

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin (Kinderklinik)
Universitätsklinikum Düsseldorf
Heinrich-Heine-Universität
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Göbel

Funktionelle Testung von Kandidatengenen an primären Fibroblasten von Patienten mit Fanconi-Anämie

Dissertation

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

vorgelegt von
Eunike Velleuer
2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez: Prof. Dr. Nürnberg
Referent: Prof. Dr. H. Hanenberg
Korreferent: Prof. Dr. R. Haas

***Ich danke dir dafür, dass ich erstaunlich
und wunderbar gemacht bin;
wunderbar sind deine Werke
und meine Seele erkennt es wohl!***

Die Bibel, Psalm 139,14

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Helmut Hanenberg, der mir nicht nur ein sehr interessantes Thema zur Bearbeitung gab, sondern mich auch mit Rat und Tat zu jeder Zeit unterstützte. Die Zusammenarbeit war durch das wissenschaftliche Arbeiten, das gemeinsame Betreuen von Patienten und durch viele Diskussionen über Musik sehr facettenreich.

Herrn Prof. Dr. Rainer Haas danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Carsten Carlberg möchte ich als sehr enthusiastischen Lehrer stellvertretend für alle die Menschen danken, die mir die Freude an der Forschung und Wissenschaft tief ins Herz gegeben haben. Er weckte zu Beginn des Studiums mein Interesse an der Molekularbiologie. Ohne diese Grundsteinlegung wäre die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. Detlev Schindler und Herrn Dipl. Biol. Reinhard Kalb aus Würzburg sowie Frau Dr. Paula Rio aus Madrid danke ich für die intensive und gute Zusammenarbeit und den Austausch von Resultaten, Ideen und Konzepten.

Frau Dr. Cordula Homberg, Frau Hildegard Schneider und Frau Silke Furlan begleiteten meine ersten unsicheren Schritte im Labor und führten mich gekonnt in die Geheimnisse eines molekularbiologischen Labors ein. Vielen Dank dafür!

Ebenso möchte ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft Hanenberg und des KMT-Labors für die gute Atmosphäre, den regen Austausch und den gemeinsamen Spaß am Forschen danken.

Familie Dietrich danke ich ganz herzlich für die ständige Unterstützung vom Beginn meiner Dissertation an und darüber hinaus.

Ein großer Dank geht in die Niederlande an Herrn Prof. Dr. Rob Pieters, Herrn Dr. Michel Zwaan, Frau Dr. Marry van den Heuvel-Eibrink, Frau Dr. Friederike Hakvoort-Cammel und ganz besonders an Frau Dr. Andrica de Vries für die wundervolle Begleitung bei meinen ersten praktischen Schritten in der Patientenversorgung.

Allen Freunden aus „Rotterdam-Zuid“, insbesondere Familie Hellendoorn, möchte ich für die liebevolle Aufnahme und die herzliche Gemeinschaft danken.

Der „Studienstiftung des Deutschen Volkes“ danke ich für die finanzielle und intellektuelle Förderung während meines Studiums und dieser Dissertation.

Allen denjenigen, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben, Orthographie, Rechtschreibung und Tipfähler geglättet haben, möchte ich herzlich danken.

Ganz besonders danke ich jedoch vor allem allen Fanconi-Anämie-Patienten, deren Angehörigen und Freunden, Unterstützern und Selbsthilfegruppen.

Der größte Dank jedoch gilt meinen Eltern und Geschwistern. SDG!

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1. Fanconi-Anämie

1.1. Historisches.....	1
1.2. Epidemiologie.....	3
1.3. Symptome/Krankheitsbild.....	4
1.3.1. Kongenitale Fehlbildungen	5
1.3.2. Hämatologie	5
1.3.2.1. Knochenmarkversagen – Defekt der Hämatopoese.....	5
1.3.2.2. Hämatologische Tumoren	6
1.3.3. Solide Tumoren	7
1.3.4. Genotyp-Phänotyp-Korrelation	9
1.4. Molekularpathologie	9
1.4.1. Chromosomale Auffälligkeiten und DNA-Doppelstrangbrüche	9
1.4.2. Andere zelluläre Auffälligkeiten bei FA-Patienten.....	10
1.4.3. Zellzyklus.....	11
1.4.3.1. Allgemeines zum Zellzyklus	11
1.4.3.2. G2/M-Arrest	12
1.4.4. Komplementationsgruppen.....	13
1.4.4.1. Zellfusion.....	13
1.4.4.2. Retrovirale Komplementation	15
1.4.5. Funktionen der FA-Proteine	16
1.4.5.1. Der FA-Kernkomplex.....	16
1.4.5.2. FANCD2-Monoubiquitinierung	17
1.5. Diagnose	18
1.5.1. Klinischer Verdacht/ Zellkulturtechnik.....	18
1.5.2. FANCD2-Westernblot.....	18
1.5.3. PND und PID	19
1.6. Therapie.....	19
1.6.1. Androgene, Zytokine	19
1.6.2. Transplantationen: KMT, SCT, Nabelschnurblut	20
1.6.3. Gentherapie.....	20
1.6.4. Supportive Chirurgie.....	20
1.7. Einleitung - Kandidatengene	
1.7.1. FA und DNA-Reparatur	21
1.7.2. Nicht homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ)	21
1.7.2.1. Schritte der NHEJ.....	22
1.7.2.2. Bedeutung der NHEJ	23
1.7.3. Homologe Rekombination (HR).....	23
1.7.3.1. Bindung und Prozessierung der Enden.....	23
1.7.3.2. Homologe Paarung und Strangaustausch	23
1.7.3.3. Auflösung der Holiday-Verbindung	24
1.7.3.4. Regulation der HR.....	24
1.8. Aufgabenstellung	26

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien.....	27
2.1.1.1. Plasmid-DNA Isolierung	27
2.1.2. Plasmide.....	28
2.1.2.1. Kandidatengene.....	28
2.1.2.2. Env-Expressionsplasmide.....	28
2.1.3. Nukleinsäuren und Oligonukleotide.....	29
2.1.3.1. Größen- und Molekulargewichtsstandards.....	29
2.1.3.2. Oligonukleotide für Sequenzierung	29
2.1.4. Kits	29
2.1.5. Zellen.....	29
2.1.5.1. Adhärent wachsende Zelllinien	29
2.1.5.2. Retrovirus-Produzentenzelllinie	29
2.1.5.3. Primäre Zellen.....	29
2.1.6. Medien und Zusätze.....	30

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Techniken	30
2.2.1.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	30
2.2.1.2. Transformation von Bakterien	30
2.2.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	31
2.2.1.4. DNA-Mengenbestimmung durch Absorptionsmessung.....	31
2.2.1.5. Restriktionsverdau	31
2.2.1.6. Agarosegelelektrophorese	32
2.2.1.7. DNA-Elution aus Agarosegelen sowie Aufreinigung	32
2.2.1.8. Dephosphorylieren der Vektorenden.....	32
2.2.1.9. Ligation	33
2.2.1.10. Sequenzierung	33
2.2.2. Zellkulturtechniken.....	33
2.2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	33
2.2.2.2. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	34
2.2.2.3. Transiente Herstellung retrovirushaltiger Überstände.....	34
2.2.2.4. Erzeugung virushaltiger Überstände.....	35
2.2.2.5. Titration.....	35
2.2.2.6. Transduktion von Patientenfibroblasten.....	36
2.2.2.7. MMC-Behandlung von Patientenfibroblasten.....	36
2.2.2.8. Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	36
2.2.2.9. Fluoreszenzmikroskopie	37

3. Ergebnisse

3.1. Typisierung

3.1.1. Transduktion von Patientenfibroblasten und Typisierung.....	38
3.1.2. Transduktionsschema	38
3.1.2.1. G418-Selektion	38
3.1.2.2. MMC-Selektion	40
3.1.2.2.1. Theorie.....	40
3.1.2.2.2. Praktische Durchführung.....	40

3.1.3. Kontrollen	41
3.1.3.1. Fibroblastenkontrolle	41
3.1.3.2. Transduktionseffizienz	42
3.1.3.3. Neomycinselektionskontrolle	42
3.1.3.4. Gentransferkontrolle	43
3.1.3.5. Vektornegativkontrolle	43
3.1.3.6. FANCL	44
3.2. Ergebnisse der Typisierung	
3.2.1. Patienten der Komplementationsgruppe A	45
3.2.2. Patienten der Komplementationsgruppe D2	46
3.2.3. Patienten 11 und 12 – nonFA	47
3.2.4. Zusammenfassung der Typisierung	48
3.3. Die Komplementationsgruppe FA-L	
3.3.1. Ergebnisse der Typisierung mit dem FANCL-Gen	49
3.3.2. Patient 17	51
3.3.2.1. FANCD2-Westernblot aus Fibroblasten	52
3.3.2.2. Zellzyklusanalyse der Lymphozyten	53
3.3.2.3. FANCD2-Westernblot aus Lymphozyten	54
3.3.2.4. Sequenzierung	54
3.4. Kandidatengene	
3.4.1. Klonierungen	59
3.4.1.1. S11IEG3 und S11IN-Konstrukte	59
3.4.1.2. BRCA1	61
3.4.2. Virusproduktion	61
3.4.3. Stabile Produzentenzelllinien	61
3.4.4. Kontrolle der Retroviren	62
3.4.5. Titerbestimmung der generierten Retroviren	62
3.4.6. Virusproduktion von S11BRCA1IEG, S11DCLR1AIEG, S11RAD54BIEG	63
3.4.8. Kandidatengene – RAD51 und seine Homologe	63
3.4.9. G418-Selektion	64
3.4.10. Ergebnisse der Typisierung mit den Kandidatengenen	66
4. Diskussion	
4.1. DNA-Doppelstrangbrüche	69
4.2. Doppelstrangbruchinduktion durch DNA-quervernetzende Reagenzien	71
4.3. Mosaik	72
4.4. Die Funktion von BRCA2 im FA-Stoffwechselweg	74
4.5. Kandidatengene	75
4.5.1. Rad51	76
4.5.2. Rad51-Homologe	76
4.5.2.1. Rad51B	76
4.5.2.2. Rad51C	76
4.5.2.3. Rad51D	77
4.5.2.4. XRCC2	77
4.5.2.5. XRCC3	78

