wurden in Zellkulturgefäßen (Corning Costar, Bodenheim) mit Kulturmedium im Series II Water Jacketed CO₂ Incubator (Thermo Forma Scientific) bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

Für die Kultivierung adhärent wachsender Zellen wurde der Boden der zellkulturbeschichteten (*tissue culture-treated*) Zellkulturgefäße zusätzlich mit einer sterilen, 0,1 % igen Gelatinelösung (1 g Gelatine pro 1000 ml A. dest.) beschichtet. Je nach Größe des Gefäßes wurden 5-10 ml dieser Lösung auf den Boden des Gefäßes pipettiert. Die Gelatinelösung wurde für mindestens 30 Minuten und maximal 3 Tage bei 37°C im Inkubator in den Gefäßen belassen. Erst kurz vor Aussaat der Zellen wurde die Gelatinelösung abgesaugt.

Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Dabei wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und für 5-10 Minuten mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (PAA) im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden im jeweiligen frischen Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 (bezogen auf die Ausgangszellzahl) in neue Zellkulturgefäße überführt.

2.2.2.2. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Um die Zellen langfristig lagern zu können, wurden die mit Trypsin abgelösten Zellen zentrifugiert (1300 rpm, 5 Minuten, RT), in Medium resuspendiert und mit 6%

Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, St. Louis, USA) versetzt. Anschließend wurde je 1 ml Zellsuspension in Kryoröhrchen (Corning Costar, Bodenheim) gegeben und in Isopropanol-gefüllten Einfriercontainern (Nalgene Labware, Rochester, USA) für mindestens 8 Stunden bei -80 °C eingefroren. Danach wurden die Röhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff, nach Möglichkeit in der Gasphase, bei -196 °C gelagert. Zur Rekultivierung wurden die Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in vorbereitete Zellkulturgefäße gegeben. Nach 12-24 Stunden wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

2.2.2.3. Transiente Herstellung retrovirushaltiger Überstände

Für die Transfektion wurden ecoFNX-Zellen verwendet, eine Zelllinie, die auf der humanen embryonalen Nierenzelllinie, 293T, basiert. Diese Verpackungszellen exprimieren stabil die viralen Proteine "gag" (*group antigenes*), "pol" (*Reverse Transkriptase*) und "env" (*envelope*, Hüllproteine).¹⁷⁵ Nach dem transienten Einbringen des Expressionsvektors in die Zellen können dann hochtitrige Überstände geerntet werden. Am Tag vor der Transfektion wurden pro Konstrukt 6×10^6 Zellen in einem Volumen von 10 ml auf einer 10 cm Platte ausgesät. Für die Transfektion wurden 400 μ l DMEM ohne Zusätze (DMEM, Gibco/BRL, Karlsruhe) mit 20 μ g DNA und 60 μ g FuGene®6 Transfektionsreagenz (Roche) nach 15-20 Minuten Inkubation bei RT auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Statt DMEM wurde nun Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco/BRL, Karlsruhe) verwendet, denn dieses besitzt eine größere Pufferkapazität und verringert somit die Gefahr einer Virusdegeneration durch einen zu sauren pH-Wert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde der virushaltige Überstand von den Platten abgenommen und, um einen zellfreien, virushaltigen Überstand zu generieren, mit einer Porengröße von 0,45 μ m filtriert (Filter der Firma Sartorius, Göttingen). Der gewonnene ecotrope Überstand wurde entweder frisch für die Transduktion von pg13-Zellen verwendet oder bei -80°C für den späteren Gebrauch eingefroren.

2.2.2.4. Erzeugung virushaltiger Überstände mit stabilen Produzentenzelllinien

Für die Transduktion von stabilen Produzentenzelllinien wurden pg13-Zellen¹⁷⁴ mit dem zuvor generierten ecotropen Virus infiziert. Am Tag vor der Infektion wurden $3,5 \times 10^4$ Zellen pro Well auf einer 6-Loch-Platte (6-Well) ausgesät. Am nächsten Tag wurden diese Zellen mit den virushaltigen Überständen transduziert, wobei 10 μ g/ml Protaminphosphat (Sigma) hinzugegeben wurde¹⁷⁶. Protaminphosphat ist ein Polykation, von dem gezeigt wurde, dass es die Transduktionseffizienz erhöht^{177,178}. Hierbei wird die initiale unspezifische Bindung zwischen Retrovirus und Zielzelle durch Polykationen erhöht, indem

diese die negative elektrostatische Abstoßung zwischen den jeweiligen Membranen aufheben. 24 Stunden nach der Transduktion wurde das Medium gewechselt. Enthielt das eingebrachten Zielgen ein Neomycinphosphotransferaseresistenzgen, so wurden die Zellen aus den Wells auf 10 cm Platten umgesetzt und mit DMEM + 0,8 mg/ml Neomycin (G418, Geneticin) versetzt. Handelte es sich um ein Puromycin-N-Acetyltransferase-Resistenzgen, wurde dem Medium Puromycin in einer Konzentration von 2-4 µg/ml zugegeben. Die Zellen wurden so lange passagiert, bis die Zellen auf der Kontrollplatte ohne Virus komplett abgestorben waren. Waren die Zellen anschließend 80% bis 90% konfluent, wurde anstelle von DMEM IMDM-Medium zur weiteren Kultivierung verwendet. 24 Stunden nach diesem Mediumwechsel wurde der virushaltige Überstand abgenommen, mit 0,45 µm Porengröße filtriert und dann entweder sofort eingesetzt oder bis zu seiner Verwendung aliquotiert bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden mit frischem IMDM versorgt und die Virusernte bis zu dreimal wiederholt. Master-Aliquots der Zellen wurden eingefroren und bei Bedarf rekultiviert, um erneut virushaltigen Überstand gewinnen zu können.

2.2.2.5. Infektion und Selektion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl adhärenente Zellen, als auch Suspensionszellen, infiziert und anschließend selektioniert. Das jeweilige Vorgehen soll in den folgenden beiden Kapiteln erläutert werden.

2.2.2.5.1 Infektion adhärenenter Zellen

Einen Tag vor der Infektion wurden die primären Fibroblasten oder Hamsterfibroblasten (V79-4/ IRS-3) abhängig von ihrer Proliferationsrate so ausgesät, dass sie am folgenden Tag 30-50% (für primäre Fibroblasten) bzw. 10% (für V79-4 und IRS-3) konfluent waren. Die Infektion erfolgte mit 5-6 ml Virusüberstand pro 10 cm-Platte. Zusätzlich wurden 10 µg/ml Protaminphosphat hinzugegeben und nach 24 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt. 48-72 Stunden nach der Infektion wurde dem Medium bei allen Konstrukten, die ein Neomycinphosphotransferaseresistenzgen tragen, G418 zugesetzt. Die Selektion der transduzierten Zellen erfolgte bis zum Absterben aller Zellen auf der nicht infizierten Kontrollplatte.

2.2.2.5.2 Infektion von Suspensionszellen

Nicht von allen zu testenden Patienten lagen primäre Fibroblasten vor, sodass ein Teil der Experimente mit lymphoiden Zelllinien der Patienten (*lymphoid cell lines*, LCL) durchgeführt wurde. Die LCL-Zellen wurden in 7-12 ml frischem Medium (RPMI) in Zellkulturflaschen expandiert. Im Unterschied zu anderen Zellen wird dem Medium bei der Kultivierung von LCL-Zellen nicht-hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum zugesetzt.

Für die Infektion der LCL-Zellen wurden zunächst 6-Loch-Platten mit $2-4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Retronektin (RetroNectin, TAKARA BIO INC, Japan, Artikelnummer: T100B, Konzentration $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) beschichtet und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit je 1 ml Virusüberstand pro Loch beladen und für 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt, indem der Virusüberstand vorsichtig abgesaugt und je 1 ml frischer Virusüberstand pro Loch hinzugegeben und wiederum für 25 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurden ca. 5×10^6 LCL-Zellen in ca. 4 ml RPMI-Medium/ Loch in die Löcher gegeben. An dieser Stelle wird dem RPMI Medium hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum zugesetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und bei allen Konstrukten, die ein Neomycinphosphotransferaseresistenzgen tragen, G418 bzw. bei allen Konstrukten, die ein Puromycin-N-Acetyltransferaseresistenzgen tragen, Puromycin zugesetzt. Die Selektion der transduzierten Zellen erfolgte ebenfalls bis zum Absterben aller Zellen in der nicht infizierten Kontrollflasche. Je nach Proliferationsrate wurden die Zellen 2 bis 3 Mal pro Woche passagiert.

2.2.2.5.3 Bestimmung der Virustiter

Der Virustiter ist ein Maß dafür, wie viele Viruspartikel pro Volumeneinheit im Zellkulturüberstand enthalten sind. Um die jeweiligen Titer der Konstrukte zu bestimmen, gibt es je nach übertragener cDNA verschiedene Ansätze.

Enthält das Plasmid als Markergen EGFP-cDNA, so lässt sich die Transduktionseffizienz bei diesen Konstrukten anhand des Anteils der grünleuchtenden Zellen in der Durchflusszytometrie bestimmen. EGFP, erstmals 1961 von Osamu Shimomura beschrieben, stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und fluoresziert nach Anregung mit blauem Licht (488 nm) grün¹⁷⁹.

Eine weitere Möglichkeit, um zu überprüfen, ob eine Transfektion bzw. Transduktion erfolgreich war, bietet die Fluoreszenzmikroskopie. Dabei wurde die EGFP-Expression mikroskopisch (Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen) beurteilt.

Enthält der Vektor als Markergen ein Neomycinphosphotransferase- oder Puromycin-N-Acetyltransferase-Resistenzgen, kann mit Hilfe dieser Resistenz eine Selektion der transduzierten Zellen erfolgen, wobei die nichttransduzierten Zellen infolge der Behandlung mit G418 bzw. Puromycin absterben.

Als Zielzellen für die Titration wurden HT1080-Zellen verwendet. Dafür wurden 35.000 HT1080-Zellen pro Loch auf einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit zunehmenden Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-6} -verdünnt, 1ml/Loch) der Überstände transduziert und jeweils $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ Protaminphosphat hinzugegeben. 24 Stunden nach der

Transduktion erfolgte ein Mediumwechsel. Weitere 24 Stunden später wurde dem Medium das Neomycinanalogon G418 in einer Konzentration von 0,6 bis 0,8 mg aktive Substanz pro ml Medium bzw. Puromycin in einer Konzentration von 2-4 μg aktive Substanz pro ml Medium hinzugesetzt. Die Selektion von G418-resistenten Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 7-10 Tagen, wobei das Medium inkl. G418 ein bis zwei Mal gewechselt wurde. Sobald alle nichttransduzierten Zellen einer Kontrollplatte abgestorben waren, erfolgte nach Methylenblaufärbung die Auswertung der Virustiter mittels Zählung der gewachsenen Kolonien. Der Titer errechnet sich aus der Verdünnung und der Anzahl der Kolonien. (Einheit: colony forming unit (CFU/ml)).

2.2.2.6. Behandlung der Zellen mit Mitomycin C

MMC ist ein natürlich vorkommendes Antibiotikum, welches Addukte an N-2 und N-7 am Guanin der DNA bildet und somit über eine DNA-Quervernetzung zum DNA-Schaden führt

120

2.2.2.6.1 MMC-Behandlung für die Zellzyklusanalyse

Nach Beendigung der Selektion wurden die Zellen so gesplittet, dass sie am darauffolgenden Tag ca. 20 bis 30 % konfluent waren. Nun wurden die Zellen mit MMC in einer Konzentration von 33 oder 45 nM versetzt und nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen bei adhärennten Zellen und 3 Tagen bei Suspensionszellen für die Zellzyklusanalyse geerntet. Für die Messung der Zellen mittels Durchflusszytometrie wurden die adhärennten Zellen zunächst gewaschen, mit Hilfe von Trypsin von den Kulturplatten gelöst und anschließend, wie auch die Suspensionszellen, zentrifugiert und mit 600 μl BSA-Lösung (1% ig in PBS) in neue Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt. Nach der Zentrifugation bei 7°C und 500 x g wurde das Sediment in 300 μl BSA-Lösung resuspendiert und anschließend erneut sedimentiert. Dieses Sediment wurde in 300 μl eiskaltes PBS aufgenommen und dazu unter ständigem Vortexen 800 μl 98 %iger Ethanol hinzugetropft. Die Lagerung der Zellkerne erfolgte für mind. 24h bei -20°C.

Für die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse wurden die Zellen sedimentiert (10 Minuten, 600 x g, 6°C), in 300 μl RNase-Lösung resuspendiert und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation (1000 x g) für 10 Minuten bei 6°C. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment gevortext. In Abhängigkeit der Größe des Sediments wurde es in 200-400 μl FACS-Puffer (0,5% BSA in PBS und 10 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid (PI; Sigma) aufgenommen weitere 15 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Für die Messung mit dem FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden die Proben in FACS-Röhrchen (BD Falcon) überführt. Es wurden

10.000 bis 100.000 Ereignisse mit maximal 400 events/sec aufgenommen. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „CellQuest“ (Becton Dickinson) und anschließender Analyse dieser Daten mit dem Programm Modfit LT (Verity Software House).

2.2.2.6.2 MMC-Behandlung für den Survival-Test

Eine weitere Methode zur Erfassung der Hypersensitivität gegenüber MMC, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist der sog. Survival-Test.

Die zu testenden LCL-Zellen wurden mit MMC in sechs unterschiedlichen Konzentrationen (3,3 nM, 10 nM, 33,3 nM, 100 nM, 333,3 nM und 1000 nM) versetzt und anschließend nach 4 bis 6 Tagen Inkubation bei 37°C durchflusszytometrisch der Anteil toter bzw. lebender Zellen bestimmt ¹⁵⁷.

Dazu wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei RT und 1500 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Pellet in PBS aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Zum Färben der Zellkerne wurde anschließend wiederum der Überstand abgesaugt und ca. 300 µl PBS mit Propidiumiodid in einer Konzentration von 0,5 mg/ml hinzugegeben.

In der Durchflusszytometrie wurde dann der Anteil lebender Zellen ermittelt und anschließend graphisch dargestellt. Zum einen lässt sich im Vergleich zu den Zellen einer gesunden Kontrollperson der verminderte Anteil lebender Zellen mit steigender MMC-Konzentration zeigen. Zum anderen kann diese Untersuchung zeigen, ob dieser verminderte Anteil lebender Zellen durch das Einbringen von Genen erhöht werden kann und im Falle der Komplementation dem Anteil lebender Zellen der Kontrolle gleicht.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierungen

Zuerst wurden die Plasmide S91IEG, S91IN und S91EGIN kloniert, die bei der retroviralen Komplementationsanalyse als Kontrollen bzw. als Ausgangsplasmide für weitere Klonierungen dienen.

S91IEG, S91EGIN und S91IN

Für die Klonierung des Plasmids S91IEG wurde aus dem bereits in der Arbeitsgruppe vorliegenden Plasmid SFbeta91 über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Not*I der 91er-*leader* in das Plasmid S11IEG3 kloniert. Ebenfalls mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Not*I wurde der S91-*leader* aus dem zuvor klonierten Plasmid S91IEG herausgeschnitten und über die gleichen Restriktionsenzyme in das schon vorhandene Plasmid S11EGIN kloniert.

Für die Herstellung des Plasmids S91IN wurde die EGFP-Kassette aus dem Plasmid S91EGIN mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bam*HI herausgeschnitten und die entstandenen Enden religiert.

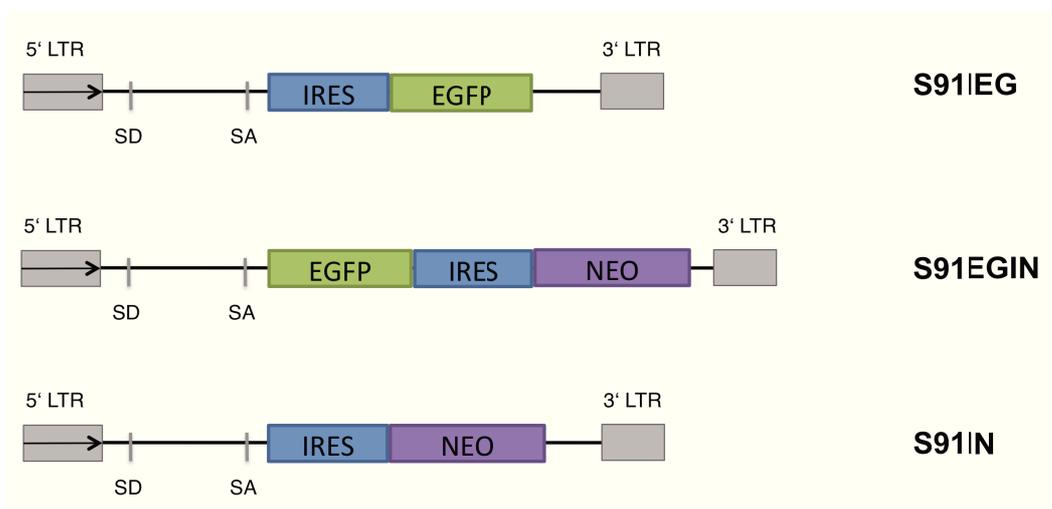


Abb. 8: Kontroll-Vektoren

Schematische Darstellung der Kontrollvektoren S91IEG3, S91EGIN und S91IN.
(SD = *splicedonor*, SA = *spliceacceptor*)

Die klonierten Plasmide wurden zuerst über einen Restriktionsverdau kontrolliert und anschließend sequenziert.

