

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Schipper

Funktionelle Kandidatengentestung an  
Patientenzellen mit Fanconi-Anämie

Dissertation

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

vorgelegt von  
Marcel Fabian Glaas

2012

---

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

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

Erstgutachter: Prof. Dr. med. H. Hanenberg  
Zweitgutachter: Prof. Dr. med. U. Germing

---

„Der Arzt hat das unglaubliche Glück, einem Beruf nachzugehen, der gleichzeitig sein  
größtes Hobby ist!“

Guido Fanconi

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>.....</b>
<b>1 Fanconi-Anämie .....</b>	<b>1</b>
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Historisches .....	3
1.3 Epidemiologie.....	4
1.4 Symptomatik.....	4
1.4.1 Kongenitale Fehlbildungen .....	4
1.4.2 Knochenmarkversagen und hämatologische Symptome.....	6
1.4.3 Neoplasien .....	8
1.4.3.1 Hämatologische Tumoren .....	8
1.4.3.2 Nicht-hämatologische Tumoren .....	9
1.4.4 Wachstumsstörungen und endokrine Störungen.....	10
1.4.5 Infertilität.....	11
1.5 Pathomechanismus der Fanconi-Anämie.....	12
1.5.1 DNA-Schäden.....	12
1.5.1.1 Ursachen für Doppelstrangbrüche .....	13
1.5.2 DNA-Reparatur.....	14
1.5.2.1 Reparatur von Doppelstrangbrüchen .....	14
1.5.2.2 Non-homologous end-joining (NHEJ).....	14
1.5.2.3 Homologe Rekombination und Fanconi-Anämie.....	16
1.5.3 Der Zellzyklus.....	18
1.5.3.1 Physiologischer Ablauf des Zellzyklus.....	18
1.5.3.2 Durchflusszytometrie .....	19
1.5.3.3 Zellzyklusregulation .....	20
1.5.3.4 Zellzyklusarrest in Zellen von FA-Patienten.....	20
1.6 Diagnostik und Differentialdiagnosen .....	21
1.6.1 Zellkulturtechnik und durchflusszytometrische Analyse.....	22

---

1.6.2	FANCD2-Westernblot .....	23
1.6.3	Pränataldiagnostik.....	25
1.7	<i>Therapie</i> .....	26
1.7.1	Supportive Therapie.....	26
1.7.1.1	Androgentherapie, Zytokintherapie.....	26
1.7.1.2	Supportive Chirurgie.....	26
1.7.2	Kausale Therapie .....	27
1.7.2.1	Stammzelltransplantation.....	27
1.7.2.2	Stammzellgentherapie.....	29
1.8	<i>Der Fanconi-Anämie-Reparaturweg</i> .....	29
1.9	<i>Ziel der Arbeit</i> .....	31
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.1	<i>Material</i> .....	32
2.1.1	Plasmide .....	32
2.1.1.1	Kandidatengene .....	32
2.1.1.2	Expressionsplasmid („S91IN“ = pSFb91).....	32
2.1.2	Größen- und Molekulargewichtsstandards.....	33
2.1.3	Oligonukleotide für Sequenzierungen.....	33
2.1.4	Enzyme.....	33
2.1.5	Zellkultur .....	33
2.1.5.1	Retrovirus-Produzentenzelllinien .....	33
2.1.5.2	adhärente Zelllinien .....	33
2.1.5.3	Patientenzelllinien.....	34
2.1.5.4	Nährmedien etc.....	34
2.1.6	Westernblot.....	34
2.1.6.1	Antikörper .....	34
2.2	<i>Methoden</i> .....	35
2.2.1	Molekularbiologische Techniken.....	35
2.2.1.1	PCR-Klonierung .....	35

---

2.2.1.2	Restriktionsverdau .....	36
2.2.1.3	Gelelektrophorese .....	37
2.2.1.4	Aufreinigung der DNA .....	37
2.2.1.5	Ligation .....	38
2.2.1.6	Transformation von Bakterien.....	38
2.2.1.7	Isolierung der Plasmid-DNA.....	38
2.2.1.8	DNA-Mengenbestimmung .....	39
2.2.1.9	Sequenzierung .....	39
2.2.2	Zellkulturtechniken .....	40
2.2.2.1	Allgemeines.....	40
2.2.2.2	Transiente Virusherstellung – Transfektion mit FuGENE™.....	41
2.2.2.3	Stabile Verpackungszelllinien – Infektion der pg13-Zellen.....	42
2.2.2.4	Selektion über Neomycin-Analogon G418 .....	42
2.2.2.5	Kryokonservierung von Produzentenzelllinien .....	43
2.2.2.6	Virustitration.....	43
2.2.2.7	Transduktion von lymphoblastoiden B-Zelllinien (LCL).....	44
2.2.2.8	Mitomycin C-Behandlung der Patienten-LCLs.....	45
2.2.2.9	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	45
2.2.3	Westernblot.....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	<i>Testung der klonierten Viruskonstrukte .....</i>	<i>47</i>
3.1.1	Titerbestimmung der Viruskonstrukte .....	48
3.1.2	G418-Resistenz-Nachweis .....	49
3.1.3	Nachweis der Überexpression in pg13-Zellen.....	49
3.2	<i>FANCD2-Westernblot der FA-Patientenzellen .....</i>	<i>51</i>
3.3	<i>Westernblot der FA-Zelllinien zu den Kandidatengenegen .....</i>	<i>52</i>
3.4	<i>FACS-Analyse der transduzierten Patientenzellen.....</i>	<i>54</i>
3.4.1	Retrovirale Komplementation .....	54
3.4.2	FANCA und gesunde Probandenzellen.....	55

---

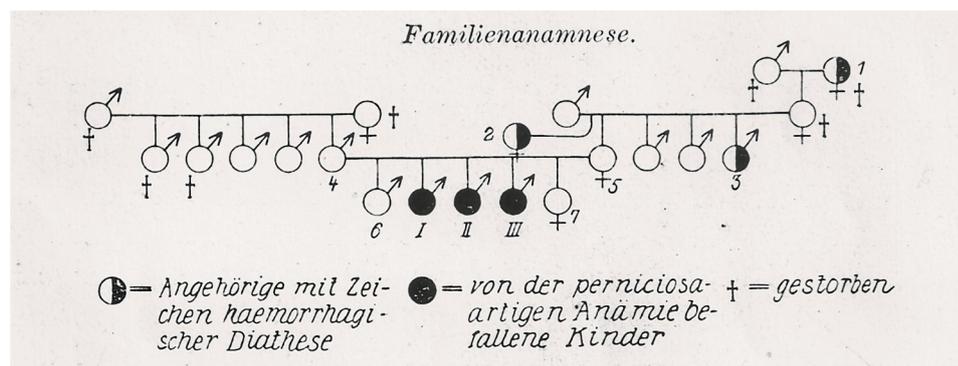
3.4.3	Zellen eines Patienten mit <i>einer</i> FANCD2-Bande im FACS.....	57
3.4.4	Zellen eines Patienten mit <i>zwei</i> FANCD2-Banden im FACS.....	59
3.4.5	Ergebnisse der FACS-Analyse.....	61
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1	<i>DNA-Reparaturgene bei Fanconi-Anämie.....</i>	<i>63</i>
4.2	<i>Voraussetzungen.....</i>	<i>64</i>
4.3	<i>Qualität der Viruskonstrukte in Verpackungszelllinien.....</i>	<i>64</i>
4.4	<i>Ergebnisse des FANCD2-Westernblots.....</i>	<i>66</i>
4.5	<i>Strukturelle Kandidatengenanalyse mittels Westernblot.....</i>	<i>67</i>
4.6	<i>Bewertung der durchflusszytometrischen Analyse.....</i>	<i>68</i>
4.6.1	<i>Patientenzellen und Mosaikbildung.....</i>	<i>68</i>
4.7	<i>Bewertung der getesteten Kandidatengene.....</i>	<i>70</i>
4.7.1	<i>Kandidatengene.....</i>	<i>70</i>
4.7.2	<i>EME1 und MUS81.....</i>	<i>71</i>
4.7.3	<i>UBE2T.....</i>	<i>75</i>
4.7.4	<i>FAAP24.....</i>	<i>76</i>
4.7.5	<i>FAAP100.....</i>	<i>77</i>
4.7.6	<i>MERIT40.....</i>	<i>78</i>
4.8	<i>Ausblick.....</i>	<i>79</i>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>94</b>

---

# 1 Fanconi-Anämie

## 1.1 Einleitung

Die Fanconi-Anämie ist eine autosomal- und x-chromosomal-rezessive Erkrankung, die durch die klinische Trias aus angeborenen Fehlbildungen an unterschiedlichen Organen, frühem progredientem Versagen der Hämatopoese und erhöhtem Malignomrisiko charakterisiert ist. Bei einer Inzidenz von 1:100.000 ist das Krankheitsbild genetisch und phänotypisch sehr heterogen, weshalb eine sichere klinische Diagnose oft erschwert ist (1-3). Die Fanconi-Anämie kann durch Mutationen in bislang 15 bekannten Genen verursacht werden [*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCI/BRIP1*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN/PALB2*, *FANCO/RAD51C* (4, 5) und kürzlich *FANCP/SLX4* (6, 7)], denen mittlerweile die 15 Komplementationsgruppen (FA-A, FA-B etc.) zugeordnet werden konnten. Ein Großteil der Genprodukte bildet einen gemeinsamen, nukleären Enzymkomplex, der die Reparatur von DNA-Crosslinks und DNA-Doppelstrangbrüchen gewährleistet. Ca. 60% der Fälle lassen sich der Komplementationsgruppe *FANCA* zuordnen. Das Gen für *FANCB* stellt eine Besonderheit dar, weil es als einziges Fanconi-Anämie-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und somit einem X-chromosomal erblich folgt. Da sich nicht alle Patienten den bekannten Komplementationsgruppen zuordnen lassen, muss davon ausgegangen werden, dass noch weitere, bisher nicht identifizierte FA-Gene existieren. Durch Testung sogenannter „Kandidatengene“, also bereits bekannter DNA-Reparaturgene, versucht man, weitere Gene zu identifizieren, die bei einem Ausfall das Krankheitsbild „Fanconi-Anämie“ auslösen. Diese könnten dann als neue, bisher unbekannte FA-Gene klassifiziert werden.



**Abb. 1:** Erstbeschreibung der Fanconi-Anämie aus (2)

**Tab. 1:** Fanconi-Anämie-Gene und ihre Frequenz in der nordeuropäischen Bevölkerung als Übersicht zusammengestellt aus (5), (6) und (8); die Frequenz des Auftretens hängt stark von der betrachteten Population ab

Subtyp	defektes Gen	Lokalisation	Core-Complex	Frequenz in %
<b>A</b>	<i>FANCA</i>	16q24.3	ja	66
<b>B</b>	<i>FANCB</i>	Xp22.2	ja	<1
<b>C</b>	<i>FANCC</i>	9q22.3	ja	12
<b>D1</b>	<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12.3	nein	<1
<b>D2</b>	<i>FANCD2</i>	3p26	nein	<1
<b>E</b>	<i>FANCE</i>	6p21.3	ja	4
<b>F</b>	<i>FANCF</i>	11p15	ja	4
<b>G</b>	<i>FANCG</i>	9p13	ja	12
<b>I</b>	<i>FANCI</i>	15q26.1	nein	<1
<b>J</b>	<i>FANCI/BRIP1</i>	17q22-24	nein	<1
<b>L</b>	<i>FANCL</i>	2q16.1	ja	<1
<b>M</b>	<i>FANCM</i>	14q21.3	ja	k.A.
<b>N</b>	<i>FANCN/PALB2</i>	16p12.1	nein	k.A.
<b>O</b>	<i>FANCO/RAD51C</i>	17q25.1	nein	k.A.
<b>P</b>	<i>FANCP/SLX4</i>	16p13.3	nein	k.A.

## 1.2 Historisches

Im Jahre 1927 wurde durch den schweizer Kinderarzt Prof. Guido Fanconi im „Jahrbuch für Kinderheilkunde“ erstmalig eine Anämie beschrieben, die er bei drei Brüdern im Alter zwischen fünf und sieben Jahren beobachtet hatte. Charakteristisch waren im Blutbild makrozytäre rote Blutkörperchen (9). Da diese Form der *Blutarmut* bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt war, beschrieb Fanconi sie zunächst als „*familiäre, infantile, pernizio- saartige Anämie*“ (2). Als Ursache für diese 1931 durch Prof. Nägeli erstmals als „Fanconi-Anämie“ bezeichnete Krankheit stellte Fanconi selbst 1964 eine naheliegende Hypothese auf, an die er sich in seiner Biographie erinnert:

*„[...] 1964, stellte ich wieder eine kühne Hypothese auf, nämlich, dass auch die „Fanconi-Anämie“, die mit so vielen Missbildungen verbunden ist, auf einer Chromosomenstörung beruhen dürfte. Ich dachte an eine Translokation. Wiederum sagte ein Kritiker, diesmal ein berühmter Hämatologe, meine Hypothese sei konfus. Lejeune teilte mir mit, dass bei den von ihm untersuchten Fällen von Fanconi-Anämie Zahl und Gestalt der Chromosomen normal seien. Trotzdem setzte in mehreren Chromosomenlaboratorien (Zürich, Boston, New York, Heidelberg) ein Suchen nach der vermuteten Aberration ein. Statt einer Translokation fand man eine ganz neue Störung, nämlich eine erhöhte Brüchigkeit aller Chromosomen. Dadurch wurde die Fanconi-Anämie, eine seltene Krankheit, plötzlich weltberühmt.“ (10)*

Heute, beinahe 80 Jahre nach der Erstbeschreibung der Fanconi-Anämie (FA), wächst das Wissen über diese Krankheit stetig, und doch wird es wahrscheinlich noch einige Zeit dauern, bis die grundlegenden Pathomechanismen vollständig verstanden sind. Mit dem Ziel der internationalen Zusammenarbeit und der weltweiten Datensammlung wurde im Jahre 1982 durch die Amerikanerin Dr. Arleen Auerbach und die Deutsche Prof. Dr. Traute Schröder-Kurth das IFAR (International Fanconi Anemia Registry) an der Rockefeller University in New York gegründet (11). Hier wurden neben biologischem Material von FA-Patienten klinische und genetische Informationen gesammelt und verwaltet. Auch war es Frau Prof. Schröder-Kurth, die als erste eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit bei Zelllinien von FA-Patienten feststellte und somit eine wichtige Grundlage für die Diagnostik der Fanconi-Anämie legte (12).

### 1.3 Epidemiologie

Mit weltweiten Prävalenz von 1-5 pro einer Million (13) und einer Heterozygotenfrequenz von eins zu 300 in der Normalbevölkerung (14) zählt die Fanconi-Anämie zu den seltenen Erkrankungen. In einigen Bevölkerungsgruppen konnten sogenannte „Foundermutationen“ beobachtet werden, die innerhalb dieser Gruppe eine wesentlich höhere Heterozygotenfrequenz aufweisen. Beispielsweise ist bei Ashkenazi-Juden im Vergleich zu anderen Bevölkerungsgruppen wesentlich häufiger eine Mutation im *FANCC*-Gen (15) zu finden, während bei Japanern eine „Foundermutation“ für das *FANCG*-Gen beschrieben wurde (16). In der südafrikanischen Population liegt die Heterozygotenfrequenz für einen Defekt in *FANCA* bei eins zu 80 (14, 17), bei spanischen Gypsies für *FANCA* sogar bei eins zu 64 (18).

### 1.4 Symptomatik

Bereits in der Erstbeschreibung der Fanconi-Anämie wurde von Guido Fanconi die enorme phänotypische Vielfalt der entdeckten Krankheit beschrieben:

*„[...]Beschreibung einer familiären, zur Zeit der ersten Streckung (5.-7. Jahr) ausbrechenden, letal verlaufenden, perniziosaartigen Anämie bei drei Brüdern mit Mikrozephalie, guter Intelligenz, intensiv brauner Hautpigmentierung, Hautblutungen, Hypoplasie der Hoden, Strabismus convergens und stark gesteigerten Sehnenreflexen. Bei einem typisch perniziösen Blutbild fehlen alle Zeichen einer gesteigerten Hämolyse.“*(2)

Das Krankheitsbild der FA lässt sich heute durch die klinische Trias aus *angeborenen Fehlbildungen* an verschiedenen Organen, frühem und progredientem *Versagen der Hämatopoese* und einem *erhöhten Malignomrisiko* charakterisieren (8).

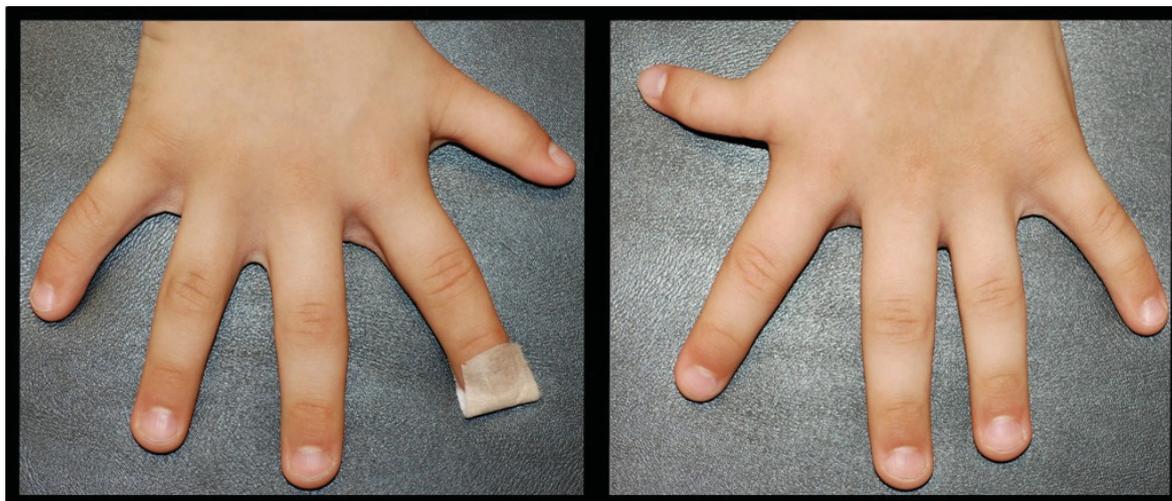
#### 1.4.1 Kongenitale Fehlbildungen

Etwa 2/3 aller Patienten mit Fanconi-Anämie weisen angeborenen Fehlbildung auf (8). Häufig, insbesondere wenn die Fehlbildungen diskret sind, wird jedoch die Diagnose „Fanconi-Anämie“ erst bei Einsetzen von hämatologischen Auffälligkeiten gestellt (19).

Etwa 71% der Patienten mit kongenitalen Fehlbildungen weisen skeletale Veränderungen auf, die sich beispielsweise als Hüftdysplasie, Skoliose oder Radiusstrahldefekte mit oder ohne Hypoplasie des Daumes manifestieren können (8). Interessanterweise können diese Radiusstrahlfehlbildungen uni- oder bilateral auftreten (20). Man vermutet, dass ein Defekt im FA-Pathway die Wahrscheinlichkeit für Anomalien um ein Vielfaches erhöht, aber nicht zwingend mit sich bringt (19). Ungefähr 64% der Patienten weisen dermatologische Auffälligkeiten wie Hypopigmentierung oder Hyperpigmentierung mit „Café-au-lait-Flecken“ auf. Eine von Geburt an verminderte Körpergröße stellt mit 63% der Betroffenen die dritthäufigste Fehlbildung dar (21). Bei ungefähr 30% aller Patienten liegen *keine* kongenitalen Fehlbildungen vor, sodass die Erstsymptome der Fanconi-Anämie in diesen Fällen häufig hämatologischer Art sind.

**Tab. 2:** Anomalien und Häufigkeit in Fällen von Fanconi-Anämie, mod. nach (8)

<i>Art der Fehlbildung/ Lokalisation</i>	<i>Frequenz (%)</i>
Skelett (Radiusstrang, Hüfte, Skoliose etc.)	71
Hautpigmentierung (Café-au-lait, Hypo- und Hyperpigmentierungen)	64
Minderwuchs (Kopfumfang, Größe, Gewicht)	63
Augen (Mikrophthalmie, Katarakt)	38
Nieren & Harntrakt (z.B. unilaterale Hypo-/Aplasie, Hufeisenniere)	34
Männliches Genitale	20
Mentale Retardierung	16
Gastrointestinale Anomalien (z.B. Anal-/Duodenalatresie, Fisteln)	14
Kardiovaskuläres System	13
Auditives System (Innenohrschwerhörigkeit)	11
Zentrales Nervensystem (z.B. Hydrozephalus, Septum Pellucidum)	8
<i>Keine Anomalien</i>	30

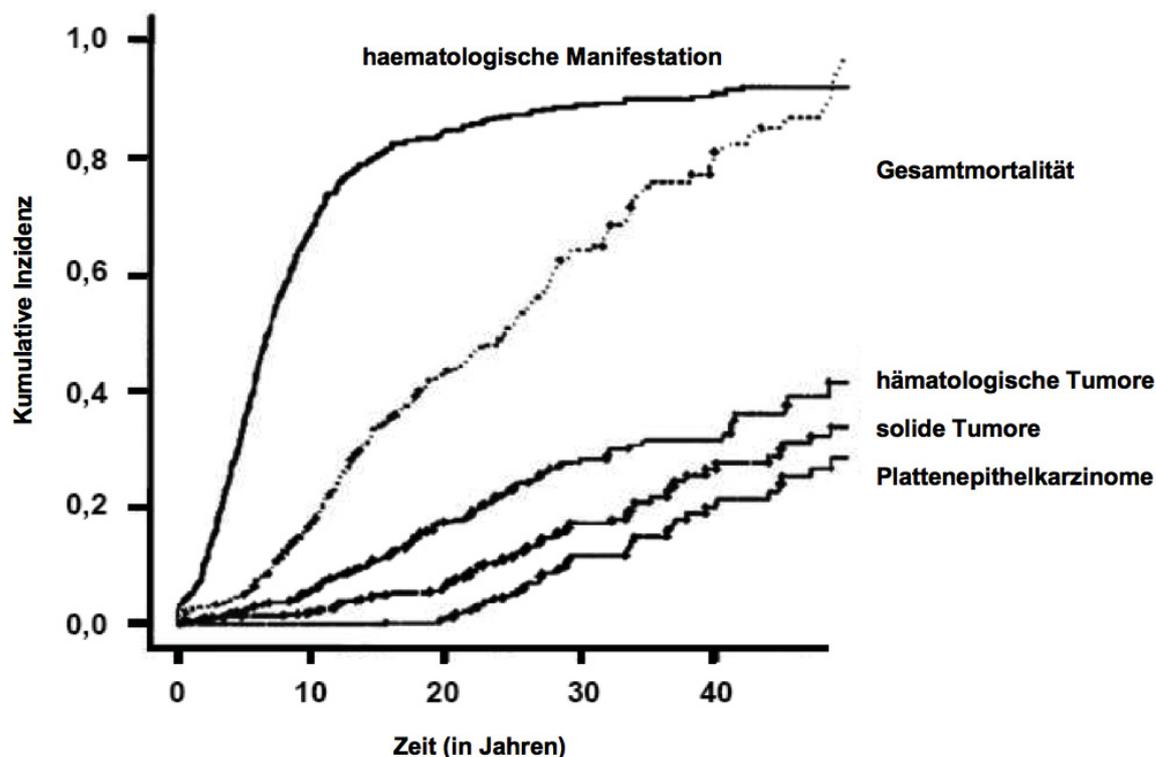


**Abb. 2:** beidseitige Daumenhypoplasie als skeletale Anomalien bei FA,  
Foto mit freundlicher Genehmigung der Familie

#### 1.4.2 Knochenmarkversagen und hämatologische Symptome

Die Fanconi-Anämie gilt als häufigste Ursache für hereditäres Knochenmarkversagen und führt besonders in homozygoten Anlageträgern gehäuft zu aplastischen Anämien, myelodysplastischen Syndromen (MDS) und Leukämien (21). Im mittleren Alter von 7 Jahren treten bei FA-Patienten im Durchschnitt zum ersten Mal hämatologische Symptome auf, die häufig, sofern keine Fehlbildungen (s.o) vorliegen, das erste Merkmal der Fanconi-Anämie darstellen (19). Einige kongenitale Fehlbildungen wurden als Risikomarker für den Verlauf des Knochenmarkversagens assoziiert. So haben Patienten mit Radiusstrahlfehlbildungen ein 5,5-fach erhöhtes Risiko, ein Knochenmarkversagen zu erleiden (8). Die kumulative Inzidenz des terminalen Knochenmarkversagens liegt im Alter von 40 Jahren bei 90% (8), sodass die hämatologischen Abnormalitäten als wichtigster klinischer Aspekt der Fanconi-Anämie bewertet werden. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die kumulativen Inzidenzen diverser Symptome in verschiedenen Lebensphasen. Es existieren ebenfalls Berichte von Patienten, die über den gesamten Krankheitsverlauf hinweg keine hämatologischen Symptome entwickelt haben (22). Die initialen Befunde können vielfältig sein; so ergab eine Studie mit 332 diagnostizierten FA-Patienten, dass bei 176 (53%) Patienten eine Panzytopenie, bei 128 (38%) Patienten eine Thrombozytopenie, bei 6 Patienten eine Anämie und bei einem einzigen Patient eine Neutropenie als *Erstbefund* festgestellt wurden, während bei den restlichen Patienten ein hämatologisches Malignom die Erstdiag-

den, während bei den restlichen Patienten ein hämatologisches Malignom die Erstdiagnose war (22).



**Abb. 3** kumulative Inzidenzen bei der Fanconi-Anämie, mod. nach (23)

Im Jahre 2008 wurde im Rahmen der Konsensus-Konferenz in Chicago das Knochenmarkversagen bei der Fanconi-Anämie je nach Grad der Zytopenie in drei Gruppen eingeteilt, die gleichzeitig wichtige Grenzwerte für die therapeutischen Empfehlungen darstellen:

**Tab. 3:** Schweregrade des Knochenmarkversagens bei Fanconi-Anämie, eingeteilt anhand von Blutparametern, nach (24)

	leicht	mittelgradig	schwer
<b>Granulozyten</b>	über 1.000/ $\mu$ l	unter 1.000/ $\mu$ l	unter 500/ $\mu$ l
<b>Thrombozyten</b>	über 50.000/ $\mu$ l	unter 50.000/ $\mu$ l	unter 30.000/ $\mu$ l
<b>Hämoglobin (Hb)</b>	über 8,0 g/dl	unter 8,0 g/dl	unter 8,0 g/dl

### 1.4.3 Neoplasien

FA-Patienten haben ein vielfach erhöhtes Risiko im Laufe ihres Lebens eine maligne Neoplasie zu entwickeln. Durch die Auswertung der im IFAR gesammelten Daten konnte 2003 ein genauerer Überblick über die verschiedenen Krebserkrankungen gewonnen werden, die vermehrt im Rahmen der Fanconi-Anämie auftreten (23). Von 754 durch Chromosomenbruchuntersuchung diagnostizierten FA-Patienten entwickelten 173 Patienten insgesamt 199 Neoplasien. Diese konnten in 120 (60%) hämatologische und 79 (40%) nicht-hämatologische Tumoren eingeteilt werden. Die Prognose von Patienten mit Defekten in *FANCD1/BRCA2* und *FANCN/PALB2* unterscheidet sich deutlich von denen der übrigen Patienten. Individuen dieser Komplementationsgruppen erreichen selten ein höheres Alter als sieben Jahre und erkranken sehr früh an mindestens einem Malignom. Hierbei stehen die akute myeloische Leukämie (AML), Wilms-Tumoren der Niere sowie Hirntumore im Vordergrund, die bei anderen Komplementationsgruppen eher selten vorkommen (25-27). Diese Erkenntnis unterstreicht die Bedeutung der genauen Bestimmung des Gendefektes bei Patienten mit Fanconi-Anämie.

#### 1.4.3.1 Hämatologische Tumoren

Hämatologische Neoplasien stellen mit 60% die größte Gruppe der Tumoren im Rahmen der Fanconi-Anämie dar. Im Alter von 20 Jahren beträgt die kumulative Inzidenz für hämatologische Malignome im Rahmen einer FA bereits 20% (vgl. Abb. 3) (23). Die akute myeloische Leukämie (AML) nimmt mit 60% der Fälle den größten Anteil der hämatologischen Neoplasien ein, dicht gefolgt vom myelodysplastischen Syndrom (MDS mit 53%), wobei diese Unterscheidung nach unterschiedlichen Definitionen getroffen wird. Die akute lymphatische Leukämie und das Burkitt-Lymphom können ebenfalls auf Grundlage der Fanconi-Anämie auftreten. Bemerkenswert ist, dass männliche Patienten eine signifikant höhere Inzidenz an hämatologischen Malignomen haben als Frauen.

---

### 1.4.3.2 Nicht-hämatologische Tumoren

Die Gruppe der nicht-hämatologischen Neoplasien stellt eine sehr heterogene Ansammlung von Tumoren in diversen Organsystemen dar. Die kumulative Inzidenz für solide Tumoren beträgt im Alter von 40 Jahren 28% (23). Im Gegensatz zu den hämatologischen Tumoren erkranken Frauen häufiger an soliden Tumoren als Männer. Besonders häufig treten Plattenepithelkarzinome (20%) im Kopf-Hals-Bereich und im Anogenitalbereich auf, in absteigender Häufigkeit gefolgt von benignen und malignen Leber-Tumoren, Hirntumoren und Nierentumoren. Genauere Angaben über die Häufigkeit der verschiedenen Tumoren und deren Untergruppen sind in Tab. 4 zu finden. Das gehäufte Auftreten von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals- sowie Anogenitalbereich von FA-Patienten ließ eine Tumorentstehung vermuten, an der das Human-Papilloma-Virus (HPV) beteiligt ist. Vor allem für die Subtypen HPV16 und HPV18 ist ein kanzerogenes Potential in diesen Regionen bekannt (28). In einer von Kutler *et al.* durchgeführten Studie konnte in 84% der untersuchten FA-Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) ein Nachweis von HPV16/18-DNA erfolgen. In der Vergleichsgruppe von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, aber *ohne* Fanconi-Anämie konnte nur in 36% der Fälle entsprechende DNA nachgewiesen werden. Somit war die Infektionsrate bei den FA-Patienten signifikant erhöht (29).