4.5.3. Mutanten von Rad51 und seinen Paralogen	78
4.5.4. Rad54B	80
4.5.5. BRCA1, Breast cancer 1 gene	80
4.5.6. XPF/ERCC1	81
4.5.7. hSNM1A = DCLRE1A	82
5. Ausblick	84
6. Literatur.....	87
7. Veröffentlichungen.....	101
8. Lebenslauf	102
9. Zusammenfassung.....	103

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ATM	„Ataxia telangiectasia mutated“
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CC	Zellzyklus
d	dezi
DEB	Diepoxybutan
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
Env	„envelope“, retrovirales Hüllprotein
EUFAR	„European Fanconi Anemia Registry“
FA	Fanconi-Anämie
FAAP	Fanconi-Anämie assoziiertes Protein
FAB	„French-American-British“
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FARF	„Fanconi Anemia Research Fund“
g	Gramm
G418	Neomycinanalogon
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	„human leukocyte antigen“
HPV	humanpathogenes Papilloma Virus
HR	Homologe Rekombination
IFAR	„International Fanconi Anemia Registry“
Kb	Kilobasen
KMT	Knochenmarktransplantation
l	Liter
LB	Luria Bertani
µ	mikro
m	milli
M	Molar
MMC	Mitomycin C
Neo	Neomycin
NHEJ	„non-homologous end-joning“
PI	Propidiumiodid
PID	Präimplantationsdiagnostik
PND	Pränataldiagnostik
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sec	Sekunde
SDG	Soli Deo Gloria
SCT	„Stem cell transplantation“
Tab	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v.a	vor allem
VSV	vesikuläres Stomatitis Virus
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1. Einleitung – Fanconi-Anämie (FA)

Fanconi-Anämie (FA) ist eine genetisch und phänotypisch sehr heterogene autosomal und x-chromosomal rezessive Erkrankung. Sie wird klinisch charakterisiert durch die Trias aus kongenitalen Fehlbildungen, einem chronisch progredientem Versagen der Hämatopoese und einer erhöhten Inzidenz von Malignomen. Auf zellulärer Ebene ist die FA durch eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit sowie eine Hypersensitivität gegenüber DNA quervernetzenden Agenzien charakterisiert. Bei der FA existieren mindestens 13 verschiedene Komplementationsgruppen (FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M, -nonJ), von denen bisher 11 Gene (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL*, *FANCM*) identifiziert wurden. Zellbiologische und biochemische Untersuchungen zeigen, dass diese FA-Proteine bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen miteinander verschiedene Funktionskomplexe bilden, daneben aber auch mit anderen Schlüsselproteinen wie ATM, BRCA1 oder Rad51 direkt interagieren.

1.1. Historisches

Fälle von Fanconi (1926)

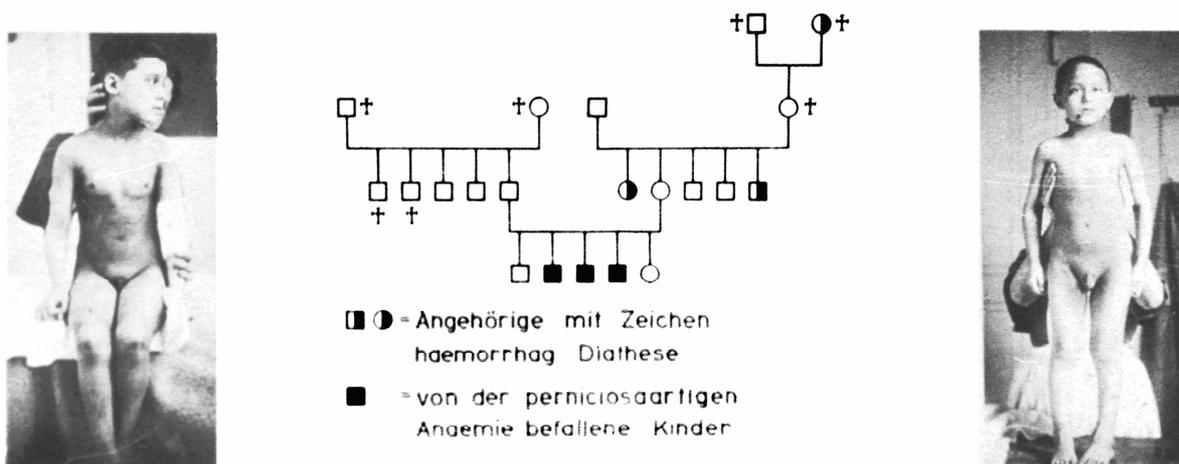


Abb. 1.1: Die erste Publikation von an Fanconi-Anämie erkrankten Patienten: Historisches Dia von Guido Fanconi aus dem Jahr 1926. Im Rahmen einer Vorlesung berichtete er erstmals von der „perniciosartigen Anämie“. Dia mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Felix Sennhauser, Kinderspital Zürich, Schweiz zur Verfügung gestellt. Aus [1].

1927 beschrieb der Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi erstmals eine Anämie [1, 2], die er bei drei Brüdern einer Familie mit 5 Kindern beobachtete [3]. In seiner Autobiographie fasst er in wenigen Zeilen seine damaligen Beobachtungen und Bemühungen zusammen, um dieses Krankheitsbild zu verstehen:

„Als junger Assistent im Kinderspital Zürich kannte ich nur die im Feer'schen Lehrbuch angeführten acht Formen der Blutarmut. 1924 wurde ein fünfjähriger Knabe ins Spital aufgenommen, mit einer eigenartigen schweren Anämie, die 1926 zum Tode führte. Früher war ein älterer Bruder dieses Patienten ebenfalls im Alter von sechs Jahren an einer ähnlichen Blutarmut gestorben. Ferner litt der zwei Jahre jüngere Bruder ebenfalls an der gleichen Krankheit. Mit allen mir damals zur Verfügung stehenden Methoden ging ich an das Studium dieser seltsamen Krankheit. Da die Eltern die Kinder nicht mehr alleine ins Spital geben wollten, gelang es mir, Prof. Feer zu bewegen, die Mutter mit den zwei Brüdern in eines seiner Privatzimmer aufzunehmen.“[4]

Wie weitreichend Fanconis Überlegungen zu einer Zeit waren, in der über chromosomale Veränderungen wenig bekannt war, zeigt der letzte Satz aus der Originalpublikation:

“Die Knochenmarkdysfunktion, die zum perniziösen Blutbild führt, ist wahrscheinlich auch nur ein Zeichen einer ererbten.“

1931 schlug Otto Nägeli den Namen „Fanconi-Anämie“ für diese Erkrankung vor. Seitdem wurden bis 2001 über 1300 Fälle beschrieben [5].

Seit der Erstbeschreibung sind nun fast 80 Jahre vergangen und das Wissen um die molekularen Ursachen dieser Anämie hat ebenso zugenommen wie die Anzahl der Forscher und Ärzte, die sich mit ihr auseinandersetzen. Nur dieser internationalen Zusammenarbeit sind die Fortschritte in den letzten Jahren und die verbesserten Therapiemöglichkeiten beispielsweise der Knochenmarktransplantationsprotokolle zu verdanken.

1982 wurde von Arleen Auerbach und Traute Schröder-Kurth das IFAR (International Fanconi Anemia Registry) gegründet, welches klinische und genetische Informationen sowie biologisches Material von FA-Patienten sammelt. Bis 2005 wurden hier über 966 Patienten aus Nordamerika registriert, von denen 625 klassifiziert werden konnten. Im Gegensatz dazu stellt die EUFAR-Gruppe (European Fanconi Anemia Research Group) keine einheitliche Datenbank mit festem Sitz dar, sondern ist eine Kooperation auf der Basis eines EU-Förderungsprogramms von europäischen FA-Arbeitsgruppen. Zwischen 1989 und 1999 wurden hier Daten von insgesamt 245 FA-Patienten aus 24 Ländern gesammelt und publiziert.

1989 gründeten Eltern in den USA den FARF (Fanconi Anemia Research Fund). Diese Patientenvereinigung organisiert unter anderem jährlich ein FA-Symposium, an dem FA-Forscher und -Ärzte, aber auch interessierte Eltern, teilnehmen. Hier ist ein optimaler Informationsaustausch und offene Diskussion Grundlage für das ständig wachsende Wissen über diese sehr seltene Erkrankung. Darüber hinaus besitzen viele Länder eigenständige Elterninitiativen, die auch international miteinander kommunizieren und so Erfahrungen und Kontakte austauschen.