S91ABRIN und S91RAPIN

Die Plasmide S91ABRIN und S91RAPIN wurden über einige Zwischenschritte kloniert. Im ersten Schritt wurden aus den Ausgangsplasmiden SFB-ABRAXAS-pIRES2-EGFP und SFB-RAP80-pIRES2-EGFP mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *SaII* bzw. *EcoRI* und *BamHI* die humanen Gene *ABRAXAS* und *RAP80* herausgeschnitten und über die jeweils gleichen Restriktionsenzyme in das Plasmid S91IEG kloniert. So entstanden die beiden Plasmide S91ABRIEG und S91RAPIEG. Da die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren ein Neomycinphosphotransferaseresistenzgen für die spätere Selektion benötigen, wurden die Plasmide S91ABRIN und S91RAPIN kloniert.

Aufgrund kompatibler Restriktionsschnittstellen wurde die IRES-NEO-Kassette aus dem bereits vorliegenden Plasmid S91FGIN3 mit Hilfe von *AvrII* und *NdeI* herausgeschnitten und über die gleichen Enzyme in das Plasmid S91ABRIEG kloniert. Für die Klonierung des Plasmid S91RAPIN wurde über die Restriktionsenzyme *SacII* und *AvrII* das humane *RAP80*-Gen herausgeschnitten und mit Hilfe der gleichen Enzyme in das Plasmid S91FGIN3 kloniert.

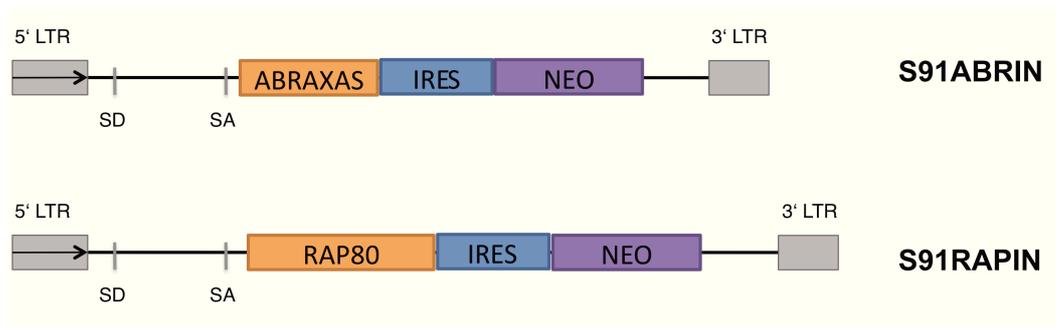


Abb. 9: Expressionsvektoren für *ABRAXAS* und *RAP80*

S91ABRIN enthält das humane Gen *ABRAXAS*, mit einer Größe von 1230 bp. S91RAPIN enthält das humane Gen *RAP80*, 2160 bp.

Diese Plasmide wurden ebenfalls zunächst über eine Restriktionsanalyse und anschließend über eine Sequenzierung auf das Vorhandensein der gewünschten Genabschnitte untersucht. Für den Nachweis der humanen Gene *ABRAXAS* und *RAP80* wurden Primer verwendet, die jeweils am Anfang und Ende der Gene binden. Außerdem wurde mit Hilfe der jeweiligen Primer die 91er-Sequenz und die IRES-NEO-Kassette nachgewiesen.

3.2. Titerbestimmung

Um eine effiziente Transduktion und somit das effektive Einbringen des Kandidatengens in die Zelle sicherzustellen, wurde zunächst geprüft, wie viele Viruspartikel pro Volumeneinheit im Virusüberstand enthalten sind. Die Titer der virushaltigen Überstände wurden, wie in Kapitel 2.2.2.5.3. beschrieben, bestimmt und in CFU/ml angegeben (CFU = colony forming unit).

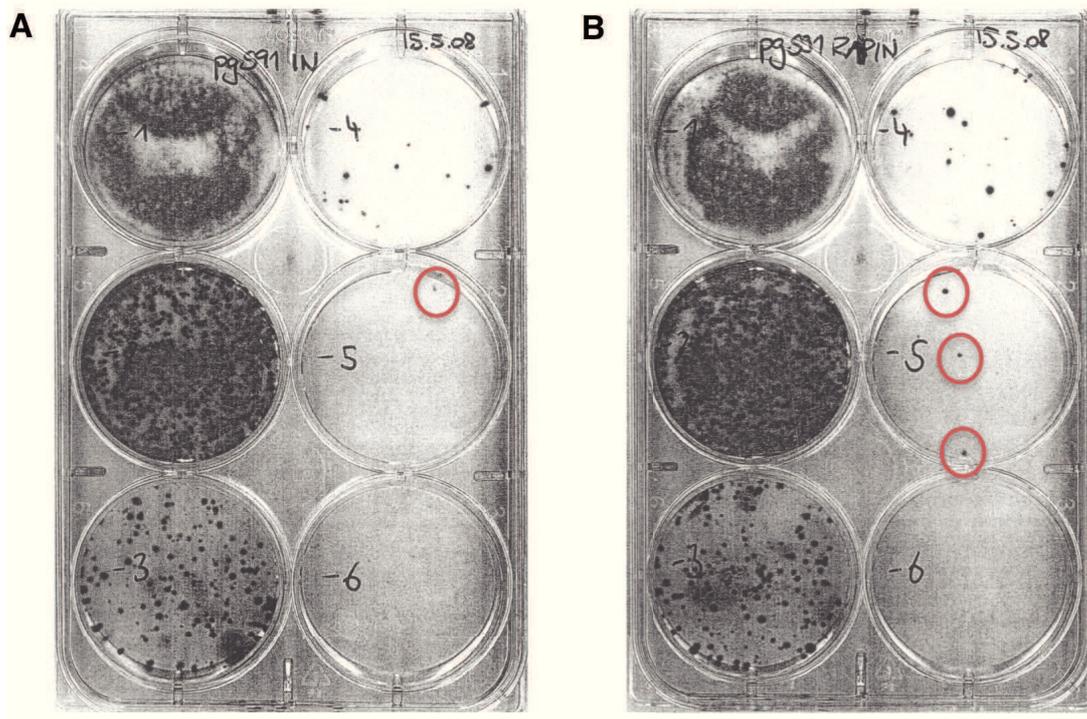


Abb. 10: Exemplarische Darstellung der Titerplatten

Mit Methyleneblau gefärbte, transduzierte HT1080 Zellen bilden die Grundlage für die Bestimmung des Virustiters in CFU/ml. Nach dem Zählen der gewachsenen Zellkolonien und Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors des Virusüberstands ergaben sich in A) ein Virustiter von 1×10^5 CFU/ml (eine Kolonie im Well mit dem Verdünnungsfaktor 10^5) und in B) ein Virustiter von 3×10^5 CFU/ml (drei Kolonien im Well mit dem Verdünnungsfaktor 10^5).

Tabelle 3: Die Titer der NEO-Konstrukte

Der Virustiter wurde aus der Anzahl der gewachsenen Zellkolonien errechnet, wobei der Verdünnungsfaktor des Virusüberstands berücksichtigt werden musste.

Retrovirus	Virustiter (CFU/ml)
S91 IN	1×10^5
S91 EGIN	2×10^5
S91ABRIN	3×10^2
S91RAPIN	3×10^5

3.3. Retrovirale Komplementationsanalysen

In dieser Arbeit wurden analog des in Kapitel 2 beschriebenen Typisierungsprotokolls Fibroblasten oder LCL von 14 Patienten mit FA aber bisher unbekannter Komplementationsgruppe mit den Kandidatengen S11RAIN, S11RBIN, S11RCIN, S11RDIN, S11XRCC2IN, S11XRCC3IN, S91ABRIN und S91RAPIN sowie den Kontrollvektoren S91IN, S11IN und S91EGIN infiziert.

Nach der Infektion wurden die Fibroblasten für drei Tage, die LCL für zwei Tage mit MMC in Konzentrationen zwischen 33 nM und 45 nM inkubiert. Anschließend wurde der relative DNA-Gehalt im Durchflusszytometer (FACSCalibur) gemessen und mit Hilfe des Programms CellQuestPro aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm ModFit^{LT} (Verity Software House).

Gesucht wurde der positive Fall, bei dem das in die Zelle gebrachte Kandidatengen den bestehenden Defekt, d.h. in diesem Fall die Hypersensitivität gegenüber MMC und damit den G₂/M-Arrest aufhebt. Erfasst wird dieser Erfolg über die prozentuale Differenz zwischen dem Median der Werte der G₂/M-Arreste der Kontrollen und dem G₂/M-Arrest der jeweiligen Konstrukte. Berechnet wurde der Median der jeweiligen Kontrollen mit Hilfe des Programms SPSS.

Im folgenden werden exemplarisch Messdaten der Patienten Nr. 1 und Nr. 9, sowie von Patient Nr. 8 vorgestellt. Abschließend werden die wesentlichen Enddaten von allen Patienten in einem Diagramm zusammenfassend erläutert.

Patient Nr. 1

Für die retrovirale Komplementationsanalyse bei Patient Nr. 1 wurden primäre Fibroblasten verwendet. Während der Infektion und anschließenden Selektion wurden keine Besonderheiten im Wachstumsverhalten beobachtet.

Tabelle 4: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse (Patient Nr. 1)

G₀/G₁ (%): prozentualer Anteil der Zellen, die sich in der G₀/G₁-Phase befinden. G₂/M (%): prozentualer Anteil der Zellen, die sich in der G₂/M-Phase befinden. S (%): prozentualer Anteil der Zellen, die sich in der S Phase befinden.

getestetes Gen	MMC +/-	G ₀ /G ₁ (%)	G ₂ /M (%)	S (%)
S91IN	+	35	62	4
S91IN	-	93	4	4
S11IN	+	46	54	0
S11IN	-	90	4	6
S91EGIN	+	36	64	0
S91EGIN	-	94	2	4
S91ABRIN	+	38	62	0
S91ABRIN	-	96	0	4
S91RAPIN	+	41	59	0
S91RAPIN	-	87	8	4
S11RAIN	+	45	55	0
S11RBIN	+	38	62	0
S11RCIN	+	42	58	0
S11RDIN	+	40	60	0
S11XRCC2IN	+	42	58	0
S11XRCC3IN	+	40	60	0

Die prozentualen Anteile der Zellen im G₂/M-Arrest der mit den Kontrollvektoren S91IN, S11IN und S91EGIN infizierten Zellen bildeten jeweils die Grundlage für die Kontrolle (in Tabelle 4 grau hinterlegt). Demnach wurden Mittelwert, Median und Standardabweichung dieser Werte für jeden Patienten mit Hilfe des Programms SPSS berechnet (Daten hier nicht gezeigt).

Der prozentuale Anteil von Zellen in der G₂/M-Phase nach Behandlung mit MMC ist deutlich höher, als der Anteil in unbehandelten Zellen, was hier für alle getesteten Kandidatengene zutrifft.

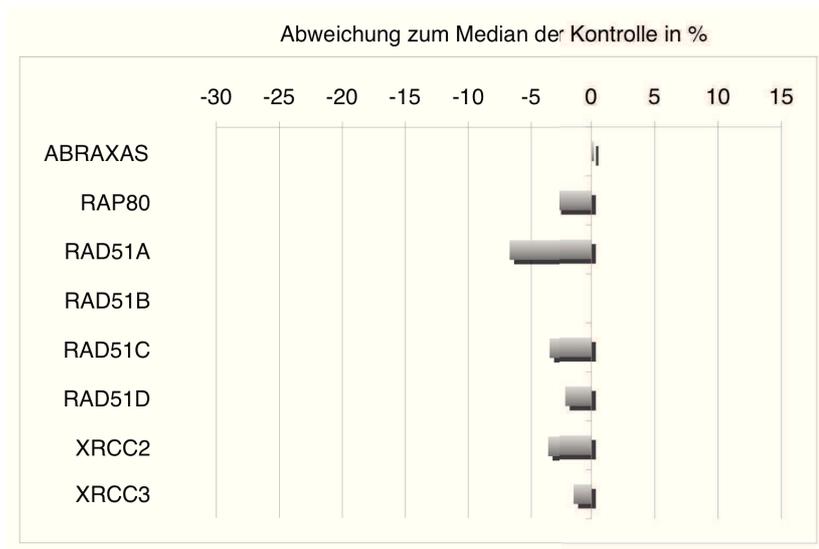


Abb. 11: Abweichung des G₂/M-Arrests zur Kontrolle (Patient Nr. 1)

Hier wird die Abweichung des G₂/M-Arrests der mit den Kandidatengenen transduzierten Zellen zum Median der G₂/M-Arreste der mit einem Kontrollvektor transduzierten Zellen dargestellt. Die Abweichung lag zwischen 0 und -7, sodass nicht von einer Komplementation durch eines der Kandidatengene ausgegangen werden kann.

Die Zellzyklusanalysen der mit den Kandidatengenen infizierten Zellen von Patient Nr. 1 zeigen, dass sich jeweils mindestens 55 % der MMC-behandelten Zellen im G₂/M-Arrest befinden, das heißt, es ist bei keinem der eingebrachten Kandidatengene von einer Komplementation auszugehen.

Die Komplementationsanalysen der Zellen von Patient Nr. 2 bis 7 sowie Nr. 9 bis 14 zeigen ähnliche Ergebnisse, wie die von Patient Nr. 1 vorgestellten, daher soll hier nicht im Einzelnen darauf eingegangen werden.

Patient Nr. 9

In der folgenden Abbildung ist beispielhaft die Auswertung der retroviralen Komplementationsanalyse von Patient Nr. 9 dargestellt. Bei allen mit MMC behandelten Zellen liegt der Anteil von Zellen in der G₂/M-Phase bei mindestens 30 %. In diesem Fall wurde die MMC-Hypersensitivität durch Einbringen der Kandidatengene also nicht aufgehoben, d.h. es wurde keine Komplementation vermittelt.

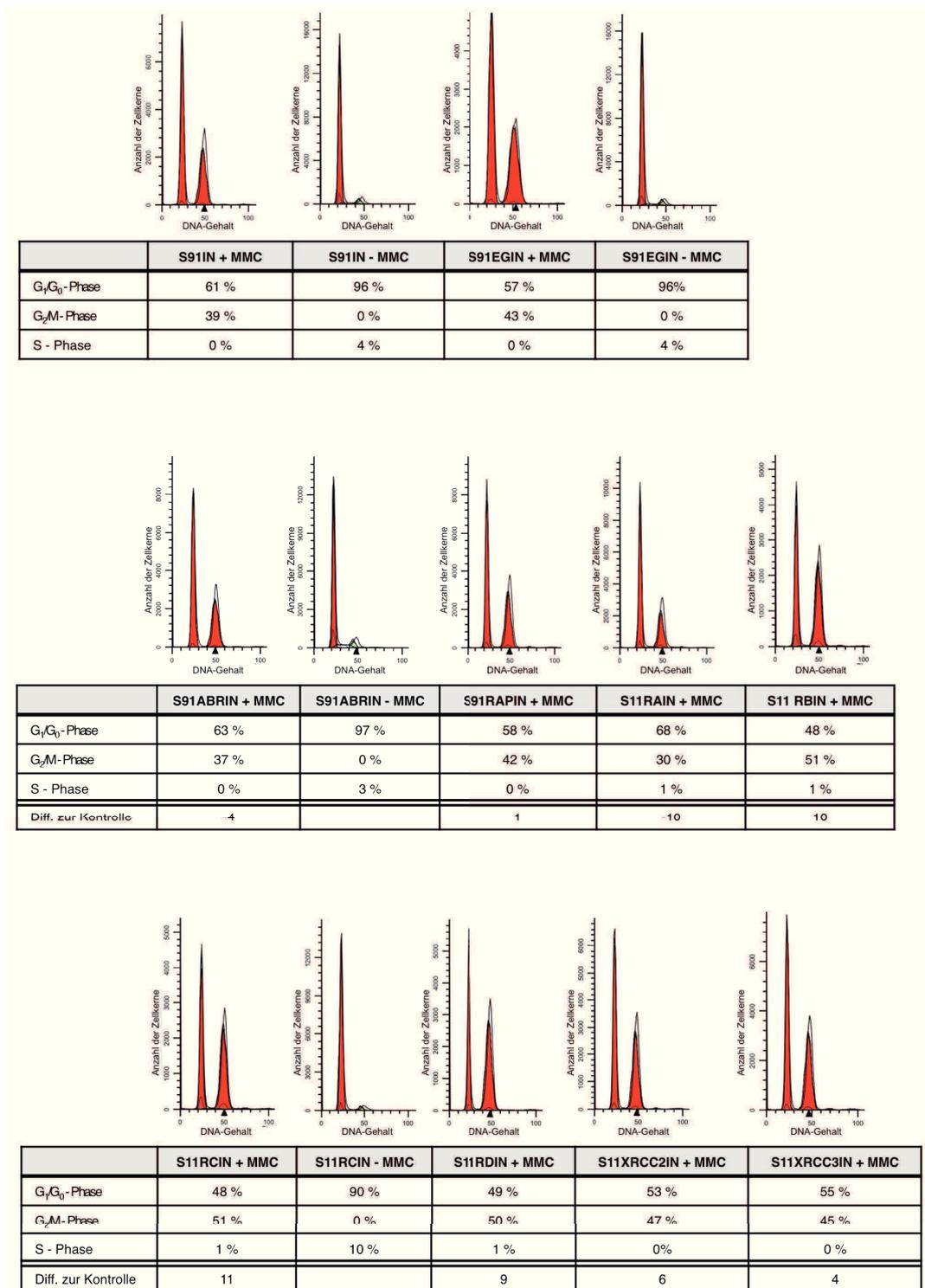


Abb. 12: Retrovirale Komplementationsanalyse (Patient Nr. 9)

Exemplarisch werden hier die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zellen (Fibroblasten) von Patient Nr. 9 nach Auswertung mit dem Programm ModFit^{LT} dargestellt. Die abweichende Skalierung der y-Achsen ist bei der Betrachtung der Diagramme zu berücksichtigen. Nach der Infektion mit den Kandidatengenen wurden die Fibroblasten einer MMC-Konzentration von 33 nM ausgesetzt und anschließend ihr Zellzyklusverhalten im Durchflusszytometer analysiert. Der erste Peak repräsentiert jeweils alle Zellen, die sich in der G₀/G₁-Phase befinden. Der zweite Peak zeigt den Anteil der Zellen, die sich in der G₂/M-Phase befinden. Deutlich wird hier der größere Anteil von MMC behandelten Zellen in der G₂/M-Phase, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, bei denen nahezu kein G₂/M-Arrest nachzuweisen ist. Keines der eingebrachten Kandidatengene konnte die MMC-Hypersensitivität und damit den G₂/M-Arrest aufheben.