Kopf-Hals-Tumore (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) kommen in der Normalbevölkerung normalerweise erst im höheren Lebensalter und verstärkt nach Exposition durch Noxen wie Alkohol oder Tabak vor. Auch unter therapeutischen Gesichtspunkten ist das vermehrte Auftreten von Kopf-Hals-Tumoren bei FA-Patienten *nach* einer Stammzeltransplantation bedeutsam (vgl. Abschnitt 1.7.2). In Anbetracht der Vielfalt der nicht-hämatologischen Tumoren und ihres frühen Auftretens wird deutlich, dass eine engmaschige Überwachung durch Kontrolluntersuchungen und eine frühzeitige Entdeckung für den schnellen Therapiebeginn absolut notwendig sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Haupttodesursachen der Fanconi-Anämie die *aplastische Anämie* infolge Knochenmarkversagen, *Leukämien* und in den höheren Lebensjahren *solide Tumoren* sind. Ferner kann es auch im therapeutischen Rahmen bei der Knochenmarktransplantation zu letalen Komplikationen kommen.

**Tab. 4:** Neoplasien bei Patienten aus dem IFAR modifiziert nach (23)

<i>Tumorart</i>	<i>Patientenzahl (%)</i>
<b>Hämatologische Tumoren</b>	<b>120 (60)</b>
<i>AML</i>	60
<i>MDS</i>	53
<i>ALL</i>	5
<i>CML</i>	1
<i>Burkitt-Lymphome</i>	1
<b>Nichthämatologische Tumoren</b>	<b>79 (40)</b>
<i>Plattenepithelkarzinome</i>	39 (20)
Kopf-Hals-Karzinome	19
Vulva	8
Cervix	6
Haut	3
Anus	2
Ösophagus	1
<i>Lebertumoren</i>	18 (9)
Leberadenom	11
Hepatozelluläres Karzinom	6
Adenokarzinom	1
<i>Mischzelltumoren</i>	11 (6)
<i>Nierentumoren</i>	6 (3)
Wilms Tumor	4
Nierenzellkarzinom	1
Nephroblastom	1
<i>Hirntumoren</i>	5 (2)
Medulloblastom	4
Astrozytom	1

#### 1.4.4 Wachstumsstörungen und endokrine Störungen

Ein für die Fanconi-Anämie typischer Befund sind Wachstumsstörungen. In einer prospektiv angelegten Studie über 54 FA-Patienten, wurden bei 81% der Patienten endokrine Störungen und Kleinwuchs nachgewiesen (30). Häufig stehen diese Störungen in Zusammenhang mit endokrinen Dysfunktionen wie Hypogonadismus, Somatotropinmangel, Schilddrüsenfehlfunktion und Insulinmangel oder Insulinresistenz. Patienten mit einer endokrinen Störung sind häufiger von Minderwuchs betroffen als solche ohne (19) (31). 44% der Patienten zeigten eine unterdurchschnittliche Reaktion auf Somatotropin-Stimulation (30). Auch scheinen die verschiedenen Komplementationsgruppen unterschiedlich stark von Wachstumsstörungen betroffen zu sein (30). So zeigte die Studie

von Wachstumsstörungen betroffen zu sein (30). So zeigte die Studie ebenfalls, dass amerikanische FA-A und FA-G-Patienten relativ gesehen größer waren, als solche Patienten der Komplementationsgruppe FA-C.

**Tab. 5:** Endokrine Störungen bei 54 Patienten (30m/24f), modifiziert nach (30)

Symptome	Anzahl	in %
Endokrine Störungen	44/54	81
Minderwuchs > 2SD	31/54	57
Verminderte spontane GH-Sekretion	13/13	100
Verminderte induzierte GH-Freisetzung	22/48	63
Abnormale Schilddrüsenfunktion	19/53	36
Reduzierte Schilddrüsenhormonbindungskapazität	8/40	20
Abnormaler Glukosetoleranztest	10/40	20
Hyperinsulinismus	28/39	72
<i>Keine Störung</i>	<i>10/54</i>	<i>19</i>

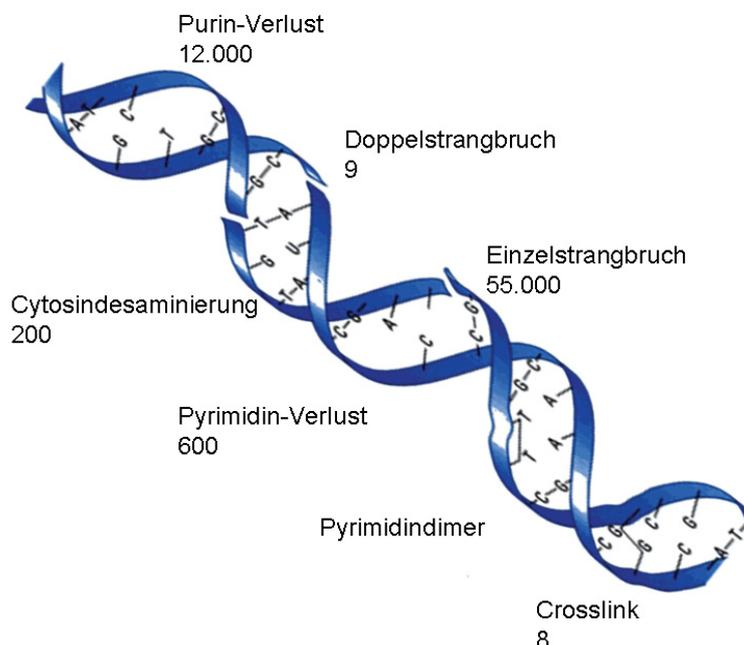
#### 1.4.5 Infertilität

Ein weiteres Problem im Verlauf der Fanconi-Anämie stellt Infertilität dar. Bei männlichen Patienten wird die Unfruchtbarkeit häufig durch genitale Fehlbildungen und Hypoplasie der Hoden verursacht (8). Im Jahr 2007 konnte in einer Studie bei 64% der männlichen Patienten ein Hypogonadismus und bei 55% der älteren weiblichen Patienten eine prämatüre Menopause festgestellt werden (31). Es ist nur ein einziger Fall bekannt, in dem ein Patient mit Fanconi-Anämie erfolgreich Nachkommen zeugen konnten (32). Bei weiblichen Patienten ist ein geringerer Anteil von Infertilität betroffen: In einer beobachteten Population konnten in 15% der Patientinnen schwanger werden (33). Diese verlaufen allerdings meist mit gravierenden Komplikationen wie beispielsweise Präeklampsie, Anämie und/ oder Thrombozytopenie und gelten daher als Riskoschwangerschaften (33).

## 1.5 Pathomechanismus der Fanconi-Anämie

### 1.5.1 DNA-Schäden

In jeder Zelle des menschlichen Körpers ereignen sich jeden Tag eine Vielzahl von DNA-Schädigungen, die im Normalfall durch verschiedene Reparaturmechanismen behoben werden können (34). Die exakte Reparatur ist eine enorm wichtige Voraussetzung für das Leben und die korrekte Weitergabe der genetischen Information. Der Ausfall von Enzymen der Reparaturkaskade kann zu verschiedenen Krankheitsbildern, wie beispielsweise dem der Fanconi-Anämie, führen (35). Abb. 4 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen DNA-Schädigungen und die Häufigkeit ihres Auftretens pro Zelle pro Tag. Durch die große Anzahl auftretender Schäden ist eine Anhäufung genetischer Veränderungen möglich, in deren Folge es auch zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder zur Aktivierung von Protoonkogenen kommen kann, sodass das Malignomrisiko drastisch erhöht wird (36). Ein bemerkenswerter Unterschied ergibt sich bei Betrachtung der DNA-Strangbrüche: Während *Einzelstrangbrüche* mit 55.000/Zelle/Tag zu den häufigsten Fehlern gehören, treten *Doppelstrangbrüche* mit 9/Zelle/Tag sehr selten auf (34). Da Fehler bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) in Zelltod, chromosomalen Veränderungen oder genomischer Instabilität enden können, wird deutlich, dass es sich hierbei um DNA-Schäden handelt, die hohe Anforderungen an das Reparatursystem stellen (35).



**Abb. 4:** Schädigungen der DNA pro Zelle pro Tag, modifiziert nach (37) und (34)

### 1.5.1.1 Ursachen für Doppelstrangbrüche

Die Ursachen für einen Doppelstrangbruch der DNA sind vielfältig und lassen sich in drei Obergruppen zusammenfassen: *Endogene* Schädigungen der DNA durch intrazelluläre Nukleasen oder metabolische Produkte des Zellstoffwechsels wie beispielsweise Sauerstoffradikale (38). Dem gegenüber stehen *exogene* Schädigungen durch ionisierende Strahlungen, ultraviolettes Licht oder Chemotherapeutika wie Topoisomerasehemmer, die in der Krebstherapie angewendet werden. Darüber hinaus entstehen Doppelstrangbrüche *physiologischerweise* bei der V(D)J-Rekombination während der Antikörperproduktion sowie beim Klassenwechsel („class-switch“) im Rahmen der spezifischen Immunantwort (35). Auch im Normalverlauf einer Meiose können Doppelstrangbrüche auftreten (39). Außerdem treten Doppelstrangbrüche im Rahmen der Reparatur von DNA-Quervernetzungen (interstrand-crosslinks = ICLs) auf. Besonders bei Zellen von FA-Patienten, die schon mit kleinsten Mengen an DNA-quervernetzenden Substanzen (z.B. Mitomycin C) behandelt wurden, können die induzierten Doppelstrangbrüche nicht mehr adäquat repariert werden (40).

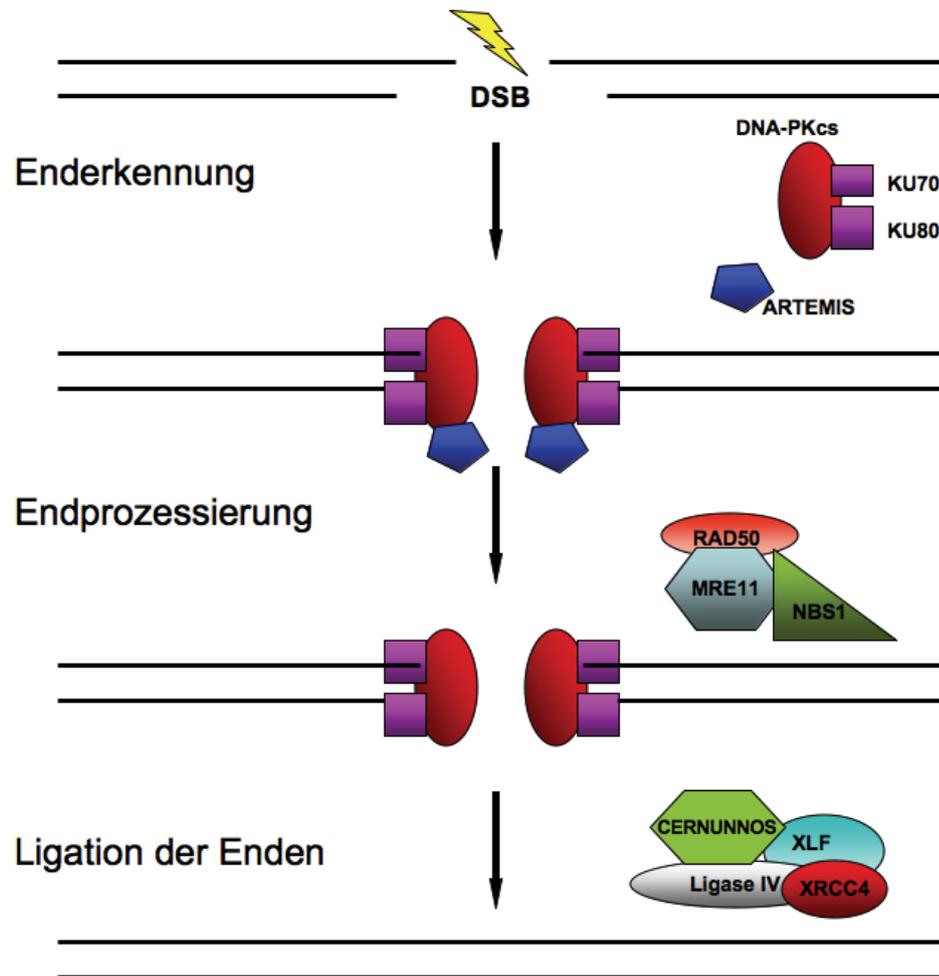
## 1.5.2 DNA-Reparatur

### 1.5.2.1 *Reparatur von Doppelstrangbrüchen*

Als eine der gefährlichsten Formen der DNA-Schädigung benötigen Doppelstrangbrüche besonders zuverlässige Reparaturmechanismen. In eukaryotischen Zellen existieren nicht zuletzt aus diesem Grunde drei verschiedene Formen der DSB-Reparatur: Neben dem sogenannten *Single Strand Annealing*, welches eine Sonderform der Doppelstrangbruch-Reparatur darstellt, wird die in der späten S-Phase und der G2-Phase stattfindende *Homologe Rekombination (HR)* von dem vor allem in der G0-, G1- und frühen S-Phase stattfindenden *Non-Homologous End Joining (NHEJ)* unterschieden. Außerdem hat das NHEJ in der V(D)J-Rekombination eine wichtige physiologische Bedeutung (35). Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Wegen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen besteht darin, dass die homologe Rekombination eine sehr exakte Reparaturform darstellt, während das NHEJ häufiger Fehler generiert (41). Dies ist dadurch zu erklären, dass bei der Homologen Rekombination die Reparatur unter Zuhilfenahme des homologen, zweiten Chromosoms als Matrize erfolgt. Die Reparatur mittels *Single Strand Annealing* kann in Ausnahmefällen erfolgen, wenn sich der Doppelstrangbruch zwischen zwei sich wiederholenden DNA-Sequenzen befindet (42) (43).

### 1.5.2.2 *Non-homologous end-joining (NHEJ)*

Das NHEJ ist der Reparaturweg, bei dem Doppelstrangbrüche nach End-Prozessierung durch Re-Ligation der beiden Bruch-Enden repariert werden. Diese Art der DNA-Reparatur findet im gesamten Zellzyklus statt, bevorzugt allerdings der G0-, G1- und der frühen S-Phase. Im Gegensatz zur Homologen Rekombination (HR) bleibt die DNA während des gesamten Reparaturvorganges beim NHEJ doppelsträngig.



**Abb. 5:** Non-homologous end-joining, modifiziert nach (36, 44, 45)

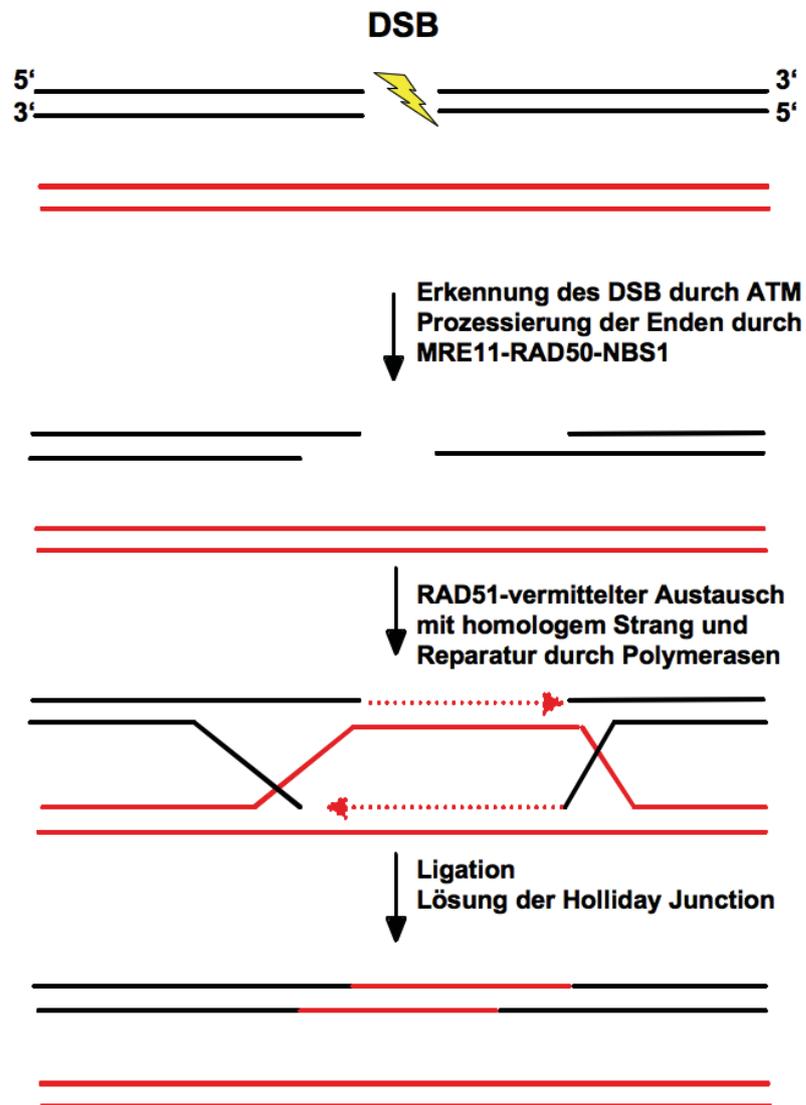
Physiologischerweise dient das NHEJ der Erzeugung einer größeren Antikörpervielfalt im Immunsystem (46). Zu Beginn der NHEJ bindet sich ein heterodimerer Komplex aus den Proteinen Ku70 und Ku80 an beide Enden der gebrochenen DNA (44). Es wird vermutet, dass diese Assoziation von Ku70/80 mit den DNA-Enden als Grundgerüst der gesamten NHEJ dient (35). Anschließend wird die katalytische Untereinheit dieses Komplexes, DNA-PKcs (DNA-Proteinkinase catalytic subunit), rekrutiert und angefügt. Aufgabe dieses Komplexes ist die (Auto-) Phosphorylierung und Aktivierung weiterer Proteine. Zusammen mit der Artemis-Nuklease, einem Enzym der Metallo- $\beta$ -Lactamase-Superfamilie, stimuliert nun DNA-PKcs die Prozessierung der DNA-Enden durch den trimeren Komplex aus RAD50-Mre11-Nbs1 (47). Bei diesem proteolytischen Abbau der DNA-Enden kann es

---

zum Verlust von Basenpaaren kommen. Die Prozessierung ist nötig, da die Enden eines Doppelstrangbruches Veränderungen aufweisen können, die eine direkte Ligation unmöglich machen. Artemis alleine besitzt eine 5'-3' Exonukleaseaktivität, im Komplex mit DNA-PKcs allerdings eine Endonukleaseaktivität an überhängenden 5'-*und* 3'-Enden (48). Im letzten Schritt der Reparatur wird die Ligation der beiden prozessierten DNA-Enden durch einen Komplex aus Cernunnos-XLF zusammen mit XRCC4 und Ligase-IV in einer noch näher zu untersuchenden Weise durchgeführt (35, 45, 49). Es wird vermutet, dass die Polymerasen  $\mu$  und  $\lambda$  an der Schließung auftretender Lücken an den Bruchenden beteiligt sind. Bei der NHEJ kommt es im Verlaufe der Prozessierung durch den Abbau der defekten Enden zu einem DNA-Verlust, was zu Deletionen in wichtigen Sequenzbereichen führen kann.

### 1.5.2.3 *Homologe Rekombination und Fanconi-Anämie*

Eine andere Möglichkeit zur Reparatur eines Doppelstrangbruches stellt die Homologe Rekombination (HR) dar. Da die HR auch zur Reparatur von DNA-Strangvernetzungen („crosslinks“) benötigt wird (vgl. Abschnitt 1.8), ist sie für das Verständnis der Fanconi-Anämie besonders wichtig, denn die betroffenen Zellen bei FA-Patienten reagieren überempfindlich auf DNA-quervernetzende Substanzen (40, 50). Die HR gilt als ein sehr zuverlässiger Mechanismus, sofern die Vorlage-DNA keine Fehler enthält (35). Als homolog wird dieser Vorgang bezeichnet, weil er entweder unter Zuhilfenahme des äquivalenten zweiten Chromosomes des doppelten Chromosomensatzes oder des duplizierten Schwesterchromatids kurz vor der Zellteilung abläuft. So ist zu erklären, dass die HR präferentiell in der späten S-Phase und der G2-Phase des Zellzyklus abläuft, da hier die DNA bereits verdoppelt vorliegt und ein unbeschädigtes Schwesterchromatid vorliegt.



**Abb. 6:** Homologe Rekombination, modifiziert nach (35, 36)

Die HR lässt sich in drei Abschnitte unterteilen. Zu Beginn erfolgt die *Erkennung und Prozessierung* des Doppelstrangbruchs. Durch den MRN-Enzymkomplex (Mre11-Rad50-Nbs1) werden die DNA-Enden zusammengehalten und prozessiert, während durch ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) die Phosphorylierung weiterer Zellzykluswächter wie z.B. p53 stattfindet (36). Beim Vorgang der Prozessierung entstehen 3'-Überhänge, an die anschließend die RAD51-Rekombinase bindet. Durch RAD51 werden weitere Proteine (RPA, RAD52, RAD54, BRCA1, BRCA2 und weitere RAD51-homologe Proteine) zum Zusammensetzen eines Nucleoproteinfilamentes rekrutiert (44). Anschließend sucht

RAD51 auf der vermeintlich unbeschädigten DNA des Schwesterchromatids die zu dem geschädigten Abschnitt homologe Sequenz. Es folgt die *Stranginvasion und die homologe Paarung* mit dem Schwesterchromatid. Hierbei dringt der geschädigte DNA-Strang in den intakten, homologen DNA-Strang ein. Das Ergebnis ist die Ausbildung eines sogenannten „D-Loops“ („displacement-loop“). Die Kreuzungsstellen zwischen dem eindringenden und dem Matrizen-Strang wird als „Holliday-Junction“ bezeichnet. Innerhalb dieser Struktur findet die Reparatursynthese statt: eine DNA-Polymerase verlängert das 3'-Ende des invasiven Stranges. Es folgt die Ligation der Fragmente durch die DNA Ligase-I. Zuletzt erfolgt die *Auflösung* des Holliday-Junctions durch einen Komplex aus SLX1-SLX4 (51). Der Doppelstrangbruch ist nach diesem letzten Schritt verlustfrei behoben. Viele Proteine, die zur Funktion der RAD51-Strecke beitragen, sind Produkte von erblichen Krebs-Prädispositionsgenen (35). So konnten kürzlich neben den bereits bekannten BRCA1 und BRCA2 auch RAD51C (4, 52) und SLX4 (6) als Risikogene für hereditäre Krebserkrankungen klassifiziert werden.

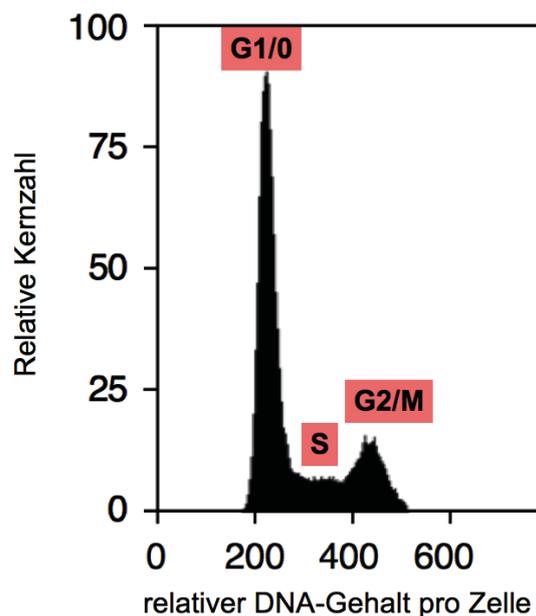
### 1.5.3 Der Zellzyklus

#### 1.5.3.1 Physiologischer Ablauf des Zellzyklus

Der Zellzyklus menschlicher Zellen lässt sich in zwei Hauptphasen unterteilen. Auf die Mitosephase, in der die Zellteilung stattfindet, folgt die Interphase. In der Interphase lassen sich wiederum verschiedene Abschnitte unterscheiden: Der erste Abschnitt, G1-Phase genannt, folgt direkt auf die Mitose und dauert bis zum Beginn der S-Phase, auf welche anschließend die G2-Phase folgt. In den verschiedenen Phasen des Zellzyklus lassen sich in den Zellen unterschiedliche Mengen DNA nachweisen. Über die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen lassen sich im Umkehrschluss Aussagen darüber machen, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen befinden (53, 54).

**Tab. 6 Phasen des Zellzyklus**

Phase	Chromosomensatz
G1	2n
S	2-4n
G2	4n
M	4n
G0	2n



**Abb. 7:** Durchflusszytometrische Messung des intrazellulären DNA-Gehaltes einer normal wachsenden LCL-Zellkultur mittels Propidiumiodid-Färbung (PI)

### 1.5.3.2 Durchflusszytometrie

Der DNA-Gehalt einer Zelle kann mittels FACS („fluorescence activated cell sorting“) bestimmt werden. Nach Behandlung der zu untersuchenden Zellen mit dem Farbstoff Propidiumiodid (PI), der in die DNA der Zellen interkaliert, kann dessen Intensität gemessen werden. Die Stärke der Färbung ist proportional zum DNA-Gehalt der Zelle (54). Der relativen Kernzahl, als Messpunkt für die Anzahl der Zellen, wird der relative DNA-Gehalt pro Zelle gegenübergestellt. In einer normal wachsenden Zellkultur wird folgendes Ergebnis der Durchflusszytometrie erwartet: Der größte Anteil der Zellen befindet sich mit einem normalen (2n) DNA-Gehalt in der G1/G0-Phase. Weitaus weniger Zellen befinden sich in der S-Phase und der G2/M-Phase, dafür allerdings mit einem größeren DNA-Gehalt (4n) (Tab. 6 und Abb. 7). Dieses Phänomen ist dadurch zu erklären, dass die G1/G0-Phase zeitlich länger dauert und sich somit immer eine größere Menge Zellen in diesem Abschnitt befindet.

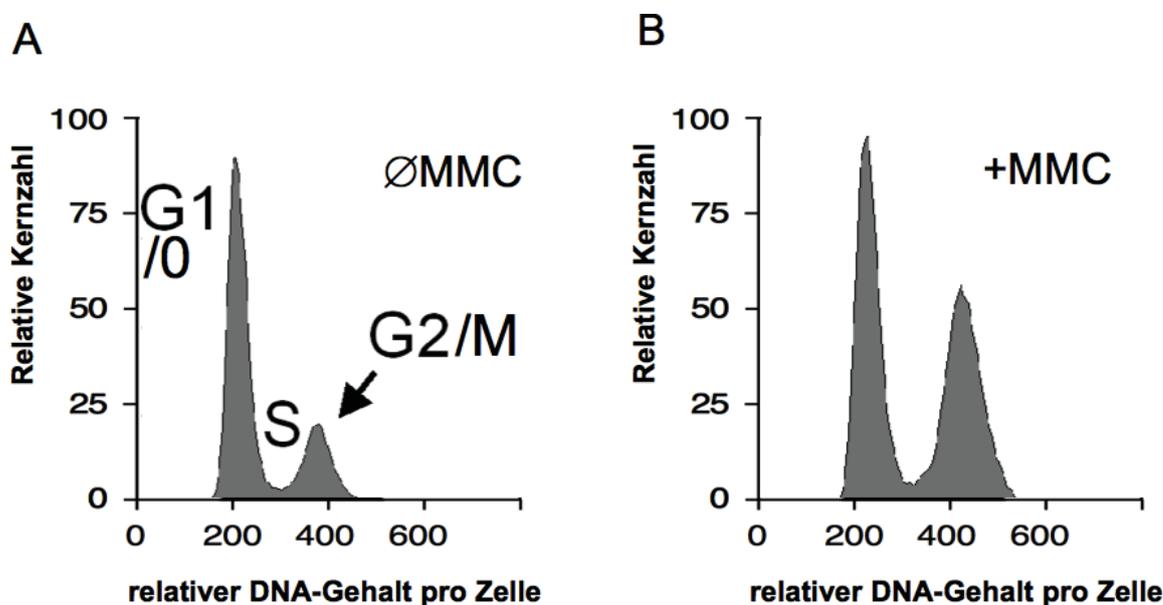
### 1.5.3.3 Zellzyklusregulation

Der korrekte Ablauf des Zellzyklus ist für die einzelne Zelle, wie auch für den gesamten Organismus, überlebenswichtig. Deshalb existiert ein komplexes System verschiedener Kontrollmechanismen, das eine regelhafte Abfolge der einzelnen Zellzyklusphasen sichern soll. Zu diesem Zweck verfügt die menschliche Zelle über verschiedene „Checkpunkte“, an denen sie den Stand des Zellzyklus überprüft (55, 56). Ein solcher Checkpunkt kontrolliert die Zelle am Ende der G1-Phase zum Übergang in die S-Phase im Hinblick auf ausreichende Größe und Intaktheit der DNA. Auch am Ende der G2-Phase überprüft ein Checkpunkt die DNA auf Fehlerhaftigkeit. Ist die DNA an dieser Stelle noch nicht vollständig oder nur fehlerhaft verdoppelt, tritt die Zelle nicht in die Mitosephase ein, sondern arretiert den Zellzyklus, um anschließend den Schaden vor der Zellteilung, wenn möglich, zu beheben. Es kommt zum sogenannten G2/M-Arrest (57). Ist der Schaden irreparabel, so wird unverzüglich die Apoptose der Zelle eingeleitet. Die genauen Bedingungen zum Übertritt eines Checkpunktes werden sowohl von externen Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, als auch von zellinternen Proteinen, sogenannten Cyclinen und cyclin-abhängigen Proteinkinasen, reguliert und sind Gegenstand aktueller Forschungen. Fest steht, dass Funktionsausfälle im Bereich der Checkpunkte die Weitergabe von DNA-Schäden an die Tochterzellen ermöglichen und somit das Risiko maligner Entartungen erhöhen.

### 1.5.3.4 Zellzyklusarrest in Zellen von FA-Patienten

Chromosomen von Patienten mit Fanconi-Anämie weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine erhöhte Rate an Veränderungen und Schäden auf (58). Diese Rate lässt sich mit DNA-quervernetzenden Substanzen wie Diepoxybutan (DEB) oder Mitomycin-C (MMC) steigern, da die Schäden aufgrund des defekten DNA-Reparatursystems nicht adäquat repariert werden können (59). Unter Einwirkung von Crosslinkern arretieren die Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus und können nicht in die Mitose eintreten. In der Durchflusszytometrie befinden sich bereits bei Exposition mit niedrigen Dosen von Mitomycin C wesentlich mehr Zellen in der G2/M-Phase als bei nicht-exponierten Zellen desselben Patienten (Abb. 8). Ein großer Vorteil der Zellzyklusanalyse liegt darin, dass jeweils eine große Menge an Zellmaterial untersucht werden kann. Aus diesem Grund konnte die Zellzyk-

lusanalyse in den letzten Jahren als zuverlässiges Methode in der Diagnostik der Fanconi-Anämie etabliert werden (53, 54).