1.2. Epidemiologie

Die Inzidenz der Fanconi-Anämie liegt bei ca. drei pro einer Millionen, die erwartete Heterozygotenfrequenz bei eins zu 300 in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika [6]. In Deutschland werden ca. 20 bis 25 neue Patienten pro Jahr diagnostiziert. Das mediane Überleben beträgt 24 Jahre [6]. In einigen ethnischen Gruppen wurden jedoch „Founder Mutationen“ mit einer erhöhten Heterozygotenfrequenz beschrieben, so zum Beispiel unter anderem bei Ashkenazi Juden im *FANCC*-Gen [7, 8], Afrikanern im *FANCG*-Gen [9, 10], Japanern im *FANCG*-Gen [11], und einer spanischen Bevölkerungsgruppe im *FANCA*-Gen [12]. In den Niederlanden konnte eine Bevölkerungsgruppe mit einer speziellen Mutation im *FANCC*-Gen (322delG) in der Nähe von Staphorst identifiziert werden, die mit einem milderem Krankheitsverlauf assoziiert werden konnte [13, 14].

Die FA ist eine sehr seltene Erkrankung, was jedoch auch die Erforschung ihrer Ursachen und Behandlungsoptionen vereinfacht. Durch eine möglichst umfassende Beschreibung dieser Erkrankung kann Wissen produziert werden, welches sich auch auf andere Erkrankungen übertragen lässt. Als 2002 eines der FA-Gene als Brustkrebsgen identifiziert wurde (*FANCD1*) [15, 16], konnte die Funktion dieses Gens näher aufgeklärt werden.

Komplementationsgruppe	Defektes Gen	Frequenz in FA (%)	Chromosomale Lokalisation	bildet FA-Kernkomplex	Referenzen
FA-A	<i>FANCA</i>	66	16q24.3	ja	[17-20]
FA-B	<i>FANCB/FAAP95</i>	<1	Xp22.31	ja	[16, 19, 21, 22]
FA-C	<i>FANCC</i>	12	9q22.3	ja	[19, 21, 23]
FA-D1	<i>FANCD1/BRCA2</i>	<1	13q12-13	nein	[16, 19, 21]
FA-D2	<i>FANCD2</i>	<1	3p25.3	ja	[21, 24]
FA-E	<i>FANCE</i>	4	6p21-22	ja	[21, 25, 26]
FA-F	<i>FANCF</i>	4	11p15	ja	[21, 26, 27]
FA-G	<i>FANCG/XRCC9</i>	12	9p13	ja	[21, 26, 28]
FA-I	<i>FANCI</i>	<1		ja	[29]
FA-J	<i>FANCI</i>	<1	17q22	nein	[29-32]
FA-L	<i>FANCL</i>	<1	2p16.1	ja	[33, 34]
FA-M	<i>FANCM</i>	<1	14q21.3	ja	[35]

Tab. 1.1: Frequenzen basierend auf nordeuropäischer Population Die Frequenzen sind für die einzelnen Fanconi-Anämie-Gene sehr unterschiedlich. Da die Komplementationsgruppen A, C und G am häufigsten vorkommen, werden in vielen Studien und Phänotyp-Genotyp-Korrelationen diese drei Gruppen miteinander verglichen, während die übrigen Gruppen zusammengefasst betrachtet werden. Nach [36].

1.3. Symptome/Krankheitsbild

1.3.1. Kongenitale Fehlbildungen

Wie in der Einleitung beschrieben, wird die FA klinisch charakterisiert durch die Trias aus kongenitalen Fehlbildungen, Defekt der Hämatopoese und einer erhöhten Tumorzinzidenz. Tabelle 1.2 zeigt, dass die kongenitalen Fehlbildungen sehr viele Organsysteme betreffen können und sie klinisch sehr heterogen sind, weswegen hier nur auf die häufigsten eingegangen werden soll.

Ungefähr 1/3 aller FA-Patienten weisen keine angeborenen Veränderungen auf. Diese Patienten werden entweder über das Knochenmarkversagen diagnostiziert oder mitdiagnostiziert, wenn Geschwister auf FA untersucht werden. Manchmal ist die einzige angeborene Veränderung eine generalisierte Hyperpigmentierung mit Café au lait-Flecken und einzelne Stellen von Hypopigmentierungen. Radiäre Defekte beziehen sich auf die Hypoplasie von Radius und/oder Daumen. 1/3 aller FA-Patienten weisen Defekte oder Missbildungen der Niere auf, wie unilaterale Aplasie, Hypoplasie, Hufeisenniere oder Doppelureteren. Die häufig zu beobachtende allgemeine Wachstumsretardierung zeigt sich sowohl *in utero* als auch postnatal. Die mediane Größe von Individuen mit FA liegt um die 5. Perzentile, was eventuell auf einen Mangel an Wachstumshormonen zurückzuführen ist [37].

Fehlbildungen	Frequenz (%)
Skelett (radiärer Strang, Hüfte, Skoliose, Rippen)	71
Hautpigmentierungen (Café au lait, Hyper- und Hypopigmentation)	64
Kleine Größe	63
Augen (Mikrophthalmie)	38
Niere und Harntrakt	34
Männliches Genitale	20
Mentale Retardierung	16
Gastrointestinal (z.B. anorektal, Duodenalatresie)	14
Herz	13
Hören	11
ZNS (z.B. Hydrozephalus, fehlendes Septum pellucidum)	8
Keine Fehlbildungen	30

Tab. 1.2: Frequenzen von Fehlbildungen in Fanconi-Anämie. [36]



Abb. 1.2: Daumenfehlbildungen bei FA: Dieser Patient wurde ohne Daumen geboren und bereits im 5 Lebensmonat operiert, wobei der Zeigefinger als Daumenersatz rekonstruiert wurde. Foto: Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. mit freundlicher Genehmigung.

1.3.2. Hämatologie

1.3.2.1. Knochenmarkversagen – Defekt der Hämatopoese

Im hämatologischen System häufige und klinisch wichtige Symptome der FA sind Abnormalitäten. Unter anderem sind sie für die Morbidität und Mortalität in Homozygoten verantwortlich. Hämatologische Abnormalitäten sind definiert als: Thrombozyten $< 100 \times 10^9/l$, Hämoglobin $< 10 \text{ g/dl}$ oder Neutrophile absolut $< 1 \times 10^9/l$. Eine Panzytopenie beschreibt eine Abnormalität in zwei oder drei Blutzelllinien. Zur Geburt weisen die Patienten häufig Normalwerte auf. Zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr manifestiert sich eine Thrombozytopenie, eine Anämie sowie mit individuell und familiär stark unterschiedlicher Ausprägung eine Panzytopenie. 50% der Patienten haben mit 7,6 Jahren erste klinische Manifestationen des Knochenmarkversagens. Die kumulative Inzidenz für ein Knochenmarkversagen liegt im Alter von 40 Jahren bei 90%.

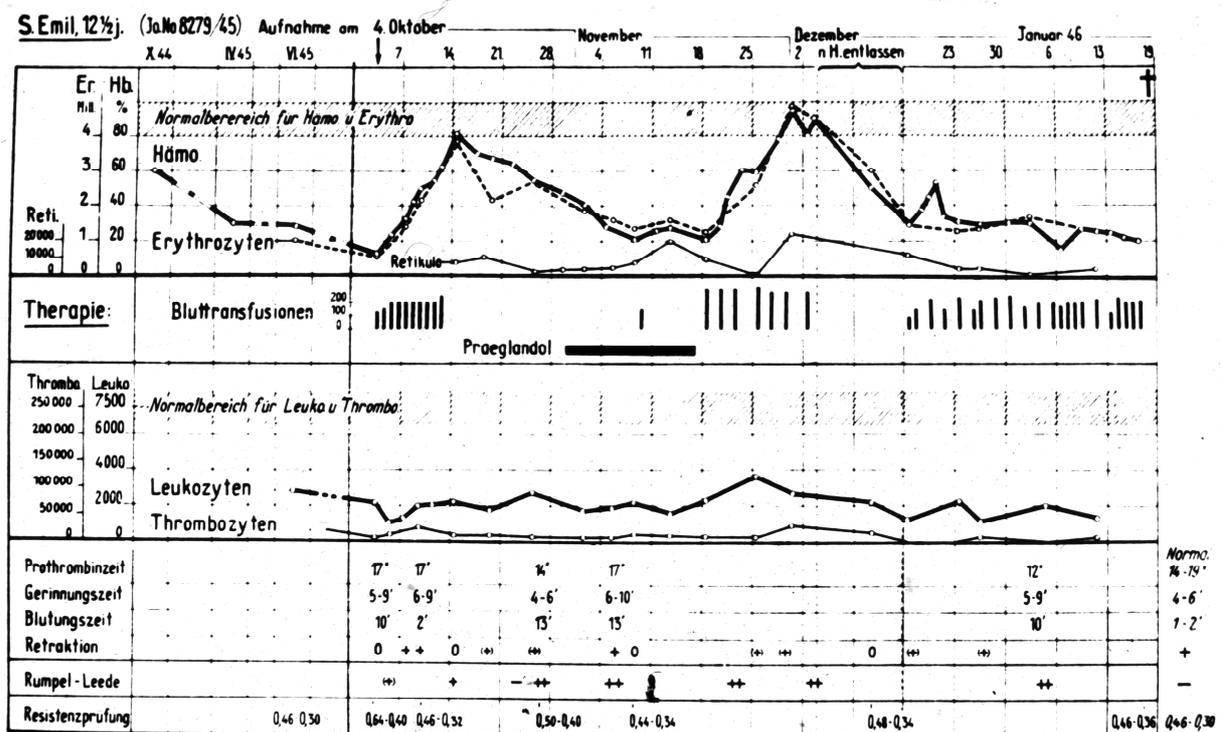


Abb. 1.3: Blutbildverlauf eines Patienten mit FA: Historische Zeichnung von Guido Fanconi eines Blutbildverlaufes einer seiner FA-Patienten aus dem Jahr 1945. Die Therapie bestand in Bluttransfusionen sowie dem experimentellen Einsatz von Prägländol. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Felix Sennhauser, Kinderspital Zürich, Schweiz. Aus [1].