Zusammenfassung Patient Nr. 1 bis 14

Zusammenfassend sollen hier die wichtigsten Daten der Messreihen aller Patienten in einem Punktdiagramm vorgestellt werden. Dargestellt ist jeweils die prozentuale Abweichung zum Median der G₂/M-Arreste der Kontrollen.



Abb. 13: Abweichung des G₂/M-Arrests zur Kontrolle (Patient Nr. 1-14)

Auf der X-Achse sind alle untersuchten Kandidatengene aufgeführt, auf der Y-Achse die jeweilige Abweichung der Höhe des G₂/M-Arrests der mit den Kandidatengenen transduzierten Zellen zum G₂/M-Arrest der mit Kontrollvektoren transduzierten Zellen.

Bei einigen Patienten fällt auf, dass die mit dem Kandidatengen transduzierten Zellen auf die Behandlung mit MMC mit einem stärkeren G₂/M-Arrest reagieren als die Kontrolle (positives Vorzeichen). Ursache dafür kann eine Toxizität aufgrund einer Überexpression des Kandidatengens in der Zielzelle sein (siehe auch Kapitel 3.4) ⁵².

Aufgrund von Vordaten, die in der Arbeitsgruppe erhoben wurden, weist eine negative Abweichung von > 20 % auf eine eventuelle Korrektur bzw. Komplementation hin. Ist dies der Fall sollte die Komplementationsanalyse wiederholt und weitere Untersuchungen eingeleitet werden.

Die Messungen bei Patient Nr. 8 zeigten eine Korrektur des Zellzyklusarrestes von fast 30 % gegenüber den Negativkontrollen, sodass wir davon ausgingen, dass das in die Zellen

gebrachte *RAD51C*-Gen den Defekt der Zellen des Patienten korrigiert und somit die Hypersensitivität gegenüber MMC aufgehoben hat. Dieser spezielle Fall wird im Kapitel 3.5. „Patient Nr. 8“ ausführlich dargestellt.

Bei den mit *ABRAXAS* und *XRCC2* transduzierten Zellen von Patient Nr. 13 fällt ebenfalls eine hohe negative Abweichung um 20 % auf, sodass auch bei diesem Patienten weitere Messungen durchgeführt wurden, die den Verdacht auf eine Komplementation durch *ABRAXAS* oder *XRCC2* jedoch nicht bestätigten. Inzwischen hat man den Gendefekt bei Patient Nr. 13 identifiziert (Komplementationsgruppe FA-D2), sodass die negative Abweichung vermutlich durch die oben beschriebene Toxizität durch Überexpression zustande kam.

Das gleiche Phänomen ist bei den mit *ABRAXAS* transduzierten Zellen von Patient Nr. 12 und 14 zu beobachten, bei denen ebenfalls ein vergleichsweise geringer G_2/M -Arrest nach Exposition mit MMC gemessen wurde. Auch bei diesen beiden Patienten zeigten wiederholte Messungen keine Komplementation, was die Arbeitshypothese, dass die Überexpression von *ABRAXAS* in den Zielzellen verstärkt zu Toxizität führt, weiter bestätigte.

3.4. Problematik *ABRAXAS*

3.4.1. Zellwachstum nach Transduktion

Die Kultivierung von S91ABRIN transduzierten Zellen gestaltete sich bei zwei Patienten schwierig. Dabei handelte es sich einmal um primäre Fibroblasten und einmal um eine lymphoide Zelllinie. Die Wachstumsrate war im Vergleich zu den mit den anderen Kandidatengen transduzierten Zellen sehr viel langsamer, außerdem starben viele Zellen ab. Bei den restlichen Patientenzellen hingegen wurde kein wesentlicher Unterschied im Wachstumsverhalten der transduzierten Zellen festgestellt.

3.4.2. Proteinexpression

Da in der Titerbestimmung für S91ABRIN die geringsten Titer erzielt wurden (siehe Tabelle 3) und um die Expression von *ABRAXAS* nach Transduktion mit dem retroviralen Vektor S91ABRIN zu testen, wurde ein direkter Proteinnachweis mittels Westernblot durchgeführt. Dazu wurde eine Hamsterfibroblastenzelllinie (V79-4) mit S91ABRIN und dem Kontrollvektor S91IN transduziert. Die Durchführung erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.1.9. beschriebenen Protokoll.

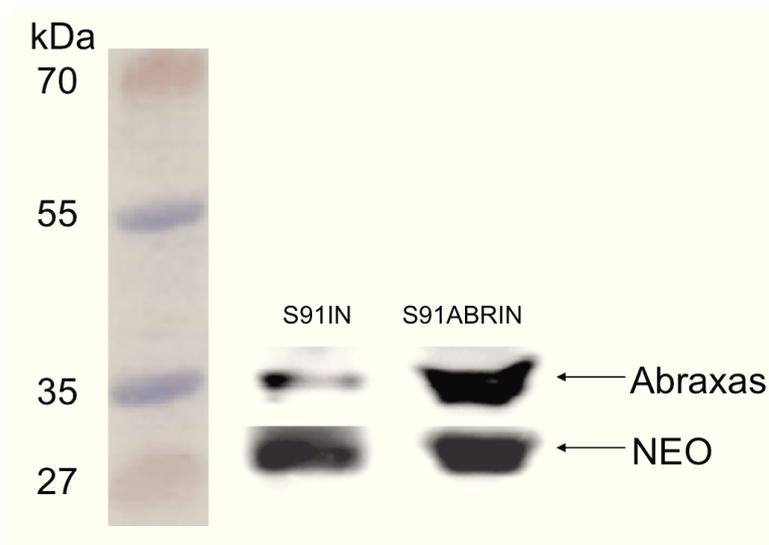


Abb. 14: Westernblot – Nachweis von ABRAXAS

Im Westernblot der mit S91ABRIN transduzierten Hamsterfibroblasten (V79-4) lässt sich mit Hilfe des polyklonalen ABRAXAS-Antikörpers vom Kaninchen die Expression des Proteins nachweisen. Zur Kontrolle wurden die Hamsterfibroblasten (V79-4) mit dem Kontrollvektor S91IN transduziert. Zur Normierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde ein Anti-NEO-Antikörper eingesetzt. Das NEO-Protein wird in vergleichbaren Mengen exprimiert.

Das detektierte Protein zeigt die erwartete Größe von 38 kD, was durch den Vergleich mit dem Größenstandard verdeutlicht wird. Es sieht so aus, als ob der Antikörper mit dem endogenen Protein ABRAXAS in den Hamsterfibroblasten reagiert. Die Überexpression des viral eingebrachten menschlichen Proteins ist jedoch eindeutig.

3.5. Patient Nr. 8

In der folgenden Tabelle sind die Daten der ersten Messreihe zu Patient Nr. 8 dargestellt. Für die Komplementationsanalyse wurden primäre Fibroblasten verwendet.

Tabelle 5: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse (Patient Nr. 8)

G₀/G₁ (%): prozentualer Anteil der Zellen, die sich in der G₀/G₁-Phase befinden. G₂/M (%): prozentualer Anteil der Zellen, die sich in der G₂/M-Phase befinden. S (%): prozentualer Anteil der Zellen, die sich in der S Phase befinden.

getestetes Gen	MMC +/-	G ₁ /G ₀ (%)	G ₂ /M (%)	S (%)
S91IN	+	67	29	4
S91IN	-	78	0	22
S91EGIN	+	61	35	3
S91EGIN	-	68	6	26
S91ABRIN	+	59	35	6
S91RAPIN	+	60	36	4
S11RAIN	+	69	28	3
S11RBIN	+	58	40	2
S11RCIN	+	83	4	13
S11RDIN	+	65	35	0
S11XRCC2IN	+	68	32	0
S11XRCC3IN	+	55	45	0

Bei den Auswertungen der transduzierten Zellen von Patient 8 fiel ein nahezu fehlender G₂-Arrest (4 %, in Tabelle 5 grau hinterlegt) bei den mit RAD51C transduzierten Zellen auf. Die Zellen, die mit den anderen Kandidatengenen transduziert wurden, zeigten nach Behandlung mit MMC alle ähnlich hohe prozentuale Anteile von Zellen in der G₂/M-Phase (im Mittel 36 %). Zunächst wurde daraufhin die Komplementationsanalyse mit den Zellen von Patient Nr. 8 wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen und Versuchsartefakte auszuschließen. Die Werte konnten mit nur geringen Abweichungen mehrfach reproduziert werden.

Die Abweichung des G₂/M-Arrest zur Kontrolle bei den *RAD51C*-transduzierten Zellen von Patient Nr. 8 ist im nachfolgenden Balkendiagramm besonders deutlich zu sehen:

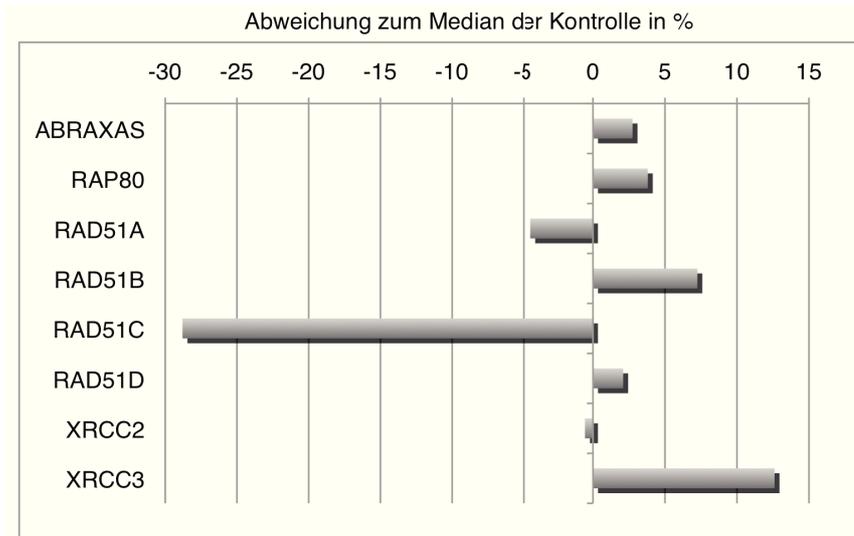


Abb. 15: Abweichung des G₂-Arrest zur Kontrolle (Patient Nr. 8)

Ergebnisse der ersten Messreihe der Zellen von Patient Nr. 8. Die Abweichung des G₂/M-Arrest zur Kontrolle bei den mit *RAD51C* transfizierten Zellen von Patient 8 beträgt 29 % und liefert damit einen Hinweis auf eine mögliche Komplementation.

Die folgende Abbildung zeigt die Daten der zweiten Messreihe der Zellen von Patient Nr. 8. Der Zellzyklusarrest, der auch hier bei den mit *ABRAXAS*, *RAP80*, *RAD51A*, *RAD51B*, *RAD51D*, *XRCC2* und *XRCC3* transduzierten Zellen deutlich zu sehen ist, wird durch die eingebrachte Kopie des intakten (wildtypischen) *RAD51C*-Gens korrigiert.

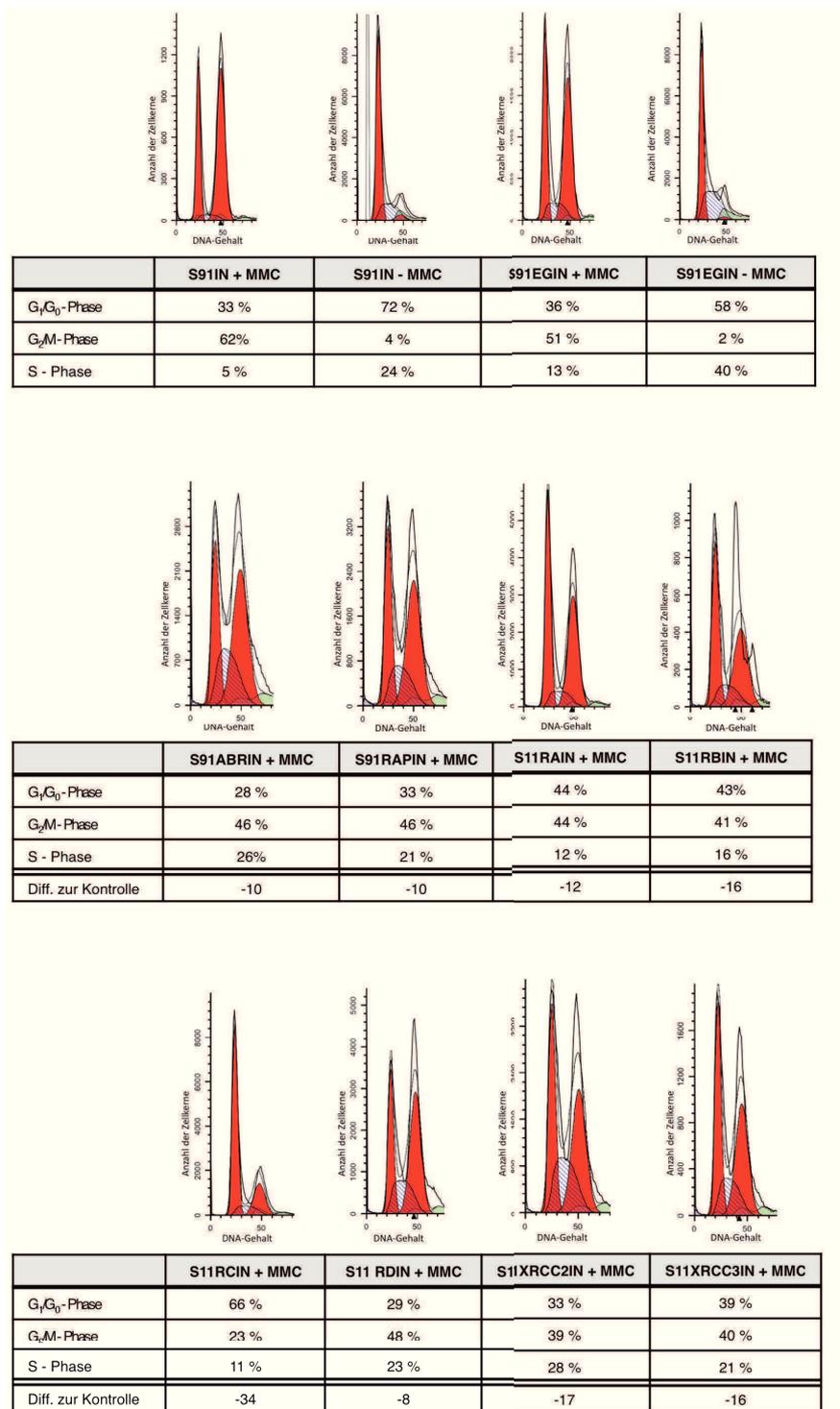


Abb. 16: Retrovirale Komplementationsanalyse (Patient Nr. 8)

Dargestellt werden hier die Ergebnisse einer Zellzyklusanalyse der Zellen (Fibroblasten) von Patient Nr. 8 nach Auswertung mit dem Programm ModFit^{LT}. Die abweichende Skalierung der y-Achsen ist bei der Betrachtung der Diagramme zu berücksichtigen. Nach der Infektion mit den Kandidatengenen wurden die Fibroblasten einer MMC-Konzentration von 33 nM ausgesetzt und anschließend ihr Zellzyklusverhalten im Durchflusszytometer analysiert. Der erste Peak repräsentiert jeweils alle Zellen, die sich in der G₀/G₁-Phase befinden. Der zweite Peak zeigt den Anteil der Zellen, die sich in der G₂/M-Phase befinden.

Auffällig ist hier der im Vergleich geringe Anteil von Zellen in der G₂/M-Phase bei den mit S11RCIN transduzierten Zellen. Durch retroviralen Transfer von *RAD51C* scheint hier die MMC-Hypersensitivität aufgehoben bzw. deutlich verringert worden zu sein.