**Abb. 8: FACS-Messung von FA-Zellen mittels PI-Färbung.** A normal wachsende B-Zelllinie, ohne Zusatz von Mitomycin C im Vergleich zu B nach Zusatz von Mitomycin C und resultierendem G2/M-Arrest, modifiziert nach (54)

## 1.6 Diagnostik und Differentialdiagnosen

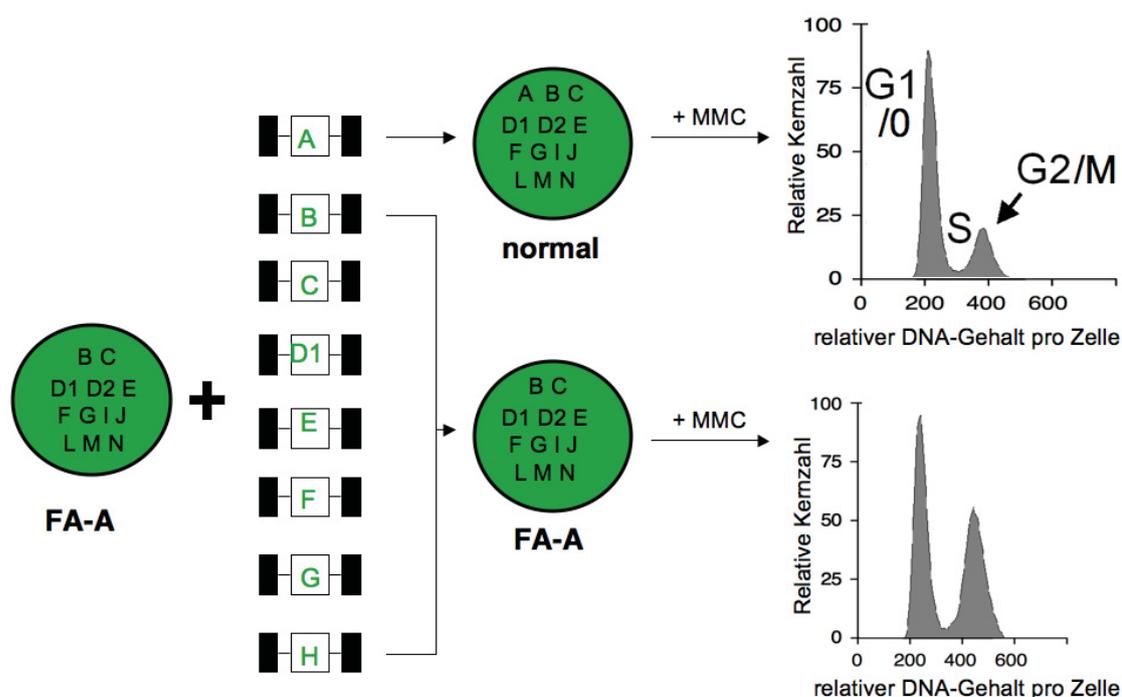
Die Fanconi-Anämie zeichnete sich durch ein sehr heterogenes und bei jedem Patienten individuelles Krankheitsbild aus. Sofern keine Malignome, angeborene Fehlbildungen oder Kleinwuchs vorliegen, werden Patienten häufig erst durch die Symptomatik des Knochenmarkversagens auffällig (23). Im Vordergrund stehen hierbei häufig Blutungen infolge der abfallenden Thrombozytenzahl, rekurrierende Infektionen durch Mangel an immunkompetenten Zellen sowie Blässe und Dyspnoe als Zeichen einer Anämie. Ein wesentliches Problem bei der Diagnosestellung für den behandelnden Arzt ist sicherlich die seltene Konfrontation mit dem Krankheitsbild der Fanconi-Anämie und dementsprechend die Erkennung derselben (20). Differentialdiagnostisch müssen erworbene aplastische Anämien durch Medikamente, ionisierende Strahlung, Virusinfektionen (z.B. Parvovirus B19) oder andere Noxen von kongenitalen aplastischen Anämien unterschieden werden. Hierbei sind Erkrankungen sowohl mit isoliertem Ausfall einzelner Zellreihen (z.B. Blackfan-Diamond-Syndrom mit Störung der Erythropoese), als auch panzytopenische Erkrankungen wie die

---

Dyskeratosis Congenita zu erwägen (19). Der klinische Verdacht der Fanconi-Anämie kann durch eine Reihe von Testverfahren bestätigt werden.

### 1.6.1 Zellkulturtechnik und durchflusszytometrische Analyse

Bereits in kultivierten Zellen von FA-Patienten finden sich gehäuft spontane Chromosomenbrüche. 1964 wurde erstmals von Prof. Traute Schroeder-Kurth beobachtet, dass sich die Rate der defekten Chromosomen durch Zugabe von DNA-quervernetzenden Substanzen, wie Diepoxybutan (DEB) oder Mitomycin C (MMC), steigern lässt (60). Diese diagnostische Methode gilt als durchaus zuverlässig, jedoch wurde mit der Durchflusszytometrie ebenfalls eine zuverlässige Analysemethode gefunden, deren Stärke vor allem in der hohen Messgenauigkeit und der großen messbaren Zellzahl liegt (19). FA-Patientenzellen zeigen, vor allem nach Behandlung mit Mitomycin C, eine arretierte G2-Phase in der Zellzyklusanalyse (61). Menschliche Zellen arretieren grundsätzlich in der G2-Phase, wenn ihre DNA nicht vollständig repliziert werden konnte. Für die „flow“-zytometrische Analyse lassen sich Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und auch Fibroblasten verwenden, die mit demselben Zelltypus eines gesunden Spenders verglichen werden. Im Rahmen der zytogenetischen Diagnostik wird bei FA-Patienten häufig die Zugehörigkeit zu einer Komplementationsgruppe ermittelt. Lange Zeit wurde dies mittels Zellfusionstechniken durchgeführt; seit einigen Jahren hat sich aber eine wesentlich einfachere und schnellere Möglichkeit zur Klärung dieser Fragestellung etabliert. Mittels retroviralem Gentransfer (62-64) werden intakte Kopien der bekannten FA-Gene in Patientenzellen mit bisher unbekanntem Gendefekt eingebracht. Diese stellen sich daraufhin, sofern das fehlende Gen verwendet wurde, in der Durchflusszytometrie phänotypisch korrigiert dar (aufgehobener G2-Arrest; vgl. Abb. 9). Bei einer weiter bestehenden Mitomycin-Überempfindlichkeit wurde vermutlich nicht das richtige Gen transfiziert. Die Zugehörigkeit zu verschiedenen Komplementationsgruppen und das betroffene Gen ist ein wichtiger Prognosefaktor (23), ebenso die Art der Mutation und der ethnische Hintergrund des Patienten (vgl. 1.3).



**Abb. 9:** schematische Darstellung der retroviralen Komplementation. Ein retroviraler Vektor bringt eine intakte Kopie des FA-Gens in defiziente Zellen der Komplementationsgruppe FANCA ein, sodass der Zellzyklusarrest korrigiert wird.

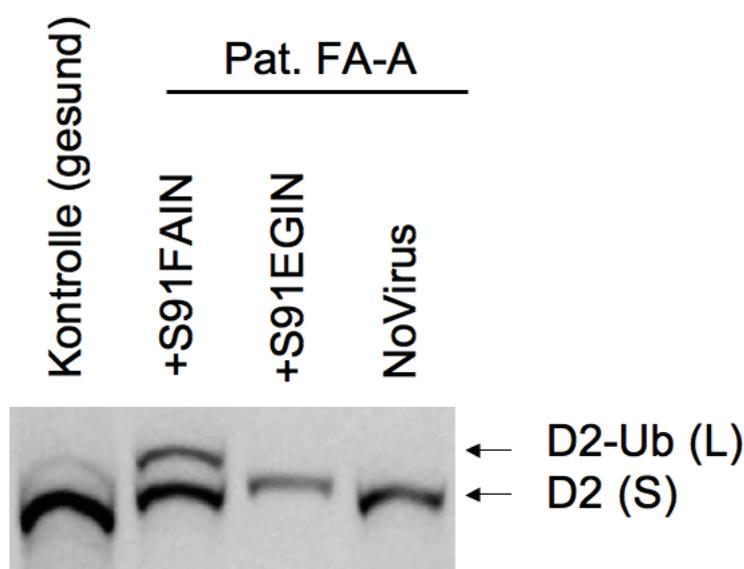
### 1.6.2 FANCD2-Westernblot

Eine weitere, diagnostische Methode, das FANCD2-Immunoblotting, erlaubt eine Aussage darüber, ob das FANCD2-Protein vorhanden ist und ob es erfolgreich am Lysin K561 monoubiquitiniert und damit aktiviert werden kann (65). FANCD2 stellt den Übergang zwischen den sogenannten „upstream“- und „downstream“-Genen des FA-Reparaturweges dar (Abb. 13). Nach einer erfolgreichen Monoubiquitinierung liegt FANCD2 nicht mehr in der kurzen (FANCD-Short), sondern einer langen (FANCD2-Long) Form vor. Ein möglicher Defekt liegt in diesem Fall „downstream“ von FANCD2 (z.B. in FANCD1/BRCA). Ein „upstream“-Gendefekt (beispielsweise in einem Gen aus dem FA-Kernkomplex oder in FANCD2 selber) verhindert eine Monoubiquitinierung von FANCD2, sodass dieses in der kurzen Form vorliegt (65). Lässt sich *kein* FANCD2 nachweisen, so gehört der Patient der

Komplementationsgruppe D2 an. Diese effiziente Screeningmethode erlaubt ein erstes, grobes Einsortieren auch von Patienten mit noch unbekanntem Komplementationsgruppen. Abb. 10 zeigt exemplarisch einen FANCD2-Westernblot von Zellen eines Patienten der Komplementationsgruppe FA-A, während Tab. 7 die möglichen Ergebnisse des FANCD2-Westernblots zusammenfasst.

**Tab. 7:** mögliche Ergebnisse eines FANCD2-Westernblots

Im Westernblot nachweisbar	mögliche Ursache
nur FANCD2-S	Defekt liegt im FA-Kernkomplex ( <i>FANC-A-B-C-E-F-G-I-L-M</i> )
kein FANCD2	Defekt liegt <i>im FANCD2-Gen</i> (z.B. an K561)
FANCD2-S und FANCD2-L	Defekt liegt in nachfolgenden Genen ( <i>FANC-DI-J-N-O-P</i> )



**Abb. 10** Ergebnis eines FANCD2-Westernblots am Beispiel von Zellen eines Patienten mit biallelischer Mutation an *FANCA* nach Zugabe von Mitomycin C; das FANCD2-Protein kann bei Patienten der Komplementationsgruppen FA-A,-B,-C,-E,-F,-G,-I,-L und -M (sog. „upstream“-Gene) nicht monoubiquitiniert werden und liegt nur in der kurzen Form (S) vor. Nach erfolgreicher Komplementation mit dem Virus S91FAIN ist wieder eine Ubiquitinierung möglich, sodass auch D2-Ub nachgewiesen werden kann. Zum Vergleich die Monoubiquitinierung eines gesunden Probanden.

### 1.6.3 Pränataldiagnostik

Die pränatale Diagnostik dient der Erkennung fetaler Anomalien und erlaubt frühzeitige Reaktionen. Indikationen für eine pränataldiagnostische Erkennung der Fanconi-Anämie sind vor allem verdächtige Ultraschallbefunde wie beispielsweise Radiusstrangaplasien der Frucht sowie bekannte Fälle von Fanconi-Anämie in der Familienanamnese (66). Als sichere pränataldiagnostische Methode zur Erkennung der Fanconi-Anämie hat sich die Chromosomenbruchanalyse erwiesen, die auch mit fetalen Zellen aus Chorionzottenbiopsie, Amniozese oder Nabelschnurblut durchgeführt werden kann (67-69). Es sei erwähnt, dass die Fanconi-Anämie eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Nabelschnurblut-Transplantation als Alternative zur Knochenmarktransplantation zwecks Behandlung hämatologischer Erkrankungen spielte. 1988 wurde bei einem FA-Patienten die erste Nabelschnurblut-Transplantation durchgeführt (70). In neueren Untersuchungen wurde auch die Durchflusszytometrie als diagnostische Methode zur schnelleren Erkennung der Fanconi-Anämie untersucht. Durch eine Kombination von Amnionzell- und Nabelschnurblut-Untersuchung konnte die Mehrzahl der Fälle per Durchflusszytometrie sicher bestätigt oder ausgeschlossen werden (66).

## **1.7 Therapie**

### 1.7.1 Supportive Therapie

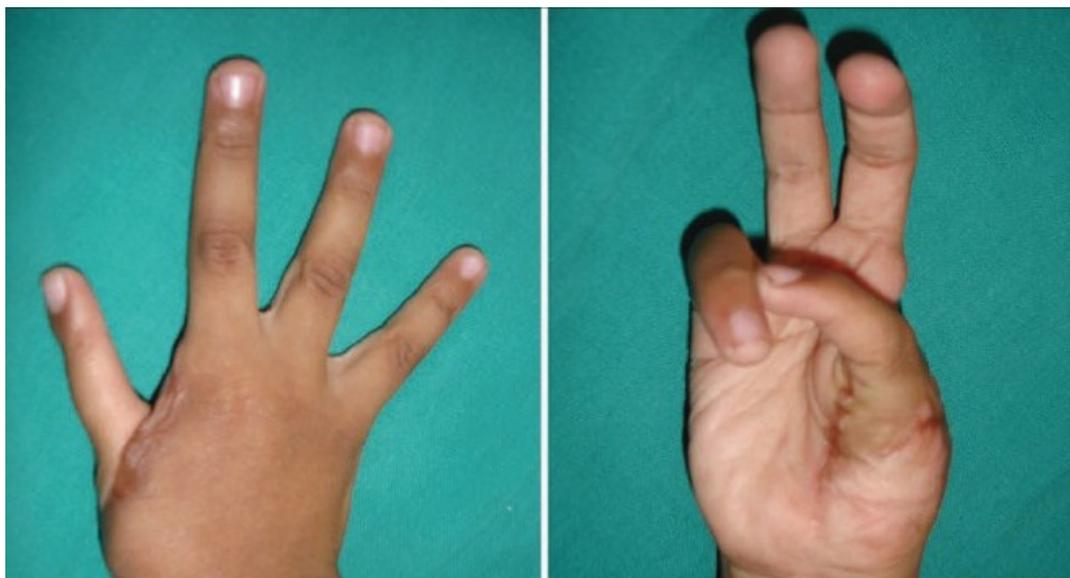
#### *1.7.1.1 Androgentherapie, Zytokintherapie*

Grundsätzlich lassen sich bei der Fanconi-Anämie supportive Therapiemöglichkeiten von kausalen Therapieansätzen unterscheiden. Als supportiv werden jene unterstützenden therapeutischen Verfahren bezeichnet, die zwar keine Heilung der Krankheit im engeren Sinne versprechen, aber den Körper in seiner Funktion unterstützen und die Symptome der Erkrankung lindern. Demgegenüber steht die kausale Therapie, welche die Ursache der Erkrankung zu beseitigen versucht. Im Anfangsstadium der aplastischen Anämie kann die Blutbildungsstörung durch Substitution von Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentraten kompensiert werden. Viele Patienten mit beginnendem Knochenmarkversagen sprechen initial auf eine Therapie mit Androgenen oder Zytokinen gut an (21, 71). So wurde bei oral appliziertem Oxymetholon in ca. 60% der Fälle eine Wachstumsreaktion aller drei Zellreihen beobachtet (8). Trotzdem sollten die starken Nebenwirkungen von synthetischen Androgenen, wie Akne, irreversible Virilisierung und vorzeitiger Schluss der Epiphysenfugen und mögliche Lebertoxizität beachtet werden (72). Der Gebrauch von Zytokinen wie G-CSF (Granulozyten-Colony-Stimulating-Factor) oder Erythropoetin wurde bei einigen Patienten als hilfreich beobachtet (71).

#### *1.7.1.2 Supportive Chirurgie*

Chirurgische Interventionen werden bei der Fanconi-Anämie unter zweierlei Gesichtspunkten benötigt. Zum einen können viele der angeborenen Fehlbildungen wie aplastische Daumen oder Radiusfehlbildungen mittels moderner, plastischer Operationen kuriert werden. Abb. 11 zeigt, wie handchirurgisch der Zeigefinger eines Patienten in einen funktionellen Daumenersatz umgewandelt wurde, sodass die Hand in ihrer Funktionalität wesentlich verbessert wurde (73). Auch Fehlbildungen an den inneren Organen wie beispielsweise Ureterstenosen, Magen-Darm-Atresien oder Ventrikelseptumdefekte können operativ behandelt werden.

Der anderen wichtigen Bereich der chirurgischen Interventionen betrifft die Therapie solider Neoplasien, besonders im Kopf-Hals-Bereich (74, 75). Bei FA-Patienten hat die Chirurgie eine therapieentscheidende Bedeutung, da jede Standardchemotherapie oder Bestrahlung, das Risiko für ein Zweitmalignom stark erhöht (8, 76). Besondere Bedeutung hat die frühe chirurgische Exzision möglicher Malignomvorstufen aus dem Mund- und Rachenraum (77).



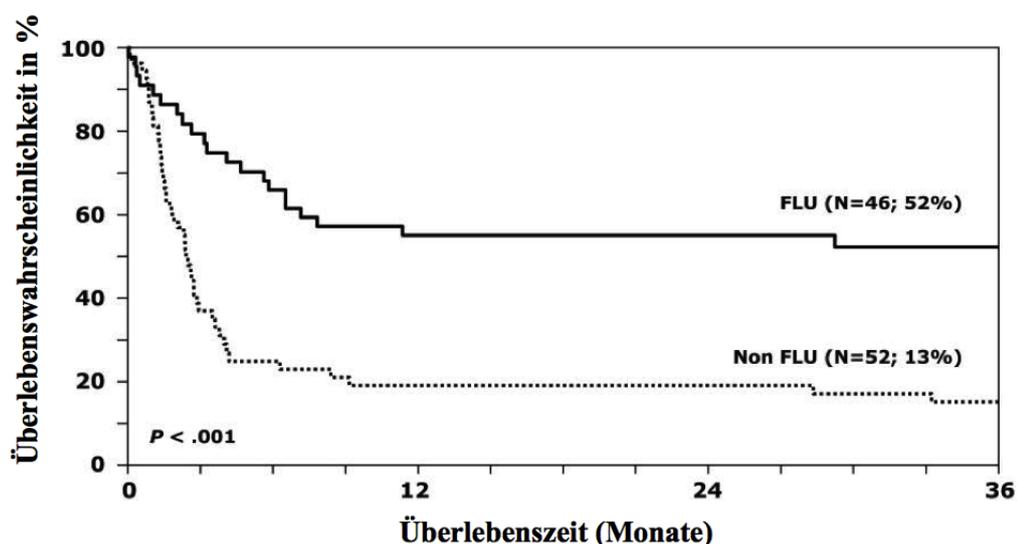
**Abb. 11** Rekonstruktion eines Daumens („Pollisation“), aus (73)

## 1.7.2 Kausale Therapie

### 1.7.2.1 Stammzelltransplantation

Bisher existieren keine Therapieansätze, die eine Heilung der Fanconi-Anämie ermöglichen. Eine kausale Behandlung des Knochenmarkversagens stellt die Transplantation von allogenen, hämatopoetischen Stammzellen dar. Hierfür kommen Stammzellen aus dem peripheren Blut, aus dem Knochenmark oder aus dem Nabelschnurblut in Frage (71). Ziel der Transplantation ist die Repopularisierung des blutbildenden Systems mit gesunden, funktionstüchtigen Stammzellen. Bevorzugt werden HLA-identische Familienspender, um das Risiko für eine GvHD (Graft-versus-host-disease) so gering wie möglich zu halten (71, 78, 79). Neben einem möglichen HLA-Mismatch konnten weitere Faktoren identifiziert werden, die mit schlechteren Überlebensraten im Rahmen der Transplantation einhergin-

gen: Ein höheres Patientenalter (>10 Jahre), eine positive Serologie für Cytomegalievirus sowie eine größere Anzahl vorausgegangener Bluttransfusionen (>20 Stück) waren mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (80). Darüber hinaus wurden bei schweren angeborenen Fehlbildungen, einer vorausgegangenen Androgentherapie und bei Transplantaten von weiblichen Spenderinnen schlechtere Überlebenschancen beobachtet (79). Eine Vorbehandlung der Patienten mit dem Chemotherapeutikum Fludarabin senkt die Mortalität signifikant, sodass eine 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 52% nach Fludarabinbehandlung einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 13% ohne Fludarabin gegenüberstehen (vgl. Abb. 12) (80). Andere Untersuchungen zeigten, dass das Risiko des Auftretens von Kopf-Hals-Karzinomen bei Patienten nach einer Transplantation 4,4-fach höher ist als bei Patienten, die keine Transplantation bekommen haben (75). Stammzelltransplantation bei Patienten mit Fanconi-Anämie ist nach wie vor ein Balanceakt zwischen einer möglichst starken Immunsuppression zum Verhindern der GvHD einerseits und einer möglichst wenig toxischen Konditionierung in Anbetracht der defizienten DNA-Reparaturmechanismen andererseits (75).



**Abb. 12:** 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten bei Verwendung von Therapieregimen mit (FLU) und ohne (Non FLU) Fludarabin (80)

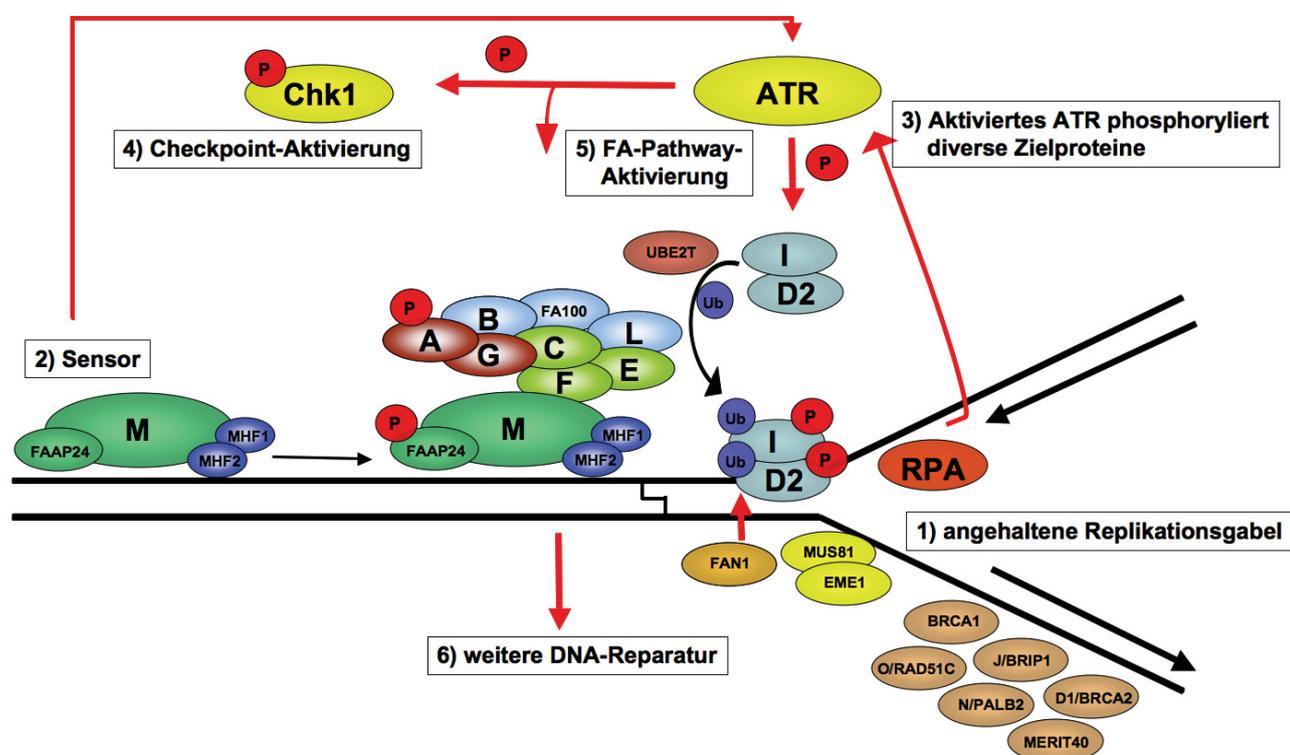
### 1.7.2.2 Stammzellgentherapie

Ein neuer, möglicher Therapieansatz liegt in der viral vermittelten Komplementation des defekten FA-Gens in den Stammzellen des Patienten. Bisher können defekte FA-Gene zu diagnostischen Zwecken mittels retroviralem Transfer in Patientenzellen eingebracht und exprimiert werden, sodass ihr FA-Phänotyp gegenüber Crosslinkern korrigiert und zum Beispiel die Komplementationsgruppe in kurzer Zeit diagnostiziert wird (64). Seit einiger Zeit zielen Versuche darauf ab, eine intakte Kopie des defekten Genes *ex vivo* in die Stammzellen des Patienten einzubauen (81). Diese würden dem Patienten anschließend, nach der Korrektur, wieder zugeführt. Auf die, bei der herkömmlichen Stammzelltransplantation notwendige Konditionierung könnte hierbei verzichtet werden, da es sich um patienteneigene Zellen handelt. Problematisch ist hierbei jedoch einerseits, dass Stammzellen von FA-Patienten in Kultur nur sehr langsam wachsen und andererseits aufgrund ihrer Defekte sehr empfindlich sind. Trotzdem konnte in Stammzellen von *Fanca*- und *Fancc*-Knockout-Mäusen bereits der Gendefekt mittels foamyviralen und lentiviralen Vektoren im Sinne einer „Gentherapie“ erfolgreich korrigiert werden (82).

## 1.8 Der Fanconi-Anämie-Reparaturweg

DNA-quervernetzende Substanzen (wie Mitomycin C) führen zu einer Aktivierung des FA-Pathways, an dessen Ende die DNA-Reparatur des Crosslinks steht. Die DNA-Quervernetzung verhindert die weitere Replikation der DNA. Dies führt zu einer Rekrutierung von FANCM und FANCD2/FANCI zur blockierten Replikationsgabel. Um FANCM herum lagern sich 9 weitere Proteine zum sogenannten „FA-Kernkomplex“ zusammen (FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L, -M und dessen Partner MHF1 und MHF2, sowie die zwei FA-assoziierten Proteine FAAP24 und FAAP100) (5). FAAP24 und FAAP100 konnten bisher nicht als FA-Gene klassifiziert werden und sollen in dieser Arbeit als Kandidatengene näher untersucht werden. Hauptaufgabe dieses Kernkomplexes ist vermutlich die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI. FANCL ist die katalytische Untereinheit des Komplexes und interagiert mit dem „E2 ubiquitin conjugating enzyme“ UBE2T, welches ebenfalls in dieser Arbeit näher untersucht wird (83). Alle Proteine, bei denen der Ausfall zur Störung der D2-Monoubiquitinierung führt, bezeichnet man als „upstream“

Proteine. Monoubiquitiniertes FANCD2 (und FANCI) lokalisieren im Zellkern an Chromatin und bilden Reparaturfoci, wo sie mit „Downstream-Proteinen“ interagieren. Hierzu gehören beispielsweise die „Brustkrebsgene“ *BRCA1* und *FANCD1/BRCA2*, sowie *FANCN/PALB2*, *FANCI/BRIP1*, *RAD51* und seine Paraloge (*XRCC2*, *XRCC3*, *RAD51B*, *FANCO/RAD51C*, *RAD51D*) (84). *FANCN/PALB2* interagiert mit den Produkten der „Brustkrebsgene“ *BRCA1* und *BRCA2* und reguliert vermutlich die Chromatin-Lokalisation von *BRCA2* (85, 86).



**Abb. 13:** Als zentrales Ereignis im Verlauf des Reparaturweges wird die Monoubiquitinierung von FANCD2 bewertet [mod. nach (5) und (87)]

Es wird vermutet, dass der FA-Kernkomplex durch die Translokase-Aktivität von FANCM von dem geschädigten DNA-Abschnitt abgezogen wird und so Platz für weitere Reparaturproteine entsteht (88). Zum Ausschneiden der DNA-Quervernetzung werden anschließend an diese Stelle die Komplexe MUS81/EME1 und XPF/ERCC1 rekrutiert (50). Die entstandene Lücke wird daraufhin vermutlich durch die TLS Polymerasen (translesion polymerase) Rev1 und Pol  $\zeta$  wieder geschlossen (89, 90). Auch für die Polymerase POLN

---

konnte kürzlich eine Interaktion mit FANCD2/FANCI und RAD51 festgestellt werden und es wird ein Zusammenspiel mit dem Fanconi-Anämie-Reparaturweg vermutet (91).

## 1.9 Ziel der Arbeit

Im vorliegenden Projekt sollen einige sogenannte „*Kandidatengene*“ untersucht werden. Durch Testung dieser bereits bekannten DNA-Reparaturgene versucht man, weitere Gene zu identifizieren, die bei einem Ausfall das Krankheitsbild „Fanconi-Anämie“ auslösen. In dieser Arbeit sollen sechs Kandidatengene (*FAAP24*, *FAAP100*, *MUS81*, *EME1*, *MERIT40* und *UBE2T*) an bisher nicht-klassifizierten Fanconi-Patientenzellen getestet werden. Hierzu sollen immortalisierte, lymphoblastoide B-Zelllinien (LCL) der Patienten durch zwei verschiedene Methoden gescreent werden. Als Kandidatengene werden Gene gewählt, bei denen aus der Literatur bekannt ist, dass Zellen mit Defekt in diesen Genen eine Überempfindlichkeit gegen DNA-crosslinkern aufweisen. Bei allen ausgewählten Kandidatengenen handelt es sich um DNA-Reparaturgene; einige der Proteinprodukte sind Komponenten des FA-Kernkomplexes (*FAAP24*, *FAAP100*), andere sind an der zentralen Ubiquitinierungsreaktion des Reparaturpfades beteiligt (*UBE2T*) oder haben Bedeutung im weiteren Verlauf der Reparatur (*MUS81/EME1*, *MERIT40*) (vgl. 1.8). Die Testung der Kandidatengene soll auf zwei Wegen erfolgen: Einerseits soll mittels Westernblot eine *strukturelle* Aussage über die Expression der kodierten Reparaturproteine getroffen werden. Andererseits wird eine *funktionelle* Testung dieser Proteinprodukte mittels retroviraler Komplementation erfolgen. Im ersten Teil werden die durch die Kandidatengene kodierten Proteine in den Patientenzellen mittels Antikörper im Westernblot angefärbt, sodass anschließend davon ausgegangen werden kann, dass die Patientenzellen das Reparaturprotein exprimieren. Dieser strukturelle, direkte Nachweis der Proteine wird im zweiten Teil der Arbeit durch eine funktionelle Analyse ergänzt: Mittels retroviralem Gentransfer werden die in ein Plasmid klonierten Kandidatengene in die Patienten-LCLs eingebracht, sodass der Zellzyklusarrest im Falle einer Komplementation aufgehoben werden kann. In diesem Fall könnte man davon ausgehen, dass das eingebrachte Gen das Reparaturprotein nicht nur exprimiert, sondern dass dieses auch funktioniert und den Patientenzellen zuvor fehlte.