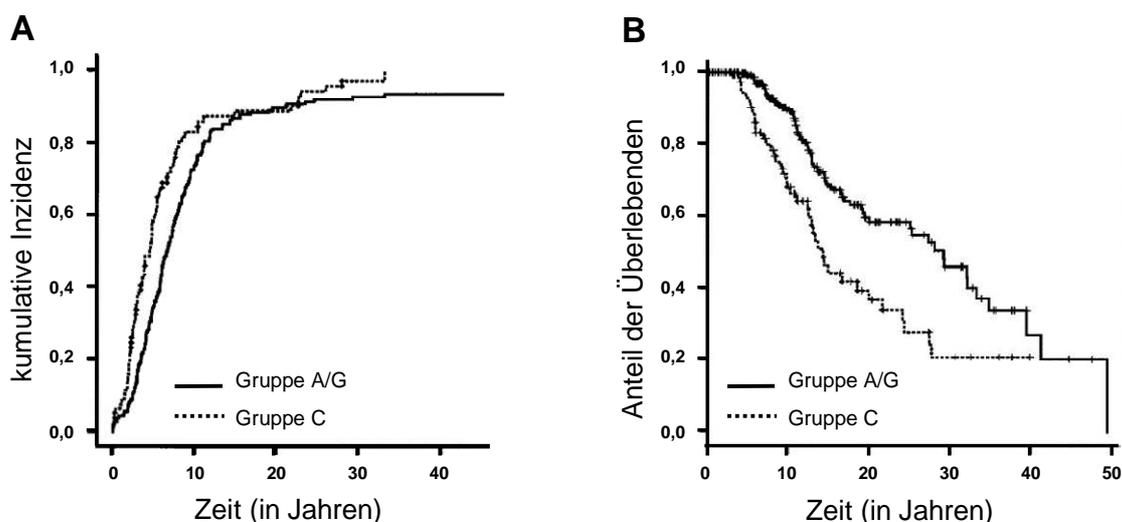


Abb. 1.4: Epidemiologische Daten aus dem IFAR: A: Kumulative Inzidenz von Knochenmarkversagen für die Komplementationsgruppen FA-A/FA-G verglichen mit FA-C. **B:** Überlebenskurven der Komplementationsgruppen FA-A/FA-G im Vergleich zu FA-C. Nach [6].

Untersuchungen über das Auftreten eines Knochenmarkversagens in den einzelnen Komplementationsgruppen ergaben, dass Patienten mit einem Defekt in *FANCC* früher an einem Knochenmarkversagen erkranken und allgemein schlechter überleben, verglichen mit Patienten, die einen Defekt in *FANCA* oder *FANCG* haben oder noch nicht Untergruppen-typisiert sind. Patienten, die noch nicht typisiert sind, haben im Vergleich zu Patienten mit einem Defekt in *FANCA* oder *FANCG* eine niedrigere Inzidenz, an einem Knochenmarkversagen zu erkranken. Jedoch sei darauf hingewiesen, dass diese Gruppe sehr heterogen ist und neuere Untersuchungen zeigen, dass Patienten mit einem Gendefekt in *FANCD1/BRCA2* besonders schwer betroffen sind [38].

1.3.2.2. Hämatologische Tumoren

Am häufigsten erkranken FA-Patienten an hämatologischen Tumoren (60% aller Tumoren bei FA). Die kumulative Inzidenz, an einem hämatologischen Malignom zu erkranken, liegt bei der FA mit 40 Jahren bei 33% (siehe Abbildung 1.2, basierend auf Daten aus dem IFAR). Männliche Patienten erkranken häufiger als weibliche Patientinnen [6]. Die häufigste Leukämieart des Kinder- und Jugendalters in einer Normalbevölkerung ist die akute lymphatische Leukämie (ALL) (84%). Diese tritt bei FA-Patienten jedoch sehr selten auf (unter 1% aller hämatologischen Tumoren) und konnte bisher nur mit der Komplementationsgruppe FA-D1 assoziiert werden. Wird die akute myeloische Leukämie (AML) nach den FAB-Kriterien klassifiziert, so ist auf-

fällig, dass bei FA die Promyelozyten AML (M3) kaum auftritt, am häufigsten die Untergruppen Myelomonozyten (M4) und die akuten Monozyten (M5).

1.3.3. Solide Tumoren

Nicht nur die kumulative Inzidenz an hämatologischen Malignomen ist bei Patienten mit FA erhöht, sondern auch die Wahrscheinlichkeit, Tumoren in anderen Organsystemen zu entwickeln, ist bei ihnen deutlich höher als in der Normalbevölkerung. Die kumulative Inzidenz für solide Malignome in einem Alter von 40 Jahren liegt bei 28%. Im Gegensatz zu den hämatologischen Tumoren lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Komplementationsgruppen feststellen. Männer weisen eine etwas geringere kumulative Inzidenz auf als Frauen, wahrscheinlich aufgrund der Häufung von genitalen Tumoren bei Frauen. Erwähnenswert ist jedoch, dass sich die kumulative Inzidenz von hämatologischen Tumoren (33% mit 40 Jahren) kaum von der kumulativen Inzidenz für solide Tumoren unterscheidet (28% mit 40 Jahren). Besonders häufig treten Plattenepithelkarzinome des oberen aerodigestiven und anogenitalen Traktes auf. Der Median bei den Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom erkranken, liegt bei 37,8 Jahren. Ein Vergleich mit der „Surveillance Epidemiology End Result“ (SEER) Population ergab eine 500fach erhöhte kumulative Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses bei Patienten mit FA [39]. Die kumulative Inzidenz für Plattenepithelkarzinome liegt in einem Alter von 40 Jahren bei 20%.

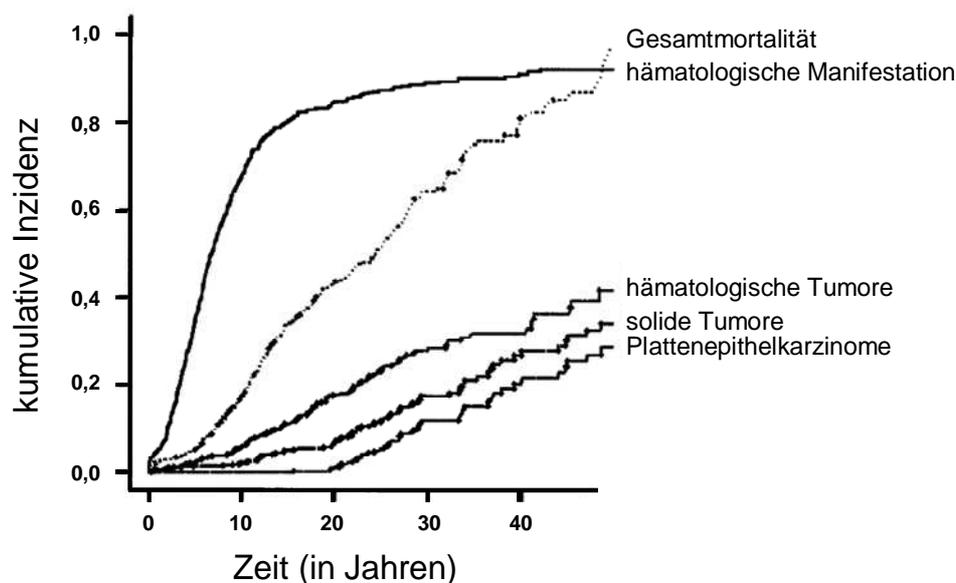


Abb. 1.5: Kumulative Inzidenzen bei Fanconi-Anämie. Dargestellt sind die kumulativen Inzidenzen für die Gesamt mortalität, die hämatologische Manifestation sowie für unterschiedliche typische FA-assoziierte Tumoren. [6]

Tumorart	Anzahl der Patienten (%)
Hämatologisch	120 (60)
AML	60
MDS	53
ALL	5
CMMOL	1
Burkitt Lymphom	1
Nicht-hämatologisch	79 (40)
Plattenepithelkarzinom	39 (29)
Kopf und Hals	19
Vulva	8
Cervix	6
Haut	3
Anus	2
Ösophagus	1
Leber	18 (9)
Leberadenom	11
Hepatozelluläres Karzinom	6
Leber Adenokarzinom	1
Mischzelltumoren	11 (6)
Nierentumor	6 (3)
Wilms Tumor	4
Nierenzellkarzinom	1
Nephroblastom	1
Hirntumor	5 (2)
Medulloblastom	4
Astrozytom	1

Tab. 1.3: Neoplasien, die bei FA-Patienten entdeckt wurden. AML = akute myeloische Leukämie, MDS = myelodysplastisches Syndrom; ALL = akute lymphatische Leukämie; CMMOL = chronische myelomonozytäre Leukämie. Daten aus dem IFAR [6]

Eine Untersuchung des IFAR von 754 Patienten ergab, dass 173 Patienten (23%) 199 Neoplasien entwickelten. 60% (120 Tumoren) davon waren hämatologisch und 40 % (79 Tumoren) waren nichthämatologische Tumoren. Werden nur die nichthämatologischen Tumoren betrachtet, so überwiegen die Plattenepithelkarzinome des Kopfes, Halses, der Anogenitalregion und der Haut. Die Neoplasien der Leber stehen an zweiter Stelle, wobei jedoch angenommen wird, dass das Auftreten der Leberadenome mit der Androgentherapie der aplastischen Anämie korreliert. Über die einzelnen Untergruppen der Tumoren des Hirns und der Niere gibt Tabelle 1.3 Auskunft. 30 der 39 Plattenepithelkarzinome traten bei FA-Patientinnen auf. Wurden jedoch die gynäkologischen Plattenepithelkarzinome ausgeschlossen, so ergab sich kein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied mehr.