3.5.1. Survival-Test

In unserer Arbeitsgruppe führten wir weitere funktionelle Untersuchungen mit dem *RAD51C*-Wildtypgen bzw. dem mutierten *RAD51C*-Gen (773G>A) durch. Dafür wurde mit einer lymphoiden Zelllinie von Patient Nr. 8 der in Kapitel 2.2.2.6.2. beschriebene Survival-Test durchgeführt.

Die LCL-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor S11IP, dem *RAD51C*-Wildtypgen enthaltenden Vektor S11RCIP und einem Vektor, der die beschriebene Mutation trug (S11RCmut773IP), transduziert. Als Selektionsmarker wurde hier ein Puromycin-N-Acetyltransferase-Resistenzgen verwendet.

Mit Hilfe des Survival-Tests sollte herausgefunden werden, ob die Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch führt, für den Phänotyp des Patienten, hier die Hypersensitivität gegenüber MMC, verantwortlich ist.

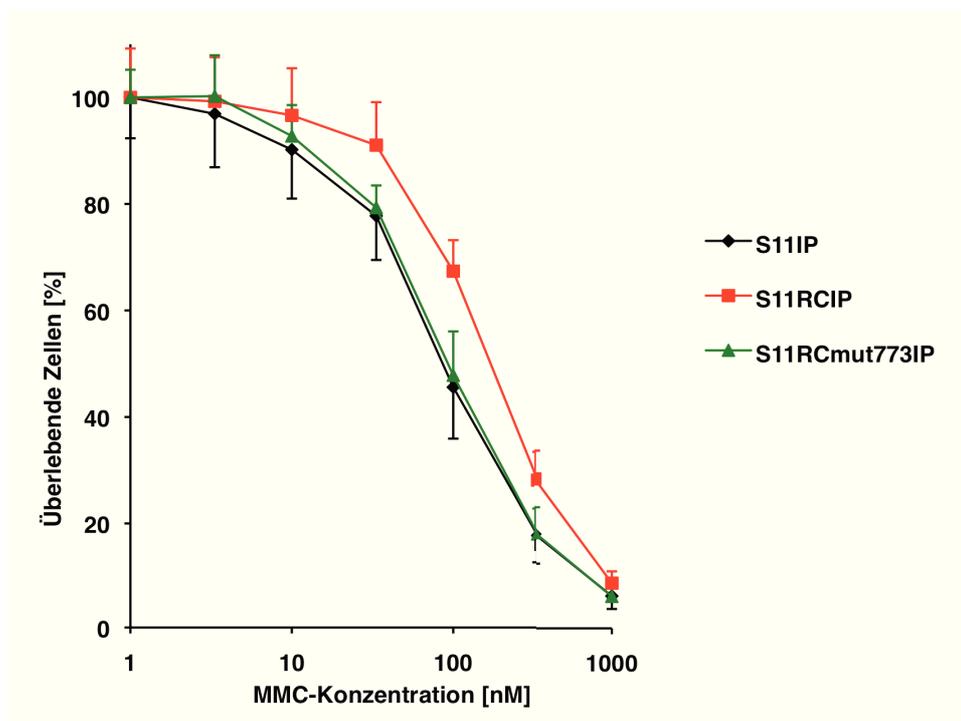


Abb. 17: Survival-Test der LCL von Patient Nr. 8

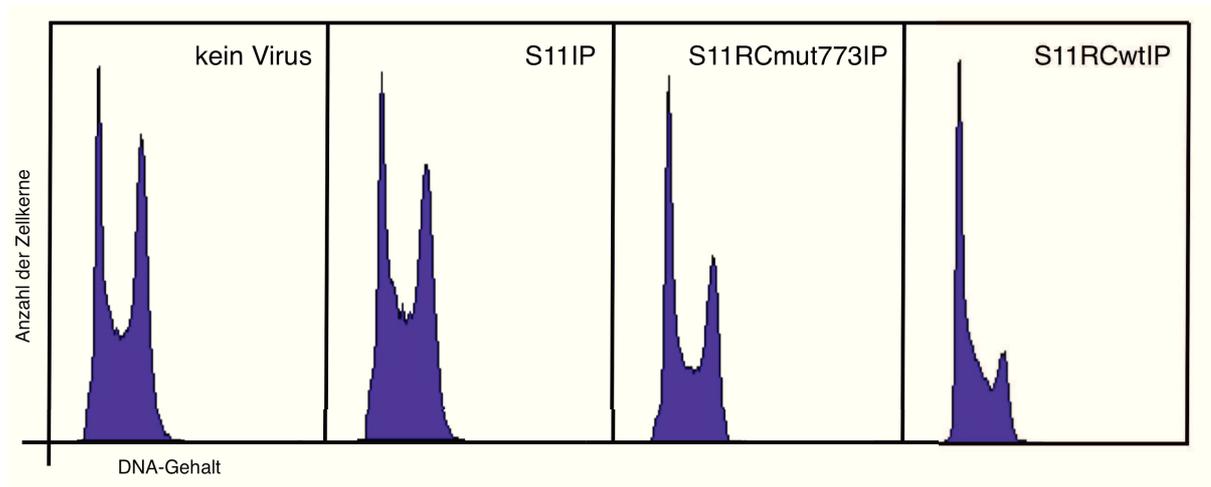
X-Achse: MMC-Konzentration in nM. Y-Achse: Anteil überlebender Zellen in %. Die schwarz gefärbte Kurve stellt das Überleben der Zellen dar, die mit dem Kontrollvektor S11IP transduziert wurden. Die rot gefärbte Kurve zeigt den Anteil der überlebenden Zellen, die mit dem *RAD51C*-Wildtypgen transduziert wurden. Grün dargestellt ist hier die Überlebenskurve der Zellen, die mit dem mutierten *RAD51C*-Gen transduziert wurden.

Die Zellen, die mit dem *RAD51C*-Wildtypgen transduziert wurden, zeigen erwartungsgemäß eine erhöhte Rate an überlebenden Zellen bei steigenden MMC-Konzentrationen, da das Wildtypgen den Gendefekt komplementiert. Die transduzierten Zellen mit der bei Patient Nr. 8 gefundenen Mutation (G773A) im *RAD51C*-Gen zeigen, wie die Kontrolle, keine erhöhte Resistenz gegenüber MMC. Diese Untersuchung zeigt, dass die in der Sequenzierung gefundene Mutation sich tatsächlich auch phänotypisch auswirkt.

3.5.2. Retrovirale Komplementationsanalyse in IRS-3 Zellen

In unserer Arbeitsgruppe wurde im Westernblot von *RAD51C*, Wildtyp und Mutante, eine stabile Proteinexpression sowohl endogen als auch überexprimiert, nachgewiesen (Daten hier nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Dissertation wurde deshalb außerdem eine funktionelle Testung des Wildtypgens und der Mutante in *RAD51C* defizienten IRS-3 Hamsterfibroblasten durchgeführt. Die IRS-3 Zelllinie hat eine „splice-site“ Mutation im *RAD51C*-Gen, die zum Übergehen von Exon 6 führt¹⁷¹.

Die IRS-3 Zellen wurden analog dem in Kapitel 2.2.2.5.1 beschriebenen Protokoll für die Infektion adhärenter Zellen mit den Vektoren S11RCIP, S11RCmut773IP sowie dem Kontrollvektor S11IP infiziert, mit MMC inkubiert und anschließend das Zellzyklusverhalten im FACS analysiert. In Abbildung 19 ist zu erkennen, dass der durch die Hypersensitivität gegenüber MMC verursachte G₂/M-Arrest in den IRS-3 Zellen durch die Überexpression des *RAD51C*-Wildtyp-Gens deutlich verringert wird. Wohingegen das Einbringen des mutierten *RAD51C*-Gens nur zu einer mäßigen Verringerung des G₂/M-Arrests führt, was die Arbeitshypothese, dass es sich bei der in Patient Nr. 8 gefundenen Mutation im *RAD51C*-Gen um eine hypomorphe Mutation handelt, bestätigt.

**Abb. 18: Zellzyklusanalyse IRS-3**

Dargestellt ist die Zellzyklusanalyse von IRS-3 Zellen nach Exposition mit MMC. Auf der X-Achse wird der DNA-Gehalt, auf der Y-Achse die Anzahl der Zellkerne abgebildet. Bei der Zellzyklusanalyse der unbehandelten Hamsterzellen (kein Virus) und den mit dem Kontrollvektor S11IP infizierten Zellen befinden sich annähernd gleich viele Zellen in der G₁- bzw. in der G₂/M-Phase. Eine deutliche Abnahme des G₂/M-Arrests ist bei den mit S11RCwtIP infizierten Zellen zu erkennen. Der G₂/M-Arrest der mit S11RCmut773IP infizierten Zellen hingegen ist schwächer ausgeprägt als bei den Kontrollen, aber noch deutlich höher als bei den mit dem Wildtypgen infizierten Zellen.

4. Diskussion

Die Methodik, die in dieser Arbeit bei der Zellzyklusanalyse der Patientenzellen angewendet wurde, wurde erstmals 1982 von Dutrillaux et al. beschrieben²² und ist inzwischen eine etablierte Methode in der FA-Forschung. 1995 wurde gezeigt, dass die FA-Diagnostik über die Chromosomenbrüchigkeit und die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus gleiche Ergebnisse erzielen¹⁸¹. In den letzten Jahren hat die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus, als schnellere und einfachere Methode, in Deutschland immer mehr an Bedeutung gewonnen und wird zur FA-Diagnostik in Hautfibroblasten oder lymphoiden Zelllinien angewendet¹⁵⁶. Stellt sich im Rahmen der Zellzyklusanalyse heraus, dass die Zellen des Patienten einen für FA typischen Phänotyp aufweisen, sich dieser aber durch keines der bekannten FA-Gene *in vitro* korrigieren lässt, so sind die Zellen des Patienten für experimentelle Arbeiten, wie im Rahmen dieser Dissertation, von besonderem Interesse.

4.1. Komplementationsanalysen

Bei der Bestimmung der Virustiter mittels Methylenblaufärbung transduzierter HT1080-Zellen fiel ein Unterschied zwischen S91ABRIN und S91RAPIN auf. Der Titer von S91ABRIN war mit 3×10^2 CFU/ml um drei Zehnerpotenzen schlechter als die Titer der anderen Vektoren. Die schlechten Titer sind wahrscheinlich auf eine erhöhte Toxizität durch die Überexpression von *ABRAXAS* in der Zelllinie zurückzuführen. Um die Transduktion von *ABRAXAS* in die Zielzelle zu beweisen, wurde daraufhin die Expression auf Proteinebene im Westernblot erfolgreich nachgewiesen (siehe Kapitel 3.4, Abbildung 14).

Im Rahmen der Kultivierung bzw. Expansion der transduzierten Zellen fiel außerdem auf, dass die mit *ABRAXAS* transduzierten Zellen im Anschluss an die G418-Selektion ein deutlich langsames Wachstumsverhalten zeigten, als die mit den anderen Kandidatengen transduzierten Zellen. Möglicherweise führte die Überexpression von *ABRAXAS* in den Zielzellen zu erhöhter Toxizität und damit zum Absterben der Zellen. Bei zwei Patienten musste die Transduktion mit dem Kandidatengen *ABRAXAS* und die anschließende Expansion mehrfach wiederholt werden, um eine ausreichende Anzahl an Zellen für die Zellzyklusanalyse zu generieren. Dabei handelte es sich in einem Fall um primäre Fibroblasten und im anderen Fall um eine lymphoide Zelllinie. Letztendlich waren jedoch bei allen 14 Patienten ausreichend S91ABRIN transduzierte Zellen für die Zellzyklusanalyse vorhanden.

Für die Zellzyklusanalyse der primären Fibroblasten und LCL-Zellen wurden MMC-Konzentrationen von 33 nM und 45 nM eingesetzt, da Experimente gezeigt haben, dass im Intervall zwischen 33 und 100 nM eine optimale Diskriminierung zwischen Zellen mit bzw. ohne Komplementation möglich ist¹⁸².

In der zusammenfassenden Darstellung der Ergebnisse der Komplementationsanalysen aller Patienten (siehe Kapitel 3.3, Abbildung 13) fällt auf, dass eine negative Abweichung zum G₂/M-Arrest der Kontrollen von mehr als 20% nur in 4 Fällen beobachtet wird. In diesen vier Fällen handelt es sich um die mit *RAD51C* transduzierten Zellen von Patient Nr. 8, sowie um die mit *ABRAXAS* transduzierten Zellen der Patienten Nr. 12, 13 und 14. In allen anderen Fällen wird die Anzahl der Zellen im G₂/M-Arrest durch keines der eingebrachten Kandidatengene wesentlich beeinflusst. Betrachtet man die Komplementationsanalysen der Patienten Nr. 12, 13 und 14 im Einzelnen, lässt sich feststellen, dass die Anzahl der mit *ABRAXAS* transduzierten Zellen im G₂/M-Arrest zwar deutlich vom Median des G₂/M-Arrests der Kontrollen abweicht, sich jedoch weiterhin 14 % (bei Patient Nr. 12), 32 % (bei Patient Nr. 13) bzw. 37 % (bei Patient Nr. 14) der Zellen in der G₂/M-Phase befinden und damit eine Komplementation durch die Transduktion von *ABRAXAS* unwahrscheinlich ist. Bei Patient Nr. 13 wurde die Komplementationsgruppe inzwischen von einer anderen Arbeitsgruppe bestimmt (FA-D2).

Patient Nr. 8, Details publiziert in Nature Genetics, 2010¹³⁶

Im Vergleich dazu werden bei den mit *RAD51C* transduzierten Zellen von Patient Nr. 8 nach Behandlung mit MMC nur 3 % der Zellen in der G₂/M-Phase detektiert, was einer Abweichung zum Median der G₂/M-Arreste der Kontrolle von -29 % entspricht. Dass *RAD51C* die Zellen von Patient Nr. 8 spezifisch korrigiert, wurde anhand der Tatsache bestätigt, dass das Einbringen von *RAD51C* den G₂/M-Arrest in den Zellen der 13 anderen getesteten Patienten nicht aufhebt.

Bei Patient Nr. 8 handelt es sich um einen 10-jährigen Jungen pakistanischer Abstammung, der mit diversen Fehlbildungen zur Welt kam. Bei ihm fielen eine bilaterale Radiushypoplasie, sowie lange, dünne Finger mit weit proximal sitzenden, hypoplastischen Daumen auf. In der sonographischen Diagnostik zeigten sich bilateral Zystennieren. Aufgrund einer Analtresie wurde der Patient in der ersten Zeit seines Lebens mehrfach operiert. In der klinisch-pädiatrischen Untersuchung zeigte sich im Verlauf ein Maldescensus testis und ein im Altersvergleich kleines Genital. Labordiagnostisch

bestanden bis auf eine milde Hypothyreose keine Auffälligkeiten, insbesondere keine Zeichen für ein (beginnendes) Knochenmarkversagen.

Zwei weitere Geschwister von Patient Nr. 8 wiesen ebenfalls kongenitale Fehlbildungen auf, drei der insgesamt fünf Kinder verstarben in frühem Alter, sodass der Verdacht auf eine genetische Ursache oder zumindest genetische Komponente nahe lag. Auch die Konsanguinität der Eltern könnte im Zusammenhang mit der Erkrankung der Kinder stehen. Die klinische Verdachtsdiagnose FA bei Patient Nr. 8 basierte auf dem Vorhandensein der kongenitalen, für FA typischen, Fehlbildungen.

Um die Region im Genom zu finden, die die verursachende Mutation enthält, wurden von der AG C. Mathew Genotypanalysen der DNA von Patient Nr. 8, seinen Eltern, seiner gesunden Schwester und der erkrankten Schwester durchgeführt. Die erkrankten Geschwister zeigten sieben Regionen mit Abschnitten gleicher Homozygotie (> 3Mb), für die die gesunde Schwester heterozygot bzw. homozygot für das andere Allel war. Die größte dieser Regionen war eine 14,6 Mb lange Region auf Chromosom 17q21-q24. Diese Region enthält drei Gene, die in der DNA-Reparatur eine Rolle spielen (*EME1*, *RAD51C* und *BRIP1*). Sind diese Gene defekt, reagieren die betroffenen Zellen hypersensibel auf DNA-quervernetzende Agenzien^{180,183,136}. Da im Westernblot der AG Schindler bereits die Proteine BRIP1 und FANCD1 in normaler Länge in den Zellen von Patient Nr. 8 nachgewiesen wurden und die ersten informativen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in der Sequenzierung distal von *EME1* liegen, geriet die Mutation im *RAD51C*-Gen immer mehr in den Verdacht, die den Defekt verursachende Mutation in der betroffenen Familie zu sein (siehe auch Abbildung 17 in Kapitel 3.5).