## 2 Material und Methoden

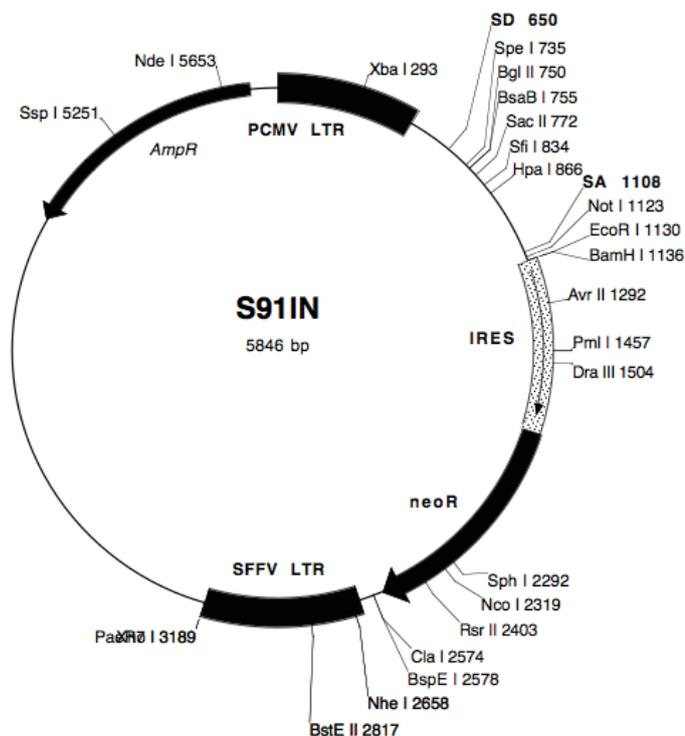
### 2.1 Material

#### 2.1.1 Plasmide

##### 2.1.1.1 Kandidatengene

Gen	Ausgangsvektor	Quelle
UBE2T	pEFF-N/UBE2T	AG Hanenberg
MUS81	pCMV-XL5	Origene Rockville (USA)
EME1	pCMV-XL5	Origene Rockville (USA)
FAAP24	pCMV-XL5	Origene Rockville (USA)
MERIT40	pCMV-AC	Origene Rockville (USA)

##### 2.1.1.2 Expressionsplasmid („S91IN“ = pSFb91)



**Abb. 14:** verwendetes Expressionsplasmid pSFb91 („S91IN“)

### 2.1.2 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Track it™ 1Kb Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)

Novex ® Sharp Protein Standard (Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.1.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Primer (Eurofins)	Bindestelle	Sequenz
256 – S91MCS	multiple Cloning Site	5': TCCGCCACTGTCCGAGGG
257 – IRES reverse	IRES	5': CTAGGAATGCTCGTCAAGAAG

### 2.1.4 Enzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Arbeitsschritt	Hersteller
BamH I Restriktion	5'-GGATCC-3'	Restriktion	NewEngland Biolabs
Not I Restriktion	5'-GGCCGC-3'	Restriktion	NewEngland Biolabs
Pwo DNA Polymerase		PCR	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase		Ligation	NewEngland Biolabs

### 2.1.5 Zellkultur

#### 2.1.5.1 *Retrovirus-Produzentenzelllinien*

Zelllinie	Charakteristika	Referenz
ecoFNX	retrovirale Verpackungszelllinie mit ecotropem Envelope, HEK293T-basiert	(92)
pg13	murine Fibroblastenzelllinie, produziert retrovirale Vektoren mit Gibbonaffen Leukämievirus (GALV)-Hülle	(93)

#### 2.1.5.2 *adhärente Zelllinien*

Zelllinie	Charakteristika	Referenz
HT1080	humane Fibrosarkomzelllinie (DSMZ)	(94)

### 2.1.5.3 Patientenzelllinien

Alle verwendeten Patientenzellen waren EBV-transformierte und somit immortalisierte lymphoblastoide B-Zelllinien (LCL) und wurden aus dem Flüssigstickstoff-Lager der AG Prof. Dr. Hanenberg der Universitätsklinik Düsseldorf aufgetaut und anonymisiert. Alle Patienten bzw. deren Angehörige haben sich damit einverstanden erklärt, dass die Zellen der Forschung zur Verfügung gestellt werden.

### 2.1.5.4 Nährmedien etc.

In der Zellkultur wurde für pg13-, eFNX- und HT1080-Zellen Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) verwendet, welches mit 10% (v/v) fötalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories) versetzt wurde. Außerdem wurden 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco/Invitrogen) und 1% L-Glutamin (200mM) (Gibco/Invitrogen) hinzugefügt. Als Standardnährmedium für die B-Zelllinien wurde RPMI (Gibco/Invitrogen) mit *nicht*-hitzeinaktiviertem Kälberserum benutzt.

## 2.1.6 Westernblot

### 2.1.6.1 Antikörper

Protein	Antikörper	Konzentration	Hersteller
MUS81	Mouse monoclonal [MTA30 2G10/3] to Mus81 (ab14387)	1:1000	abcam
EME1	Mouse monoclonal [mta317h2/1] to EME1 (ab14392)	1:300	abcam
FAAP24	Rabbit polyclonal to FAAP24 (ab48124)	1:300	abcam
UBE2T	UBE2T monoclonal antibody (M01), clone 1E12-4A3	1:500	Abnova
FANCD2	FANCD2 mouse monoclonal antibody sc-20022	1:800	Santa Cruz
neomycin	Anti-Neomycin Phosphotransferase (rabbit polyclonal IgG)	1:5000	Upstate, NY
2. AK mouse	Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase	1:10000	GE Healthcare
2. AK rabbit	Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase	1:10000	GE Healthcare

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Techniken

#### 2.2.1.1 PCR-Klonierung

Um die verschiedenen Vektoren - beispielsweise das S91UBE2TIN-Plasmid - zu konstruieren, musste *UBE2T* zunächst mit den zum Zielvektor passenden Schnittstellen (NotI/BamHI) versehen werden. Dies geschah mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction). Dazu wurde ein 5'-Primer (5'UBE2T-NotI: CATGCGGCCGCATGCAGAGAGCTTCA-3') und ein 3'-Primer mit der Sequenz (3'UBE2T-BamHI: GTAGGATCCCTAAACATCAGGATG-5') eingesetzt (Eurofins MWG Operon). Beim Design der Primer wurde jeweils eine Schnittstelle in den Überhang des Primers inkludiert (unterstrichen), sodass das amplifizierte PCR-Produkt jeweils an seinen Enden eine Schnittstelle enthielt und im nachfolgenden Arbeitsschritt mit den entsprechenden Enzymen gedaut werden konnte. Diese Prozedur wurde mit entsprechenden Primern ebenfalls für *MERIT40* durchgeführt (Tab. 8).

**Tab. 8:** Überblick über die verwendeten Primer und deren Sequenzen

Primer	Sequenz
5' UBE2T-Not I	CATGCGGCCGCATGCAGAGAGCTTCA
3' UBE2T-BamH I	GTAGGATCCCTAAACATCAGGATG
5' Merit-Not I	CATGCGGCCGCATGGAAGTGGCAGAG
3' Merit-BamH I	GTAGGATCCTCAGACAGTGGCCTC

Zur Durchführung der PCR wurden zunächst zwei Ansätze (1 & 2 à 50µl) vorbereitet, die im Folgenden zusammenpipettiert (=100µl) und dann wiederum auf jeweils 50µl für zwei PCR-Tubes aufgeteilt wurden:

**Tab. 9:** Ansätze für die PCR

Ansatz 1 (50µl)	Ansatz 2 (50µl)
1µl 5'Primer (1:10)	0,5µl Pwo DNA Polymerase (Roche)
1µl 3'Primer (1:10)	10µl PCR Puffer (10x mit MgSO <sub>4</sub> )
2µl dNTPMix	39,5µl HPLC
1µl Template (UBE2T-Plasmid) (1:10)	
45µl HPLC	

Anschließend wurde im Thermocycler (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700) nach folgendem Schema eine PCR durchgeführt: Zuerst 2min Denaturierung bei 94°C, dann 35 Zyklen: 15s bei 94°C, 30s bei 52°C, 60s bei 72°C. Abschließend 7min Extension bei 72°C. In den Fällen von EME1, MUS81, FAAP24 war dieses Vorgehen nicht nötig, da das gelieferte Insert (Origene®) von *zwei* NotI-Schnittstellen flankiert war, und die cDNAs mit nur diesem Enzym ausgeschnitten und anschließend in den Zielvektor kloniert werden konnten.

### 2.2.1.2 Restriktionsverdau

Um ein Expressionsplasmid zu synthetisieren, wurden sowohl der Zielvektor (S91IN), als auch das entsprechende Insert (z.B. *UBE2T*) mit Restriktionsendonukleasen der Firma „New England Biolabs (NEB)“ geschnitten. Eine genaue Auflistung der Enzyme findet sich in Tab. 10. Dazu wurden beispielsweise für den Verdau von S91IN 1µg der Vektor-DNA mit jeweils 10U Not I und 10U BamH I unter Verwendung der spezifischen Puffer (2µl Puffer 3 und 2µl BSA) und mit 12,5µl Wasser bei einem Gesamtvolumen von 20µl für eine Stunde bei 37°C verdaut. Um Enzyme und DNA-Reste von dem gewünschten Fragment zu trennen wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt.

**Tab. 10** Ausgangsvektoren und Zielvektoren der verwendeten Gene

Gen	Ausgangsvektor	Enzyme	Zielvektor	Enzyme	Ergebnis
UBE2T	pEFF-N/UBE2T	Not I /BamH I	S91IN	Ligase	S91UBE2TIN
MUS81	pCMV-XL5	Not I	S91IN	Ligase	S91MUS81IN
EME1	pCMV-XL5	Not I	S91IN	Ligase	S91EME1IN
FAAP24	pCMV-XL5	Not I	S91IN	Ligase	S91FAAP24IN
MERIT40	pCMV-AC	Not I /BamH I	S91IN	Ligase	S91MERIT40IN
FAAP100	pOTB7	Not I /BamH I	S91IN	Ligase	S91FAAP100IN

### 2.2.1.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der Auftrennung und somit der Reinigung der verdauten DNA-Abschnitte. Es wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 1% verwendet, wobei 500mg Agarose (Biozym LE Agarose) in 50ml TAE-Puffer in der Mikrowelle durch kurzes Aufkochen aufgelöst wurden. Anschließend wurden 2µl Ethidiumbromid (Sigma) der Konzentration 10mg/ml hinzugegeben. In einem Laufbehältnis wurde das Gel nach Erhärten in TAE-Laufmittel gelagert. Neben den mit Blaumarker versehenen Proben wurde auch ein 1kb Größenmarker (Invitrogen „Track it™ 1Kb Ladder“) als Orientierung laufen gelassen. Die angelegte Spannung betrug 100mV, sodass bereits nach ca. 20 Minuten einzelne Banden im UV-Licht unterschieden werden konnten. Bei bekannter Länge des Fragments konnte nun die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt werden.

### 2.2.1.4 Aufreinigung der DNA

Die Extraktion der DNA aus dem ausgeschnittenen Agarosegel erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit®“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Das Produkt wurde in 50µl HPLC-Wasser präzipitiert.

### 2.2.1.5 *Ligation*

Zur Ligation von Vektor (S91IN) und jeweiligem Insert (z.B. *UBE2T*) mit gleichen Schnittenden wurden Vektor und Insert in einem Reaktionsvolumen von 20µg mit 400 Units T4 Ligase und T4-Ligationspuffer (mit 10mM ATP) (NEB) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Verhältnis der Mengen von Vektor und Insert betrug 1:3. Nach einer Stunde Inkubation war die Ligation abgeschlossen, sodass nun die Transformation folgen konnte.

### 2.2.1.6 *Transformation von Bakterien*

Die Transformation dient der Vermehrung von Plasmid-DNA in Bakterien. Hierfür wurden transformationskompetente E.Coli Bakterien (50µl) Typ "OneShot® TOP10" (Invitrogen) auf Eis aufgetaut. Nach ca. 10 Minuten wurden 5µl des Ligationsansatzes (0,1µg Plasmid-DNA) hinzugefügt und das Gemisch für weitere 20 Minuten auf Eis gelassen. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden durchgeführt, um die Vektor-DNA in die Bakterien zu bringen. Nach einem kurzen Abkühlen auf Eis wurde 250µl vorgewärmtes S.O.C.-Medium hinzugefügt und der Ansatz sofort bei 37°C und 170rpm für eine Stunde inkubiert. Danach wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer vorgewärmten LB-Agarplatte ausgestrichen. Diese enthielt zusätzlich das Selektionsantibiotikum Ampicillin (100µg/ml, Serva), sodass nur die Bakterien mit dem im Vektor kodierten Ampicillin-Resistenzgen überlebten. Über Nacht erfolgte eine Kultivierung bei 37°C im Brutschrank, um Einzelkolonien anzuzüchten. Die gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag mit einer Pipettenspitze „gepickt“, welche dann über Nacht in 3ml LB-Flüssigmedium inkubiert wurde. Am Folgetag konnte nun mit der Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien begonnen werden.

### 2.2.1.7 *Isolierung der Plasmid-DNA*

Um die amplifizierte DNA aus den Bakterien zu gewinnen, wurden zwei unterschiedliche Systeme genutzt. Ein sogenanntes „Mini-Prep“ für die Isolierung geringer DNA-Mengen mit geringerer Reinheit wurde beispielsweise genutzt, um DNA für eine Kontroll-Sequenzierung als Zwischenschritt zu gewinnen. Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem

„FastPlasmid™ Mini Kit“ (5Prime). Dazu wurden 2ml der am Vortag angeimpften, flüssigen Bakterienkultur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 13.000rpm für eine Minute zentrifugiert, sodass ein Bakterienpellet entstand. Anschließend wurde das Medium abgegossen und zu dem Pellet 400µl eiskalte Lysis-Lösung gegeben. Durch Schütteln für 30 Sekunden wurde das Pellet vollständig resuspendiert und im Folgenden für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Lysat in die dafür vorgesehene „spin column“ pipettiert und erneut für eine Minute zentrifugiert. Nun wurde 400µl mit reinem Isopropanol versetzter Waschpuffer ebenfalls in die spin column gegeben und es folgte eine erneute Zentrifugation. Anschließend wurde das gesamte Medium abgegossen und die spin column in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben. Die im Filter aufgefangene DNA wurde nun mit 50µl HPLC-Wasser unter erneuter Zentrifugation eluiert und konnte anschließend verwendet werden. Wenn größere Mengen hochreiner DNA erwünscht waren, erfolgte die Isolation mittels „MaxiPrep“ mit dem „PureLink™ HiPure Plasmid Kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Per DNA-Mengenbestimmung wurde die Endkonzentration der gewonnenen DNA auf 1µg/µl eingestellt.

#### *2.2.1.8 DNA-Mengenbestimmung*

Um nach entsprechenden Arbeitsschritten den DNA-Gehalt einer Lösung zu bestimmen, wurde eine Messung in einem Spektralphotometer der Firma NanoDrop nach Herstelleranleitung durchgeführt. Der DNA-Gehalt wurde basierend auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz angegeben. Nach Durchtritt der Strahlung bei einer Wellenlänge von konstant 260nm durch eine Quarzküvette von 1cm Dicke entspricht eine optische Dichte der Größe 1 einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

#### *2.2.1.9 Sequenzierung*

Zur Kontrolle der Vektoren wurden Sequenzierungen durch Didesoxymethode nach Sanger im automatischen Kapillarsequencer durchgeführt (95). Zuerst wurden hierbei im Rahmen einer Sequenzierungs-PCR unterschiedlich lange Oligonukleotide hergestellt, die gemeinsam die Gesamtheit aller möglichen Fragmente eines DNA-Abschnittes darstellen.

Neben den üblichen Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) enthielt der gelieferte Ansatz für die PCR ebenfalls Didesoxynukleotide (ddNTP), die bei einem Einbau in die Nukleotidkette für einen Syntheseabbruch derselben sorgen. Die genannten Nukleotide waren in dem benutzten „BigDye ® Terminator v1.1 cycle sequencing kit“ enthalten und wurden nach Herstellerangaben verwendet. Im Thermocycler wurden für die Sequenzierungs-PCR folgende Einstellungen vorgenommen: 25 Zyklen mit 10s bei 96°C, 5s bei 50°C, 4min bei 60°C. Danach wurde das Produkt auf 4°C zur Lagerung abgekühlt. Für die Sequenzierungs-PCR wurde immer nur ein Primer eingesetzt, sodass die DNA nur in eine Richtung amplifiziert wurde. Alternativ zum genannten Forward-Primer ließ sich auch ein Reverse-Primer (z.B. IRES-Reverse-Primer) einsetzen, um die Sequenz in 3'-Richtung verfolgen zu können. Nach der Sequenzierungs-PCR wurde das Produkt mit dem „DyeEx 2.0 Spin Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt. Das entstandene Produkt von 20µl wurde mit 15µl HiDi-Formamide resuspendiert, sodass anschließend die Sequenzierung im „3130 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems) erfolgen konnte.

## 2.2.2 Zellkulturtechniken

### 2.2.2.1 Allgemeines

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank (Thermo Forma Series II) bei 37°C, 5%-CO<sub>2</sub>-Gehalt und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die verwendeten Zellen wurden in Zellkulturschalen (Corning Costar) mit Nährlösung versetzt. 500ml dieser DMEM-Nährlösung wurden mit 60ml hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (PAA), 6ml Glutamin (Gibco) und 6ml Penicillin/Streptomycin (Gibco) versetzt. Um die Zelldichte durchschnittlich bei  $5 \times 10^5$  Zellen zu halten, wurden die Zellen entsprechend ihrer Ausgangszahl nach einer Trypanblau-Färbung (Sigma) und Auszählung in der Neubauer-Zählkammer im Verhältnis 1:5 bis 1:10 auf neue Zellkulturschalen übertragen. Dazu wurde initial das DMEM-Medium abgesaugt und es wurden 10ml PBS-Waschlösung auf die Platte gegeben. Nach Entfernung der Waschlösung wurden 2ml Trypsin-EDTA (PAA) hinzugegeben und die Platte für ca. sieben Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach abgelaufener Zeit wurde die Trypsinisierung mit DMEM abgestoppt und die Zellen resuspendiert. Anschließend konnten sie auf neue Zellkulturplatten verteilt werden. Bei einer gewünsch-

ten Passagierung von 1:7 wurde die Reaktion beispielsweise mit 5ml Medium gestoppt, sodass die gewonnenen 7ml Gesamtlösung zu je 1ml auf 7 neue Platten verteilt werden konnten. Jeweils eine halbe Stunde vor dem Ausplattieren wurden die Zellkulturschalen mit 0,1%-iger Gelatine-Lösung beschichtet, um ein gleichmäßiges Anwachsen der Zellen zu gewährleisten.

#### 2.2.2.2 *Transiente Virusherstellung – Transfektion mit FuGENE™*

Zur Herstellung ecotroper, retroviraler Überstände wurden ecoFNX-Zellen verwendet. In diesen Zellen, die als Verpackungszelllinien dienen, sind die zur Replikation und Verpackung essentiellen viralen Gene *gag* (gruppenspezifisches Antigen), *pol* (virale Enzyme) und ecotropes *envelope* (Virushülle) stabil im Genom integriert. Für die verwendeten ecoFNX-Zellen ist entsprechend des spezifischen env-Genes ein *ecotroper* Wirtsbereich charakteristisch, d.h. sie besitzen im Gegensatz zu einem amphotropen Vektor ein enges Wirtsspektrum, das auf Mäuse und Ratten begrenzt ist (92, 96). Um Virus mit dem vorgesehenen Transgen zu produzieren, muss der molekularbiologisch hergestellte Vektor nun in diese Zellen eingebracht werden. Da bei diesem Verfahren nur ein Bruchteil des genetischen Materials dauerhaft in das Genom der Produzentenzellen eingeschleust wird und der überwiegende Teil nach kurzer Expression auch schnell wieder abgebaut wird (ca. 24-71h), bezeichnet man diese Art Virusherstellung als *transient*. Um die Transfektion durchzuführen, wurden zuerst  $6 \times 10^6$  ecoFNX-Zellen pro 10cm-Platte ausgesät und jede Platte mit 10ml DMEM versorgt. Am Folgetag erfolgte die Transfektion. Dabei wurden zu 600µl zusatzfreiem Medium (DMEM, Gibco), 20µg Plasmid-DNA und kurz danach 60µl Fugene® (Roche) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit konnte es auf die am Vortag ausplattierten ecoFNX-Zellen pipettiert werden. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma), dessen große Pufferkapazität gewährleistete, dass zum Zeitpunkt der Virusernte bei saurem pH-Wert keine Virusdegeneration eintrat. Am selben Tag wurden  $5 \times 10^5$  pg13-Zellen pro 10cm-Platte für die Infektion am Folgetag ausplattiert. Um einen reinen, zellfreien Virusüberstand zu generieren, konnte am nächsten Tag das Nährmedium mit den extrazellulären Virusüberständen abgesaugt und

durch einen Filter mit der Porengröße 0,45µm (Sartorius Stedim) aufgereinigt werden. Der gewonnene Überstand wurde anschließend zur Infektion der am Vortag ausplattierten pg13-Zellen verwendet.

### 2.2.2.3 *Stabile Verpackungszelllinien – Infektion der pg13-Zellen*

Bei den anschließend verwendeten „pg13-Zellen“ handelt es sich um eine *murine* Fibroblastenzelllinie. Sie exprimiert stabil die MuLV-Gene (murines Leukämievirus) *gag* und *pol* und statt des MuLV-Hüllproteins das *env*-Gen des „Gibbonaffen-Leukämievirus“ (GALV). Dementsprechend lassen sich mit viralen Überständen dieser Zelllinie auch effizient Zielzellen infizieren (z.B. von Mensch, Affe, Hund, Hamster) (93). Um die stabile Virusproduktion zu initiieren, wurden die pg13-Zellen nun mit den virushaltigen, ecotropen Überständen infiziert. Pro Milliliter Virusüberstand wurden 6µl Protaminsulfat (Sigma) zur Erhöhung der Transduktionseffizienz hinzugegeben. Anschließend wurde das Produkt auf die ausplattierten pg13-Zellen pipettiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit komplettem Medium (DMEM). 24 Stunden nach diesem Mediumwechsel konnten die konfluenten Zellen passagiert werden, sodass für die spätere Ernte mehr Virusüberstand zur Verfügung stand. In diesem Schritt wurde dem Nährmedium ein Neomycin-Analogon G418 Geneticin (Invitrogen) in einer Konzentration von 1,5 mg/dl hinzugefügt. Dieser Schritt diente der Selektion derjenigen pg13-Zellen, die erfolgreich mit dem ein Neomycin-Resistenzgen tragenden Vektor transduziert worden waren. Nach Absterben der Kontrollplatte und einer 80-90%igen Konfluenz der Zellen konnte erneut ein Mediumwechsel mit IMDM vorgenommen werden, sodass am Folgetag die Virusernte der pg13-Zellen durchführbar war. Diese Ernte wurde bei Bedarf an drei Folgetagen wiederholt. Die zellfreien, 0,45µm gefilterten Virusüberstände wurden entweder bei -80°C eingefroren oder sofort zum Ansetzen des Virustiters verwendet.

### 2.2.2.4 *Selektion über Neomycin-Analogon G418*

Wie beschrieben enthielt der zum Gentransfer benutzte Vektor (S91IN) ein Resistenzgen gegen das Neomycin-Analogon G418, sodass nach Transfektion und Integration des Plas-

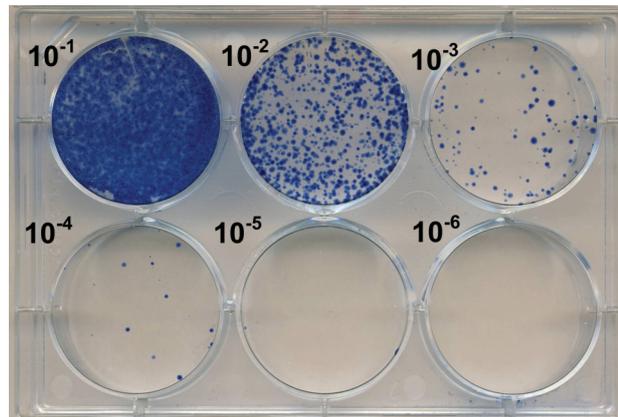
mides die Zellen, die das Transgen stabil exprimieren sollten, selektioniert werden konnten. Neomycin ist ein Breitbandantibiotikum aus der Gruppe der Aminoglycoside, dessen Analogon G418 sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryonten die Proteinbiosynthese durch Blockade der Ribosomen hemmt. 48 Stunden nach Infektion der pg13-Zellen wurde mit der Selektion durch Zugabe des Analogons begonnen und solange beibehalten, bis die Zellkolonie auf der Kontrollplatte komplett abgestorben war.

#### 2.2.2.5 *Kryokonservierung von Produzentenzelllinien*

Um pg13-Zellen für längere Zeit zu konservieren, mussten diese nach einem PBS-Waschgang jeweils mit 1ml Trypsin und kurzer Inkubation von ihrer Zellkulturplatte abgelöst werden. Die Trypsin-Reaktion wurde mit 1ml des jeweiligen Nährmediums gestoppt. Pro Platte wurden dementsprechend 2 Kryo-Röhrchen à 1ml angefertigt. Nach Zusatz von 6% DMSO (= 60µl Dimethylsulfoxid pro Röhrchen) (Sigma) wurden die Röhrchen direkt in Isopropanol-haltigen Einfriercontainern (Nalgene) bei -80°C eingefroren. Zur Rekultivierung wurden die Kryo-Röhrchen bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in eine vorbereitete Platte mit Nährmedium überführt. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das restliche DMSO vollständig zu entfernen.

#### 2.2.2.6 *Virustitration*

Der Virustiter ist ein Maß für die Menge der infektiösen Viruspartikel pro Volumeneinheit des Virusüberstandes und wird in der Einheit „cfu/ml“ („colony forming units/ ml“) angegeben. Zur Bestimmung des Virustiters wurden jeweils 35.000 HT1080-Zellen pro Well auf einer 6-Well-Platten ausplattiert, nachdem sie in einer Neubauer-Zählkammer zuvor abgezählt worden waren. Bei den verwendeten HT1080-Zellen handelt es sich um Zellen einer Fibrosarkom-Zelllinie.



**Abb. 15:** Virustitration des Vektors pgS91FAAP24IN auf einer 6-Well-Platte mit  $2 \times 10^5$  colony forming units (CFU)/ml

Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 1ml des Virusüberstandes in einer Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$ ) infiziert. Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wurden dem Medium  $6 \mu\text{l/ml}$  Protaminsulfat (Sigma) hinzugefügt. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel mit DMEM vorgenommen. Am zweiten Tag nach der Infektion erfolgte ein Mediumwechsel mit einem DMEM-Nährmedium, dem das Neomycin-Analogon G418 (Geneticin, Invitrogen) in der Konzentration  $0,8 \text{mg/dl}$  zugefügt worden war, sodass nun eine Selektion entsprechend der Viruskonzentration erfolgen konnte. Über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen wurde so lange alle 48 Stunden ein Neomycin-Mediumwechsel durchgeführt, bis auf der Kontrollplatte alle nichtinfizierten Zellen abgestorben waren. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Virustiters. Nach Entfernung des Nährmediums wurden die gewachsenen Kolonien mit Methyleneblaulösung gefärbt. Nach einem vorsichtigen Abspülen der Methyleneblaulösung waren die Kolonien blau angefärbt und ließen sich nun gut zählen.

#### 2.2.2.7 Transduktion von lymphoblastoiden B-Zelllinien (LCL)

Die bereits EBV-transformierten Patienten LCLs wurden aus flüssigem Stickstoff aufgetaut und in T25-Zellkulturflaschen mit RPMI-Medium (+LCL-FCS) aufgezogen. Bei ausreichend dichtem Wachstum wurden die Zellen auf T75-Flaschen umgesetzt. Die Infektion wurde auf Retronectin-beschichteten 6-Well-Platten (non-tissue treated) durchgeführt (97). Zuerst wurden die Platten jeweils dreimal eine halbe Stunde mit 1ml des jeweiligen Virus-

überstandes inkubiert und anschließend für 24h mit 2ml der Zellsuspension der Patienten-LCLs im Brutschrank gelagert. Es folgte ein Mediumwechsel mit RPMI-Neomycin G418 in der Konzentration 0,8mg/ml und ein Umsetzen der Zellen in T25-Flaschen. Die Selektion erfolgte, bis alle LCLs in der Kontrollflasche (NoVirus) abgestorben waren.

#### 2.2.2.8 *Mitomycin C-Behandlung der Patienten-LCLs*

Nach der Neomycin-Selektion wurden die Zellen wieder gesplittet und anschließend jeweils die Hälfte des Materials mit einer Konzentration von 33 nM (3,3 µg/ml) MMC versetzt. Nach dreitägiger Inkubation mit MMC konnte die Ernte für die Zellzyklusanalyse folgen.

#### 2.2.2.9 *Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)*

Die mit MMC behandelten LCLs wurden in 15ml-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 13.000rpm abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte eine erneute Zentrifugation. Anschließend wurde das erhaltene Zellpellet in 600µl BSA-Lösung (1% in PBS) aufgenommen. In Eppendorfgefäßen wurden die Zellen anschließend bei 7°C und 500 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wieder in 300µl BSA-Lösung aufgenommen, erneut zentrifugiert und anschließend in 300µl eiskaltem PBS suspendiert. Es wurden unter ständigem Schütteln 800µl 98% Ethanol hinzugetropft. Es erfolgte eine mindestens 24-stündige Lagerung der Suspension bei – 20°C. Am nächsten Tag konnten die Zellen sedimentiert (10°C / 600g/ 10min) und anschließend in 300µl RNase-Lösung (100µg/ml) resuspendiert werden. Nach einer Inkubation bei 37°C für 10 Minuten erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 10°C und 1000g für 10 Minuten. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet kurz geschüttelt. In Abhängigkeit von seiner Größe wurde das Pellet in 300-400µl PBS aufgenommen, dem 10 µg/ml Propidiumiodid (Sigma) hinzugefügt wurden. Die Messungen wurden an einem FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Es wurden mindestens 100.000 Ereignisse bei ca. 500 events/sec aufgenommen. Alle gewonnenen Daten wurden anschließend mit ModFit<sup>LT</sup> (Verity Software House, Topsham, US) ausgewertet.