Wie genau die Beziehung zwischen Malignom und der genomischen Instabilität bei der FA ist und warum vor allem Plattenepithelkarzinome bei den soliden Tumoren überwiegen, ist noch nicht klar. Nur in drei der 19 Patienten konnten die Noxen Alkohol und Tabak als Risikofaktoren für ein Plattenepithelkarzinom des oberen aerodigestiven Traktes eruiert werden. Bei 54% der Patienten aus Nordamerika mit Plattenepithelkarzinomen konnte jedoch eine HPV Infektion in der Vergangenheit ausgemacht werden, was zu der Hypothese führt, dass bei FA eine erhöhte Bereitschaft für

verändernde Ereignisse vorliegen könnte. Denkbar wäre auch, die Ursache der soliden Tumoren in der Behandlung mit Chemotherapeutika zu suchen, die bekanntlich in der Normalbevölkerung mit einem erhöhten Risiko für ein Zweitmalignom assoziiert sind. Erythroplastische und leukoplastische Veränderungen der Mundschleimhaut von FA-Patienten sind Präkanzerosen, die chirurgisch möglichst vollständig entfernt werden sollten.



Abb. 1.6: Leukoplakie bei Fanconi-Anämie. Leukoplastische Veränderungen als Präkanzerose bei einem 19jährigen FA-Patienten 15 Jahre nach einer KMT. Foto mit freundlicher Genehmigung von Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V.

1.4.4. Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Da sowohl der Phänotyp von Patienten mit FA als auch der Genotyp sehr heterogen sind, wäre es naheliegend eine Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp anzunehmen. Koc et al beschrieben 1999 jedoch vier FA-Patienten mit der gleichen Mutation im *FANCA* Gen [40]. Dabei zeigten diese Patienten allerdings sehr unterschiedliche Geburtsgewichte, Hautpigmentierungen und Fehlbildungen des Skelettes, der Niere und genitale Fehlbildungen. Die Schwere des klinischen Phänotyps ergibt sich wahrscheinlich aus einer Kombination von genetischem Hintergrund und Umweltfaktoren zum spezifischen Defekt in einem der Fanconi-Anämie-Gene [11, 41].

1.4. Molekularpathologie

1.4.1. Chromosomale Auffälligkeiten und DNA-Doppelstrangbrüche

Bereits Guido Fanconi vermutete eine genetische Ursache dieses komplexen Krankheitsbildes. Er nahm an, numerische Aberrationen wie einen verminderten oder vermehrten Chromosomensatz zu finden [42]. Die Suche nach numerischen Veränderungen blieb erfolglos, vielmehr konnte gezeigt werden, dass ein veränderter zellulärer Phänotyp mit strukturellen chromosomalen Aberrationen der FA zugrunde liegt

[43-46]. Nicht die Anzahl, sondern die Form und Gestalt der Chromosomen von FA-Patienten waren verändert. So zeigten sich beispielsweise Tetramere, Quadrimere und andere Gebilde fehlerhafter Chromosomen. Solche chromosomalen Veränderungen entstehen bei fehlerhafter Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (siehe Abbildung 1.7).

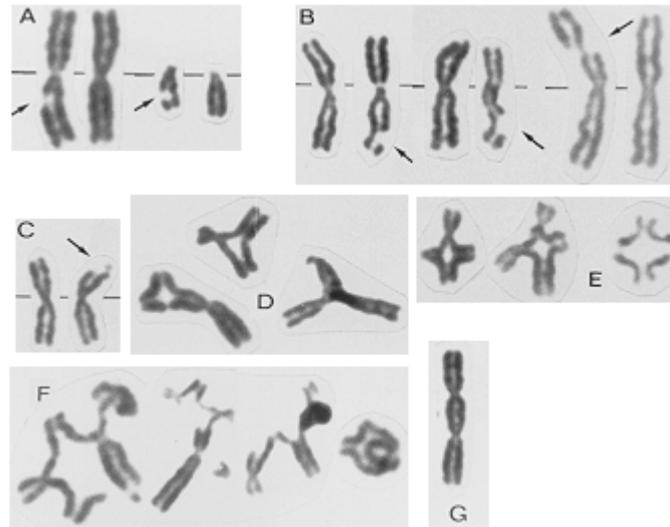


Abb 1.7: Doppelstrangbrüche von Chromosomen und fehlerhafte Reparatur in Zellen von Patienten mit FA. Deutlich erkennbar sind Chromosomenlücken (A) und -brüche (B), Deletionen (C), Tetramere (D), Quadrimere (E) und sonstige unphysiologische Gebilde (F und G). Giemsa Färbung. Abbildung mit freundlicher Genehmigung Prof. Schindler, Würzburg.

Die Möglichkeiten der einzelnen Zelle, auf DNA-Doppelstrangbrüche zu reagieren, sind sehr vielfältig. Über die Regulation des Zellzyklus kann die Zelle die Zellteilung solange aufhalten, bis der Schaden repariert werden konnte [47]. Ist der gesetzte Schaden jedoch so groß, dass er nicht repariert werden kann, so wird die Zelle in den programmierten Selbstmord, die Apoptose, eintreten [48]. Werden DNA-Schäden fehlerhaft repariert oder toleriert, so führt dies zur Akkumulation von Mutationen im Erbgut und damit langfristig zur genomischen Instabilität. Diese ist dann wiederum als Prädisposition zu sehen, bei der bestimmte Mutationen hinsichtlich des verbesserten Überlebens der Einzelzelle getestet werden.

1.4.2. Andere zelluläre Auffälligkeiten bei FA-Patienten

Neben einer Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Agentien und einer spontan erhöhten Chromosomeninstabilität ist in hämatopoetischen Stammzellen von FA-Patienten eine erhöhte Apoptoserate nachweisbar [49]. Sie steht jedoch eventuell im gleichen Zusammenhang wie die erhöhte Chromosomeninstabilität. Mit der erhöhten Chromosomeninstabilität wird auch eine schnellere Telomerverkürzung assoziiert [50, 51]. FA-Zellen weisen mehr reaktive Sauerstoffspezien (ROS) auf, als normale Zellen [52].

1.4.3. Zellzyklus

1.4.3.1. Allgemeines zum Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus verschiedenen Phasen:

- G1: erste Pause, Chromosomensatz einfach (= $2n$)
- S: DNA-Synthese
- G2: zweite Pause, Chromosomensatz doppelt (= $4n$)
- M: Mitose (Zellteilung), Chromosomensatz (= $4n$)
- G0: ruhende, sich nicht teilende Zellen, Chromosomensatz (= $2n$)

Wird nur der DNA-Gehalt einer Zelle betrachtet (siehe Abbildung 1.8B), so können die Zellen in drei Abschnitte eingeteilt werden: G0/G1, S und G2/M. In den Phasen G0/G1 besitzt die Zelle einen einfachen Chromosomensatz (= $2n$). In der S-Phase synthetisiert die Zelle ihre DNA und verfügt zu diesem Zeitpunkt über einen bis zwei Chromosomensätze. Einen doppelten Chromosomensatz (= $4n$) besitzen Zellen, die sich in G2 bzw. in der Mitose befinden. Um den DNA-Gehalt von Zellen zu messen, werden diese mit Alkohol fixiert, mit RNase behandelt und anschließend die DNA mit Propidiumjodid gefärbt und in einem Durchflusszytometer (z.B. FACScann der Firma Becton Dickinson) gemessen. Propidiumjodid ist ein fluoreszierender Stoff, der stöchiometrisch an die DNA bindet. Somit ist die Intensität der PI-Fluoreszenz proportional zum DNA-Gehalt.