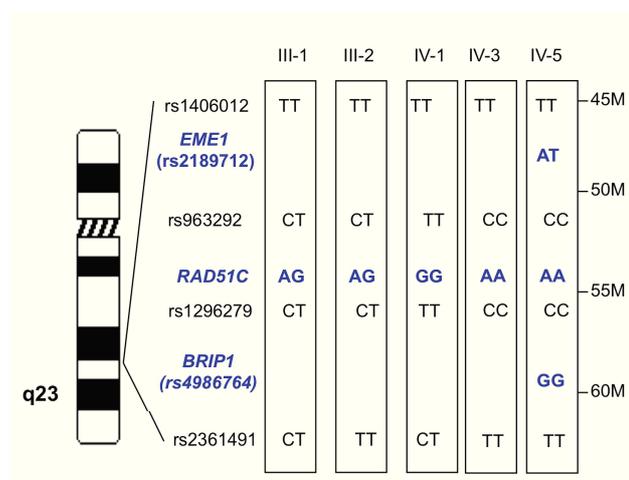


Abb. 19: Linkage-Analyse

Abbildung aus Vaz et al Fig. 1c¹³⁶. Hier werden die *Linkage*-Analysen der Eltern (III-1 und III-2) sowie der gesunden (IV-1) und erkrankten (IV-3) Schwester von Patient Nr. 8 (IV-5) dargestellt.

Die von der AG um C. Mathew durchgeführte Sequenzierung von neun Exons und Splice Sites vom *RAD51*-Paralog *RAD51C* bei Patient 8 ergab eine homozygote Mutation (G773A) in Exon 5, was zum Austausch einer Aminosäure führt (R258H). Die erkrankte Schwester erwies sich ebenfalls als homozygot für diese Mutation. Die Eltern waren heterozygot. Bei der gesunden Schwester hingegen fand man eine Homozygotie für die Wildtyp-Sequenz.

Um zu beweisen, dass die gefundene Mutation (G773A) die zugrundeliegende Ursache für den Defekt bei Patient Nr. 8 ist, wurde im nächsten Schritt im Rahmen dieser Dissertation eine lymphoide Zelllinie von Patient Nr. 8 mit retroviralen Vektoren transduziert, die zum einen die Wildtyp *RAD51C*-cDNA (S11RCIP) und zum anderen die *RAD51C*-Mutante (S11RCmut773IP) enthielten. Als Vektorkontrolle diente S11IP. Die Ergebnisse zeigten, dass der in den Zellen beobachtete, durch MMC verursachte G₂/M-Arrest durch die Expression des Wildtypgens aufgehoben wurde, nicht jedoch durch die Expression der mutierten Variante. Dies bestätigten auch die Zellzyklusanalysen in der *RAD51C*-defizienten IRS-3 Zelllinie (siehe Ergebnisse aus Kapitel 3.5.2). Der Aminosäureaustausch ist demnach als echte Mutation zu betrachten, bei der eine Restfunktion des Proteins das Überleben der Zellen bzw. des Patienten ermöglicht.

In mehreren Arbeiten wurde bewiesen, dass der Funktionsverlust des Proteins *RAD51C* in eukaryoten Zellen mit einer geschädigten Bildung von *RAD51*-Reparaturfoci als Antwort auf DNA-Schäden einhergeht^{171,184,185}. Diese Beobachtung lässt sich auch in den Zellen von Patient Nr. 8 machen¹³⁶ und gilt als weiterer Beweis dafür, dass der Funktionsverlust von *RAD51C* in der hier beschriebenen Familie, zumindest auf zellulärer Ebene, zu einem Defekt führt. Auch in zwei anderen bekannten FA-Subgruppen führt der vorliegende Defekt zu einer verminderten bzw. fehlenden *RAD51*-Reparaturfoci-Bildung. Diese beiden FA-Gruppen, denen Defekte im *BRCA2*- bzw. *PALB2*-Gen zugrunde liegen, spielen eine entscheidende Rolle in der HR bei DNA-Schäden^{40,55}. Zellen von FA-Patienten zeigen nur eine moderate Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung¹⁸⁶, was sich auch bei den Zellen von Patient Nr. 8 beobachten ließ¹³⁶.

Eine weitere Parallele zum Phänotyp FA konnte unsere AG bei der Analyse der Camptothecin-Sensitivität der lymphoblastoiden Zelllinie von Patient Nr. 8 finden. Die Sensitivität gegenüber dem Topoisomerasehemmer Camptothecin zeigte sich bei Patient Nr. 8 zwar nicht so ausgeprägt, wie bei Zellen von FA-Patienten mit den Komplementationsgruppen D1, N und M, nach Einbringen von *RAD51C* in die Zellen von Patient Nr. 8 überlebten jedoch fast genauso viele Zellen, wie in der gesunden Kontrolle¹⁸⁷.

4.2. Die Kandidatengene

4.2.1. Die mit *BRCA1* interagierenden Gene *RAP80* und *ABRAXAS*

Das *RAP80*-Protein interagiert mit *BRCA1* über eine Region, die sogenannte *BRCT-Repeats* enthält, und hilft bei der Rekrutierung von *BRCA1* an die beschädigte DNA. Die Depletion von *RAP80* bewirkt eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, eine verminderte Aktivierung der *CHK1* und infolgedessen eine defekte *G₂/M-Checkpoint-Kontrolle* des Zellzyklus¹⁸⁸⁻¹⁹¹. *RAP80* scheint für die DNA-Reparatur von *DSB* über die *HR* notwendig zu sein, auch wenn das Ausschalten von *RAP80* keine so dramatischen Auswirkungen zeigt, wie der Verlust von *BRCA1*. Daher scheinen noch weitere Proteine, wie *MERIT40*, an der Lokalisierung von *BRCA1* an den DNA-Schaden beteiligt zu sein¹⁹². Unklar ist noch, ob *RAP80* auch eine Funktion in der DNA-Reparatur über *NHEJ* hat. 2010 berichteten Junko Iijima, Zhihong Zeng, Shunichi Takeda, et al., dass *RAP80* nicht nur in Kooperation mit *BRCA1* an der DNA-Reparatur beteiligt ist, sondern auch eine unabhängige Funktion in der Reparatur von Topoisomerase-II-Hemmer induzierten DNA-Schäden hat¹⁹³.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiteres Protein untersucht, das mit *BRCA1* interagiert: *ABRAXAS/CCDC98*. *CCDC* ist die Abkürzung für *coiled-coil domain-containing protein* und interagiert ebenfalls mit den *BRCT-Repeats* von *BRCA1*. Zellen in denen *ABRAXAS* ausgeschaltet wurde, weisen die gleichen Eigenschaften, wie *RAP80*-defiziente Zellen auf^{189,194,195}.

Weder *ABRAXAS* noch *RAP80* konnten die Hypersensitivität in den Zellen der 14 *FA*-Patienten aufheben. Dass andere, hier nicht getestete, *FA*-Patienten mit unbekannter Komplementationsgruppe einen Defekt in *ABRAXAS* oder *RAP80* aufweisen ist denkbar, aber vermutlich selten. Möglicherweise führt der Verlust von *ABRAXAS* oder *RAP80* auch zu Defekten, die mit dem menschlichen Leben nicht vereinbar sind, wofür es bisher jedoch keinen direkten Hinweis gibt.

Aufgrund der Interaktion mit *BRCA1* und der Rolle in der DNA-Reparatur lässt sich vermuten, dass *ABRAXAS* und *RAP80* im Zusammenhang mit dem Mamma- und Ovarialkarzinom stehen. In einer Studie wurde kürzlich herausgefunden, dass sich bei 5-19% der Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten spezifische Antikörper gegen *RAP80* nachweisen lassen, sodass *RAP80* möglicherweise als neues Tumor-assoziiertes Antigen fungiert¹⁹⁶. Mutationsanalysen von *ABRAXAS* und *RAP80* bei Patientinnen mit familiärem Mamma- oder Ovarialkarzinom, die keine Mutationen in *BRCA1* und *BRCA2*

aufwiesen, konnten jedoch nur geringe Veränderungen zeigen, die ebenfalls in der Normalbevölkerung vorkommen¹⁹⁷. Eine weitere Analyse von *RAP80* konnte bei Patienten mit familiärem Mamma- oder Ovarialkarzinom lediglich *missense*-Mutationen, aber keine Mutationen mit Funktionsverlust zeigen¹⁹⁸. Die genaue Funktion der Proteine, sowie ihre Rolle in der Entstehung von Tumoren bleibt Bestandteil gegenwärtiger Forschung.

4.2.2. Die RAD51 Paraloge

Biochemische Experimente haben gezeigt, dass die korrespondierenden Proteine der RAD51 Paraloge zwei große Komplexe untereinander bilden: Zum einen bilden RAD51B, RAD51C, RAD51D und XRCC2 den BCDX2-Komplex, den zweiten Komplex bilden die Proteine RAD51C und XRCC3 (CX3-Komplex)¹⁹⁹. Außerdem bilden die Paraloge jeweils Heterodimere: RAD51B/ RAD51C^{200,201}, RAD51D/ XRCC2²⁰², RAD51C/ XRCC3^{203,204,205}. Die Interaktion zwischen den Proteinen wird über eine Bindung zwischen N- und C-terminalen Regionen gebildet. Alle Paraloge bis auf XRCC2 besitzen beide Regionen zur Interaktion. Bei XRCC2 fehlt die N-terminale Domäne.

RAD51B bildet ein Heterodimer mit RAD51C und ist außerdem Bestandteil des BCDX2-Komplexes. Mutationen in RAD51B konnten in verschiedenen Tumorzellen, wie zum Beispiel Leiomyomen des Uterus, beobachtet werden^{206,207} und stehen im Verdacht in der Pathogenese des non-*BRCA1/2* Mammakarzinoms eine Rolle zu spielen^{208,209}.

Das **RAD51D** Protein hat als Aktivator der HR an Telomeren der Chromosomen eine Wirkung auf die genomische Stabilität²¹⁰. Telomere sind die natürlichen Enden von Chromosomen in der linearen Form. Sie enthalten viele guaninreiche DNA-Abschnitte und sollen die Enden der Chromosomen vor Abbau oder Fusion mit anderen schützen. Werden die Telomere nicht geschützt, können daraus schwerwiegende Schäden der genomischen Integrität resultieren²¹¹. Daneben haben auch BRCA2 und RAD51C eine Funktion im Prozess der Telomerprotektion²¹².

XRCC steht für „*X-ray cross-complementing*“. Die XRCC-Proteine wurden hauptsächlich über ihre Rolle als Protektor von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung entdeckt²¹³. **XRCC2** ist in der chinesischen Hamsterzelllinie IRS1 defekt²¹⁴ und spielt eine wichtige Rolle in der HR bzw. der Reparatur von DSB. XRCC2-defiziente Zellen weisen eine 100-fach niedrigere Rate an HR auf²¹⁵. Im Mausmodell bewirkt das Ausschalten von *XRCC2* eine frühe embryonale Letalität²¹⁶. Im Januar 2012 veröffentlichte eine Gruppe aus Saudi Arabien einen Bericht über eine Mutation im *XRCC2*-Gen bei einem 2,5-jährigen Patienten

mit Fanconi-Anämie²¹⁷. Darin wird eine homozygote Mutation im *XRCC2*-Gen beschrieben, die auf dem Austausch einer Base und dem damit verbundenem Einbau eines Stopcodons (TGA) beruht und somit zur Dysfunktion auf Proteinebene führt. Entdeckt wurde die Mutation über eine Hochdurchsatzsequenzierung des Genoms des Patienten, seiner Eltern sowie einer saudi-arabischen Kontrollgruppe und sich daran anschließende bioinformatische Analysen. Shamseldin et al. beschreiben einen FA-Patienten mit klassischen Dysplasiezeichen (Mikrozephalie und Radiusaplasie) und die für FA typische Chromosomenbrüchigkeit nach DEB-Exposition. Eine Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen, wie MMC, mit daraus resultierendem G₂/M-Arrest in der Zellzyklusanalyse ist in dieser Arbeit nicht beschrieben, sodass eine, wie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte, retrovirale Komplementationsanalyse mit Fibroblasten oder einer LCL des Patienten von großem Interesse wäre. Außerdem sollten weitere FA-Patienten mit bisher unbekannter Komplementationsgruppe auf Mutationen in *XRCC2* untersucht werden.

XRCC3 bildet ein Heterodimer mit *RAD51C* und ist vermutlich an der Auflösung der Holliday-Junctions im Rahmen der HR beteiligt²¹⁸. Aber auch in den frühen Schritten der HR scheint *XRCC3*, sowohl zusammen mit als auch unabhängig von *RAD51C*²¹⁹, beteiligt zu sein. *XRCC3* defiziente Zellen weisen, wie alle *RAD51* Paraloge, eine genomische Instabilität auf²²⁰.

RAD51C ist Bestandteil beider o.g. Komplexe - *BCDX2* und *CX3* - und gehört neben *BRCA1*, *FANCD1*, *FANCN*, und *FANCI* zu den klassischen FA-assoziierten Genen der HR und scheint sowohl in den frühen^{136,221} als auch späten Schritten, beim Auflösen der Holliday Junctions^{171,218,222,223} in der HR eine Rolle zu spielen²²⁴. Es wird diskutiert, ob *RAD51C* als eine Art Vermittler für das Zusammenspiel von *RAD51* und seinen Paralogen verantwortlich ist. Eine mögliche Hypothese ist, dass *RAD51C* während der gesamten HR oder zumindest über einen längeren Zeitraum an der Stelle des DNA-Schadens verbleibt und somit einen Link zwischen den frühen und späten Schritten der HR darstellt.

Im Gegensatz zu den anderen Paralogen besitzt *RAD51C* ein *nuclear localization signal*, das den Transport in den Zellkern von *RAD51C* selbst oder mit anderen Bindungspartnern erleichtert. So wurde zunächst vermutet, dass *RAD51C* die Translokation von *RAD51* in den Zellkern reguliert und somit zur DNA-Reparatur beiträgt^{225,226}.

Jüngere Studien vermuten jedoch, dass *RAD51C* eine direktere Rolle in der HR zukommt, im Sinne eines Weichenstellers: *RAD51C* gibt das Signal des DNA-Schadens weiter und sichert den Reparaturweg über die HR²²⁷. In der Arbeit von Badie et al. konnte 2009 die

Aufgabe von RAD51C als Checkpoint-Aktivator im Zellzyklus und damit Promotor der HR bestätigt werden. RAD51C bindet früh und unabhängig von RAD51 an beschädigte DNA, ist in Abhängigkeit des Replikationsproteins A (RPA) für die Phosphorylierung der Checkpoint-Kinase 2 (CHK2) notwendig und hat somit Einfluss auf den Zellzyklusarrest. An der Aktivierung der CHK2 ist außerdem XRCC3 beteiligt, wobei noch unklar ist, ob das Zusammenspiel zwischen RAD51C und XRCC3 dabei eine besondere Rolle spielt. Eine defekte CHK2 Aktivierung führt zur Progression des Zellzyklus in die G₂/M-Phase als Antwort auf den DNA-Schaden ²²⁷.

Ein weiterer wichtiger Schritt war die kürzlich entdeckte Verbindung zwischen RAD51C und RAD18. RAD18 ist eine E3 Ubiquitinligase und ubiquitiniert die das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) an angehaltenen Replikationsgabeln. RAD51C und RAD18 sind über den N-Terminus an RAD51C miteinander verbunden ²²⁸. Ein Verlust dieser Region führt zur Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen und Defekten in der HR, ohne jedoch die Komplexbildung der RAD51 Paraloge zu stören. Diese erfordert die C-terminale Region von RAD51C ²²⁹.

RAD51 und seine Paraloge haben in der Zelle eine lebenswichtige Funktion, sodass das der komplette Funktionsverlust von RAD51 für eine Zelle letal ist ²³⁰. Es gibt nur zwei RAD51C defiziente Zelllinien, die *chicken*-Zelllinie DT40 und die chinesische Hamsterfibroblastenzelllinie IRS-3 ^{171,172}.

Takata et al. beschrieben 2001 eine Chromosomeninstabilität und defekte HR in Knock-out-Zellen, sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin aller fünf RAD51 Paraloge ¹⁷². Außerdem konnte eine signifikant niedrigere Wachstumsrate im Vergleich zu Wildtypzellen nachgewiesen werden. Die Länge des Zellzyklus ist in beiden Gruppen vergleichbar, jedoch starben 20-30% mehr Zellen ab. Dass sich im Rahmen dieser Experimente kein erhöhter G₂/M-Arrest zeigte, könnte daran liegen, dass das p53 Protein in diesen Zellen mutiert ist ²³¹. Die Anzahl an Chromosomenbrüchen variiert zwischen den einzelnen Mutanten, was auf unterschiedliche Funktionen der einzelnen Paraloge schließen lassen könnte. Alle RAD51 Paraloge zeigen einen reduzierten SCE, sowohl spontan, als auch induziert durch MMC ¹⁷².

Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine Überexpression von RAD51 den Phänotyp der Paraloge nur teilweise supprimieren, also die volle Aktivität der HR nicht wiederherstellen kann ¹⁷².

Die Ähnlichkeit des zellulären Phänotyps der Knock-out-Zellen der RAD51 Paraloge zu FA-Zellen machen die RAD51 Paraloge als potentielle FA-Gene besonders interessant.

Gemeinsam ist den Zellen, dass sie hypersensitiv gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen sind, eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit und Defekte in der HR aufweisen¹⁷².

Die zellulären Auffälligkeiten lassen sich sowohl in Hühner- als auch Hamsterzellen und jetzt, wie diese Arbeit zeigt, erstmals auch in menschlichen Zellen nachweisen und in Zusammenhang mit einer genetischen Erkrankung bringen^{139,136,232}.