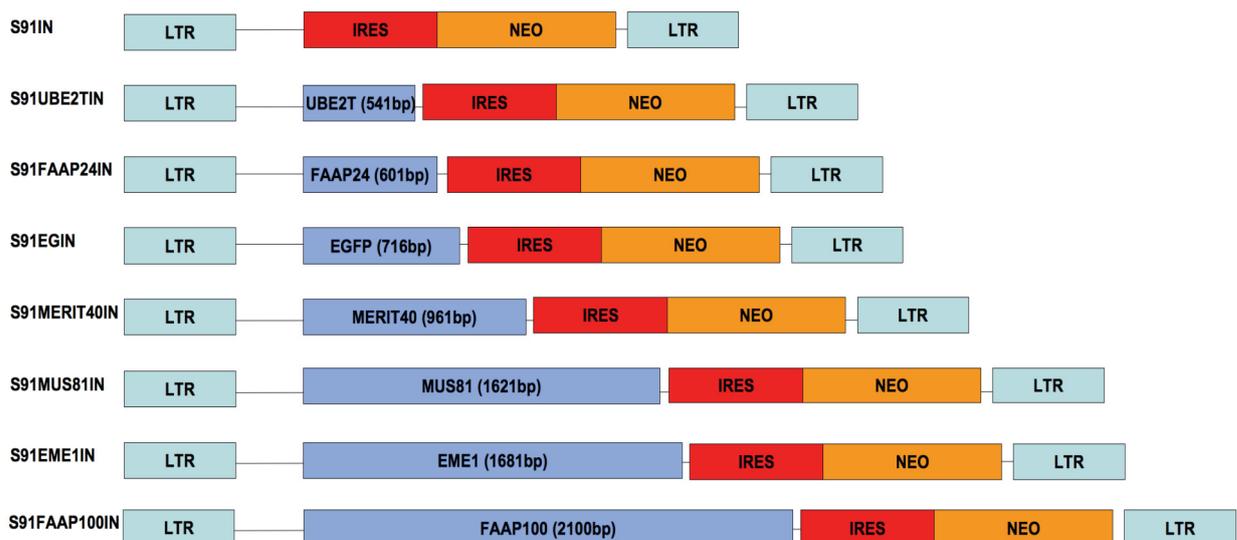
### 2.2.3 Westernblot

Für den Nachweis der Proteine im Westernblot erfolgte die Ernte der Zellen, die abzentrifugiert, mit frischem PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und anschließend für mindestens 45 Minuten in 200-400µl Lysispuffer auf Eis lysiert wurden. Bei 14.000rpm und 4°C für 10 Minuten wurden nicht lösliche Bestandteile wie DNA und RNA abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und weiter verwendet. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem „Quick Start™ Bradford Protein Essay“ nach Herstelleranweisung. Für die Elektrophorese wurden fertige 7% Trisacetat-Gele (Invitrogen) verwendet. Es wurden 50µg Protein zusammen mit 7,5µl LDS Sample Preparation Buffer (Invitrogen) und 3µl Reducing Agent (Invitrogen) für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend in die Geltaschen gefüllt. Als Laufmarker wurde ein „Novex® Sharp Protein Standard“ (Invitrogen) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 Volt in NuPAGE® Trisacetat-Laufpuffer (Invitrogen) für 6-8h. Die Gelelektrophorese wurde beendet, wenn der kleinste Blaumarker am Gel-Ende angelangt war. Für das eigentliche Blotting musste die Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) in 5%-Methanol aktiviert und anschließend kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen werden. Anschließend erfolgte der Zusammenbau des Blotsystems und der eigentliche Westernblot in NuPAGE® Transfer Buffer (Invitrogen). Nach drei Stunden Blot bei 30 Volt wurde die Membran für eine Stunde komplett mit Blotting-Milch (Roth) geblockt und bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x 10 Minuten in PBS-Tween (Merck, PAA Laboratories) gewaschen. In der folgenden Nacht wurde die Membran mit dem jeweiligen Antikörper (1:800) im Kühlraum inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 3x10 min PBS-Tween am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (im Falle von D2-Blots 1: 2000) für eine Stunde. Anschließend wurde die Membran wieder gewaschen und mit SuperSignal® Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) nach Herstelleranweisungen aktiviert. Die Detektion erfolgte in einem LAS-3000 imaging system (Fujifilm). Alle Werte beziehen sich hier exemplarisch auf den FANCD2-Westernblot.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Testung der klonierten Viruskonstrukte

Die cDNAs der in diesem Projekt untersuchten Gene wurden teils mittels Restriktionsverdau teils per PCR aus ihren Ausgangsplasmiden gewonnen und in ein S91IN-Expressionsplasmid kloniert (vgl. 2.2.1). Eine genaue Übersicht über die Ausgangs- und Zielvektoren findet sich in Tabelle 10. Zur transienten Herstellung retroviraler Überstände wurden die molekularbiologisch hergestellten Plasmide in ecoFNX-Verpackungszelllinie eingeschleust (vgl.2.2.2.2). Um eine stabile Verpackungszelllinie herzustellen, wurden anschließend pg13-Zellen mit den Virushaltigen überständen infiziert (vgl. 2.2.2.3). An allen hergestellten Plasmiden erfolgte vor ihrer Transfektion eine *strukturelle* Kontrolle durch Sequenzierung. Über Titerbestimmung, Neomycin-Selektion und den Nachweis der Überexpression der G418-Resistenz in infizierten pg13-Zellen wurden die Konstrukte anschließend auf ihre *Funktionalität* getestet. Außerdem konnten die durch die Kandidatengene kodierten Proteinprodukte in infizierten pg13-Zellen *direkt auf Proteinebene* nachgewiesen werden, was ein weiteres Indiz für die Funktionstüchtigkeit der produzierten Viren ist. Abbildung 16 erlaubt einen schematischen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Expressionsplasmide.



**Abb. 16:** schematische Darstellung der verwendeten Retroviren, „NEO“ bezeichnet die G418-Resistenz

### 3.1.1 Titerbestimmung der Viruskonstrukte

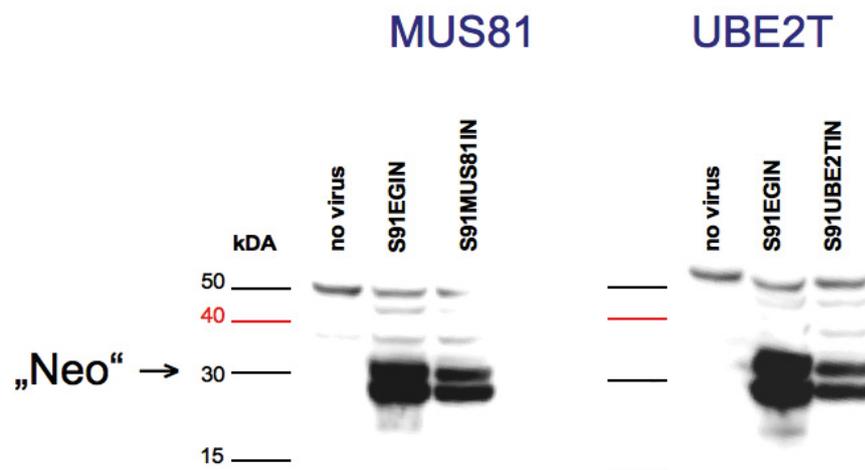
An den transduzierten pg13-Zellen erfolgte eine Selektion über das Neomycin-Analogon G418, sodass sichergestellt werden konnte, dass jede überlebende pg13-Produzentenzelllinie Viren hervorbrachte, die das vorgesehene Konstrukt inklusive der Neomycinresistenz als Provirus im Genom beinhalteten. Einen initialen Test auf Funktionalität der als replikationsdefektes Virus hergestellten Kandidatengenkonstrukte stellte die Virustiterbestimmung mittels HT1080-Zellen dar (vgl. 2.2.2.6). Die Titerbestimmung auf HT1080-Zellen ist ein Maß für die Menge der infektiösen Viruspartikel pro Volumeneinheit des gewonnenen Virusüberstandes. Alle in pg13-Zelllinien verpackten Viruskonstrukte erwiesen sich als funktionstüchtig und waren in der Lage, die verwendeten HT1080-Zellen verdünnungsabhängig zu infizieren. Einen Überblick über die erreichten Virustiter erlaubt Tabelle 11. Auffällig war, dass die Konstrukte mit den beiden größten Genen (S91EME1IN und S91FAAP100IN) nur relativ ineffizient verpackt wurden, sodass nur gering-titrige Überstände in der G418-Selektion erreicht werden konnten. Die verwendeten Retroviren für die Kandidatengene enthielten alle ein Resistenzgen gegen das verwendete Neomycin-Analogon G418 (s. Abbildung 16).

**Tab. 11:** Virustiter der produzierten Konstrukte in HT1080-Zellen

<i>Retrovirus</i>	Virustiter (CFU/ml)
S91IN	$3 \times 10^5$
S91UBE2TIN	$1 \times 10^5$
S91FAAP24IN	$10 \times 10^4$
S91EGIN	$3 \times 10^5$
S91MERIT40IN	$1 \times 10^5$
S91MUS81IN	$1 \times 10^5$
S91EME1IN	$6 \times 10^2$
S91FAAP100IN	$2 \times 10^3$

### 3.1.2 G418-Resistenz-Nachweis

Mittels Westernblot wurden darüber hinaus das Protein der kodierten Neomycin-Resistenz in den transduzierten pg13-Zellen dargestellt (Abb. 17). Hierbei fällt auf, dass vor allem bei größeren Genen, wie beispielsweise *EMEI* oder *FAAP100*, das auf dem Plasmid nachfolgende G418-Resistenzgen schwächer exprimiert wurde. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass bei diesen Konstrukten die niedrigsten Virustiter erreicht wurden. Zum Vergleich wurden nicht infizierte Zellen (NoVirus) hinzugezogen, bei denen das bakterielle *nptII*-Gen nicht im Genom vorhanden ist und deshalb keine G418-Resistenz nachweisbar war. Der durchgeführte Westernblot entspricht einer funktionellen Analyse der produzierten Viruskonstrukte, da nur bei erfolgter Übertragung der Genkassette eine Überexpression des Neomycinresistenz-Proteins nachweisbar ist.

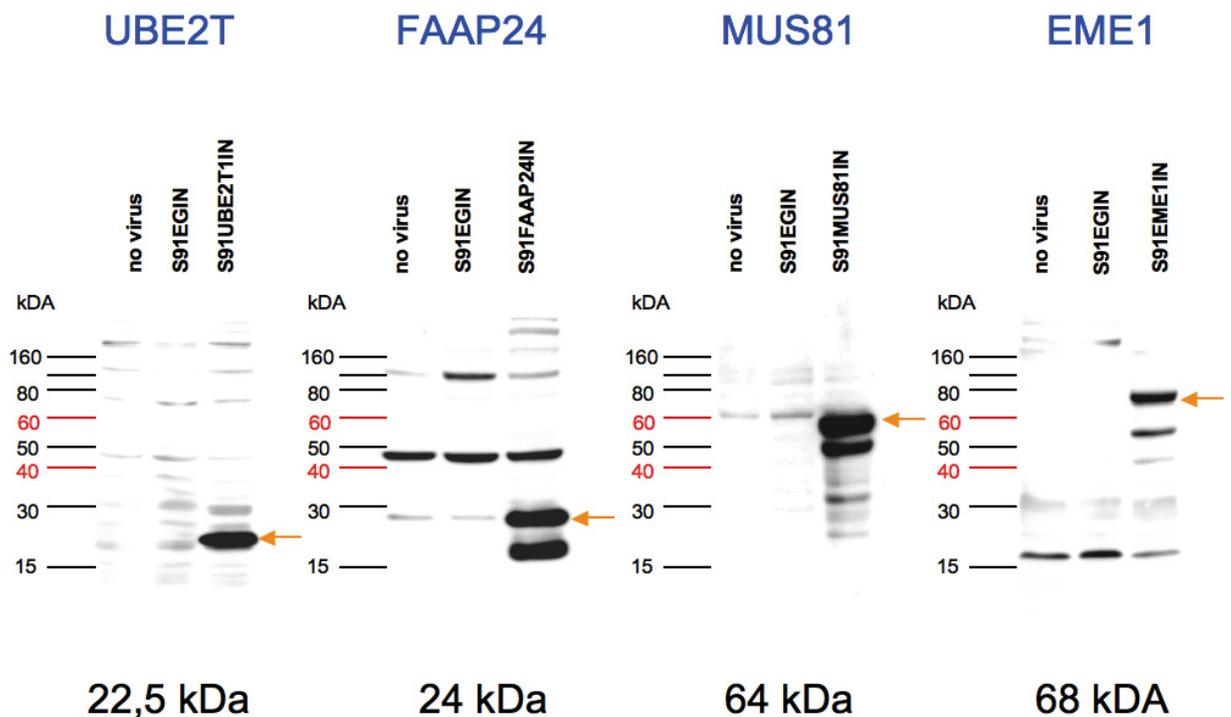


**Abb. 17:** Exemplarische Darstellung eines Westernblots mit pg13-Zelllinien, nach Transduktion von S91EGIN, S91MUS81IN und S91UBE2TIN zum Nachweis der *Neomycinresistenz-Proteins* bei 30kDa („Neo“), zum Vergleich pg13-Ausgangszellen

### 3.1.3 Nachweis der Überexpression in pg13-Zellen

Eine weitere Methode zur Überprüfung der Funktionalität der hergestellten Viren war der direkte Nachweis der durch die Kandidatengene kodierten Proteine in den transduzierten pg13-Zellen. Hierzu wurden die pg13-Zellen lysiert, die Proteine nach Aufarbeitung der Zellen im Westernblot aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper angefärbt.

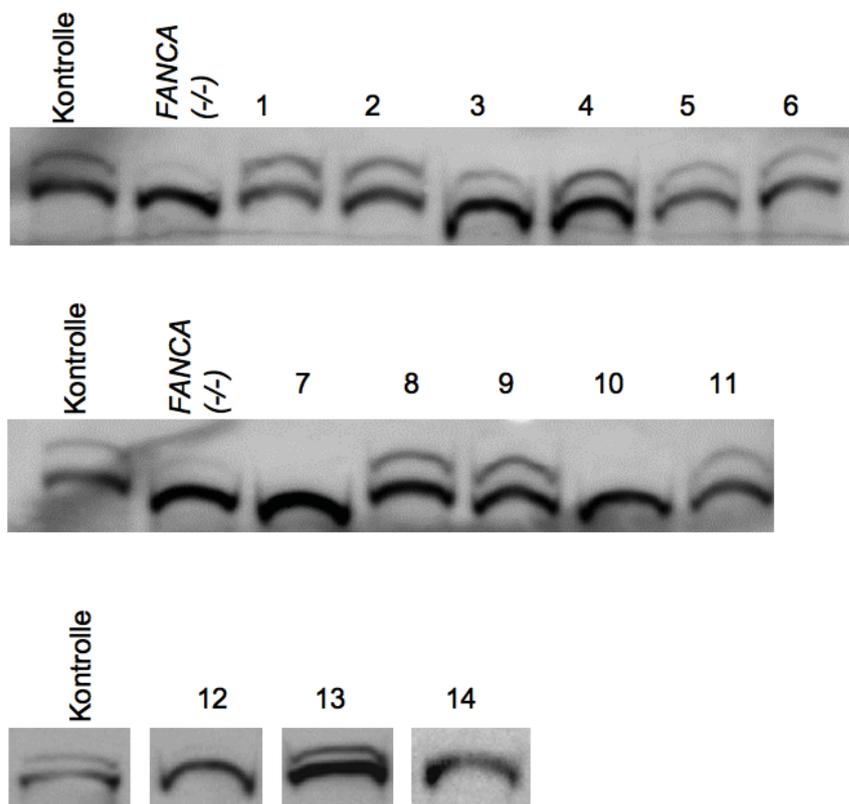
Es war davon auszugehen, dass das in den pg13-Zellen naturgemäß vorkommende, murine Homolog der Proteine durch die verwendeten Antikörper nicht angefärbt werden würde. Diese Vermutung konnte in den Kontrollen (NoVirus) bestätigt werden (Abb. 18). Durch die Transduktion mit den Kandidatengen-exprimierenden Retroviren wurde in den pg13-Zellen die Produktion der Proteine induziert. Durch den Vergleich zu dem Proteinstandard Novex® (Invitrogen, Karlsruhe) konnte eine Größenbestimmung der Proteine erfolgen. Allen getesteten Kandidatengen konnte die jeweilige Proteinbande im Westernblot zugeordnet werden (Abb. 18).



**Abb. 18:** Westernblot der durch Retroviren infizierten pg13-Zelllinien zum Nachweis der Proteine bei Überexpression des entsprechenden Kandidatengens (←); für FAAP100 und MERIT40 waren zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Antikörper verfügbar.

### 3.2 FANCD2-Westernblot der FA-Patientenzellen

Eine erste Klassifizierung der Zelllinien von FA-Patienten wurde mittels FANCD2-Westernblot vorgenommen. Alle getesteten Lymphozyten-Zelllinien stammten von Patienten, die bis zum Zeitpunkt der Untersuchung keiner bekannten Komplementationsgruppe zugeordnet werden konnten. Im FANCD2-Immunoblotting wurde analysiert, ob das FANCD2-Protein, das ein zentrales Element im FA-Reparaturweg darstellt, monoubiquitiniert werden kann (vgl. 1.8). Mittels dieses Screenings ließen sich die Defekte der Zelllinien grob in „upstream“ und „downstream“ einteilen. Eine Übersicht über die Ergebnisse des D2-Westernblots gibt Tabelle 12.



**Abb. 19:** FANCD2-Westernblot der lysierten Patienten-Lymphozyten nach Behandlung mit Mitomycin C. Zum Vergleich die Zellen eines gesunden Probanden (JB198) und eines Patienten mit Defekt in FANCA. Bei intakter Monoubiquitinierung liegt FANCD2 sowohl in der *nicht* monoubiquitinierten Form FANCD2-S (short), als auch in der monoubiquitinierten Form FANCD2-L (long) vor. Ist dies *nicht* der Fall, so ist im Westernblot nur FANCD2-S detektierbar (eine Bande).

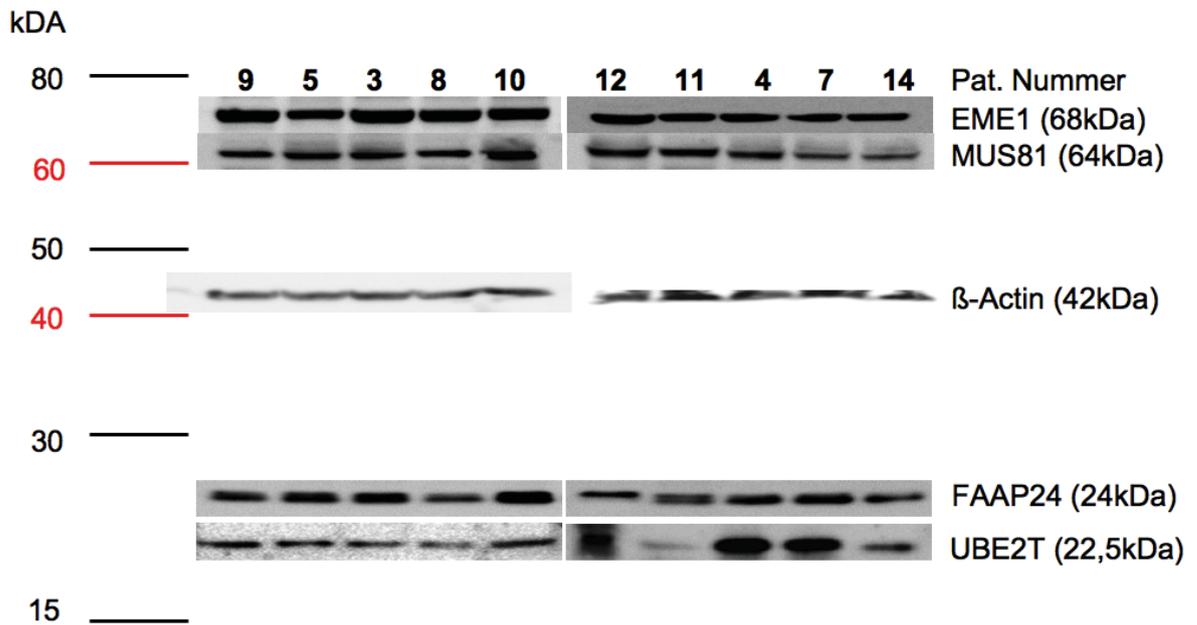
**Tab. 12:** Übersicht über die Resultate der FANCD2-Westernblots

<b>D2-Banden</b>	<b>Patienten</b>
1 Bande	7, 10, 12, 14
2 Banden	1,2,3,4,5,6,8,9,11,13

In allen untersuchten Lysaten von Patientenzellen ließ sich FANCD2 nachweisen, sodass Mutationen in FANCD2 mit instabiler oder fehlender Proteinproduktion ausgeschlossen werden konnte. Es konnten bei zehn Patienten sowohl die FANCD2-S als auch FANCD2-L nachgewiesen werden, was auf einen funktionsfähigen Kernkomplex mit aktiver Monoubiquitinierung hinweist. Auffällig waren die Zelllinien der Patienten 7, 10, 12, 14, an denen nur eine Bande (FANCD2-S) als nicht-ubiquitinierte Form von FANCD2 detektiert werden konnte.

### **3.3 Westernblot der FA-Zelllinien zu den Kandidatengen**

Die in Zellkultur gehaltenen Patienten-Lymphozyten wurden vor der retroviralen Infektion per Westernblot gescreent. Die Zellen wurden wie beim FANCD2-Blot lysiert und mit spezifischen Antikörpern für die Kandidatengene angefärbt. Dadurch sollte festgestellt werden, ob das vermutete Kandidatengen in den Patientenzellen überhaupt exprimiert wird. Ein fehlender Nachweis der untersuchten Reparaturproteine hätte nahegelegt, dass die Patientenzellen das jeweilige Protein nicht herstellen. Dies wäre ein möglicher Hinweis auf die Ursache der defekten DNA-Reparatur. Ein Nachweis im Immunoblot keine funktionelle Analyse der jeweiligen Kandidatengene. So kann es auch sein, dass ein Protein im Westernblot nachweisbar ist, aber sich in weiteren Untersuchungen als nicht funktionsfähig erweist. Zum Vergleich wurden einerseits ein Laufmarker auf dem Gel verwendet, sodass eine Größenbestimmung der in der Chemielumineszenz sichtbaren Banden möglich war. Andererseits wurde jeweils eine pg13-Zelllinie herangezogen, die zuvor mittels Virustransduktion mit dem gesuchten Kandidatengen ausgestattet worden war. Das nun in den Kontrollzellen exprimierte Kandidatengen konnte durch die Antikörper erfolgreich detektiert werden.



**Abb. 20:** Westernblots der untersuchten Patientenzelllinien; Detektion der Proteine UBE2T, FAAP24, MUS81, EME1 und  $\beta$ -Actin zur Beladungskontrolle. Auffällig ist die deutlich abgeschwächte Proteinbande bei Patient 11. Die bei diesem Blot parallel durchgeführte Ladungskontrolle mit  $\beta$ -Actin zum Ausschluss einer ungleichmäßigen Beladung zeigt eine gleiche Menge Lysat für alle Laufaschen.

Das Kandidatengen UBE2T konnte in den Zelllysaten aller Patientenzelllinien durch entsprechende Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 20). Jedoch zeigte sich bei Patient 11 eine deutlich abgeschwächte Proteinbande. Um eine ungleiche Beladung der Geltaschen auszuschließen, wurde eine Ladungskontrolle mit  $\beta$ -Actin durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein eukaryotisches Strukturprotein, welches in allen untersuchten Lysaten in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden konnte. Die gleichmäßigen Banden für  $\beta$ -Actin zeigen, dass in allen Geltaschen vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden.

Mittels spezifischer Antikörper konnte ebenfalls FAAP24, ein weiteres Kandidatenprotein und essentieller Bestandteil des FA-Kernkomplexes, in den Patientenzellen erfolgreich nachgewiesen werden (98). In allen Patientenzelllinien zeigten sich einheitliche Anfärbungen in der Chemielumineszenz bei der erwarteten Proteingröße von 24kDa. Zuvor wurde auch hier der Antikörper an FAAP24-infizierten pg13-Zellen getestet (Abb. 18).

Mit einer Proteingröße von 68kDa handelte es sich bei EME1 und das größte der untersuchten Proteine. Bestätigt durch die Größenmarkierung mittels Laufmarker und durch

---

eine entsprechende Bande in infizierten pg13 Zellen konnte EME1 angefärbt werden. In allen untersuchten Patientenzellen zeigten sich vergleichbare Proteinmengen von EME1.

Die Patientenzellen wurden ebenfalls auf die Expression des Proteins MUS81 untersucht. Auch dieses Protein ließ sich im Westernblot in allen Patientenzellen mit einem spezifischen Antikörper nachweisen. Wie bei den anderen Kandidatengen wurde der Antikörper auch hier zuvor an infizierten pg13 Zellen auf seine Spezifität getestet (Abb. 18).

*Zusammenfassend* lässt sich sagen, dass im strukturellen Nachweis mittels Westernblot alle Reparaturproteine in den Patientenzellen detektiert werden konnten. Einzige Ausnahme stellt das Protein UBE2T mit einer verminderten Anfärbbarkeit im Lysat von Patient 11 dar. Für die weiteren, in dieser Arbeit untersuchten Proteine (MERIT40, FAAP100) waren zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine Antikörper verfügbar.

### **3.4 FACS-Analyse der transduzierten Patientenzellen**

#### **3.4.1 Retrovirale Komplementation**

Wie in Abschnitt 1.5.3.2 erläutert, ist es eine Eigenschaft von FA-Zellen, bei Kontakt mit DNA-quervernetzenden Substanzen aufgrund des geschädigten DNA-Reparatursystems einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase aufzuweisen. Diese Eigenschaft lässt sich zur Diagnostik und Einordnung der Patienten in verschiedene Komplementationsgruppen verwenden. In der Routinediagnostik der Fanconi-Anämie in Deutschland werden Patientenzellen von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Hanenberg mit Retroviren transduziert, welche die gängigen Fanconi-Anämie-Gene exprimieren. Lässt sich der Zellzyklusarrest einer Zelllinie dadurch aufheben, kann davon ausgegangen werden, dass das entsprechenden Virus das defekte oder fehlende Gen in die Zelle eingebracht hat. Die DNA-Reparatur ist in diesem Fall wieder funktionstüchtig, sodass bei den eingesetzten Dosen MMC kein G2/M-Arrest im FACS mehr nachweisbar ist. In dieser Arbeit wurden Patientenzellen untersucht, die zwar einen FA-typischen Zellzyklusarrest nach Inkubation mit MMC aufwiesen, aber keiner der bisher bekannten Komplementationsgruppen zugeordnet werden konnten. Ziel war es, durch eine Infektion der Patientenzellen mit Kandidatengen-tragenden

Viren ein Aufheben des Zellzyklusarrestes zu erreichen und somit einerseits bereits bekannte Reparaturgene als FA-Gene zu klassifizieren und andererseits die Patientenzellen einer dann neuen Komplementationsgruppe zuordnen zu können. Eine besondere Bedeutung kam hierbei der jeweiligen Kontrolle (S91EGIN), die *kein* Kandidatengen beinhaltet und deshalb auch keine Korrektur erwarten lies. Das in Tabelle dargestellte Analysesystem gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene und die verwendeten Kontrollen.

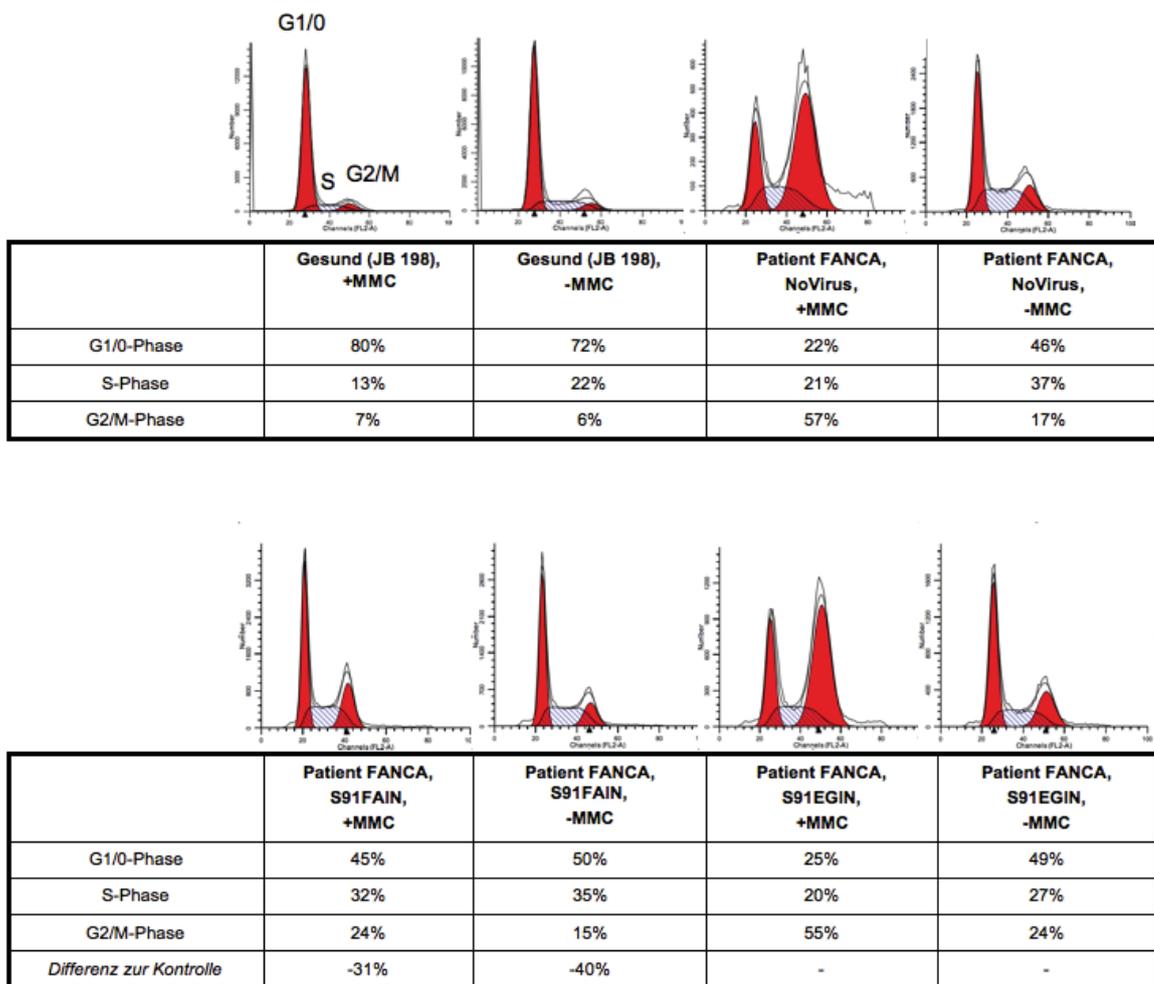
**Tab. 13:** Analysesystem der untersuchten Kandidatengene mit entsprechenden Kontrollen,  $\emptyset$  = kein Gen oder keine Selektion, Korrektur = Verlust des FA-typischen G2/M-Arrestes bei Korrektur der MMC-Hypersensitivität

Gene	Vektor	Selektion	Crosslinker	Analyse
$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	Zellzyklusverhalten ohne MMC
$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	MMC	Zellzyklusverhalten mit MMC
$\emptyset$	$\emptyset$	G418	$\emptyset$	Selektionskontrolle
<i>EGFP, neoR</i>	S91	G418	$\emptyset$	resistente, überlebende Zellen
<i>EGFP, neoR</i>	S91	G418	$\emptyset$	Zellzyklusverhalten ohne MMC
<i>EGFP, neoR</i>	S91	G418	MMC	MMC-Hypersensitivität
<i>MUS81, neoR</i>	S91	G418	MMC	Korrektur?
<i>EME1, neoR</i>	S91	G418	MMC	Korrektur?
<i>FAAP24, neoR</i>	S91	G418	MMC	Korrektur?
<i>MERIT40, neoR</i>	S91	G418	MMC	Korrektur?
<i>UBE2T, neoR</i>	S91	G418	MMC	Korrektur?
<i>FAAP100, neoR</i>	S91	G418	MMC	Korrektur?