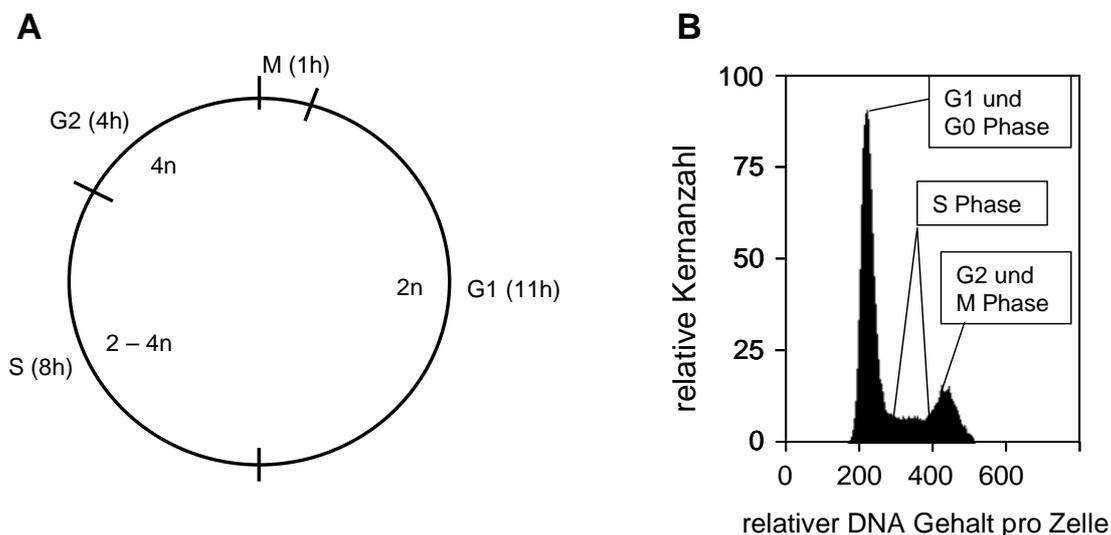


Abb. 1.8: Der Zellzyklus einer Zelle. A: Der Zellzyklus besteht aus 4 Phasen, die ineinander übergehen. Zellen, die nach der Mitose (M) in die G0-Phase (hier nicht dargestellt) eingetreten sind, ruhen. Sie besitzen ebenso wie Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, einen einfachen Chromosomensatz. Die Dauer der G0-Phase kann von Zelle zu Zelle unterschiedlich lang sein. **B:** Messungen des DNA-Gehaltes von Zellen mittels Propidium-Färbung (= PI-Färbung) an einer Durchflusszytometrie. Die hier dargestellte Population repräsentiert eine normal wachsende Zellkultur, in der sich viele Zellen in der G1/0-Phase befinden und nur wenige in der S und G2/M-Phase.

Die Abbildung 1.8B stellt den Zustand von normal wachsenden primären Hautzellen in Kultur dar. Die meisten dieser Zellen befinden sich in der G1/G0-Phase und nur wenige in der G2/M-Phase. Dies liegt unter anderem daran, dass die G2/M-Phase zeitlich gesehen kürzer als die G1/G0-Phase ist und sich nicht alle Zellen ständig teilen. Das führt dazu, dass mehr Zellen in der G1/G0-Phase detektiert werden. Der Zellzyklus wird von einer Reihe von Kinasen reguliert, die an bestimmten Checkpunkten den Übergang von einer Phase zur nächsten kontrollieren. Ist der Chromosomensatz beispielsweise noch nicht vollständig dupliziert, so tritt die Zelle noch nicht in die G2-Phase ein. Der Checkpoint am Übergang von der G2- zur M-Phase gewährleistet vor allem die genomische Integrität. Verfügt die Zelle über einen DNA-Schaden, so wird der Zellzyklus in der G2-Phase angehalten und die Zelle versucht, diesen Schaden zu reparieren, bevor sie in die M-Phase eintritt. Ist der Schaden zu groß oder kann er aus anderen Gründen nicht repariert werden, leitet die Zelle den programmierten Zelltod, die Apoptose, ein. Wenn die Kontrolle am jeweiligen Checkpoint nicht funktionstüchtig ist und die Zelle trotz DNA-Schaden in die Mitose übergeht, wird der Schaden an die Tochtergeneration weitergegeben. So kann die Wahrscheinlichkeit steigen, dass diese Zelle strukturelle Chromosomenveränderungen akkumuliert und durch entsprechende „Hits“ in kritischen Genen maligne entartet.

1.4.3.2. G2/M-Arrest

Werden Zellen eines Normalprobanden mit DNA-quervernetzenden Reagenzien wie Mitomycin-C (MMC), Cisplatin oder Diepoxybutan (DEB) behandelt, so können diese aufgrund ihres intakten DNA-Reparatur-Systems den gesetzten Schaden während der G2-Phase reparieren und die Zellen treten nach abgelaufener G2-Phase in die Mitose über. Bei entsprechend hohen Dosen können jedoch auch normale Zellen so geschädigt werden, dass sie in dem G2/M-Arrest verharren. FA-Zellen hingegen zeigen eine charakteristische Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Reagenzien bereits bei sehr geringen Konzentrationen. Der Grund für diese Hypersensitivität liegt darin, dass diese Reagenzien Doppelstrangbrüche verursachen, die die FA-Zellen nur schwer bis gar nicht reparieren können. Aufgrund dieser Unfähigkeit verharren die Zellen in der G2-Phase und treten nicht in die Mitose über. Dieser Zustand wird als G2/M-Arrest bezeichnet. Abbildung 1.9 zeigt in B eine Zellpopulation, in der sich annähernd gleich viele Zellen (im Gegensatz zur Abb. 1.9.A) in der G1/G0- sowie der G2/M-Phase befinden.

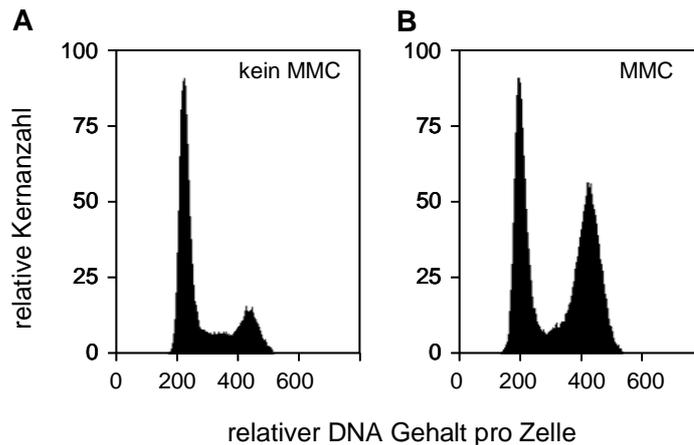


Abb. 1.9: Messungen des DNA-Gehaltes von FA-Zellen mittels PI-Färbung am FACScan. Die in **A** dargestellte Population repräsentiert eine normal wachsende Zellkultur, die nicht behandelt wurde. **B** zeigt eine Population, die mit MMC behandelt wurde, diesen Schaden jedoch nicht reparieren kann und sich zum Zeitpunkt der Messung im G2/M-Arrest befindet.

Diese Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Reagenzien mit nachweisbarem G2-Arrest wird seit der Beschreibung von Schröder-Kurth weltweit als Standard zur Diagnostik der FA eingesetzt [53-56].

1.4.4. Komplementationsgruppen

1.4.4.1. Zellfusion

Bei der FA konnten bisher 12 Komplementationsgruppen mittels somatischer Zellhybridisierungsanalysen und anderer Ansätze unterschieden werden: FA-A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L und M (siehe Tabelle 1.1 sowie Abbildung 1.10).

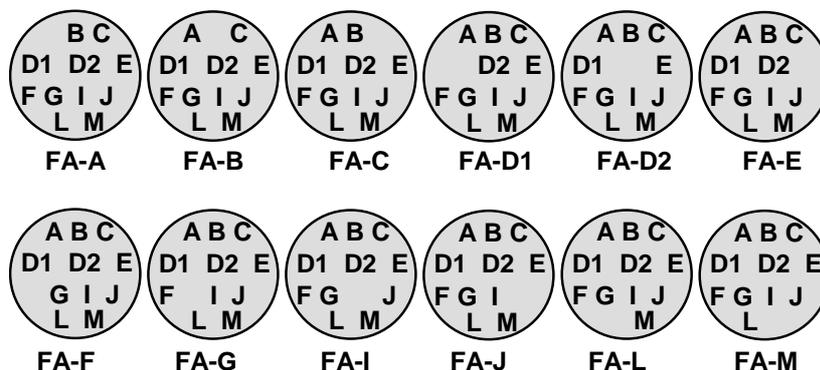


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der FA-Gen-Defekte in Zellen von Patienten unterschiedlicher Komplementationsgruppen. Bei jeder der zwölf bekannten Gruppen (FA-A bis -M) ist genau das FA-Gen funktionsuntüchtig, das der entsprechenden Komplementationsgruppe entspricht.

Jedoch wird angenommen, dass noch mehr Komplementationsgruppen existieren, da einige Patienten noch keiner dieser bekannten Komplementationsgruppen zugeordnet werden konnten. Bei FA-D1/D2 wurde nach der Identifizierung der Gene festgestellt, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Gene handelt und die Zellfusionsstudien, die ursprünglich nur eine D-Gruppe vermuten ließen, nicht eindeutig waren. Die Komplementationsgruppe FA-H wurde im Nachhinein als FA-A identifiziert. Die klassische Komplementierung beruht auf der Tatsache, dass in Zellen einer bestimmten Komplementationsgruppe (z. B. FA-A) nur das jeweilige FA-Gen (hier *FANCA*) und das zugehörige Protein defekt sind, alle anderen FA-Gene bzw. – Proteine aber funktionstüchtig sind. Das Prinzip der somatischen Zellhybridisierung beruht darauf, dass zwei FA-Zellen miteinander hybridisiert werden und die entstandene Fusionszelle in einem Mitomycin-C-Hypersensibilitätstest untersucht wird. Werden in dieser Hybridisierung zwei Zellen der gleichen Komplementationsgruppe, (z. B. FA-A mit FA-A) fusioniert, so sind die Fusionszellen auch weiterhin defekt, da keiner der beiden Fusionspartner das fehlende Wildtyp FA-Gen (*FANCA*) mit in die Fusionszellen einbringt. Wird jedoch eine Fusion zwischen zwei unterschiedlichen Komplementationsgruppen durchgeführt, so stellt beispielsweise die FA-A-Zelle der FA-C-Zelle ihr FA-C Wildtypgen zur Verfügung und die FA-C-Zelle der FA-A-Zelle ihr FA-A-Wildtypgen. Im anschließenden Mitomycin-C-Hypersensibilitätstest verhalten sich diese Fusionszellen dann wie Zellen eines Patienten ohne FA. Die Bestimmung der Komplementationsgruppe mittels somatischer Zellhybridisierung ist jedoch eine langwierige, sehr aufwendige und fehleranfällige Analyse, die sich angesichts der Vielzahl an FA-Genen über Monate bis Jahre hinzieht.