4.2.3. *RAD51C* als neuer FA-Subtyp

Die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation generiert wurden, wurden zum Teil in Vaz et al. im Mai 2010 veröffentlicht¹³⁶. Zum aktuellen Zeitpunkt ist diese Veröffentlichung in der Literatur zusammen mit der Arbeit von Meindl et al., ebenfalls in Nature Genetics publiziert, der erste Bericht über den Zusammenhang einer Mutation im *RAD51C*-Gen und einer genetischen Erkrankung beim Menschen.

Mutationen im *RAD51C*-Gen beim Menschen sind eine Rarität. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass das komplette Fehlen von *RAD51C* zu einer frühen embryonalen Letalität führt²³³, wohingegen Mäuse mit hypomorphen Mutationen im *RAD51C*-Gen ein normales Wachstum und eine normale Entwicklung, aber kongenitale Anomalien und eine verminderte Fertilität zeigten²³⁴.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde nur ein kleiner Teil der noch nicht klassifizierten FA-Patientenzellen und auch nur eine geringe Auswahl an potentiellen Kandidatengenomen getestet, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit¹³⁶, sowie die kürzlich in Verdacht geratene Mutation im *XRCC2*-Gen²¹⁷ eines FA-Patienten, Anlass zu weiteren Untersuchungen der *RAD51* Paraloge in FA-Patienten mit bisher unbekannter Komplementationsgruppe geben sollten.

In den letzten Jahren haben die *RAD51* Paraloge und insbesondere *RAD51C* über die Verbindung zum hereditären Mammakarzinom über *BRCA1* in der Wissenschaft immer mehr an Bedeutung gewonnen, weshalb im folgenden Kapitel auf die Rolle von *RAD51C* in der Pathogenese des Mamma- und Ovarialkarzinoms eingegangen werden soll.

4.3. Fanconi-Anämie und die Entwicklung von Malignomen

Defekte FA-Gene manifestieren sich auf zellulärer Ebene mit einer Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen, was sich in einer erhöhten Rate an Chromosomenaberrationen und Zellzyklusstörungen zeigt. Diese genetische Instabilität resultiert in einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Malignomen, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollkommen entschlüsselt ist. Im menschlichen Organismus gibt es verschiedene Gene, die als „Wächter“ der genomischen Integrität fungieren, man spricht von sogenannten *Caretaker*-Genen. Dies sind Gene, die für Proteine kodieren, die DNA-Schäden erkennen bzw. reparieren können. Dazu gehören neben Reparaturgenen wie ATM, ATR und BLM unter anderem auch die FA-Gene sowie die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene. Wird die DNA also durch Chemikalien, Radikale oder ionisierende Strahlung geschädigt, sorgen intakte *Caretaker*-Gene für die Erkennung des Schadens, reparieren ihn oder führen die Zelle in die Apoptose, sodass der Schaden nicht an Tochterzellen weitergegeben werden kann.

Bei FA-Patienten werden im Zusammenhang mit Neoplasien neben der erhöhten Inzidenz zwei Besonderheiten beobachtet. Zum einen das frühe Auftreten von Neoplasien bei homozygoten/ biallelischen Mutationen in *FANCD1* und *FANCN* im Kindesalter und zum anderen die Tatsache, dass das Spektrum der Neoplasien bei FA-Patienten weder dem der Normalpopulation noch dem der Patienten mit Defekten in anderen *Caretaker*-Genen, wie dem Bloom-Syndrom, Ataxia teleangiectasia oder dem Nijmegen Breakage Syndrom ähnelt. So ist es wahrscheinlich, dass der Typ der Neoplasie einen Rückschluss auf das zugrundeliegende defekte *Caretaker*-Gen zulässt. Die frühe Entwicklung von Neoplasien steht vor allem bei Patienten der Komplementationsgruppen FA-D1 (*FANCD1/BRCA2*) und FA-N (*FANCN/PALB2*) im Vordergrund. Nahezu 100% der FA-D1 Patienten entwickeln bis zum 5. Lebensjahr Neoplasien ²³⁵, bei den FA-N Patienten gibt es keinen, der bis zu diesem Alter nicht mindestens eine Neoplasie entwickelt hat ⁵⁶.

Die Rolle der FA-Gene in der Pathogenese des Mammakarzinoms

Ein wichtiger Hinweis auf die Verbindung zwischen FA und Brustkrebs ergab sich im Jahr 2002 mit der Entdeckung, dass das Brustkrebsgen *BRCA2* und das FA-Gen *FANCD1* identisch sind ²³⁶. Heterozygote Träger einer Mutation im *BRCA2*-Gen (*BRCA2 +/-*) zeigen ein erhöhtes Risiko für Mammakarzinome, Ovarialkarzinome und Pankreaskarzinome ^{237,238}. Der Tumor in Heterozygoten ist Folge des Verlusts des intakten *BRCA2*-Allels in den Zellen. Zellen, in denen in beiden Allelen Mutationen im *BRCA2*-Gen zu finden sind, zeigen

den typischen Phänotyp von FA-Zellen: erhöhte Chromosomenbrüchigkeit und Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Agenzien. FA-Patienten mit Defekt in *FANCD1* sind also homozygote Träger (*BRCA2* -/-) und zeigen ein schweres Krankheitsbild mit einem besonders frühen Auftreten von Tumoren ¹⁶⁶.

Später fand man heraus, dass biallelische Mutationen in *BACH1/BRIP1 (FANCI)* ⁵¹ und *PALB2 (FANCL)* ⁵⁶ ebenfalls zum Krankheitsbild FA führen.

FANCL bindet direkt an FANCD1 (*BRCA2*) und ist für dessen Stabilität verantwortlich, was die ähnliche Klinik bei FA-Patienten der Gruppen D1 und N erklärt ²³⁹.

FANCI bindet an *BRCA1* und hat eine 5'-3'-Helicaseaktivität. Heterozygote Keimbahnmutationen in FANCI wurden bei Patientinnen mit früh aufgetretenem, erblichem Mammakarzinom gefunden. Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms bei Mutationen in *FANCI* ist jedoch unbekannt ²⁴⁰.

FA-Patienten mit biallelischer Mutation in *BRCA1* wurden bisher nicht gefunden. Dies könnte jedoch auch daran liegen, dass der Verlust beider *BRCA1* Allele nicht mit dem Leben vereinbar ist, da es noch weitere Funktionen außerhalb der DNA-Reperatur hat. Im Jahr 2002 wurde die Hypothese aufgestellt, dass Östrogen in *BRCA2*(+/-)-Zellen von Ovar und Mamma zu einer erhöhten Überlebensrate dieser Zellen führt ²⁴¹.

In der Ätiologie des Mammakarzinoms, wie auch bei vielen anderen komplexen Erkrankungen, werden in der Wissenschaft zwei Hypothesen diskutiert: Die „*Common Disease – Common Variant*“- Hypothese (CDCV), bei der man davon ausgeht, dass genetische Variationen von nennenswerter Frequenz in der Gesamtbevölkerung vorkommen, aber nur mit geringer Penetranz vererbt werden und die „*Common Disease – Rare Variant*“- Hypothese (CDRV), der die Idee zugrunde liegt, dass viele seltene DNA-Sequenz-Variationen mit jeweils hoher Penetranz zu einer genetischen Prädisposition für bestimmte Erkrankungen führen ²⁴². Bei diesem Modell wird die Ausprägung einer Krankheit von verschiedenen anderen Faktoren, wie zusätzlichen genetischen Veränderungen oder Umweltbedingungen, beeinflusst ²⁴³. Um seltene Variationen zu detektieren und mit einer Erkrankung in Verbindung zu bringen werden *Genome-Wide Association Studies* (GWAS) durchgeführt, bei denen die DNA von zwei Gruppen, Individuen mit der zu untersuchenden Erkrankung und ähnlichen, gesunden Individuen, untersucht wird. Tritt ein Allel in der Gruppe der erkrankten Individuen mit einer höheren Frequenz auf, so gilt dieses als „assoziert“ mit der zu untersuchenden Erkrankung.

Dass *RAD51C* in der Pathogenese des hereditären Mammakarzinoms auch eine zunehmend wichtige Rolle spielt, konnte die Arbeit „*Germline mutations in breast and*

ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene“ von Alfons Meindl et al. zeigen ²²¹. Das gleichzeitige Vorkommen von Mammakarzinom und Ovarialkarzinom in einer Familie oder einem Individuum mit Mutationen in *RAD51C* erinnert an das klinische Bild von Patientinnen mit Mutationen in *BRCA1 und 2* ^{244,245}. Histopathologisch und endokrinologisch ähneln die *RAD51C*-assoziierten Tumore mit günstigeren histopathologischen Eigenschaften eher den durch Mutationen in *BRCA2* verursachten Tumoren. Experimente mit *RAD51C*-knock-out Mäusen zeigen, dass *RAD51C* als P53 abhängiges Tumorsuppressorgen arbeitet ²³³.

Um zukünftig weitere Gene zu finden, die mit einem erhöhten Risiko für Mamma- und Ovarialkarzinom einhergehen, ist es sinnvoll Patientinnen, bei denen keine Mutationen in *BRCA1*, *BRCA2* oder *RAD51C* gefunden wurde, auf weitere Mutationen zu untersuchen. Nur über die Sammlung und Verknüpfung weiterer molekulargenetischer Befunde und klinischem Phänotyp, kann eine Aussage über das Risiko ein Malignom zu entwickeln und die Prognose gemacht werden.

Auch die anderen *RAD51* Paraloge stehen unter Verdacht *Cancer Susceptibility*-Gene zu sein. So wurden kürzlich Mutationen in *RAD51B* und *RAD51D* mit einem erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Mamma- bzw. Ovarialkarzinoms assoziiert ^{209,246}.

Der Zusammenhang zwischen FA und der Entwicklung von Neoplasien legt nahe, dass auch in Neoplasien bei nicht-FA-Patienten somatische Mutationen oder Keimbahnmutationen in FA-Genen gefunden werden könnten ²⁴⁷⁻²⁵². Diese Tatsache hat den *FA/BRCA-Pathway* zu einem vielversprechenden Modell für die Entwicklung einer **targeted therapy**, d.h. einer zielgerichteten Tumorzelltherapie gemacht. Eine solche Therapie soll im Vergleich zu der herkömmlichen zytostatischen Therapie, die immer auch gesunde Zellen schädigt, nur Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen nehmen.

In diesem Zusammenhang spielt der Begriff **synthetische Letalität** eine große Rolle. Zwei Gene sind synthetisch letal, wenn der Funktionsausfall eines Gens nur dann letal für die Zelle ist, wenn auch im anderen Gen eine ebenfalls zum Funktionsausfall des Gens führende Mutation vorhanden ist. Dieser Effekt lässt sich in der zielgerichteten Tumorthherapie nutzen, indem Gene, die im Zusammenhang mit Tumor-verursachenden Mutationen synthetisch letal sind, ausgeschaltet werden, sodass dies nur für die Zellen mit der Tumor verursachenden Mutation letal ist, nicht jedoch für gesunde umgebende Zellen ²⁵³. Ein Beispiel für ein solches Verhältnis sind Gene, die in einem essentiellen Reparaturweg hintereinander oder parallel geschaltet sind. T. Hucl und E. Gallmeier stellten in ihrer Übersichtsarbeit im Jahr 2011 zwei mögliche synthetisch letale Zusammenhänge in HR-defizienten Zellen vor ²⁵⁴. Einer der Zusammenhänge fand bereits klinische Anwendung

bei Patientinnen mit Mutationen in *BRCA1* oder *BRCA2* und rezidiviertem Ovarialkarzinom²⁵⁵: DNA-Einzelstrangbrüche werden vorwiegend über den Mechanismus der Basenexzision repariert, bei dem das Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP) involviert ist. Werden DNA-Einzelstrangbrüche nicht repariert, weil der Reparaturmechanismus - durch PARP-Inhibitoren - inhibiert wird, entstehen ICL durch kollabierte Replikationsgabeln, die wiederum repariert werden müssen. Bei der Reparatur kollabierter Replikationsgabeln werden Enzyme der HR benötigt. Ist die HR z.B. aufgrund von Mutationen im *BRCA2*-Gen gestört, stirbt die Zelle. So lässt sich in *BRCA2* defizienten Tumorzellen durch die Gabe von PARP-Inhibitoren selektiv ein Zelltod einleiten²⁵⁵. Die umgebenden, gesunden Zellen bei denen alle Enzyme für die DNA-Reparatur über HR intakt sind, können die Einzelstrangbrüche bzw. die durch PARP-Inhibitoren verursachten ICL problemlos reparieren und nehmen keinen Schaden.

Bereits 2007 beschrieben Kennedy et al. eine Hypersensitivität in *FA/BRCA-Pathway* - defizienten Tumorzellen gegenüber ATM-Inhibitoren, die sich in einer erhöhten Rate von DNA-Brüchen, Zellzyklusarrest und dem Zelltod manifestierte²⁵⁶. Der *FA/BRCA-Pathway* bietet also weiterhin großes Potential für die Entwicklung von Therapieoptionen im Sinne einer zielgerichteten Tumorzelltherapie, sodass die Entdeckung weiterer FA-Gene nicht nur für FA-Patienten sondern auch für Tumorpatienten ohne FA, in deren Tumorzellen Mutationen in FA-Genen gefunden werden, eine entscheidende Rolle spielt.

5. Ausblick

Da die Fanconi-Anämie eine sehr seltene Erkrankung ist, ist die genaue Untersuchung des genetischen Defektes und des klinischen Verlaufs jedes einzelnen Patienten von besonderer Bedeutung, um weitere Erkenntnisse über die Ätiologie aber vor allem auch die Genotyp-Phänotyp-Korrelation und die damit verbundenen prognostischen Faktoren zu gewinnen. Neben dem Wissen, das sich aus molekularbiologischen und zellkulturtechnischen Experimenten für die Diagnostik und Therapie von FA-Patienten entwickelt, hat die Untersuchung von FA-Genen eine große Bedeutung für die Onkogenetik. Der zelluläre Phänotyp von FA-Patienten wird charakterisiert durch eine gestörte Antwort auf DNA-Schäden und ist auf Defekte in DNA-Reparaturgenen, den sog. *Caretaker*-Genen, zurückzuführen.

Die hohe Ähnlichkeit von FA-Zellen mit Tumorzellen macht die FA-Zellen für die Forschung an der Entstehung von Malignomen besonders interessant. Im Gegensatz zu Tumorzellen, in denen häufig mehrere *Caretaker*-Gene defekt sind und somit die Untersuchung einzelner Reparaturwege schwierig ist, zeichnen sich somatische FA-Zellen durch den Ausfall eines definierten Gens aus. Dies hat den Vorteil, dass die Auswirkungen des Defekts auf den DNA-Reparaturweg selektiv untersucht und insbesondere therapeutische Substanzen bzw. Substanzkombinationen für synthetisch letale Systeme gezielt getestet werden können.

Wie die Ergebnisse im Rahmen dieser Dissertation bzw. der Veröffentlichung von Vaz et al.¹³⁶ und Meindl. et al.²²¹, in denen bis zum heutigen Zeitpunkt erstmals ein Zusammenhang zwischen einer Mutation im *RAD51C*-Gen und einer Erkrankung beim Menschen gefunden wurde, gezeigt haben, ist es weiterhin nicht nur für die FA-Forschung wichtig neue FA-Gene zu finden. So können neue FA-Gene als neue Tumorsuszeptibilitätsgene sowohl in der Pathogenese gynäkologischer als auch anderer Tumoren zukünftig von großer Bedeutung sein.

6. Zusammenfassung

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine seltene Erkrankung aus der Gruppe der kongenitalen Blutbildungsstörungen mit autosomal-rezessivem bzw. x-chromosomalem Erbgang. Klinisch zeichnet sie sich durch kongenitale Dysplasien, progressives Knochenmarkversagen und eine stark erhöhte Inzidenz von Malignomen aus. Auf zellulärer Ebene lassen sich bei Betroffenen eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit sowie eine charakteristische Hypersensitivität gegenüber DNA quervernetzenden Substanzen feststellen. Bis zu Beginn dieser Dissertation konnten Defekte in 13 verschiedenen Genen mit dem Krankheitsbild FA in Verbindung gebracht werden (*FANCA*, *-B*, *-C*, *-D1/BRCA2*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-J/BRIP1*, *-L*, *-M* und *-N/PALB2*). Alle FA-Genprodukte spielen eine wesentliche Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen an angehaltenen Replikationsgabeln und interagieren mit anderen DNA-Reparatur-Signalkaskaden wie ATR/CHK1 und ATM/CHK2 oder MRE11/NBS1/RAD50.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hautfibroblasten oder lymphoide Zelllinien von 14 FA-Patienten mit bisher unbekanntem Gendefekt untersucht. Bei allen Patientenzellen wurde eine normale posttranslationale Modifikation von FANCD2 (Monoubiquitinierung) im Westernblot nachgewiesen, weshalb 8 Kandidatengene gewählt wurden, die ihre Funktion *downstream* der FANCD2-Monoubiquitinierung, also im Bereich des Reparaturfokus bzw. der DNA-Reparatur haben: *RAD51A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* und *XRCC3* sowie die mit *BRCA1* interagierenden Gene *ABRAXAS* und *RAP80*.