### 3.4.2 FANCA und gesunde Probandenzellen

Im Vorfeld der Untersuchung an Patientenzellen wurde an einer gesunden Probandenzelllinie (JB198) die Wirkung von MMC untersucht. Mit den in dieser Arbeit eingesetzten MMC-Dosen konnte in den JB198-Zellen mit intakter DNA-Reparatur keine MMC-Hypersensitivität nachgewiesen werden und ein signifikanter Zellzyklusarrest blieb aus (Abb. 21). Im nächsten Schritt wurden *vier* bereits als FA-A diagnostizierte Patientenzellen mit dem entsprechenden Virus S91FAIN infiziert, um eine Korrektur exemplarisch darzustellen. Hier zeigte sich bei nicht-transduzierten Patientenzellen (NoVirus) und solchen Zellen, die ausschließlich mit S91EGIN infiziert wurden, ein deutlicher G2/M-Arrest nach MMC-Behandlung (Abb. 21). Dieser konnte durch die Infektion der Zellen mit dem kom-

plementierenden Virus (S91FAIN) aufgehoben werden. Mithilfe des Programms „Mod-Fit®“ wurde der DNA-Gehalt in den jeweiligen Zellzyklusphasen aus den FACS-Daten nach Anleitung ermittelt. Im *Mittel* konnte durch retrovirale Komplementation der getesteten Kontrollen eine *Korrektur von 27%* nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um die Differenz aus dem prozentualen DNA-Gehalt der G2/M-Phase zwischen S91FAIN-infizierter und nicht-infizierter oder S91EGIN-infizierter Zelllinie. Durch die Infektion mit S91EGIN war keine Korrektur zu erwarten, da dieses Plasmid ausschließlich für das grün fluoreszierende Protein (EGFP) und das Neomycin-Resistenzprotein kodiert. Es ergab sich bei vier Messungen eine Standardabweichung von 3,5%.



**Abb. 21:** Messdaten von Lymphozyten eines gesunden Probanden (JB198) und einer FA-Patientenzelllinie mit Mutation in *FANCA* (gerundete Ergebnisse)

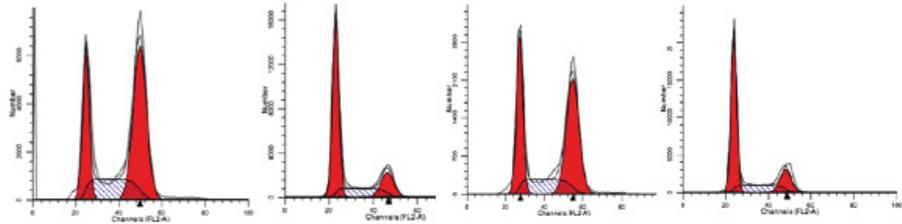
### 3.4.3 Zellen eines Patienten mit *einer* FANCD2-Bande im FACS

Exemplarisch werden im Folgenden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie eines Patienten mit *einer* Bande im FANCD2-Blot (Pat. 7) sowie eines Patienten mit *zwei* Banden (Pat. 8) dargestellt. Im Fall von Patient 7 wurde die klinische Vermutung durch die Diagnose Fanconi-Anämie bei einem Geschwisterkind weiter erhärtet. Der klinische Verdacht einer Fanconi-Anämie konnte durch das Ergebnis des FANCD2-Westernblot und die Durchflusszytometrie bestätigt werden: die Zelllinien des Geschwisterkindes und des Patienten wiesen eine erhöhte MMC-Sensitivität auf. In Abb. 22 zeigt sich deutlich, dass die in Kultur gehaltenen LCLs des Patienten ohne Transduktion und ohne Behandlung mit MMC ein typisches Bild mit 64% Zellen in der G1/0-Phase und nur 17% Zellen in G2/M-Phase aufweisen. Auch nach Transduktion mit dem Kontrollvektor S91EGIN zeigte sich keine Veränderung in der Zellzyklusanalyse, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Vektor *ohne* Kandidatengen das Zellzyklusverhalten *nicht* beeinflusst (Vektornegativkontrolle). Eine durchgeführte Kontrolle mit dem Kandidatengen-Vektor S91MERIT40IN *ohne* MMC-Behandlung zeigte, dass auch der Vektor *mit* Kandidatengen keinen verstärkten Zellzyklusarrest auslöst: der Anteil der G2/M-Phase beträgt ohne MMC-Behandlung 16%. Nach Behandlung mit Mitomycin C stellte sich sowohl bei der NoVirus-Kontrolle, als auch bei der S91EGIN-Kontrolle ein deutlicher Zellzyklusarrest mit einem Anteil der G2/M-Phase von 47% (NoVirus) bzw. 52% (S91EGIN) ein. Dementsprechend sind NoVirus-Proben und Ausgangsvektor-Proben (S91EGIN) in ihrem Zellzyklusverhalten vergleichbar und können in gleichem Maße als Ausgangswert dienen, von dem aus eine Verminderung des Zellzyklusarrestes im Sinne einer Korrektur bestimmt wird („Differenz zur Kontrolle“). Keines der im Folgenden getesteten Kandidatengene konnte den Zellzyklusarrest in diesen Zellen korrigieren. In allen infizierten Zelllinien bestand nach Behandlung mit Mitomycin C ein mit den Kontrollen vergleichbarer Zellzyklusarrest mit G2/M-Werten zwischen 51% und 54%. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass

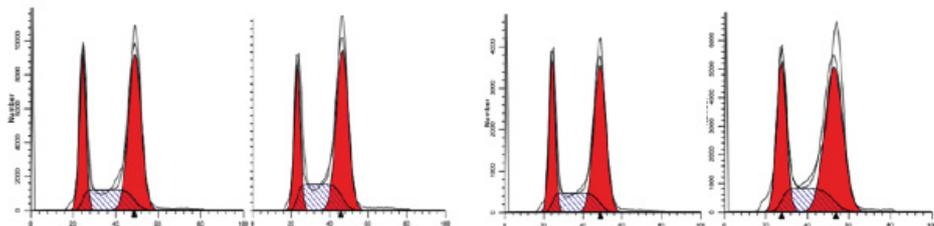
- die Zellen *ohne* MMC-Behandlung keinen signifikanten Zellzyklusarrest aufweisen
- der verwendete Vektor (S91EGIN) das Zellzyklusverhalten nicht beeinflusst
- NoVirus-Kontrolle und Ausgangsvektorkontrolle (S91EGIN) ähnliche Werte sowohl vor als auch nach MMC-Behandlung aufweisen (als Kontrollen gleichwertig)

- keines der verwendeten Kandidatengene in der Lage ist, den Zellzyklusarrest in Zellen von *diesem* Patienten funktionell zu korrigieren

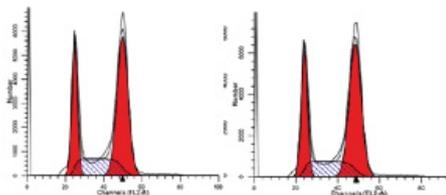
Pat. 7



	S91EGIN, +MMC	S91EGIN, - MMC	NoVirus, + MMC	NoVirus, - MMC
G1/0-Phase	26%	64%	34%	64%
S-Phase	22%	19%	19%	19%
G2/M-Phase	52%	17%	47%	17%



	S91FAAP24IN, + MMC	S91FAAP100IN, + MMC	S91EME1IN, +MMC	S91MUS81IN, +MMC
G1/0-Phase	27%	24%	28%	29%
S-Phase	22%	25%	21%	19%
G2/M-Phase	51%	51%	51%	52%
Differenz zur Kontrolle	0%	0%	-1%	0%



	S91UBE2TIN, +MMC	S91MERIT40IN, +MMC
G1/0-Phase	26%	27%
S-Phase	21%	20%
G2/M-Phase	52%	54%
Differenz zur Kontrolle	1%	2%

Abb. 22: Messdaten von Lymphozyten von Patient 7, eine FANCD2-Bande im Westernblot

#### 3.4.4 Zellen eines Patienten mit zwei FANCD2-Banden im FACS

Patient 8 konnte zum Zeitpunkt der Untersuchung keiner der gängigen Komplementationsgruppen zugeordnet werden. Im FANCD2-Westernblot konnten zwei Banden detektiert werden (vgl. Abb. 19), sodass von einer intakten Monoubiquitinierung ausgegangen werden kann und ein „upstream“ Gendefekt im FA-Core-Komplex unwahrscheinlich erscheint. In den weiterführenden Westernblots konnten die Proteinprodukte der Kandidatengene UBE2T, FAAP24, MUS81 und EME1 im Sinne eines strukturellen Nachweises detektiert werden. In der Durchflusszytometrie zeigte sich ein für Fanconi-Anämie typischer Zellzyklusarrest nach Behandlung der Zelllinien mit Mitomycin C (vgl. Abb. 23).

In der funktionellen Analyse konnte durch keines der getesteten Kandidatengene eine Verminderung des G2/M-Arrestes im Sinne einer Komplementation erzielt werden. Die gemessenen G2/M-Werte der Kontrollen betragen 48% (S91EGIN) bzw. 52% (NoVirus) nach der Behandlung mit MMC und lagen damit deutlich über den Werten der unbehandelten Proben, sodass von einem deutlichen Zellzyklusarrest gesprochen werden kann. Auch hier sind NoVirus-Probe und S91EGIN-Probe in ihrem Zellzyklusverhalten wie bei Pat. 7 vergleichbar und können in gleichem Maße als Ausgangswert zur Ermittlung einer möglichen Korrektur dienen. Die G2/M-Werte der mit den Kandidatengen transduzierten Patientenzellen lagen nach Behandlung mit Mitomycin C zwischen 47% und 52%, sodass keine signifikante Verbesserung im Sinne einer Komplementation nachgewiesen werden konnte. Der Defekt in dieser Patientenzelllinie liegt also vermutlich in einem weiteren, bisher nicht bekannten DNA-Reparaturgen. Ferner lässt sich erkennen, dass die G2/M-Werte alle verwendeten Transgene bei diesem Patienten auch im Vergleich miteinander keine wesentlichen Differenzen aufweisen. Interessant ist, dass die relativ gemessenen G2/M-Werte von Patient 8 im Vergleich deutlich unter denen von Patient 7 lagen. Dies unterstreicht, wie wichtig es ist, für jede Patientenzelllinie eigene Kontrollen (NoVirus und S91EGIN) zu verwenden, von deren gemessenem Wert als Ausgangswert eine mögliche Verbesserung im Sinne einer Komplementation festgestellt werden kann. Insgesamt ließen sich die bei Patient 7 zusammengefassten Ergebnisse durch die Messungen bei Patient 8 bestätigen.

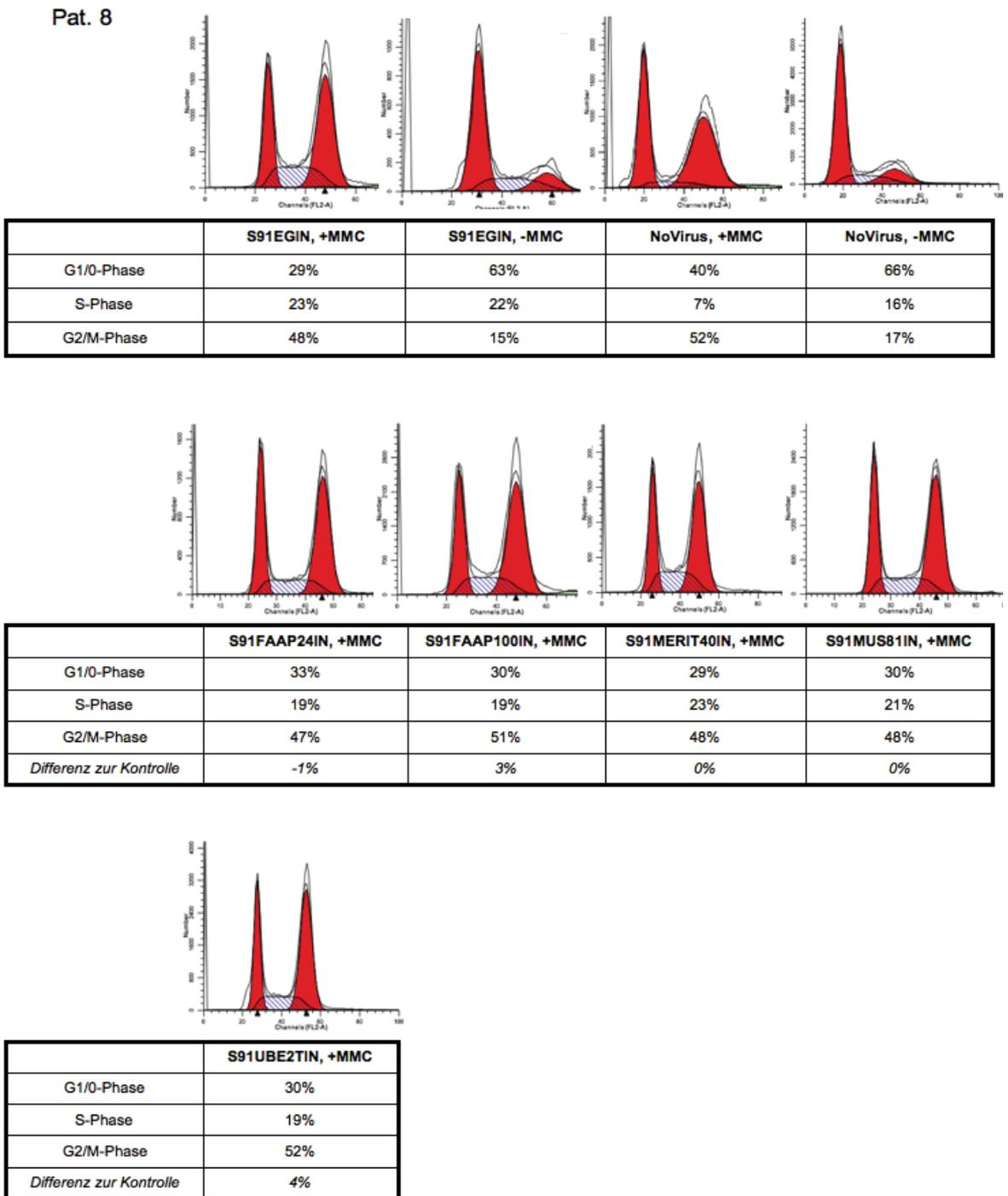


Abb. 23: Messdaten von Lymphozyten von Patient 8, zwei Banden im FANCD2-Westernblot

### 3.4.5 Ergebnisse der FACS-Analyse

Die Ergebnisse der FACS-Analysen sind in Tabelle 14 dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist hier jeweils nur die *prozentuale Abweichung* der G2/M-Werte der Konstrukte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Als Kontrolle wurde meist die jeweilige Zelllinie mit S91EGIN transduziert. So wurde erreicht, dass zwar alle Zellen gleichermaßen die Belastung einer Virustransduktion zu überstehen hatten, bei der Kontrollgruppe aber von keiner Korrektur des Reparaturdefektes ausgegangen werden konnte. Wie bereits erwähnt, zeigten sich zwischen den Messwerten der S91EGIN- und NoVirus-Kontrollen nur minimale Unterschiede, sodass sie als gleichwertig bezeichnet werden können (vgl. 3.4.3). Die Durchnummerierung der Patienten erfolgte anhand der Position der Banden im FANCD2-Westernblot (vgl. 3.2). Die Ergebnisse dieses FANCD2-Westernblots sind ebenfalls in der Tabelle aufgeführt.

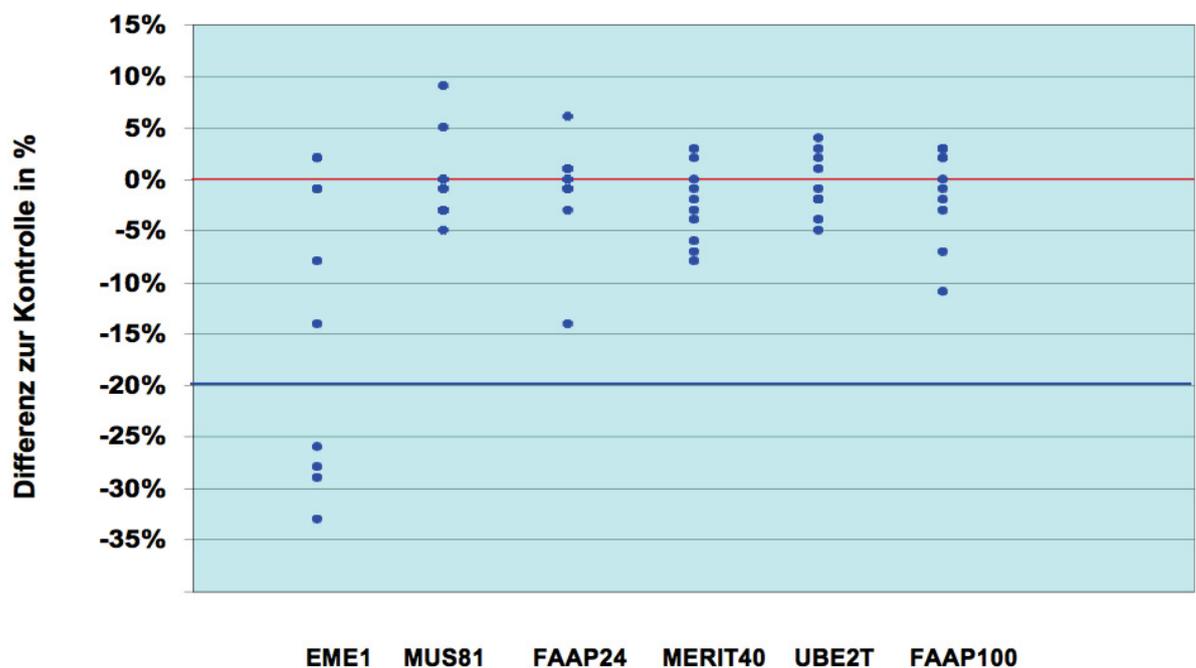
**Tab. 14: Übersicht über die prozentuale Abweichung der G2/M-Phase der untersuchten Kandidatengene** im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Als Kontrolle diente immer S91EGIN, lediglich bei Patient 9\* wurde die NoVirus-Kontrolle als Ausgangswert verwendet. In einigen Fällen wurden mehrere Messungen durchgeführt und die entsprechenden Mittelwerte aufgeführt (*kursiv*). Ebenfalls ist aufgeführt, welcher Gendefekt nach Abschluss dieser Arbeit bei einigen Patienten nachgewiesen werden konnte.

Blot Nr.	D2-Banden	EME1	MUS81	FAAP24	MERIT40	UBE2T	FAAP100	Gendefekt
3	2	+2%	-3%	+1%	-3%	+3%	+2%	unknown
4	2	<b>-26%</b>	-3%	-14%	-6%	-5%	-11%	FANCP
5	2	-14%	-1%	-3%	+3%	-4%	-3%	FANCP
7	1	-1%	0%	0%	+2%	+1%	0%	FANCI
8	2	<b>-33%</b>	0%	-1%	0%	+4%	+3%	FANCI
9*	2	+2%	-5%	0%	-2%	-2%	2%	unknown
10	1	<b>-29%</b>	+5%	+6%	-7%	+2%	+3%	unknown
11	2	-1%	-1%	-1%	-1%	-2%	-2%	unknown
14	1	<b>-28%</b>	+9%	-1%	-4%	-1%	-7%	FANCI
12	1	-8%	-3%	+1%	-8%	-2%	-1%	unknown

Zu beachten ist, dass die Differenzen einiger transduzierte Patientenzellen ein positives, andere ein negatives Vorzeichen aufweisen. Ein *positives* Vorzeichen bedeutet, dass die entsprechenden Patientenzellen einen stärkeren G2/M-Arrest als die Kontrolle aufwiesen. Dies ist möglicherweise auf die starke Überexpression des Kandidatengens nach der Transduktion zurückzuführen. Die Transduktion mit dem Kandidatengen war in diesen

Fällen für die Patientenzellen eher ein Nachteil. Eine *negative* Abweichung würde eine Korrektur im Sinne einer Komplementation anzeigen, wenn die Differenz deutlich negativ wäre. Als *Schnittpunkt* wurde hier  $\leq 20\%$  gewählt, da bei vorausgegangenen Testmessungen mit FA-A-Patienten im Mittel Differenzen zur Kontrolle von mehr als  $-27\% \pm 3,5\%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) erreicht werden konnten (vgl. 3.4.2). Zellen, die nicht mit MMC behandelt wurden, zeigten keinen G2/M-Arrest.

Bemerkenswert ist, dass vor allem das Kandidatengen *EME1* bei einem Teil der Fälle eine deutlich negative Differenz von  $\leq 20\%$  aufweist. Im Verlauf der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit konnten einige der bisher nicht klassifizierten Patientenzellen den bekannten Komplementationsgruppe FA-I, FA-J, und der neuen Gruppe FA-P zugeordnet werden. So sind die Zellen von Patient 10 die einzigen mit einer deutlichen Abweichung beim Kandidatengen *EME1*, die bis jetzt noch keiner anderen Komplementationsgruppe zugeordnet wurden. Im Westernblot zeigte sich im Sinne einer strukturellen Analyse, dass das Protein EME 1 zumindest exprimiert wird (vgl. Abb. 20).



**Abb. 24:** Prozentuale Abweichung der Kandidatengene im Vergleich zur Kontrolle (S91EGIN; nur Pat. 9: NoVirus) bei Verwendung von 33nM Mitomycin C. Eine *negative* Abweichung zeigt prinzipiell eine Korrektur im Sinne einer Komplementation an. Als *Schnittpunkt* wurde eine Abweichung von  $\leq 20\%$  gewählt. Details siehe Text.

---

In Abbildung 24 werden die Ergebnisse aus Tabelle 14 noch einmal graphisch dargestellt. Die x-Achse zeigt die jeweiligen Kandidatengene an, der y-Achse ist die prozentuale Abweichung der Kandidatengene von der Kontrolle zu entnehmen. Ein Punkt steht dementsprechend für die Testung des unten genannten Kandidatengens an einer Patientenzelllinie. Eine negative Abweichung von mehr als 20% würde für eine Korrektur sprechen. Vier Messergebnisse bei EME1 weisen eine größere Abweichung im Sinne einer Korrektur auf. Drei dieser Patienten konnten in jüngerer Zeit einer Komplementationsgruppe zugeordnet werden, sodass sich weitere Untersuchungen vor allem mit Patient 10 befassen sollten.

## **4 Diskussion**

### **4.1 DNA-Reparaturgene bei Fanconi-Anämie**

Die Fanconi-Anämie ist eine seltene, erbliche Erkrankung, die durch Mutationen in bislang 15 bekannten Genen verursacht werden kann. Einige Patienten mit Fanconi-Anämie zeigen zwar das typische klinische Bild mit den Trias aus angeborenen Fehlbildungen, Hämatopoeseversagen und erhöhtem Malignomrisiko, konnten aber bisher keiner der bekannten Komplementationsgruppen zugeordnet werden. Ziel dieser Arbeit war, mögliche „Kandidatengene“, deren Mitwirken bei der DNA-Reparatur gesichert ist, bei diesen Patienten zu testen und auf diese Weise ein neues „FA-Gen“ und eine neue Komplementationsgruppe zu identifizieren zu können. Es wurden in dieser Arbeit sechs Kandidatengene an zehn FA-Patienten untersucht. Dies geschah mit zwei grundlegend verschiedenen Methoden: Als strukturelle Analyse der durch die Kandidatengene kodierten Proteine wurde ein Nachweis mittels Westernblot durchgeführt; per Durchflusszytometrie erfolgte die funktionelle Analyse. Zusätzlich wurde ein Screening der Patientenzellen mittels FANCD2-Immunoblot durchgeführt. Die Kombination aller drei Untersuchungen hat sich in der Vergangenheit als zuverlässige Methode für die Subtypisierung bei der Diagnostik der Fanconi-Anämie etabliert (63).

---

## 4.2 Voraussetzungen

Es konnte gezeigt werden, dass die bei Patienten mit Fanconi-Anämie ohnehin schon erhöhte Rate an Chromosomenschäden durch Zugabe von DNA-quervernetzenden Reagentien (wie DEB oder MMC) noch weiter gesteigert wird (58, 59). Deshalb treten die Zellen mit starker DNA-Schädigung nicht in die Mitose ein, sondern arretieren in der G2-Phase des Zellzyklus. Dies lässt sich in der durchflusszytometrischen Analyse eindrucksvoll darstellen: Es befinden sich bei MMC-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen desselben Patienten wesentlich mehr Zellen in der G2/M-Phase (vgl. Abb. 8). Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Patientenzelllinien konnte dieser G2/M-Arrest deutlich nachgewiesen und somit die Diagnose Fanconi-Anämie experimentell bestätigt werden. Die gesunde Kontroll-Zelllinie (JB198) zeigte wie erwartet keine signifikante Beeinträchtigung durch MMC in den eingesetzten Dosen (vgl. Abb. 21).

## 4.3 Qualität der Viruskonstrukte in Verpackungszelllinien

Bei der Verwendung von Retroviren als Transfersystem zum Einbringen möglicher Kandidatengene in Lymphozyten handelt es sich um ein bereits etabliertes Verfahren (93), auf das zurückgegriffen werden konnte. Die erfolgreiche Transduktion konnte durch drei verschiedene Methoden überprüft werden: Über das Neomycin-Analogon G418 wurden die Produzentenzelllinien solange selektioniert, bis die untransduzierten Zellen abgestorben waren (*Selektionskontrolle*). Diese Selektion entsprach einem *funktionellem* Test, da nur bei Eintritt der retroviralen Partikel in die Zellen und Integration des retroviralen Genoms in das Wirtsgenom eine Neomycin-Resistenz zu erwarten war. Die anschließende Messung (vgl. Tab. 11) der Virustiter zeigte bei allen Viruskonstrukten ähnliche Ergebnisse; lediglich bei S91EME1IN konnte nur ein schwächerer Virustiter erreicht werden (vgl. 4.7.2). Eine mögliche Erklärung für den geringen Virustiter von *EME1* wäre eine erhöhte Toxizität dieses Reparaturgens bei Überexpression. *EME1* (essential meiotic endonuclease 1) ist eine Endonuklease und hat dementsprechend die Aufgabe, DNA durch Spaltung innerer Phosphodiesterbrücken zu schneiden (50, 99). Möglicherweise wird die Endonukleaseaktivität von *EME1* bei Überexpression für die verwendeten Zelllinien zu toxisch, sodass sie

---

vermehrt absterben. Auch für andere FA-Gene wie beispielsweise *FANCD2* ließ sich in der Vergangenheit eine erhöhte Toxizität bei starker mRNA-Instabilität mit vermehrter Zellsterblichkeit beobachten (100, 101). Möglicherweise ist im Falle von *EME1* ebenfalls mit einer erhöhten mRNA-Instabilität zu rechnen, sodass weniger Zellen überleben. Ein Zusammenhang zwischen mRNA-Länge und möglicher Instabilität derselben wurde bereits für *S. cerevisiae* beschrieben (102). Auch für ein weiteres, großes Kandidatengen (*FAAP100*) konnten ebenfalls nur relativ schwache Virustiter erreicht werden (Tab. 11).

Als zweite Methode zur Testung der Funktionalität der Viren wurde das Produkt des Neomycin-Resistenzgens im *Westernblot* nachgewiesen (vgl. Abb. 17). Transduzierte pg13-Zellen exprimieren dieses Protein natürlicherweise nicht, sodass es in den nicht-infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Eine deutliche Überexpression konnte in allen infizierten Zellen detektiert werden; lediglich im Falle von *EME1* schien weniger Proteinmenge vorhanden zu sein, wahrscheinlich, weil weniger provirale Integrationen pro pg13-Zelle vorlagen.

Zuletzt erfolgte der *direkte* Nachweis der durch die Kandidatengene kodierten Proteinprodukte in transduzierten pg13-Zellen. Da die Antikörper in der Maus gegen das menschliche Protein erzeugt wurden, ist davon auszugehen, dass die endogenen, murinen Proteine nicht angefärbt werden und somit nur spezifisch die durch die Vektoren eingebrachten Proteine erkannt werden. So konnten nach erfolgter Transduktion die entsprechenden Proteine in starker Überexpression im Vergleich zur NoVirus-Kontrolle im Westernblot an der erwarteten Stelle nachgewiesen werden (vgl. Abb. 18). Es zeigte sich, dass die Antikörper für *EME1* und *FAAP24* auch unspezifisch weitere Proteinbanden anfärbten. Durch den parallel laufenden Größenmarker konnte jedoch die richtige Zuordnung getroffen werden.