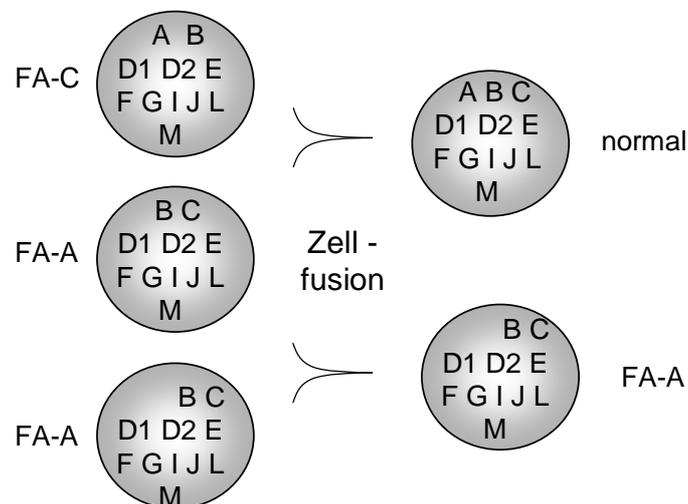


Abb. 1.11: Prinzip der klassischen Komplementationsgruppenbestimmung mittels Zellfusion. Werden Zellen der gleichen Komplementationsgruppe (z. B. FA-A, unten) fusioniert, weisen die Fusionszellen denselben Gendefekt wie die Fusionspartner auf und zeigen weiterhin die typischen FA-Eigenschaften der Überempfindlichkeit gegenüber Mitomycin C und anderen DNA-quervernetzenden Substanzen. Stammen die Fusionszellen von Partnern unterschiedlicher Komplementationsgruppen (FA-A und FA-C, oben), so sind die Fusionszellen normal, da jeder Fusionspartner den FA-Gendefekt des anderen komplementiert.

1.4.4.2. Retrovirale Komplementation

Eine neuere Methode der Komplementationsanalyse benutzt gentechnisch veränderte retrovirale Vektoren, um jeweils spezifisch ein FA-Gen in die Zellen eines FA-Patienten mit noch nicht zugeordneter Komplementationsgruppe einzubringen [57, 58]. Der prinzipielle Unterschied zwischen Komplementation durch Zellfusion und retroviraler Komplementation besteht darin, dass bei der Komplementationsanalyse durch Zellfusion in FA-Zellen einer noch nicht zugeordneten Komplementationsgruppe mit dem Fusionspartner (Zellen einer FA-Referenzlinie), immer alle FA-Gene außer einem übertragen werden. Es wird nach dem aussagekräftigen negativen Fall gesucht, bei dem durch den Fusionspartner keine Komplementation vermittelt wird. Bei der retroviralen Komplementationsanalyse wird immer nur ein FA-Gen pro Ansatz übertragen und es wird der positive Fall gesucht, in dem dieses eine FA-Gen Komplementation vermittelt, d. h. die FA-typische MMC-Hypersensitivität der Zellen korrigiert [59, 60].

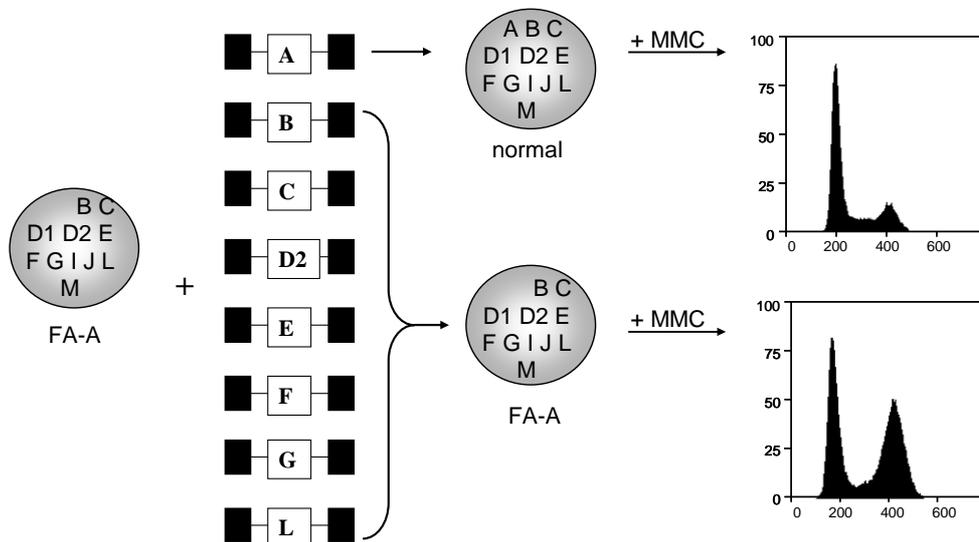


Abb. 1.12: Prinzip der Komplementation mittels retroviraler Vektoren. In Zellen der Komplementationsgruppe FA-A bringt ein retroviraler Vektor eine intakte Kopie des FA-Gens ein, das in den Zellen defekt ist (FANCA, oben). Die Zellen werden korrigiert. Die anderen Retroviren übertragen Gene, die in den Zellen nicht defekt sind (FANCB/C/D2/E/F/G/L, unten). Die Zellen werden daher nicht korrigiert.

Von den 12 Komplementationsgruppen bei FA sind bisher 11 FA-Gene kloniert worden. Die Gene *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* und *FANCL* wurden jeweils in einen retroviralen Vektor kloniert und mit diesen können Zellen von Patienten noch nicht zugeordneter Komplementationsgruppen infiziert werden. Nur eines der retroviral übertragenen FA-Gene kann die FA-Eigenschaften der Patientenzellen (MMC-Hypersensitivität) korrigieren, nämlich die gesunde Kopie desjenigen Gens, das beim Patienten defekt ist (Abbildung 1.12). Korrigiert keines

der retroviral in die Zellen eingeführten Gene die Zellen, so gehört der Patient zu den Komplementationsgruppen FA-D1, FA-I, FA-J und FA-M oder zu einer neuen noch nicht definierten Gruppe. Zur schnelleren Prüfung der MMC-Hypersensibilität wird als automatisiertes Analyseverfahren oft die Durchflusszytometrie angewandt.

1.4.5. Funktionen der FA-Proteine

1.4.5.1. Der FA-Kernkomplex

Ein wesentliches Charakteristikum des FA-Stoffwechselweges ist die FANCD2-Monoubiquitinierung durch den FA-Kernkomplex. Innerhalb dieses Kernkomplexes konnte 2003 FAAP43 als FANCL-Gen identifiziert werden, welches eine katalytische Untereinheit mit E3-Ubiquitinligaseaktivität enthält [33]. Ein Jahr später wurde FAAP95 als *FANCB*-Gen kloniert [22, 61]. *FANCB* scheint für die Stabilität von FANCL verantwortlich zu sein [61]. Im Gegensatz zu allen anderen klonierten FA-Genen liegt es auf dem X-Chromosom. Tatsächlich sind auch alle vier bisher bekannten Patienten mit einer Mutation in *FANCB* männlich. 2005 wurde mittels Zellfusionsexperimenten FAAP250 als bis dahin unbekannte neue Komplementationsgruppe FA-M identifiziert [35]. FA-Proteine, die dem FA-Kernkomplex angehören, werden als „upstream“-Proteine bezeichnet, da sie vor der FANCD2-Monoubiquitinierung aktiv sind.