Die Kandidatengene wurden mittels retroviralem Gentransfer in die Hautfibroblasten oder lymphoiden Zelllinien von FA-Patienten hineingebracht und die transduzierten Patientenzellen mit der DNA quervernetzenden Substanz Mitomycin C (MMC) behandelt. Anschließend wurde das Zellzyklusverhalten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der bei FA-Zellen typische G₂/M-Arrest nach Exposition gegenüber MMC konnte durch das retroviral eingebrachte Kandidatengen *RAD51C* in Hautfibroblasten und lymphoiden Zelllinien eines Patienten korrigiert werden. Verantwortlich für den zellulären FA-Phänotyp ist in diesem Patienten eine homozygote Keimbahnmutation (c.772G>A) in Exon 5, die zu einem Aminosäureaustausch (p.R258H) führt, und in funktionellen Untersuchungen – auch in *RAD51C* defizienten Hamster- und Hühnerzellen – im Gegensatz zum normalen Protein keine Komplementation der Zellen vermittelte.

7. Literatur

1. Fanconi G. Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrb Kinderh.* 1927;117:257-280.
2. Lobitz S, Velleuer E. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:863-866.
3. Fanconi G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (FA). I. Clinical aspects. *Semin Hematol.* 1967;4:233-240.
4. Unal S, Ozbek N, Kara A, Alikasifoglu M, Gumruk F. Five Fanconi anemia patients with unusual organ pathologies. *Am J Hematol.* 2004;77:50-54.
5. Fanconi G. *Erinnerungen eines Kinderarztes*: Rothenhäusler Verlag; 1986.
6. Alter BP. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer.* 2003;97:425-440.
7. Schroeder TM, Anschultz F, Knopff A. Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik.* 1964;1:194-196.
8. Sasaki M, Tonomura, A. A high susceptibility of Fanconi's Anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res.* 1973:1829-1836.
9. Schroeder T, Kurth, R. Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. *Blood.* 1971:96-112.
10. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood.* 2003;101:1249-1256.
11. Schroeder TM, Tilgen D, Kruger J, Vogel F. Formal genetics of Fanconi's anemia. *Hum Gene.* 1976;32:257-288.
12. Ogilvie P, Hofmann UB, Brocker EB, Hamm H. [Skin manifestations of Fanconi anemia]. *Hautarzt.* 2002;53:253-257.
13. Auerbach AD. Fanconi anemia. *Dermatol Clin.* 1995;13:41-49.
14. Wajnrajch MP, Gertner JM, Huma Z, et al. Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics.* 2001;107:744-754.
15. Tischkowitz M, Dokal I. Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *Br J Haematol.* 2004;126:176-191.
16. Auerbach AD, Batish SD, Flit Y, et al. International Fanconi Anemia Registry (IFAR) update on patients in North America: Distribution of complementation groups and genotype phenotype correlations. *Blood.* 2000;96, suppl 1:229 (abstr).
17. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood.* 1994;84:1650-1655.
18. Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. *Am J Hematol.* 1996;53:99-110.
19. Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, et al. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129:106-112.
20. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood.* 1989;73:391-396.
21. Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, et al., eds. *Current Protocols in Human Genetics*. New York: Current Protocols; 1994:8.7.1-12.
22. Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, Buriot D, Prieur M. The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum Genet.* 1982;62:327-332.

23. Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS. Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet.* 1985;37:1022-1030.
24. Seyschab H, Sun Y, Friedl R, Schindler D, Hoehn H. G2 phase cell cycle disturbance as a manifestation of genetic cell damage. *Hum Genet.* 1993;92:61-68.
25. Zhu W, Dutta A. An ATR- and BRCA1-mediated Fanconi anemia pathway is required for activating the G2/M checkpoint and DNA damage repair upon rereplication. *Mol Cell Biol.* 2006;26:4601-4611.
26. Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC. Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood.* 1998;91:3582-3592.
27. Calado RT, Pintao MC, Rocha V, et al. Lack of mutations in the human telomerase RNA component (hTERC) gene in Fanconi's anemia. *Haematologica.* 2004;89:1012-1013.
28. Malumbres M. Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle. *Cell Cycle.* 2005;4:206-210.
29. Löffler G. PPE. *Biochemie und Pathobiochemie.* Vol. Buch, 7. Auflage (ed 7.). Heidelberg; 2003.
30. Lobrich M, Jeggo PA. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:861-869.
31. Taniguchi T, D'Andrea AD. The molecular pathogenesis of fanconi anemia: recent progress. *Blood.* 2006;107:4223-4233.
32. Patel KJ, Joenje H. Fanconi anemia and DNA replication repair. *DNA Repair (Amst).* 2007;6:885-890.
33. Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet.* 1997;5:137-148.
34. Joenje H, Levitus M, Waisfisz Q, et al. Complementation analysis in Fanconi anemia: re-assignment of the reference FA-H patient to group A. *Am J Hum Genet.* 2000;67:759-762.
35. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet.* 2004;36:1219-1224.
36. Fei P, Yin J, Wang W. New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. *Cell Cycle.* 2005;4:80-86.
37. Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet.* 1992;1:196-198.
38. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, et al. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell.* 2001;7:249-262.
39. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature.* 1992;356:763-767.
40. Stewart G, Elledge SJ. The two faces of BRCA2, a FANcTastic discovery. *Mol Cell.* 2002;10:2-4.
41. Timmers C, Taniguchi T, Heijna J, et al. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell.* 2001;7:241-248.
42. Waisfisz Q, Saar K, Morgan NV, et al. The Fanconi Anemia Group E Gene, FANCE, Maps to Chromosome 6p. *Am J Hum Genet.* 1999;64:1400-1405.
43. de Winter JP, Leveille F, van Berkel CG, et al. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet.* 2000;67:1306-1308.
44. Joenje H, Lo Then Foe JR, Oostra AB, et al. Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth subtype. *Blood.* 1995;86:2156-2160.

45. de Winter J, Rooimans MA, van der Weel L, et al. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet.* 2000;24:15-16.
46. de Winter JP, van Der Weel L, de Groot J, et al. The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2665-2674.
47. de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, et al. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet.* 1998;20:281-283.
48. Saar K, Schindler D, Wegner W-D, et al. Localisation of a Fanconi anaemia gene to chromosome 9p. *Eur J Hum Genet.* 1998;6:501-508.
49. Dorsman JC, Levitus M, Rockx D, et al. Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol.* 2007;29:211-218.
50. Meijer GA. The 13th Fanconi anemia gene identified: FANCI. Importance of the 'Fanconi anemia pathway' for cellular oncology. *Cell Oncol.* 2007;29:181-182.
51. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, et al. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet.* 2005;37:934-935.
52. Levran O, Attwooll C, Henry RT, et al. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet.* 2005;37:931-933.
53. Meetei ARY, Z, Wang, W. FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *Cell Cycle.* 2004:179-187.
54. Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, et al. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet.* 2005;37:958-963.
55. Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet.* 2007;39:159-161.
56. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet.* 2007;39:162-164.
57. Venkitaraman AR. Tracing the network connecting brca and fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:266-276.
58. D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:23-34.
59. Kee Y, D'Andrea AD. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev.* 2010;24:1680-1694.
60. Kennedy RD, D'Andrea AD. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev.* 2005;19:2925-2940.
61. Ciccia A, Ling C, Coulthard R, et al. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol Cell.* 2007;25:331-343.
62. Ling C, Ishiai M, Ali AM, et al. FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *Embo J.* 2007;26(8):2104-14.
63. Yan Z, Delannoy M, Ling C, et al. A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. *Mol Cell.* 2010;37:865-878.
64. Pichierri P, Rosselli F. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *Embo J.* 2004;23:1178-1187.
65. Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev.* 2004;18:1958-1963.
66. Ali AM, Singh TR, Meetei AR. FANCM-FAAP24 and FANCI: FA proteins that metabolize DNA. *Mutat Res.* 2009;668:20-26.
67. Singh TR, Saro D, Ali AM, et al. MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM. *Mol Cell.* 2010;37:879-886.

68. Mosedale G, Niedzwiedz W, Alpi A, et al. The vertebrate Hef ortholog is a component of the Fanconi anemia tumor-suppressor pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12:763-771.
69. Rosado IV, Niedzwiedz W, Alpi AF, Patel KJ. The Walker B motif in avian FANCM is required to limit sister chromatid exchanges but is dispensable for DNA crosslink repair. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:4360-4370.
70. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, et al. Identification of the FANCI Protein, a Monoubiquitinated FANCD2 Paralog Required for DNA Repair. *Cell.* 2007;129:289-301.
71. Sims AE, Spiteri E, Sims RJ, 3rd, et al. FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:564-567.
72. Meetei AR, De Winter JP, Medhurst AL, et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet.* 2003;35:165-170.
73. Longerich S, San Filippo J, Liu D, Sung P. FANCI binds branched DNA and is monoubiquitinated by UBE2T-FANCL. *J Biol Chem.* 2009;284:23182-23186.
74. Machida YJ, Machida Y, Chen Y, et al. UBE2T Is the E2 in the Fanconi Anemia Pathway and Undergoes Negative Autoregulation. *Mol Cell.* 2006;23:589-596.
75. Alpi A, Langevin F, Mosedale G, Machida YJ, Dutta A, Patel KJ. UBE2T, the FA core complex and FANCD2 are recruited independently to chromatin: A basis for the regulation of FANCD2 monoubiquitination. *Mol Cell Biol.* 2007;27: 8421-30.
76. Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, et al. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell.* 2005;17:331-339.
77. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, et al. Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell.* 2002;109:459-472.
78. Bogliolo M, Lyakhovich A, Callen E, et al. Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *Embo J.* 2007.
79. Shigechi T, Tomida J, Sato K, et al. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res;*72: 1149-56.
80. Liu T, Ghosal G, Yuan J, Chen J, Huang J. FAN1 Acts with FANCI-FANCD2 to Promote DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Science.* 2010; 329: 693-6.
81. Kratz K, Schopf B, Kaden S, et al. Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell.* 2010;142:77-88.
82. MacKay C, Declais AC, Lundin C, et al. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell.* 2010;142:65-76.
83. Smogorzewska A, Desetty R, Saito TT, et al. A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol Cell.* 2010;39:36-47.
84. Kitao H, Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol.* 2011;93: 417-24.
85. Volker M, Mone MJ, Karmakar P, et al. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell.* 2001;8:213-224.
86. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001;27:247-254.
87. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet.* 2001;2:196-206.
88. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411:366-374.
89. Svendsen JM, Harper JW. GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution. *Genes Dev.* 2010;24:521-536.

90. San Filippo JS, P Klein, H Mechanism of Eukariotic Homologous Recombination. Annual Review of Biochemistry. 2008;77: 229-57.
91. Sartori AA, Lukas C, Coates J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection. Nature. 2007;450:509-514.
92. Gravel S, Chapman JR, Magill C, Jackson SP. DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. Genes Dev. 2008;22:2767-2772.
93. Gatei M, Young D, Cersaletti KM, et al. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. Nat Genet. 2000;25:115-119.
94. Mimitou EP, Symington LS. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. Nature. 2008;455:770-774.
95. Zhu Z, Chung WH, Shim EY, Lee SE, Ira G. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. Cell. 2008;134:981-994.
96. Baumann P, West SC. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. Trends Biochem Sci. 1998;23:247-251.
97. Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. Cell Mol Life Sci. 2009;66:1039-1056.
98. Benson FE, Baumann P, West SC. Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. Nature. 1998;391:401-404.
99. Thompson LH, Schild D. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. Mutat Res. 2001;477:131-153.
100. Ristic D, Wyman C, Paulusma C, Kanaar R. The architecture of the human Rad54-DNA complex provides evidence for protein translocation along DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:8454-8460.
101. Mazin AV, Mazina OM, Bugreev DV, Rossi MJ. Rad54, the motor of homologous recombination. DNA Repair (Amst). 2010;9:286-302.
102. Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi. Genet Res 2007;2007 Dec.:285-307.
103. West SC. The search for a human Holliday junction resolvase. Biochem Soc Trans. 2009;37:519-526.
104. Mahdi AA, Sharples GJ, Mandal TN, Lloyd RG. Holliday junction resolvases encoded by homologous *rusA* genes in *Escherichia coli* K-12 and phage 82. J Mol Biol. 1996;257:561-573.
105. Boddy MN, Gaillard PH, McDonald WH, Shanahan P, Yates JR, 3rd, Russell P. Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. Cell. 2001;107:537-548.
106. Osman F, Dixon J, Doe CL, Whitby MC. Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. Mol Cell. 2003;12:761-774.
107. Nishino T, Komori K, Ishino Y, Morikawa K. X-ray and biochemical anatomy of an archaeal XPF/Rad1/Mus81 family nuclease: similarity between its endonuclease domain and restriction enzymes. Structure. 2003;11:445-457.
108. Ciccia A, McDonald N, West SC. Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. Annu Rev Biochem. 2008;77:259-287.
109. Constantinou A, Chen XB, McGowan CH, West SC. Holliday junction resolution in human cells: two junction endonucleases with distinct substrate specificities. EMBO J. 2002;21:5577-5585.
110. Ip SC, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC. Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. Nature. 2008;456:357-361.
111. Andersen SL, Bergstralh DT, Kohl KP, LaRocque JR, Moore CB, Sekelsky J. Drosophila MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination. Mol Cell. 2009;35:128-135.

112. Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, et al. Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell*. 2009;138:63-77.
113. Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, et al. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell*. 2009;138:78-89.
114. Munoz IM, Hain K, Declais AC, et al. Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair. *Mol Cell*. 2009;35:116-127.
115. Magana-Schwencke N, Henriques JA, Chanet R, Moustacchi E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:1722-1726.
116. Lawley PD, Phillips DH. DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res*. 1996;355:13-40.
117. Poklar N, Pilch DS, Lippard SJ, Redding EA, Dunham SU, Breslauer KJ. Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer DNA duplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:7606-7611.
118. Scott BR, Pathak MA, Mohn GR. Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. *Mutat Res*. 1976;39:29-74.
119. Brem R, Daehn I, Karran P. Efficient DNA interstrand crosslinking by 6-thioguanine and UVA radiation. *DNA Repair (Amst)*;10:869-876.
120. Warren AJ, Maccubbin AE, Hamilton JW. Detection of mitomycin C-DNA adducts in vivo by ³²P-postlabeling: time course for formation and removal of adducts and biochemical modulation. *Cancer Res*. 1998;58:453-461.
121. Pritsos CA, Sartorelli AC. Generation of reactive oxygen radicals through bioactivation of mitomycin antibiotics. *Cancer Res*. 1986;46:3528-3532.
122. Tomasz M. H₂O₂ generation during the redox cycle of mitomycin C and dna-bound mitomycin C. *Chem Biol Interact*. 1976;13:89-97.
123. Deans AJ, West SC. FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Mol Cell*. 2009;36:943-953.
124. Gong Z, Kim JE, Leung CC, Glover JN, Chen J. BACH1/FANCI acts with TopBP1 and participates early in DNA replication checkpoint control. *Mol Cell*. 2010;37:438-446.
125. Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, et al. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol*. 2004;24:5776-5787.
126. Hanada K, Budzowska M, Modesti M, et al. The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks. *Embo J*. 2006;25:4921-4932.
127. Knipscheer P, Raschle M, Smogorzewska A, et al. The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science*. 2009;326:1698-1701.
128. Moldovan GL, Madhavan MV, Mirchandani KD, McCaffrey RM, Vinciguerra P, D'Andrea AD. DNA polymerase POLN participates in cross-link repair and homologous recombination. *Mol Cell Biol*. 2010;30:1088-1096.
129. Moldovan GL, D'Andrea AD. FANCD2 hurdles the DNA interstrand crosslink. *Cell*. 2009;139:1222-1224.
130. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet*. 2007;8:735-748.
131. Liu Y, West SC. More complexity to the Bloom's syndrome complex. *Genes Dev*. 2008;22:2737-2742.
132. Vinciguerra P, D'Andrea AD. FANCM: A landing pad for the Fanconi Anemia and Bloom's Syndrome complexes. *Mol Cell*. 2009;36:916-917.

133. Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, Ushio N, Ikeo K, Ogawa T. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet.* 1993;4:239-243.
134. West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:435-445.
135. Albala JS, Thelen MP, Prange C, et al. Identification of a novel human RAD51 homolog, RAD51B. *Genomics.* 1997;46:476-479.
136. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet.* 2010;42:406-409.
137. Dosanjh MK, Collins DW, Fan W, et al. Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:1179-1184.
138. Pittman DL, Weinberg LR, Schimenti JC. Identification, characterization, and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene. *Genomics.* 1998;49:103-111.
139. Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, et al. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell.* 1998;1:783-793.
140. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell.* 2002;108:171-182.
141. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:665-676.
142. Glover JN. Insights into the molecular basis of human hereditary breast cancer from studies of the BRCA1 BRCT domain. *Fam Cancer.* 2006;5:89-93.
143. Alter BP, Greene MH, Velazquez I, Rosenberg PS. Cancer in Fanconi anemia. *Blood.* 2003;101:2072.
144. Auerbach AD, Pujara K, Batish SD, Levran O, Mathew CG. The Fanconi Anemia mutation database. *Am j Hum Genet.* 2001;69, suppl 1:612a.
145. Verlander PC, Lin JD, Udono MU, et al. Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *Am J Hum Genet.* 1994;54:595-601.
146. Kutler DI, Auerbach AD. Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. *Fam Cancer.* 2004;3:241-248.
147. Morgan NV, Essop F, Demuth I, et al. A common Fanconi anemia mutation in black populations of sub-Saharan Africa. *Blood.* 2005;105:3542-3544.
148. Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV, et al. Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5734-5739.
149. Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, et al. The IVS4 + 4 A to T mutation of the fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood.* 2000;95:1493-1498.
150. Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD, et al. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood.* 2005;105:1946-1949.
151. Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res.* 2009;668:4-10.
152. Vogt PK. Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
153. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220:868-871.

154. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 1970;226:1209-1211.
155. Coffin JM. Retroviridae and their replication. In: Knipe DM, et al, eds. *Virology*. New York: Raven Press, Ltd.; 1990:1437-1500.
156. Chandra S, Levrán O, Jurickova I, et al. A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. *Mol Ther*. 2005;12:976-984.
157. Hanenberg H, Batish SD, Pollok KE, et al. Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells from patients with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol*. 2002;30:410-420.
158. Giampietro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC, Pavlakis SG, Davis JG, Auerbach AD. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*. 1993;91:1116-1120.
159. Auerbach AD, Sagi M, Adler B. Fanconi anemia: prenatal diagnosis in 30 fetuses at risk. *Pediatrics*. 1985;76:794-800.
160. Auerbach AD, Min Z, Ghosh R, et al. Clastogen-induced chromosomal breakage as a marker for first trimester prenatal diagnosis of Fanconi anemia. *Hum Genet*. 1986;73:86-88.
161. Gillio AP, Verlander PC, Batish SD, Giampietro PF, Auerbach AD. Phenotypic consequences of mutations in the Fanconi anemia FAC gene: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood*. 1997;90:105-110.
162. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. *Blood*. 2000;96:4064-4070.
163. Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, et al. Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet*. 1999;22:379-383.
164. Gregory JJ, Wagner JE, Verlander PC, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2532-2537.
165. Koc A, Pronk JC, Alikasifoglu M, Joenje H, Altay C. Variable pathogenicity of exon 43del (FAA) in four Fanconi anaemia patients within a consanguineous family. *Br J Haematol*. 1999;104:127-130.
166. Wagner JE, Tolar J, Levrán O, et al. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia and Fanconi anemia. *Blood*. 2004;103:3226-3229.
167. Reid S, Renwick A, Seal S, et al. Biallelic BRCA2 mutations are associated with multiple malignancies in childhood including familial Wilms tumour. *J Med Genet*. 2005;42:147-151.
168. Alter BP. The association between FANCD1/BRCA2 mutations and leukaemia. *Br J Haematol*. 2006;133:446-448; author reply 448.
169. Cumming RC, Lightfoot J, Beard K, Youssoufian H, O'Brien PJ, Buchwald M. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat Med*. 2001;7:814-820.
170. Scheckenbach K, Morgan M, Filger-Brillinger J, et al. Treatment of the bone marrow failure in Fanconi anemia patients with danazol. *Blood Cells Mol Dis*. 2011;48: 128-31.
171. French CA, Masson JY, Griffin CS, O'Regan P, West SC, Thacker J. Role of mammalian RAD51L2 (RAD51C) in recombination and genetic stability. *J Biol Chem*. 2002;277:19322-19330.
172. Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, et al. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol*. 2001;21:2858-2866.

173. Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, Lynch CM, Wilson C, Eiden MV. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol.* 1991;65:2220-2224.
174. Grignani F, Kinsella T, Mencarelli A, et al. High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* 1998;58:14-19.
175. Nolan GP. Phoenix cells. http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phxhtml. 1996.
176. Cornetta K, Anderson WF. Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J Virol Methods.* 1989;23:187-194.
177. Toyoshima K, Vogt PK. Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polybrene. *Virology.* 1969;38:414-426.
178. Palsson B, Andreadis S. The physico-chemical factors that govern retrovirus-mediated gene transfer. *Exp Hematol.* 1997;25:94-102.
179. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.* 1962;59:223-239.
180. Abraham J, Lemmers B, Hande MP, et al. Eme1 is involved in DNA damage processing and maintenance of genomic stability in mammalian cells. *Embo J.* 2003;22:6137-6147.
181. Seyschab H, Friedl R, Sun Y, et al. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood.* 1995;85:2233-2237.
182. Schindler D, Friedl R, Gavvovidis I, et al. Application of cell cycle testing in Fanconi anemia. In: Schindler D, Hoehn H, eds. *Fanconi anemia A paradigmatic disease for the understanding of cancer and aging*. Vol. 15. Basel: Karger; 2007:110-130.
183. Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica.* 2008;93:511-517.
184. Godthelp BC, Wiegant WW, van Duijn-Goedhart A, et al. Mammalian Rad51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesion and genomic stability. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:2172-2182.
185. Rio P, Hanenberg H. Functional knock-down of human RAD51 for testing the Fanconi anemia-BRCA connection. In: Schindler D, Hoehn H, eds. *Fanconi anemia A paradigmatic disease for the understanding of cancer and aging*. Vol. 15. Basel; 2007:211-225.
186. Alter BP. Radiosensitivity in Fanconi's anemia patients. *Radiother Oncol.* 2002;62:345-347.
187. Singh TR, Bakker ST, Agarwal S, et al. Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M. *Blood.* 2009;114:174-180.
188. Yan J, Kim YS, Yang XP, et al. The ubiquitin-interacting motif containing protein RAP80 interacts with BRCA1 and functions in DNA damage repair response. *Cancer Res.* 2007;67:6647-6656.
189. Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, et al. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science.* 2007;316:1194-1198.
190. Sobhian B, Shao G, Lilli DR, et al. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science.* 2007;316:1198-1202.
191. Kim H, Chen J, Yu X. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science.* 2007;316:1202-1205.
192. Feng L, Huang J, Chen J. MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair. *Genes Dev.* 2009;23:719-728.

193. Iijima J, Zeng Z, Takeda S, Taniguchi Y. RAP80 acts independently of BRCA1 in repair of topoisomerase II poison-induced DNA damage. *Cancer Res*;70:8467-8474.
194. Liu Z, Wu J, Yu X. CCDC98 targets BRCA1 to DNA damage sites. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14:716-720.
195. Kim H, Huang J, Chen J. CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14:710-715.
196. Shebzukhov YV, Koroleva EP, Khlgatian SV, et al. RAP80/UIMC1 as cancer-associated antigen: alternative splice variants and their immunogenicity. *Cancer Lett*. 2007;255:255-262.
197. Osorio A, Barroso A, Garcia MJ, Martinez-Delgado B, Urioste M, Benitez J. Evaluation of the BRCA1 interacting genes RAP80 and CCDC98 in familial breast cancer susceptibility. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113:371-376.
198. Akbari MR, Ghadirian P, Robidoux A, et al. Germline RAP80 mutations and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113:377-381.
199. Masson JY, Tarsounas MC, Stasiak AZ, et al. Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev*. 2001;15:3296-3307.
200. Sigurdsson S, Van Komen S, Bussen W, Schild D, Albala JS, Sung P. Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev*. 2001;15:3308-3318.
201. Miller KA, Yoshikawa DM, McConnell IR, Clark R, Schild D, Albala JS. RAD51C interacts with RAD51B and is central to a larger protein complex in vivo exclusive of RAD51. *J Biol Chem*. 2002;277:8406-8411.
202. Braybrooke JP, Spink KG, Thacker J, Hickson ID. The RAD51 family member, RAD51L3, is a DNA-stimulated ATPase that forms a complex with XRCC2. *J Biol Chem*. 2000;275:29100-29106.
203. Masson JY, Stasiak AZ, Stasiak A, Benson FE, West SC. Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:8440-8446.
204. Kurumizaka H, Ikawa S, Nakada M, et al. Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3.Rad51C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5538-5543.
205. Wiese C, Collins DW, Albala JS, Thompson LH, Kronenberg A, Schild D. Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and XRCC3 in human cells. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:1001-1008.
206. Schoenmakers EF, Huysmans C, Van de Ven WJ. Allelic knockout of novel splice variants of human recombination repair gene RAD51B in t(12;14) uterine leiomyomas. *Cancer Res*. 1999;59:19-23.
207. Ingraham SE, Lynch RA, Kathiresan S, Buckler AJ, Menon AG. hREC2, a RAD51-like gene, is disrupted by t(12;14) (q15;q24.1) in a uterine leiomyoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;115:56-61.
208. Johnson J, Healey S, Khanna KK, Chenevix-Trench G. Mutation analysis of RAD51L1 (RAD51B/REC2) in multiple-case, non-BRCA1/2 breast cancer families. *Breast Cancer Res Treat*;129:255-263.
209. Thomas G, Jacobs KB, Kraft P, et al. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). *Nat Genet*. 2009;41: 579-84.
210. Tarsounas M, Munoz P, Claas A, et al. Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. *Cell*. 2004;117:337-347.
211. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*. 2008;42:301-334.

212. Badie S, Escandell JM, Bouwman P, et al. BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping. *Nat Struct Mol Biol*;17:1461-1469.
213. Thacker J, Zdzienicka MZ. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair (Amst)*. 2003;2:655-672.
214. O'Regan P, Wilson C, Townsend S, Thacker J. XRCC2 is a nuclear RAD51-like protein required for damage-dependent RAD51 focus formation without the need for ATP binding. *J Biol Chem*. 2001;276:22148-22153.
215. Johnson RD, Liu N, Jasin M. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature*. 1999;401:397-399.
216. Deans B, Griffin CS, Maconochie M, Thacker J. Xrcc2 is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice. *EMBO J*. 2000;19:6675-6685.
217. Shamseldin HE, Elfaki M, Alkuraya FS. Exome sequencing reveals a novel Fanconi group defined by XRCC2 mutation. *J Med Genet*;2012;49:184-6.
218. Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC. RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science*. 2004;303:243-246.
219. Forget AL, Bennett BT, Knight KL. Xrcc3 is recruited to DNA double strand breaks early and independent of Rad51. *J Cell Biochem*. 2004;93:429-436.
220. Brenneman MA, Wagener BM, Miller CA, Allen C, Nickoloff JA. XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell*. 2002;10:387-395.
221. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*. 2010;42:410-414.
222. Rodrigue A, Lafrance M, Gauthier MC, et al. Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *EMBO J*. 2006;25:222-231.
223. Liu Y, Tarsounas M, O'Regan P, West SC. Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem*. 2007;282:1973-1979.
224. Levy-Lahad E. Fanconi anemia and breast cancer susceptibility meet again. *Nat Genet*. 2010;42:368-369.
225. Bennett BT, Knight KL. Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *J Cell Biochem*. 2005;96:1095-1109.
226. Gildemeister OS, Sage JM, Knight KL. Cellular redistribution of Rad51 in response to DNA damage: novel role for Rad51C. *J Biol Chem*. 2009;284:31945-31952.
227. Badie S, Liao C, Thanasoula M, Barber P, Hill MA, Tarsounas M. RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation. *J Cell Biol*. 2009;185:587-600.
228. Huang J, Huen MS, Kim H, et al. RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*. 2009;11:592-603.
229. Miller KA, Sawicka D, Barsky D, Albala JS. Domain mapping of the Rad51 paralog protein complexes. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:169-178.
230. Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, et al. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:6236-6240.
231. Takao N, Kato H, Mori R, et al. Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation. *Oncogene*. 1999;18:7002-7009.
232. Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, et al. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6354-6358.

233. Kuznetsov SG, Haines DC, Martin BK, Sharan SK. Loss of Rad51c leads to embryonic lethality and modulation of Trp53-dependent tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* 2009;69:863-872.
234. Kuznetsov S, Pellegrini M, Shuda K, et al. RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. *J Cell Biol.* 2007;176:581-592.
235. Alter BP, Rosenberg PS, Brody LC. Clinical and molecular features associated with biallelic mutations in FANCD1/BRCA2. *J Med Genet.* 2006;44:1-9.
236. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science.* 2002;297:606-609.
237. Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, et al. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat Genet.* 1996;13:238-240.
238. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 1995;378:789-792.
239. Oliver AW, Swift S, Lord CJ, Ashworth A, Pearl LH. Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep.* 2009;10:990-996.
240. Cantor S, Drapkin R, Zhang F, et al. The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:2357-2362.
241. Elledge SJ, Amon A. The BRCA1 suppressor hypothesis: an explanation for the tissue-specific tumor development in BRCA1 patients. *Cancer Cell.* 2002;1:129-132.
242. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19:212-219.
243. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet.* 2008;40:695-701.
244. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:321-345.
245. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science.* 2003;302:643-646.
246. Wickramanyake A, Bernier G, Pennil C, et al. Loss of function germline mutations in RAD51D in women with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*;2012; epub.
247. Tischkowitz MD, Morgan NV, Grimwade D, et al. Deletion and reduced expression of the Fanconi anemia FANCA gene in sporadic acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2004;18:420-425.
248. van der Heijden MS, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2003;63:2585-2588.
249. Marsit CJ, Liu M, Nelson HH, Posner M, Suzuki M, Kelsey KT. Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene.* 2004;23:1000-1004.
250. Pejovic T, Yates JE, Liu HY, et al. Cytogenetic instability in ovarian epithelial cells from women at risk of ovarian cancer. *Cancer Res.* 2006;66:9017-9025.
251. Narayan G, Arias-Pulido H, Nandula SV, et al. Promoter hypermethylation of FANCF: disruption of Fanconi Anemia-BRCA pathway in cervical cancer. *Cancer Res.* 2004;64:2994-2997.
252. Goggins M, Schutte M, Lu J, et al. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 1996;56:5360-5364.
253. Gallmeier E, Hucl T, Brody JR, et al. High-throughput screening identifies novel agents eliciting hypersensitivity in Fanconi pathway-deficient cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67:2169-2177.

254. Hucl T, Gallmeier E. DNA repair: exploiting the Fanconi anemia pathway as a potential therapeutic target. *Physiol Res*;60:453-465.
255. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*;376:245-251.
256. Kennedy RD, Chen CC, Stuckert P, et al. Fanconi anemia pathway-deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated. *J Clin Invest*. 2007;117: 1440-9.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
ATM	<i>Ataxia Teleangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia Teleangiectasia and RAD3 Related Protein</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BIR	<i>Break Induced Replication</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>Breast Cancer Gene 1</i> , Brustkrebsgen 1
BRCA2	<i>Breast Cancer Gene 2</i> , Brustkrebsgen 2
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CHK1	Checkpoint-Kinase 1
CHK2	Checkpoint-Kinase 2
DEB	Diepoxybutan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FA	Fanconi-Anämie
FAAP	FA-assoziierte Proteine
G418	Geneticin, Neomycinanalogon
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HJ	<i>Holliday Junction</i>
HR	Homologe Rekombination
ICL	<i>Interstrand Crosslinks</i>
IFAR	<i>International Fanconi Anemia Registry</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
LCL	<i>Lymphoid Cell Lines</i> , lymphoide Zelllinien
MCV	<i>Mean Corpuscular Volume</i> , Mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHF I und II	FANCM-assoziierte <i>histone fold</i> Proteine I und II
Min.	Minuten
MMC	Mitomycin C
NEO	Neomycinphosphotransferaseresistenzgen
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	<i>Non Homologous End-Joining</i> , Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung

PARP-1	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1
PI	Propidiumiodid
PURO	Puromycin-N-Acetyltransferaseresistenzgen
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A
rpm	<i>Rounds Per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
SCE	<i>Sister Chromatid Exchange</i> , Schwester-Chromatid-Austausch
Sek.	Sekunden
SNP	<i>Single Nucleotid Polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismen
SSA	<i>Single Strand Annealing</i> , Einzelstrangannäherung
SDSA	<i>Synthesis Dependent Strand Annealing</i>
Ub	Ubiquitin

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Daumenfehlbildung bei FA.....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	4
Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus	5
Abb. 4: Interaktion der bisher bekannten FA-Proteine	7
Abb. 5: Aktivierung von FA-Proteinen durch Phosphorylierung	10
Abb. 6: Doppelstrangbruchreparatur durch Homologe Rekombination.....	12
Abb. 7: Vereinfachte Darstellung der ICL-Reparatur.....	15
Abb. 8: Kontroll-Vektoren	39
Abb. 9: Expressionsvektoren für <i>ABRAXAS</i> und <i>RAP80</i>	40
Abb. 10: Exemplarische Darstellung der Titerplatten	41
Abb. 11: Abweichung des G ₂ /M-Arrest zur Kontrolle (Patient Nr. 1)	44
Abb. 12: Retrovirale Komplementationsanalyse (Patient Nr. 9).....	45
Abb. 13: Abweichung des G ₂ /M-Arrests zur Kontrolle (Patient Nr. 1-14)	46
Abb. 14: Westernblot – Nachweis von <i>ABRAXAS</i>	48
Abb. 15: Abweichung des G ₂ -Arrest zur Kontrolle (Patient Nr. 8)	50
Abb. 16: Retrovirale Komplementationsanalyse (Patient Nr. 8).....	51
Abb. 17: Survival-Test der LCL von Patient Nr. 8	52
Abb. 18: Zellzyklusanalyse IRS-3.....	54
Abb. 19: <i>Linkage</i> -Analyse	57

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit von kongenitalen Dysplasien bzw. Auffälligkeiten bei FA.....	2
Tabelle 2: FA-Gene. Platzierung und Funktion im <i>FA/BRCA-Pathway</i>	6
Tabelle 3: Die Titer der NEO-Konstrukte.....	41
Tabelle 4: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse (Patient Nr. 1).....	43
Tabelle 5: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse (Patient Nr. 8).....	49

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

15.04.2014

Verena Friemann geb. Erven