Insgesamt konnte durch die genannten Verfahren eine gute Funktionsfähigkeit der produzierten Virusüberstände gezeigt werden. In Zukunft sollen weitere funktionelle Tests durch die Verwendung von Knockoutzellen ergänzt werden. Diese waren zum Zeitpunkt der Untersuchung leider noch nicht verfügbar. Hier könnte das ausgeschaltete Kandidatengen experimentell durch das Virus in die Zelle eingebracht und somit komplementiert werden. Hier würden sich DT40 Zelllinien anbieten, die häufiger von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Testung menschlicher cDNAs Verwendung fanden (103, 104).

#### 4.4 Ergebnisse des FANCD2-Westernblots

In früheren Untersuchungen des FA-Signalweges wurde von einem rein linearen Ablauf ausgegangen, in dessen Mittelpunkt die Monoubiquitinierung von FANCD2 stand. Weitere Abläufe in der Signalkaskade erfolgten entweder „upstream“ oder „downstream“ dieser Monoubiquitinierung (105). Neuere Ergebnisse haben jedoch gezeigt, dass es auch Querverbindungen im FA-Reparaturweg gibt (106-108). Von dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FANCD2-Immunoblot kann die Diagnose „Fanconi-Anämie“ nur gestellt, wenn es sich um einen Defekt der Gene im FA-Kernkomplex handelt. Wenn allerdings ein Defekt in einem Reparaturgen „downstream“ von *FANCD2* vorliegt, kann dies im FANCD2-Blot nicht erkannt werden (65). Im Immunoblot von Zelllysaten dieser Patienten werden, wie bei einem gesunden Probanden, sowohl die kurze Form sowie die lange, monoubiquitinierte Form von FANCD2 nachgewiesen. Dementsprechend wird der FANCD2-Immunoblot in der Diagnostik der Fanconi-Anämie meistens für Fragen der Subtypisierung genutzt. Bei den hier untersuchten Patienten konnte in allen Fällen ein eindeutiges Ergebnis im FANCD2-Immunoblot erzielt werden (Abb. 19). Wie erwartet, zeigte sich bei der Kontrolle mit *FANCA*-mutierten Zellen, einem Gendefekt im FA-Kernkomplex, nur eine Bande. In den Zellen eines gesunden Probanden (JB198) ließen sich erwartungsgemäß beide Banden nachweisen. Im Zeitraum der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit konnten einige der getesteten Patientenzellen bezüglich ihrer Komplementationsgruppe klassifiziert werden. Die Patientenzelllinien 7 und 14 konnten der Komplementationsgruppe FANCI zugeordnet werden. Hierbei handelte es sich um bisher nicht beschriebene missense-Mutationen. Da FANCI im Komplex mit FANCD2 agiert (109) und beide sich gegenseitig für eine erfolgreiche Ubiquitinierung benötigen, ist bei einem Defekt von FANCI im D2-Westernblot nur eine FANCD2-Bande nachweisbar (110). Eine Übersicht über die Ergebnisse des FANCD2-Westernblots und die erfolgreiche Komplementationsanalyse gibt Tab. 15. Zelllinien mit Mutationen in *FANCI* (*BRIP1*), *FANCN* (*PALB2*), *FANCD1* (*BRCA2*) (89) und wie seit kurzer Zeit bekannt ist auch *FANCO/RAD51C* (4, 52) sowie *FANCP/SLX4* (6), weisen eine normale FANCD2-Monoubiquitinierung auf. Auch die jetzt als FA-P (Pat. 4+5) und FA-J (Pat. 8) klassifizierten Patientenzelllinien zeigten im Westernblot zwei Banden im Sinne einer physiologischen Monoubiquitinierungsreaktion von FANCD2 nach Zugaben von Crosslinkern.

**Tab. 15:** Ergebnisse von FANCD2-Westernblot und Komplementationsanalyse

Patient	D2-Banden	Defekt
4	2	FANCP
5	2	FANCP
7	1	FANCI
8	2	FANCI
14	1	FANCI

#### 4.5 Strukturelle Kandidatengenanalyse mittels Westernblot

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10 Patienten mittels Westernblot auf das Vorhandensein von vier Kandidatengen (*UBE2T*, *FAAP24*, *MUS81*, *EME1*) gescreent. Für die weiteren Kandidatengene (*FAAP100* und *MERIT40*) waren zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Antikörper verfügbar. Es sollte festgestellt werden, ob die betreffenden Proteine, die durch die Kandidatengen kodiert werden, in der Patientenzelle exprimiert werden. Es handelte sich also um einen *strukturellen* Nachweis, der die funktionellen Analysen per FACS nach Überexpression durch Vektoren ergänzen sollte. Die verwendeten, kommerziellen Antikörper wurden zuvor an pg13-Zelllinien getestet, die mit den entsprechenden Expressionskonstrukt infiziert worden waren (vgl. 4.3). Die verwendeten Antikörper für *MUS81* und *UBE2T* zeigten eine große Spezifität, während die Antikörper für *EME1* und *FAAP24* auch einige andere Proteine im Westernblot markierten. Durch die Verwendung eines parallel laufenden Größenmarkers konnten jedoch die richtige Zuordnung zum Kandidatenprotein getroffen werden. In fast allen Patientenzelllinien ließ sich das gesuchte Protein in normaler Größe und Konzentration im Gel nachweisen (Abb. 20). Lediglich bei *Patient 11* war die Proteinbande für *UBE2T* geschwächt. Eine ungleiche Beladung der Geltaschen konnte mittels  $\beta$ -Actin Anfärbung ausgeschlossen werden. Die Hypothese, dass hier eine geringere oder funktionsuntüchtigere Menge an *UBE2T* als bei anderen Patientenzellen vorliegt, konnte in der Durchflusszytometrie nicht bestätigt werden (siehe dort). Im FANCD2-Westernblot konnten für Patient 11 *zwei* Banden detektiert werden, was einen

---

Defekt von UBE2T, welches für die Ubiquitinierung benötigt wird, eher unwahrscheinlich macht (Abb. 19).

Obwohl es prinzipiell möglich ist, Patientenzellen mittels Antikörpern auf das Vorhandensein der FA-Proteine FANCA oder FANCC zu screenen (63), ist der Westernblot als alleiniges Screening oder Diagnostikum für die Fanconi-Anämie nicht geeignet, da sich hierdurch keine Aussage über die Funktionstüchtigkeit der jeweiligen Proteinprodukte treffen lässt. Als Beispiele hierfür seien die Identifikationen von *FANCI* (110) oder *FANCO* (4) genannt, bei denen im Westernblot adäquate Mengen des Proteins nachweisbar waren. In der Sequenzierung der entsprechenden Gene konnten jedoch Missense-Mutationen als Ursache für die Funktionsuntüchtigkeit der Reparaturproteine gefunden werden (4, 52, 110).

## 4.6 Bewertung der durchflusszytometrischen Analyse

### 4.6.1 Patientenzellen und Mosaikbildung

Bei der retroviralen Komplementationsgruppenbestimmung handelt es sich um ein etabliertes und an verschiedenen Stellen (Düsseldorf, Madrid, Cincinnati) angewandtes Verfahren (62-64, 93, 111). Durch künstlich hergestellte Retroviren können sowohl die bisher bekannten FA-Gene (bis auf *FANCD1*, welches hierfür zu groß ist) als auch vermutete Kandidatengene in die Zellen eines Patienten eingebracht werden. Durch Expression des richtigen Gens kann es zur funktionellen Komplementation kommen, d.h. die Überempfindlichkeit gegen DNA-quervernetzende Substanzen wird aufgehoben. Eine Komplementationsanalyse wird routinemäßig an einem der folgenden Zelltypen durchgeführt: Lymphozyten (T-Zellen), lymphoblastoiden B-Zellen (LCL) oder Fibroblasten (63, 64, 112). Für die Verwendung lymphoblastoider Zelllinien und der primären Fibroblasten spricht die Tatsache, dass sie nach der Analyse eingefroren und für spätere Versuche wieder aufgetaut werden können. LCLs können dank der Immortalisierung mittels Epstein-Barr-Virus kontinuierlich und ohne Stimulation wachsen. Im Gegensatz dazu müssen T-Zellen sofort verwendet werden und können anschließend nicht weiter genutzt werden. Nachteilig an lymphoblastoiden Zelllinien ist, dass der Vorgang der Immortalisierung durch EBV einige Wochen dauert, eine hohe Fehlerrate hat und bei etwa einem Viertel der Zellen eine teilweise MMC-Resistenz in Kultur infolge einer Revertierung auftritt (64).

---

weise MMC-Resistenz in Kultur infolge einer Revertierung auftritt (64). Dies kann zu diagnostischen Problemen führen, da nur ein Teil dieser Patienten tatsächlich eine somatische Mosaikbildung im hämatopoetischen System aufweist. Als „Mosaik“ wird das Vorliegen von genetisch unterschiedlichen Zellpopulationen in ein und demselben Patienten bezeichnet (113, 114), was ein natürliche Grund für eine MMC-Resistenz ist. Dementsprechend finden sich bei Mosaik-Patienten sowohl typische Fanconi-Anämie-Zellen als auch selbstkorrigierte, phänotypisch normale Zellen. Diese Selbstkorrektur zurück zum Wildtypallel bezeichnet man als Reversion. Revertierte Zellen zeichnen sich in vivo durch einen natürlichen Wachstumsvorteil gegenüber FA-Zellen aus. Es besteht die Hoffnung, diesen Wachstumsvorteil korrigierter Zellen auch im Rahmen einer retroviralen Gentherapie eines Tages therapeutisch nutzen zu können (115). Einerseits kann es durch das Vorliegen eines Mosaiks zu normalen Blutwerten kommen und dementsprechend zum Wegfall eines der Hauptsymptome der Erkrankung; andererseits kann gerade der normale Phänotyp bei geringer Empfindlichkeit gegenüber Crosslinkern zur verzögerten Diagnose der Fanconi-Anämie führen.

Gerade unter diesem Aspekt muss die Wichtigkeit der Typisierung der Patienten und auch ihrer Familie erwähnt werden. Dementsprechend sollten in Fragen zur diagnostischen Typisierung neben Lymphozyten und lymphoblastoiden B-Zellen (LCL) auch Fibroblasten verwendet werden, da hier bisher keine Mosaikbildung beschrieben werden konnte. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden ausschließlich lymphoblastoide Zelllinien verwendet. Eine Verminderung des Zellzyklusarrestes der verwendeten LCL im FACS hätte also entweder für eine Korrektur durch den retroviralen Gentransfer *oder* eine natürlich MMC-Resistenz im Sinne eines Mosaik-Patienten gesprochen und hätte im positiven Falle durch weitere Tests, zum Beispiel durch die Testung von Fibroblastenkulturen des Patienten, ultimativ aber durch die Sequenzierung des betroffenen Gens, ergänzt werden müssen.

Alle verwendeten Zelllinien dieser Arbeit gingen aus der vorangegangenen Routinediagnostik ohne Ergebnis hervor: Der Ablauf der Diagnostik bei Verdacht auf Fanconi-Anämie sieht einen mehrschrittigen Diagnostik-Algorithmus vor, an dessen Beginn die Metaphaseanalyse oder Zellzyklusanalyse von T-Zellen einer mit MMC behandelten, peripheren Blutprobe steht. Hierbei wird die klinische Verdachtsdiagnose „Fanconi-Anämie“

---

gegebenenfalls bestätigt. Anschließend erfolgt die retrovirale Infektion der T-Zellen mit Retroviren, welche die häufigsten Fanconi-Anämie-Gene (FA-ABCEFGL) tragen. Nach Inkubation mit MMC kann wenig später die durchflusszytometrische Analyse erfolgen, um eine mögliche Komplementation auszumachen. Im Rahmen dieser ca. dreiwöchigen Routinediagnostik können ca. 85% aller Patientenzellen durch in Retroviren exprimierte FA-cDNAs komplementiert werden, sodass es zu einer eindeutigen Diagnose kommt. Parallel dazu wird mit der zeitaufwändigen Etablierung einer lymphoblastoiden Zelllinie begonnen, die für weitere Untersuchungen, wie die hier durchgeführten, zur Verfügung steht. Zusätzlich können Westernblots für FANCD1/BRCA2 und FANCD2 durchgeführt werden (116). Die in dieser Arbeit untersuchten Patientenzelllinien haben alle diese Diagnostik durchlaufen und konnten bisher keiner Komplementationsgruppe zugeordnet werden, sodass die Identifizierung der defekten Gene zu Beginn dieser Dissertation noch ausstand.

## **4.7 Bewertung der getesteten Kandidatengene**

### **4.7.1 Kandidatengene**

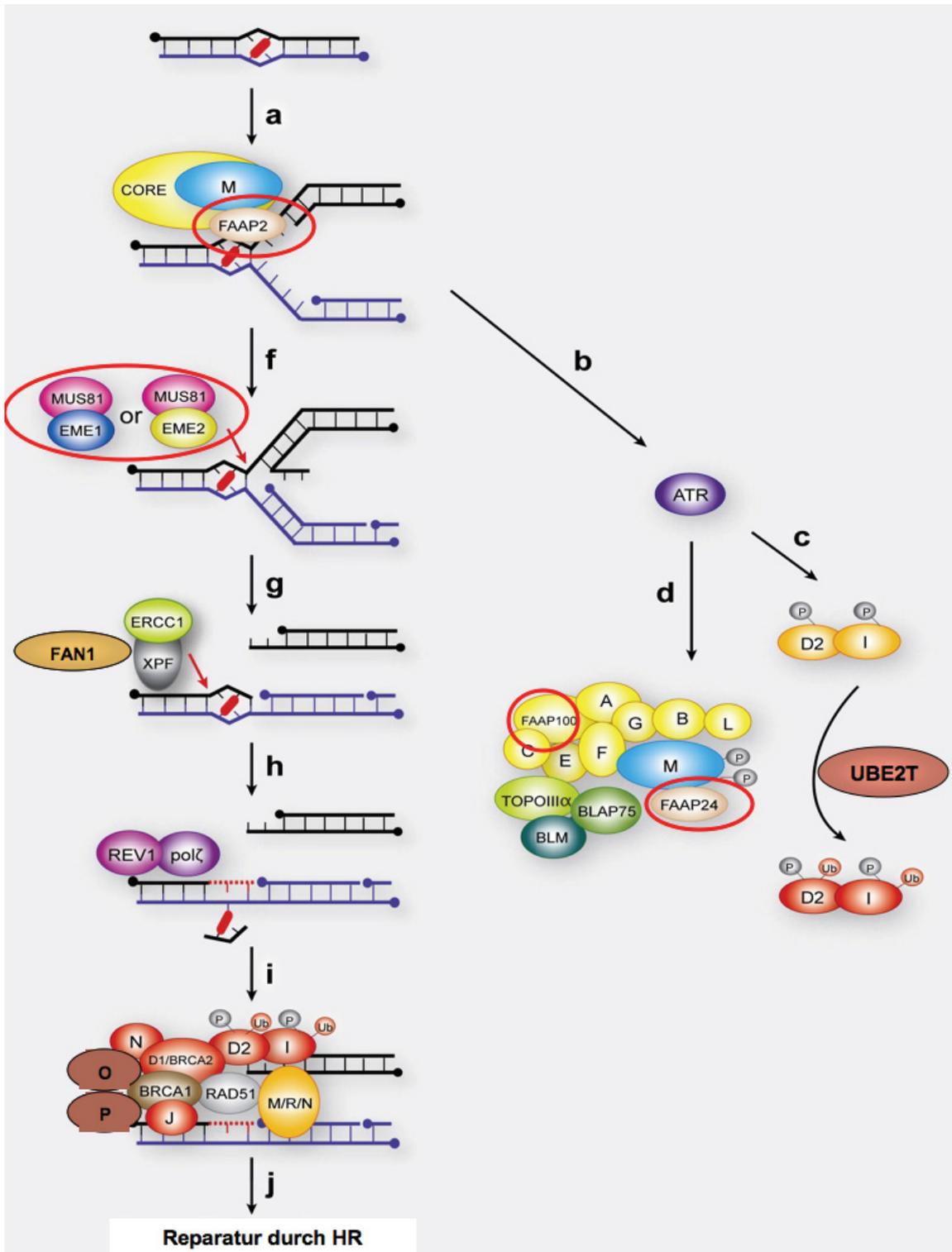
Als Kandidatengene wurden verschiedene Gene ausgewählt, für die in anderen Arbeiten ein Mitwirken bei der DNA-Reparatur oder im FA-Pathway gesichert werden konnte. Für einige dieser Kandidatengene waren Antikörper verfügbar, sodass mittels Westernblot auch ein struktureller Nachweis des Proteinproduktes erfolgen konnte. Diese und weitere Kandidatengene (MERIT40, FAAP100) konnten anschließend erstmals durch retrovirale Transduktion in Patientenzellen eingeführt werden. Bei allen Patientenzellen, sowie auch bei vier bekannten *FANCA*-defizienten Patientenzelllinien, konnte durch Inkubation mit der DNA-quervernetzenden Substanz MMC ein eindeutiger Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase nachgewiesen werden. Somit wurde noch einmal die Diagnose der Fanconi-Anämie bei diesen Patientenzellen bestätigt. Alle Viruskonstrukte konnten erfolgreich in die Patientenzellen eingebracht werden, wie sich durch Selektion und Westernblot nachweisen ließ. Trotz der guten Funktionstüchtigkeit der Viruskonstrukte konnte in der Durchflusszytometrie keines der getesteten Kandidatengene den Zellzyklusarrest signifikant und spezifisch vermindern, wie es bei einem neuen FA-Gen zu erwarten gewesen wäre. Das Kandidatengen EME1 stellt hier eine Ausnahme dar.

---

An dieser Stelle sei angemerkt, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur ein Bruchteil der noch nicht klassifizierten Patientenzellen untersucht werden konnte. Es lassen sich also nur Aussagen darüber machen, ob die konstruierten Viren funktionstüchtig waren und ob sie in diesen Patientenzellen in der Lage waren, den durch Mitomycin C getriggerten Zellzyklusarrest zu komplementieren. In Zukunft sollten die hier untersuchten Kandidatengene weiterhin an nicht-klassifizierten Patientenzellen getestet werden, um durch die Identifizierung eines neuen „FA-Gens“ das Verständnis zur Funktionsweise des FA-Pathways weiter zu vervollständigen und somit möglicherweise die Therapie und Lebensqualität von Patienten mit Fanconi-Anämie zu verbessern.

#### 4.7.2 EME1 und MUS81

Der Proteinkomplex aus MUS81 und EME1 hat die Funktion einer Endonuklease und gehört der XPF/MUS81 Proteinfamilie an (50). Proteine dieser Familie haben eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden, die durch UV-Licht oder quervernetzende Substanzen hervorgerufen wurden. In Vertebraten lassen sich vier Mitglieder dieser Familie identifizieren, die jeweils aus einem Heterodimer bestehen. XPF/ERCC1, MUS81/EME1 und MUS81/EME2 haben endonukleolytische Funktion wobei die katalytische Domäne immer zuerst genannt wird. Außerdem wird der Komplex aus FANCM/FAAP24, obwohl er keine Endonukleaseaktivität besitzt, aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ebenfalls dieser Familie zugeordnet (50). Die katalytischen Anteile besitzen alle einen charakteristischen Kern namens ERCC4 (excision repair cross complementation group 4), der die kleinste funktionelle Einheit in diesem System darstellt. Er wird sowohl zum Auffinden als auch zum Zerschneiden von DNA-Regionen benötigt (50). *Mus81*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten erhöhte Raten an Chromosomenbrüchen und Prädisposition für Malignome. Ferner konnte in *MUS81*-defizienten Zellen Beeinflussung der Zellzyklusprogression und Aktivierung von S-Phase sowie G2/M-Phase-Checkpoints beobachtet werden (99). Andere Untersuchungen zeigten, dass *MUS81/EME1*-defiziente Zellen verstärkte Anfälligkeit für Interstrand-Crosslinks (ICLs) aufwiesen (117).



**Abb. 25:** Involvierung der FA-Proteine bei der ICL-Reparatur, mod. nach (50), a) Erkennung der durch ICL blockierten Replikationsgabel mittels FANCM/FAAP24, b) Aktivierung der Checkpoint-Antwort durch ATR, c) Monoubiquitinierung und Phosphorylierung von FANCI/FANCD2, d) Aktivierung des FA-Kernkomplex, Bildung nukleärer Reparaturfoci, f-g) blockierte Replikationsgabel am ICL wird durch MUS81 im Komplex mit EME1 oder EME2 zerschnitten. Weitere Einschnitte durch ERCC1/XPF und FAN1 ermöglichen „unhooking“ des ICL, h) die ssDNA-Lücke kann vermutlich durch Polymerase REV1 und pol $\zeta$  repariert werden, i-j) anschließende DSB-Reparatur durch homologe Rekombination

Es wird angenommen, dass der MUS81/EME1-Komplex zur Auslösung eines Doppelstrangbruches im Rahmen der Reparatur von ICLs benötigt wird. Hier wird auch eine Beteiligung des neu entdeckten Proteins FAN1 vermutet. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine Nuklease, welche die Reparatur von ICLs zu unterstützen scheint (118, 119). Auch wenn der FA-Pathway vermutlich bei jeder Art von DNA-Schädigung aktiviert wird, ist seine Hauptaufgabe wahrscheinlich die Reparatur solcher ICLs. Gegenwärtig wird für die Teilnahme von FAAP24/FANCM und MUS81/EME1 das abgebildete Modell angenommen (Abb. 25).

Bereits in der Herstellung des Viruskonstruktes (S91EME1IN) zeigte sich mehrfach, dass das Kandidatengen EME1 eine Sonderstellung einnehmen würde. Im Westernblot konnte das entsprechende Resistenz-Protein nur vermindert angefärbt werden. Im Rahmen der Zellzyklusanalyse zeigten sich auch wieder verschiedene Besonderheiten, die nur bei EME1 beobachtet werden konnten:

Blot Nr.	D2-Banden	Differenz zur Kontrolle	Gene
4	2	-26%	FANCP/SLX4
5	2	-14%	FANCP/SLX4
8	2	-33%	FANCJ/BRIP1
10	1	-29%	<b>unbekannt</b>
14	1	-28%	FANCI
7	1	-1%	FANCI

**Tab. 16:** Besonderheiten bei der Kandidatengentestung von EME1

---

Auffällig war, dass EME1 bei fast der Hälfte der Patienten eine relative Korrektur im Sinne einer Abnahme des G2/M-Arrestes in der Durchflusszytometrie zeigte (Tab. 14). Als signifikant wurde in dieser Arbeit zuvor eine Verminderung der G2/M-Phase von  $\leq 20\%$  im Vergleich zur Kontrolle (ohne Kandidatengen) festgelegt. Es konnten jedoch einige der Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, während der Fertigstellung der Arbeit ihrer Komplementationsgruppe eindeutig zugeordnet werden (FA-I, FA-J, FA-P). Patienten 4 und 5 konnten eindeutig der Komplementationsgruppe FA-P zugeordnet werden und in der Sequenzierung des Patienten-Gens konnte eine Mutation in *FANCP/SLX4* detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für die relative Verbesserung des Zellzyklusarrestes durch EME1 könnte ein Zusammenwirken dieser beiden Proteine sein. Fekairi et al. konnten bereits eine Assoziation von FANCP/SLX4 und EME1 nachweisen (51, 120). Wie FANCP agiert auch FANCI *downstream* von FANCD2 (121). Möglicherweise können in Zukunft auch Interaktionen zwischen EME1 und FANCI nachgewiesen werden. Dies könnte die Verbesserung des Zellzyklusarrestes durch EME1 bei Patient 8 erklären, der als FA-J klassifiziert wurde. Während Patient 14 als FA-I eingeordnet werden konnte, sollten bei Patient 10 weitere Untersuchungen einen Defekt in *EME1* ausschließen. Dieser konnte bisher keiner Komplementationsgruppe zugeordnet werden und *EME1* ist das einzige Gen, durch dessen retrovirale Komplementation bisher eine Korrektur des Zellzyklusarrestes erzielt werden konnte. Demgegenüber steht das Ergebnis des FANCD2-Westernblots, der bei Patient 10 lediglich eine Bande anzeigte und somit eher für einen Gendefekt „upstream“ von FANCD2 spricht, während EME1 nach bisherigen Vorstellungen *downstream* agiert (50).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte eine zentrale Rolle von EME1 in den Prozessen „downstream“ von FANCD2 sein. EME1 könnte ein rate-limiting step im FA-Pathway sein, der normalerweise limitierend und negativ regulierend auf die DNA-Reparatur wirkt. Durch eine Überexpression von EME1, wie sie durch das künstliche Einführen des Kandidatengens in die Patientenzelle zustande kommt, wird möglicherweise diese Limitierung aufgehoben. Dies würde erklären, warum es gerade bei EME1 gehäuft zu Verminderungen des Zellzyklusarrestes und somit zu einem Vorteil für die Patientenzellen kam. Ausblickend sollte mittels Sequenzierung eine Analyse von EME1 in Patient 10 durchgeführt

---

werden. Die Möglichkeit einer erhöhten Zelltoxizität von EME1 wurde bereits in Abschnitt 4.3 diskutiert.

#### 4.7.3 UBE2T

Monoubiquitinierung ist eine physiologische Methode der Proteinaktivierung in Organismen und spielt eine wichtige Rolle in vielen Signaltransduktionswegen (122). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Ubiquitinierung auch im FA-Pathway eine Schlüssel-funktion hat und die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI die Hauptaufgabe des FA-Kernkomplexes ist (123, 124). Ubiquitinierungsreaktionen benötigen normalerweise eine bestimmte Abfolge von verschiedenen Enzymen. So wird auch in diesem Fall Ubiquitin zuerst durch das E1 „ubiquitin activating enzyme“ energieabhängig aktiviert, anschließend an das E2 „conjugating enzyme“ überführt und im letzten Schritt mittels der E3 Ligase von E2 auf das Zielprotein übertragen. Nach der Identifikation von FANCL als E3-Ligase (123) und bislang einziger bekannter Komponente des FA-Kernkomplexes mit „RING finger domain“, wurde FANCL zum Ausgangspunkt für die weitere Suche nach einem „E2 conjugating enzyme“ gewählt. Bei der Erstellung einer cDNA-library des gesamten humanen FANCL konnten zwei „E2 conjugating enzymes“ (UBE2T und UBE2W) identifiziert werden (125). Es konnte gezeigt werden, dass UBE2T im Fanconi-Anämie-Signalweg die Funktion des „E2 activating enzymes“ übernimmt (83). FANCL rekrutiert und stimuliert UBE2T über seine RING (really interesting new gene) finger domain und seine „RWD like domain“ (125). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass UBE2T verstärkte Aktivität in der S-Phase des Zellzyklus aufweist, was ebenfalls für eine Teilnahme am FA-Pathway spricht (83). UBE2T-Knockout-Zellen zeigten neben einer verminderten D2-Monoubiquitinierung die für FA-Zellen typische, erhöhte Empfindlichkeit gegen über Mitomycin C (126). Experimentell konnte gezeigt werden, dass UBE2T und FANCL Chicken-FANCD2 monoubiquitinieren und, dass bei Herunterregulation von UBE2T die D2-Ubiquitinierung abnimmt (125). UBE2T kann also zu den „upstream“ agierenden Proteinen gezählt werden. Obwohl sich UBE2T auch auto-monoubiquitiniert, scheint dies entgegen früherer Annahmen keinen regulatorischen Einfluss auf die FANCD2-Monoubiquitinierung zu haben (125). UBE2T konnte mittels Westernblot in allen Patien-

---

tenzelllysaten durch einen entsprechenden Antikörper detektiert werden (Abb. 20). Lediglich im Fall von Patient 11 zeigte sich eine stark abgeschwächte Proteinbande für UBE2T im Vergleich der Banden untereinander. In der durchflusszytometrischen Analyse konnte der Verdacht, dass hier eine geringere oder weniger funktionstüchtige Menge an UBE2T vorliegt, für diesen Patienten und alle anderen untersuchten Patienten nicht bestätigt werden: in keiner Patientenzelllinie konnte der Zellzyklusarrest durch retroviral vermittelte UBE2T-Überexpression korrigiert werden.

#### 4.7.4 FAAP24

FAAP24 (Fanconi anemia associated polypeptide of 24 kDa) ist ein Protein des Fanconi-Anämie-Kernkomplexes und interagiert mit der C-terminalen Region von FANCM (98). Es konnte gezeigt werden, dass FAAP24 für eine normale FANCD2-Monoubiquitinierung nach DNA-Schädigung benötigt wird und „upstream“ agiert. FAAP24-depletierte Zellen zeigten chromosomale Instabilität und eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber DNA-Crosslinkern (98). FAAP24 bildet mit FANCM ein Heterodimer, das DNA-Bindungsaktivität besitzt und ebenfalls zur XPF/MUS81 Proteinfamilie zählt (50). Um FAAP24 näher zu untersuchen, wurden Koimmunopräzipitationen durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Interaktion mit FANCM stattfindet. Diese Interaktion konnte bei C-terminal deletiertem FANCM nicht nachgewiesen werden (98). Es kann also davon ausgegangen werden, dass FAAP24 mit der C-terminalen Region von FANCM interagiert (98). Während normalerweise in dieser Familie mindestens ein Teil des Heterodimers eine aktive Nukleasedomäne besitzt, ist dies beim FANCM/FAAP24-Komplex nicht der Fall. Dem Heterodimer aus FANCM/FAAP24 wird eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung des FA-Kernkomplexes zur geschädigten DNA zugeschrieben. Neuere Arbeiten zeigen, dass der FA-Pathway durch angehaltene Replikationsgabeln aktiviert wird, wie sie bei DNA-Quervernetzungen entstehen. FAAP24 besitzt besonders für einzelsträngige DNA eine hohe Bindungsfähigkeit. Es wird vermutet, dass FANCM/FAAP24 als ein Sensor für DNA-Quervernetzungen agiert (98). Außerdem wird FANCM/FAAP24 eine Rolle bei der Aktivierung und Regulation von ATR/CHK1 zur Zellzykluskontrolle zugeschrieben. Es zeigte sich, dass FANCM/FAAP24-defiziente Zellen eine erhöhte Anfälligkeit für DNA-

---

Schäden und eine weniger effiziente Zellzykluskontrolle aufwiesen (127). Interessanterweise bleibt der FA-Kernkomplex in Abwesenheit von FANCM intakt, sodass davon ausgegangen wird, dass FANCM/FAAP24 als eine Art „Landeplatz“ für den Kernkomplex dient, anstatt aktiv in ihm zu agieren (105, 128). Die Identifikation von FAAP24 als Teil des FA-Kernkomplexes macht es zu einem Kandidatengen, das weiter untersucht wurde. Allerdings konnten weder in den Ergebnissen des Westernblots (Abb. 20), noch in der FACS-Analyse (Tab. 14) bei einer der untersuchten Patientenzelllinien Auffälligkeiten festgestellt werden.

#### 4.7.5 FAAP100

Ein weiteres, „upstream“ agierendes Kandidatengen ist *FAAP100*. Es kodiert ein Protein mit einer Größe von 100 kDa, das ein fester Bestandteil des FA-Kernkomplexes ist und erstmals aus dem Kernkomplex über Massenspektrometrie identifiziert wurde (123) und die nachfolgenden Untersuchungen suggerierten, dass FAAP100 Bestandteil des FA-Kernkomplexes ist: In der Koimmunopräzipitation von FAAP100 mit Antikörpern gegen die verschiedenen, bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Komponenten des FA-Kernkomplexes konnten vor allem Interaktionen mit FANCB und FANCL nachgewiesen werden (129). FAAP100 scheint zusammen mit FANCB und FANCL einen stabilen Subkomplex innerhalb des FA-Kernkomplexes zu bilden, der biochemisch isoliert werden kann (129). Die Formation dieses Subkomplexes schützt die anderen Bestandteile des FA-Kernkomplexes vor Proteolyse. FAAP100-defiziente Zellen zeigten die für FA-Zellen mit „upstream“ Gendefekt typischen Kriterien wie fehlerhafte D2-Monoubiquitinierung und erhöhte Anfälligkeit gegenüber DNA-Crosslinkern wie MMC (129). Patientenzellen mit Defekten in *FANCB* oder *FANCL* wiesen einen wesentlich geringeren Gehalt an FAAP100 auf, was darauf schließen lässt, dass FAAP100 seinerseits diese Proteine zur Stabilisierung benötigt (129). Darüber hinaus ist die Konzentration von FAAP100 im Zellkern abhängig von FANCA und FANCM, weshalb vermutet wird, dass der gesamte L-B-FAAP100-Subkomplex möglicherweise beim Import in den Zellkern durch FANCA oder FANCM reguliert wird (129). Die genaue Funktion von FAAP100 ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschungen. Bisher konnte bei keinem Fanconi-Anämie-Patienten biallelische Defekte

---

in *FAAP100* nachgewiesen werden. Keine der in dieser Arbeit untersuchten Patientenzelllinien wiesen einen retroviral komplementierbaren Defekt in *FAAP100* auf.

#### 4.7.6 MERIT40

MERIT40 (MEdiator of Rap80 Interactions and Targeting 40 kd) ist eine neu-identifizierte Komponente des BRCA1-RAP80 Komplexes. *BRCA1* (Breast cancer susceptible gene 1) ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Produkt verschiedene wichtige Aufgaben im Rahmen der DNA-Reparatur erfüllt. Bei Beschädigung oder Dysregulation dieses Gens kommt es zu familiärer Prädisposition für frühe Brust- oder Ovarialmalignome. MERIT40 wurde als ein RAP80-assoziiertes Protein identifiziert, welches von BRCA1 für die Lokalisation von Doppelstrangbrüchen benötigt wird. In Abwesenheit von MERIT40 konnte eine reduzierte BRCA1-Reparaturfokusbildung gezeigt werden (130). MERIT40 reguliert und erleichtert somit anscheinend die BRCA1-Akkumulation in Foci am Ort des DNA-Schadens.

Ferner tritt MERIT40 vermutlich in einem Komplex mit vier weiteren Proteinen (RAP80/CCDC98/BRCC36/BRE) auf, die gegenseitig stabilisierende und regulierende Funktionen haben (130). Hierbei wird CCDC98 als zentrale Komponente betrachtet. MERIT40 interagiert nur indirekt über BRE mit diesem zentralen Element. Ähnlich wie RAP80 und CCDC98 akkumuliert MERIT40 an DNA-Schäden. Mit bisherigen Theorien übereinstimmend zeigten MERIT40-depletierte Zellen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber ionisierender Strahlung und einen defekten G2/-Checkpoint mit vermindertem Zellüberleben (131). Außerdem wurden in diesen Zellen nur noch verminderte Mengen an RAP80 und ABRAXAS nachgewiesen. Zusammenfassend lässt sich MERIT40 also als RAP80-assoziiertes Protein beschreiben, das wesentliche Funktion in der BRCA1/RAP80-Interaktion und –Stabilität besitzt und für das Auffinden von Doppelstrangbrüchen benötigt wird. In dieser Hinsicht ist es auch für die Untersuchung als Kandidatengen bei der Fanconi-Anämie interessant. Die genaue Rolle von MERIT40 bei der DNA-Reparatur ist auch weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. In keiner der Patientenzelllinien aus dieser Arbeit konnte der Zellzyklusarrest durch retroviral vermittelte MERIT40-Überexpression korrigiert werden.

## 4.8 Ausblick

Defekte im FA-BRCA-Pathway verursachen genomische Instabilität und begünstigen das Entstehen verschiedener bösartiger Tumoren. Noch vor wenigen Jahren war nicht bekannt, dass eine seltene Erkrankung, die Fanconi-Anämie, so eng mit anderen Tumorentität, welche wesentlich größere Teile der Bevölkerung betreffen – beispielsweise Brust- oder Ovarialkrebs – molekular verwandt ist.

Ein besseres Verständnis des FA/BRCA-Pathways ist in vielerlei Hinsicht wichtig: Die genaue Bestimmung des Gendefektes hat für jeden Patienten mit Fanconi-Anämie aufgrund der Genotyp-Phänotyp-Korrelation eine entscheidende prognostische Bedeutung. So ist haben beispielsweise Patienten mit einem Gendefekt in *FANCD1/BRCA2* mit einem wesentlich schwereren klinischen Verlauf zu rechnen als Patienten anderer Komplementationsgruppen. Dies hat auch Auswirkungen auf die Art und Häufigkeit bestimmter Vorsorgeuntersuchungen und unterstreicht die Wichtigkeit der Patienten-Subtypisierung und Erforschung weiterer Kandidatengene. Nach wie vor können einige Patienten, auch aus dieser Arbeit, keiner Komplementationsgruppe zugeordnet werden.

Auf der anderen Seite können bei vielen Patienten mit sporadischen Tumoren ebenfalls Defekte im FA/BRCA-Pathway festgestellt werden (132, 133). Dies könnte in Zukunft therapeutische genutzt werden, da festgestellt wurde, dass beispielsweise sporadische Ovarialtumoren, die einen Defekt im FA/BRCA-Pathway aufweisen, wesentlich sensibler gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Mitomycin C sind (134). Denkbar wäre eine gezielte Ausschaltung des FA/BRCA-Pathways bei sporadischen Tumoren im Sinne einer adjuvanten Therapie als „Sensitivierung“ gegenüber DNA-quervernetzenden Chemotherapeutika. Erste Untersuchungen mit dem „small molecule“ Curcumin (135) oder mit Phenylbutyrat (136) scheinen erfolgversprechend. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch sogenannte PARP-Inhibitoren (Poly-ADP-Ribose), welche Tumorzellen mit einem Defekt im FA/BRCA-Pathway gezielt abtöten (137, 138).

Trotz intensiver Erforschung der Fanconi-Anämie bleiben weiter Fragen offen. Bisher konnte beispielsweise keine Erklärung dafür gefunden werden, warum ein Defekt der DNA-Reparatur die klassischen Trias aus Fehlbildungen, Versagen der Hämatopoese und erhöhtem Malignomrisiko sowie auch endokrinologische Probleme verursacht. Es ist im-

mer noch nicht klar, warum ein Defekt im FA/BRCA-Pathway eine Überempfindlichkeit gegenüber DNA-Crosslinkern auslöst und andere Arten der DNA-Schädigung die Zellen hingegen kaum beeinträchtigen.

Weitere Untersuchungen der Fanconi-Anämie und anderer seltener Tumorformen werden in Zukunft hoffentlich nicht nur Antworten auf diese Fragen liefern, sondern auch das Verständnis für den Vorgang der Krebsentstehung in der „Normalbevölkerung“ verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine autosomal- und x-chromosomal-rezessive Erkrankung, die durch die klinische Trias aus angeborenen Fehlbildungen an verschiedenen Organen, frühem progredientem Versagen der Hämatopoese und erhöhtem Malignomrisiko charakterisiert ist. Bei einer Inzidenz von 1:100.000 ist das Krankheitsbild genetisch und phänotypisch sehr heterogen, weshalb eine sichere klinische Diagnose oft erschwert ist. Die Fanconi-Anämie kann durch Mutationen in bislang 15 bekannten Genen verursacht werden (*FANCA*, *-B*, *-C*, *-D1/BRCA2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-I*, *-J/BRIP1*, *-L*, *-M*, *-N/PALB2*, *-O/RAD51C* und *-P/SLX4*), die mittlerweile den 15 Komplementationsgruppen (FA-A bis FA-P) zugeordnet werden konnten. Durch Testung sogenannter „Kandidatengene“, also bereits bekannter DNA-Reparaturgene, versucht man, weitere Gene zu identifizieren, die bei einem Ausfall das Krankheitsbild auslösen. In dieser Arbeit wurden sechs Kandidatengene (*FAAP24*, *FAAP100*, *EMEI*, *MUS81*, *MERIT40* und *UBE2T*), bei denen aus funktionellen Studien in experimentellen Systemen bekannt war, dass der Ausfall einen FA-typischen Phänotyp induziert, an nichtklassifizierten FA-Patientenzellen getestet. Es wurden ausschließlich immortalisierte lymphoblastoide B-Zelllinien (LCLs) verwendet, bei denen die Diagnose Fanconi-Anämie durch DNA-quervernetzende Reagenzien bereits bestätigt werden konnte. Einerseits konnte mittels Westernblot eine *strukturelle* Aussage über die Expression der kodierten Reparaturproteine getroffen werden. Andererseits erfolgte eine *funktionelle* Testung der Kandidatengene mittels retroviraler Komplementationsgruppenanalyse. Nach Klonierung der Kandidatengene in retrovirale Expressionsvektoren wurden die LCLs der nichtklassifizierten FA-Patienten mit diesen Replikations-inkompetenten Viren transduziert, dann der DNA-quervernetzenden Substanz Mitomycin C ausgesetzt und nach drei Tagen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Alle Patientenzellen konnten mittels FANCD2-Westernblot auf das Vorliegen eines Defektes „upstream“ oder „downstream“ der Ubiquitinierung von FANCD2, dem zentralen Regulationsschritt des FA-Pathways, eingeteilt werden. Des Weiteren konnten die durch die Kandidatengene kodierten Proteinprodukte in den Patientenzellen mittels Westernblot nachgewiesen werden. In den funktionellen Analysen konnte keine Patientenzelllinie durch transduzierte Gene komplementiert werden. Aufgrund dieser funktionellen Untersuchungen nach Überexpression in Zelllinien von FA Patienten konnte gezeigt werden, dass keines der Kandidatengene den DNA-Reparaturdefekt in den untersuchten Patientenzellen korrigiert und somit ein neues Fanconi-Anämie-Gen ist.

---

## 6 Literaturverzeichnis

1. Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H. Fanconi anemia. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The Genetic Bases of Human Cancer*, 2nd Edition. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2002. p. 289-306.
2. Fanconi G. Familiäre infantile perniziösaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution): *Jb Kinderheilkunde*; 1927 (117).
3. Fanconi G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (FA). I. Clinical aspects. *Semin Hematol.* 1967;4:233-40.
4. 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 May;42(2):406-9.
5. Kitao H, Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol.* 2011 Feb 18.
6. Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet.* Feb;43(2):142-6.
7. Stoepker C, Hain K, Schuster B, Hilhorst-Hofstee Y, Rooimans MA, Steltenpool J, et al. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nat Genet.* 2011 Jan 16.
8. Tischkowitz M, Dokal I. Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *Br J Haematol.* 2004 Jul;126(2):176-91.
9. Lobitz S, Velleuer E. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov;6(11):893-8.
10. Fanconi G. *Erinnerungen eines Kinderarztes*. Stäfa: Rothenhäusler Verlag; 1986.
11. Auerbach AD, Schroeder TM. First announcement of the Fanconi anemia International Registry. *Blood.* 1982 Oct;60(4):1054.
12. Schroeder TM, Anschultz F, Knopff A. Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik.* 1964;1:194-6.
13. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet.* 2001 Jun;2(6):446-57.
14. Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV, Gibson RA, Kuyt LP, Havenga C, 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 May 8;98(10):5734-9.

15. Baris HN, Kedar I, Halpern GJ, Shohat T, Magal N, Ludman MD, et al. Prevalence of breast and colorectal cancer in Ashkenazi Jewish carriers of Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Isr Med Assoc J.* 2007 Dec;9(12):847-50.
16. Yagasaki H, Oda T, Adachi D, Nakajima T, Nakahata T, Asano S, et al. Two common founder mutations of the fanconi anemia group G gene FANCG/XRCC9 in the Japanese population. *Hum Mutat.* 2003 May;21(5):555.
17. Rosendorff J, Bernstein R, Macdougall L, Jenkins T. Fanconi anemia: another disease of unusually high prevalence in the Afrikaans population of South Africa. *Am J Med Genet.* 1987 Aug;27(4):793-7.
18. Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, et al. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood.* 2005 Mar 1;105(5):1946-9.
19. Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res.* 2009 Jul 31;668(1-2):4-10.
20. 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 Jun;91(6):1116-20.
21. Tischkowitz MD. Fanconi Anemia. *Med Genet* 2003;40(1):1-10.
22. 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 Sep 1;84(5):1650-5.
23. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood.* 2003 Feb 15;101(4):1249-56.
24. Shimamura A. Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management, . Fanconi Anemia Research Fund. 2008;3rd Edition:p.53.
25. Offit K. BRCA mutation frequency and penetrance: new data, old debate. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Dec 6;98(23):1675-7.
26. Wagner JE, Tolar J, Levran O, Scholl T, Deffenbaugh A, Satagopan J, et al. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood.* 2004 Apr 15;103(8):3226-9.
27. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):162-4.

- 
28. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, et al. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer*. 2001 Dec 1;92(11):2875-84.
  29. Kutler DI, Wreesmann VB, Goberdhan A, Ben-Porat L, Satagopan J, Ngai I, et al. Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Nov 19;95(22):1718-21.
  30. Wajnrajch MP, Gertner JM, Huma Z, Popovic J, Lin K, Verlander PC, et al. Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*. 2001 Apr;107(4):744-54.
  31. Giri N, Batista DL, Alter BP, Stratakis CA. Endocrine Abnormalities in Patients with Fanconi Anemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2624-31.
  32. Liu JM, Auerbach AD, Young NS. Fanconi anemia presenting unexpectedly in an adult kindred with no dysmorphic features. *Am J Med*. 1991 Nov;91(5):555-7.
  33. Alter BP, Frissora CL, Halperin DS, Freedman MH, Chitkara U, Alvarez E, et al. Fanconi's anaemia and pregnancy. *Br J Haematol*. 1991 Mar;77(3):410-8.
  34. Saul RL, Ames BN. Background levels of DNA damage in the population. *Basic Life Sci*. 1986;38:529-35.
  35. Hartlerode AJ, Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J*. 2009 Oct 15;423(2):157-68.
  36. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*. 2001 Mar;2(3):196-206.
  37. Digweed M. aus Kulozik, Hentze, Hagemeyer, Bartram: *Molekulare Medizin*. 2000:S.129.
  38. 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 Mar;66(6):1039-56.
  39. Wu TC, Lichten M. Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science*. 1994 Jan 28;263(5146):515-8.
  40. Niedernhofer LJ, Lalai AS, Hoeijmakers JH. Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell*. 2005 Dec 29;123(7):1191-8.
  41. Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol*. 1998 Dec;8(12):483-9.

- 
42. Lin FL, Sperle K, Sternberg N. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol*. 1984 Jun;4(6):1020-34.
  43. Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999 Jun;63(2):349-404.
  44. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. 2002 May;23(5):687-96.
  45. Sekiguchi JM, Ferguson DO. DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):260-2.
  46. Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev*. 1999 Apr 15;13(8):916-34.
  47. Rupnik A, Lowndes NF, Grenon M. MRN and the race to the break. *Chromosoma*. Apr;119(2):115-35.
  48. Povirk LF, Zhou T, Zhou R, Cowan MJ, Yannone SM. Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease. *J Biol Chem*. 2007 Feb 9;282(6):3547-58.
  49. Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O, et al. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):287-99.
  50. Ciccica A, McDonald N, West SC. Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:259-87.
  51. Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, Taylor ER, Tissier A, Coulon S, et al. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell*. 2009 Jul 10;138(1):78-89.
  52. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*. May;42(5):410-4.
  53. Kaiser TN, Lojewski A, Dougherty C, Juergens L, Sahar E, Latt SA. Flow cytometric characterization of the response of Fanconi's anemia cells to mitomycin C treatment. *Cytometry*. 1982 Mar;2(5):291-7.
  54. Schindler D, Friedl R, Gavvovidis I, Kalb R, Neveling K, Linka Y, et al. Application of cell cycle testing in Fanconi anemia. In: Schindler D, Hoehn H, editors. *Fanconi*

- anemia A paradigmatic disease for the understanding of cancer and aging. Basel: Karger; 2007. p. 110-30.
55. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000 Nov 23;408(6811):433-9.
  56. Harrison JC, Haber JE. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet*. 2006;40:209-35.
  57. Lobrich M, Jeggo PA. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov;7(11):861-9.
  58. Schroeder TM. [Cytogenetic and cytologic findings in enzymopenic panmyelopathies and pancytopenias. Familial myelopathy of Fanconi, glutathione-reductase deficiency anemia and megaloblastic B12 deficiency anemia]. *Humangenetik*. 1966;2(3):287-316.
  59. Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, Laquerbe A, Moustacchi E, Papadopoulo D. Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Exp Cell Res*. 2000 Nov 1;260(2):208-15.
  60. Schroeder TM, F. Anschutz, and A. Knopp. [*Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy*]. *Humangenetik* 1. 1964:194-6.
  61. Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, Hentze S, et al. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood*. 1995 Apr 15;85(8):2233-7.
  62. Chandra S, Levran O, Jurickova I, Maas C, Kapur R, Schindler D, et al. A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. *Mol Ther*. 2005 Nov;12(5):976-84.
  63. Pulsipher M, Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Lee JS, Jakobs P, et al. Subtyping analysis of Fanconi anemia by immunoblotting and retroviral gene transfer. *Mol Med*. 1998 Jul;4(7):468-79.
  64. Hanenberg H, Batish SD, Pollok KE, Vieten L, Verlander PC, Leurs C, et al. Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol*. 2002 May;30(5):410-20.
  65. Shimamura A, Montes de Oca R, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4649-54.

- 
66. Bechtold A, Friedl R, Kalb R, Gottwald B, Neveling K, Gavvovidis I, et al. Prenatal exclusion/confirmation of Fanconi anemia via flow cytometry: a pilot study. *Fetal Diagn Ther.* 2006;21(1):118-24.
  67. Auerbach AD, Min Z, Ghosh R, Pergament E, Verlinsky Y, Nicolas H, et al. Clastogen-induced chromosomal breakage as a marker for first trimester prenatal diagnosis of Fanconi anemia. *Hum Genet.* 1986 May;73(1):86-8.
  68. Auerbach AD, Sagi M, Adler B. Fanconi anemia: prenatal diagnosis in 30 fetuses at risk. *Pediatrics.* 1985 Nov;76(5):794-800.
  69. Auerbach AD. Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet.* 2003 Jul;Chapter 8:Unit 8 7.
  70. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989 Oct 26;321(17):1174-8.
  71. Kook H. Fanconi anemia: current management. *Hematology.* 2005;10 Suppl 1:108-10.
  72. Velazquez I, Alter BP. Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. *Am J Hematol.* 2004 Nov;77(3):257-67.
  73. Sabapathy S VH. Rhabdomyosarcoma of thumb: A case report with review of literature. *Indian J of Plastic Surgery* 2007;40(2):189-93.
  74. van Zeeburg HJ, Snijders PJ, Pals G, Hermsen MA, Rooimans MA, Bagby G, et al. Generation and molecular characterization of head and neck squamous cell lines of fanconi anemia patients. *Cancer Res.* 2005 Feb 15;65(4):1271-6.
  75. Rosenberg PS, Socie G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):67-73.
  76. Alter BP. Radiosensitivity in Fanconi's anemia patients. *Radiother Oncol.* 2002 Mar;62(3):345-7.
  77. Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, et al. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Jan;129(1):106-12.
  78. Guardiola P, Socie G, Pasquini R, Dokal I, Ortega JJ, van Weel-Sipman M, et al. Allogeneic stem cell transplantation for Fanconi Anaemia. *Severe Aplastic Anaemia*

- 
- Working Party of the EBMT and EUFAR. European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Apr;21 Suppl 2:S24-7.
79. Guardiola P, Pasquini R, Dokal I, Ortega JJ, van Weel-Sipman M, Marsh JC, et al. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):422-9.
80. Wagner JE, Eapen M, MacMillan ML, Harris RE, Pasquini R, Boulad F, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):2256-62.
81. Liu JM, Kim S, Read EJ, Futaki M, Dokal I, Carter CS, et al. Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther*. 1999 Sep 20;10(14):2337-46.
82. Galimi F, Noll M, Kanazawa Y, Lax T, Chen C, Grompe M, et al. Gene therapy of Fanconi anemia: preclinical efficacy using lentiviral vectors. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):2732-6.
83. Machida YJ, Machida Y, Chen Y, Gurtan AM, Kupfer GM, D'Andrea AD, et al. UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Mol Cell*. 2006 Aug;23(4):589-96.
84. Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, Sonoda E, Schild D, et al. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol*. 2001 Apr;21(8):2858-66.
85. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell*. 2006 Jun 23;22(6):719-29.
86. Zhang F, Fan Q, Ren K, Andreassen PR. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res*. 2009 Jul;7(7):1110-8.
87. Wang W. A major switch for the Fanconi anemia DNA damage-response pathway. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Nov;15(11):1128-30.
88. de Winter JP, Joenje H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat Res*. 2009 Jul 31;668(1-2):11-9.
89. D'Andrea AD. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *N Engl J Med*. 2010 May 20;362(20):1909-19.

- 
90. Thompson LH, Hinz JM. Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights. *Mutat Res.* 2009 Jul 31;668(1-2):54-72.
  91. 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 Feb;30(4):1088-96.
  92. Swift S, Lorens J, Achacoso P, Nolan GP. Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol.* 2001 May;Chapter 10:Unit 10 7C.
  93. Bunnell BA, Muul LM, Donahue RE, Blaese RM, Morgan RA. High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 15;92(17):7739-43.
  94. Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer.* 1974 Apr;33(4):1027-33.
  95. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
  96. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8392-6.
  97. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med.* 1996 Aug;2(8):876-82.
  98. Ciccia A, Ling C, Coulthard R, Yan Z, Xue Y, Meetei AR, et al. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol Cell.* 2007 Feb 9;25(3):331-43.
  99. Hiyama T, Katsura M, Yoshihara T, Ishida M, Kinomura A, Tonda T, et al. Haploinsufficiency of the Mus81-Eme1 endonuclease activates the intra-S-phase and G2/M checkpoints and promotes rereplication in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(3):880-92.
  100. Hejna J, Holtorf M, Hines J, Mathewson L, Hemphill A, Al-Dhalimy M, et al. Tip60 is required for DNA interstrand cross-link repair in the Fanconi anemia pathway. *J Biol Chem.* 2008 Apr 11;283(15):9844-51.
  101. Hejna J, Bruun D, Pauw D, Moses RE. A FANCD2 domain activates Tip60-dependent apoptosis. *Cell Biol Int.* Sep 1;34(9):893-9.

- 
102. Santiago TC, Purvis IJ, Bettany AJ, Brown AJ. The relationship between mRNA stability and length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 1986 Nov 11;14(21):8347-60.
  103. Takata M, Ishiai M, Kitao H. The Fanconi anemia pathway: insights from somatic cell genetics using DT40 cell line. *Mutat Res.* 2009 Jul 31;668(1-2):92-102.
  104. Takata M, Yamamoto K, Matsushita N, Kitao H, Hirano S, Ishiai M. The Fanconi anemia pathway promotes homologous recombination repair in DT40 cell line. *Subcell Biochem.* 2006;40:295-311.
  105. Moldovan GL, D'Andrea AD. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet.* 2009;43:223-49.
  106. Kachnic LA, Li L, Fournier L, Willers H. Fanconi anemia pathway heterogeneity revealed by cisplatin and oxaliplatin treatments. *Cancer Lett.* Jun 1;292(1):73-9.
  107. Howlett NG, Harney JA, Rego MA, Kolling FWt, Glover TW. Functional interaction between the Fanconi Anemia D2 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) via a conserved putative PCNA interaction motif. *J Biol Chem.* 2009 Oct 16;284(42):28935-42.
  108. Wilson JB, Yamamoto K, Marriott AS, Hussain S, Sung P, Hoatlin ME, et al. FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3. *Oncogene.* 2008 Jun 12;27(3641-52).
  109. Grompe M, van de Vrugt H. The Fanconi family adds a fraternal twin. *Dev Cell.* 2007 May;12(5):661-2.
  110. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell.* 2007 Apr 20;129(2):289-301.
  111. Antonio Casado J, Callen E, Jacome A, Rio P, Castella M, Lobitz S, et al. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J Med Genet.* 2007 Apr;44(4):241-9.
  112. Fu KL, Foe JR, Joenje H, Rao KW, Liu JM, Walsh CE. Functional correction of Fanconi anemia group A hematopoietic cells by retroviral gene transfer. *Blood.* 1997 Nov 1;90(9):3296-303.
  113. Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJ, van Weel M, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet.* 1997 May-Jun;5(3):137-48.

- 
114. Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, et al. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1329-36.
  115. Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, et al. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res*. 2002;98(2-3):126-35.
  116. Hanenberg H, Schindler D. Komplementationsgruppenbestimmung bei Fanconi-Anämie mit Hilfe retroviraler Vektoren. *FA Handbuch*. 2005:159-72.
  117. Pamidi A, Cardoso R, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Poonepalli A, Tamblyn L, et al. Functional interplay of p53 and Mus81 in DNA damage responses and cancer. *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8527-35.
  118. MacKay C, Declais AC, Lundin C, Agostinho A, Deans AJ, MacArtney TJ, et al. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell*. Jul 9;142(1):65-76.
  119. Smogorzewska A, Desetty R, Saito TT, Schlabach M, Lach FP, Sowa ME, et al. A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol Cell*. Jul 9;39(1):36-47.
  120. Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, O'Connell BC, Gygi SP, Elledge SJ, et al. Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell*. 2009 Jul 10;138(1):63-77.
  121. Ali AM, Singh TR, Meetei AR. FANCM-FAAP24 and FANCI: FA proteins that metabolize DNA. *Mutat Res*. 2009 Jul 31;668(1-2):20-6.
  122. Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet*. 1992;26:179-207.
  123. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*. 2003 Oct;35(2):165-70.
  124. Jacquemont C, Taniguchi T. The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochem*. 2007;8 Suppl 1:S10.
  125. Alpi AF, Pace PE, Babu MM, Patel KJ. Mechanistic insight into site-restricted monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. *Mol Cell*. 2008 Dec 26;32(6):767-77.
  126. Zhang Y, Zhou X, Huang P. Fanconi anemia and ubiquitination. *J Genet Genomics*. 2007 Jul;34(7):573-80.

- 
127. Collis SJ, Ciccia A, Deans AJ, Horejsi Z, Martin JS, Maslen SL, et al. FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. *Mol Cell*. 2008 Nov 7;32(3):313-24.
  128. Deans AJ, West SC. FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Mol Cell*. 2009 Dec 25;36(6):943-53.
  129. Ling C, Ishiai M, Ali AM, Medhurst AL, Neveling K, Kalb R, et al. FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J*. 2007 Apr 18;26(8):2104-14.
  130. Feng L, Huang J, Chen J. MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair. *Genes Dev*. 2009 Mar 15;23(6):719-28.
  131. Shao G, Patterson-Fortin J, Messick TE, Feng D, Shanbhag N, Wang Y, et al. MERIT40 controls BRCA1-Rap80 complex integrity and recruitment to DNA double-strand breaks. *Genes Dev*. 2009 Mar 15;23(6):740-54.
  132. Tischkowitz MD, Morgan NV, Grimwade D, Eddy C, Ball S, Vorechovsky I, et al. Deletion and reduced expression of the Fanconi anemia FANCA gene in sporadic acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004 Mar;18(3):420-5.
  133. van der Heijden MS, Brody JR, Gallmeier E, Cunningham SC, Dezentje DA, Shen D, et al. Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. *Am J Pathol*. 2004 Aug;165(2):651-7.
  134. Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, et al. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med*. 2003 May;9(5):568-74.
  135. Chirnomas D, Taniguchi T, de la Vega M, Vaidya AP, Vasserman M, Hartman AR, et al. Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cancer Ther*. 2006 Apr;5(4):952-61.
  136. Burkitt K, Ljungman M. Phenylbutyrate interferes with the Fanconi anemia and BRCA pathway and sensitizes head and neck cancer cells to cisplatin. *Mol Cancer*. 2008;7:24.
  137. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res*. 2006 Aug 15;66(16):8109-15.
  138. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):913-7.

## 7 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die fortwährende Unterstützung, auch interkontinental und über verschiedene Zeitzonen hinweg möchte ich zuerst meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Helmut Hanenberg, ganz herzlich danken. Die Zusammenarbeit mit ihm und seiner gesamten Arbeitsgruppe hat mir zu jedem Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit viel Freude gemacht und mir den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten erleichtert.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Germing danke ich sehr für die Bereitschaft, die Erstellung des Zweitgutachtens zu übernehmen.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. Marcel Freund für seine freundliche, ruhige und geduldige Betreuung meiner molekularbiologischen Arbeiten und die ausführliche Beantwortung von Fragen aller Art.

Ein ebenso großer Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Constanze Wiek, vor allem für ihre Unterstützung und viele Erklärungen bei Fragen in der Welt der Zellkultur. Sie war zu jeder Zeit ein felsenfester Ansprechpartner für mich und meine Fragen.

Frau Waltraud Kuss möchte ich ebenfalls für ihre Unterstützung im Bereich der Zellkultur danken. Sie hatte immer ein offenes Ohr und hat mich in jedem Bereich dieser Arbeit motiviert.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern des KMT-Labors in der Kinderonkologie Düsseldorf wie auch des HNO-Labors für die gute Arbeitsatmosphäre, die Kollegialität und den freundlichen Gedankenaustausch danken.

Meiner Freundin Clara Maria Jansen möchte ich für ihre liebevolle Unterstützung und die wohlthuende Anwesenheit in meinem Leben danken.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Sie waren immer für mich da, haben mir zu jeder Zeit den Rücken freigehalten, mich motiviert und mir das Durchhaltevermögen gegeben, das ich in vielen Phasen des Studiums und der Doktorarbeit benötigt habe. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

## **8 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.

12.11.2014

Marcel Fabian Glaas