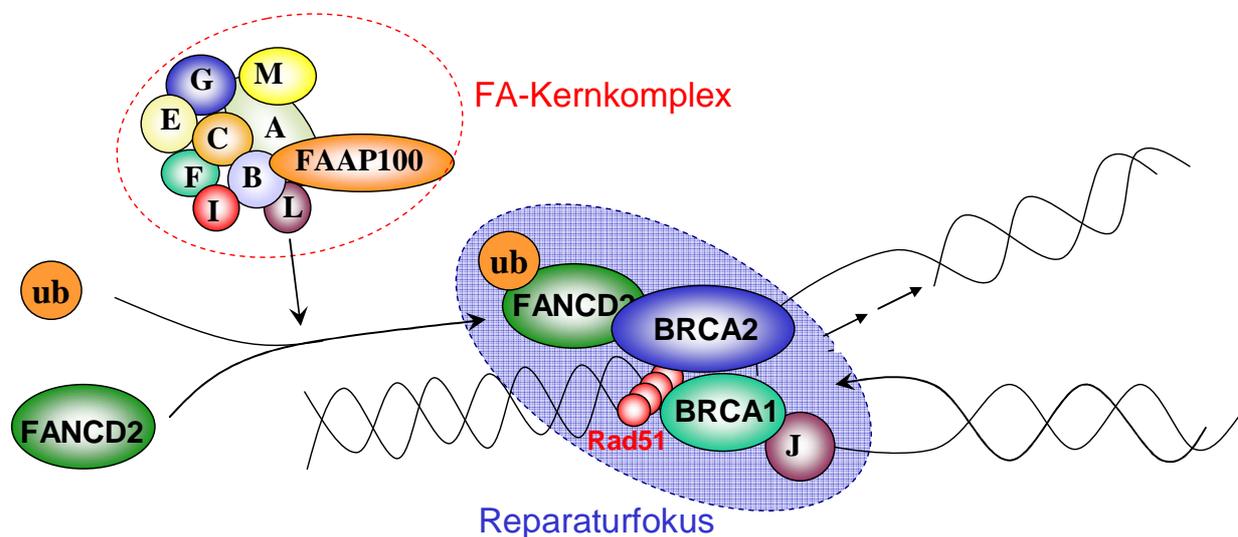


Abb 1.13: Der FA-Stoffwechselweg. DNA-quervernetzende Substanzen wie MMC führen (möglicherweise über ATR und BRCA1) zu einer Aktivierung des FA-Stoffwechselweges. Der FA-Kernkomplex besteht aus den FA-Proteinen der Komplementationsgruppen A, B, C, E, F, G, I, M und dem noch nicht näher bestimmten FA-assoziierten-Protein FAAP100. Nach der Multimerisation zum Kernkomplex, kann die Ubiquitinligase FANCL FANCD2 monoubiquitinieren und damit aktivieren. Dieses FANCD2-L-Protein interagiert mit FANCD1/BRCA2. BRCA2 bildet mit RAD51, BRCA1 sowie FANCI nucleäre Foci. Diese Foci enthalten neben RAD51 auch die RAD51-Homologe. Modifiziert nach [62].

FA-D1 und FA-J liegen nach der FANCD2-Monoubiquitinierung und werden demnach als „downstream“-Proteine bezeichnet. Dass diese Interaktion zwischen den FA-Proteinen jedoch nicht so linear ist, wie bisher dargestellt, ist jetzt erstmalig elegant bewiesen worden [63].

1.4.5.2. FANCD2-Monoubiquitinierung

Ein sehr fruchtbarer Durchbruch in der FA-Forschung war die Beobachtung, dass fünf FA-Proteine (A, C, E, F, G) einen Kernkomplex bilden und dieser das neu geklonte FANCD2-Protein monoubiquitiniert und damit aktiviert [21, 64]. Diese Monoubiquitinierung findet während der S-Phase des Zellzyklus am Lysin K561 statt. Sie kann jedoch auch induziert werden, wenn Zellen mit Reagenzien behandelt werden, die die DNA schädigen oder die Replikation blockieren [64].

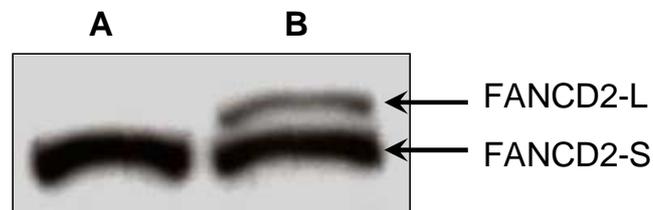


Abb 1.14: Westernblot von FANCD2. A: Ist das FANCD2-Protein nicht monoubiquitiniert, so liegt es in seiner Kurzform (s für „short“) vor. FA-Zellen der Komplementationsgruppen FA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -I, -L und -M (so genannte „upstream“-Gruppen) sind nicht zur Monoubiquitinierung fähig, da bei ihnen der FA-Kernkomplex nicht funktionstüchtig ist. B: FANCD2 in der monoubiquitinierten Form wird mit FANCD2-L (L für „long“) bezeichnet. FA-Zellen der Komplementationsgruppen FA-D1 und FA-J (so genannte „downstream“-Gruppen) sind zur Monoubiquitinierung fähig, da sie einen funktionstüchtigen FA-Kernkomplex besitzen.

Mittels biochemischer Aufreinigung konnte dieser aus Multiuntereinheiten zusammengesetzte Kernkomplex näher identifiziert werden [23, 33]. Neun Proteine vereinigen sich zum sogenannten FA-Kernkomplex, der nicht nur aus den erwarteten fünf bereits bekannten Proteinen besteht, sondern daneben noch vier neue Proteine enthält, FA-assoziierte-Proteine genannt: FAAP43, FAAP95, FAAP100, FAAP250. Die Nummern stehen für das jeweilige Molekulargewicht. Mutationen in diesen Genen stören die Multimerisation zum Komplex und die Zellen weisen nur eine FANCD2-Bande, die FANCD2-S-Bande, auf [22, 33, 34, 65-70] (Abbildung 1.14). In FA-Zellen der Komplementationsgruppen FA-D1 und -J ist dieser Kernkomplex intakt, so dass vermutet wird, dass die Funktion dieser FA-Proteine nach der FANCD2-Monoubiquitinierung liegt (= „downstream“) [29].

1.5. Diagnose

1.5.1. Klinischer Verdacht/ Zellkulturtechnik

Aufgrund der großen klinischen Variabilität, mit der sich Patienten mit Fanconi-Anämie präsentieren (siehe auch Abschnitt 1.3) und der niedrigen Inzidenz der Erkrankung, ist die klinische Diagnosestellung sehr erschwert. Sind keine angeborenen Fehlbildungen vorhanden, so fallen die meisten Kinder durch den Kleinwuchs oder durch das beginnende Knochenmarkversagen auf. Plötzlich auftretende Blutungen weisen auf eine Abnahme der Thrombozyten hin. Rekurrierende Infektionen können ein Hinweis für den Rückgang an immunkompetenten Zellen sein. Anämiesymptome wie Blässe und Kurzatmigkeit lassen an einen Rückgang der Erythrozytenproduktion denken.

FA-Zellen zeigen eine erhöhte Anzahl an spontanen Chromosomenbrüchen [43]. Werden FA-Zellen zusätzlich mit DNA-quervernetzenden Reagenzien behandelt, so steigt die Zahl dieser Brüche signifikant an. Diese initiale Beobachtung von Schröder-Kurth wird heutzutage als ein spezifischer diagnostischer Test genutzt (siehe Kapitel 1.4.4.). Eine schnellere und im Ergebnis vergleichbare Alternative ist die flow-cytometrische Messung des prozentualen Anteils an Zellen in der G2-Phase in FA-Zellen, die mit DNA-quervernetzenden Reagenzien behandelt wurden [71].

Eine Zuordnung zu einer entsprechenden Komplementationsgruppe war lange Zeit nur mit den sehr aufwendigen, langwierigen und anfälligen Zellfusionsexperimenten möglich (siehe Kapitel 1.4.4.1). Mittels retroviralem Gentransfer und anschließender Phänotypkorrektur (fehlender G2-Arrest in korrigierten Zellen) kann diese Zuordnung nun recht schnell erfolgen. Da die Komplementationsgruppe ein wichtiger prognostischer Marker für die Komplementationsgruppen FA-C, FA-D1 und FA-D2 ist, wird jeder Patient typisiert.

Ist die Diagnose FA in einer Familie gesichert, so sollten auch die anderen Geschwister auf FA untersucht werden, da der klinische Phänotyp auch innerhalb der Familie sehr variieren kann und so eventuell klinisch bisher unauffällige Geschwister übersehen werden können.

1.5.2. FANCD2-Westernblot

Ein relativ schnelles Screening ist das FANCD2-Immunoblotting. Hier wird untersucht, ob das FANCD2-Protein monoubiquitiniert werden kann, also in der langen Form (FANCD2-L) vorliegt, oder nicht. Ist kein FANCD2 nachweisbar, so gehört der Patient zur Komplementationsgruppe FA-D2 mit Defekt in dem *FANCD2*-Gen. Kann FANCD2 nicht monoubiquitiniert werden, so liegt der Defekt im FA-Komplex oder in FANCD2 selber (z.B. an K561). Ist jedoch sowohl eine FANCD2-S als auch eine FANCD2-L Bande nachweisbar, so liegt der Defekt entweder in *FANCD2* oder in einem der nachfolgenden FA-Gene (bisher identifiziert *FANCD1/BRCA2* und *FANCI*). In diesem Fall werden diese Gene im Westernblot hinsichtlich ihrer Expression un-

tersucht und letztendlich auch auf Mutationen sequenziert. Dieses Gen ist zu groß, um in herkömmliche retrovirale Vektoren eingebaut werden zu können.

Mittels dieses Screenings auf FANCD2-Monoubiquitinierung lassen sich auch FA-Patienten noch unbekannter Komplementationsgruppen grob einsortieren (up- oder downstream der FANCD2-Ubiquitinierung).

1.5.3. PND und PID

Die oben genannten Untersuchungen können auch mit Amnionzellen, Chorionzottenbiopsien oder fetalem Blut durchgeführt werden, was die Möglichkeit einer Pränataldiagnostik (PND) ermöglicht. Die erste Transplantation mit Stammzellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden, erfolgte bei einem Kind mit Fanconi-Anämie [72]. Kürzlich wurde erstmals die Präimplantationsdiagnostik (PID) beim Menschen genutzt, um aus *in vitro* befruchteten Embryonen solche zu selektieren, die gesund und HLA-identisch für das an FA erkrankte Geschwisterkind waren. Nach mehreren Versuchen konnte schließlich eines der implantierten Embryonen ausgetragen werden. Aus dessen Nabelschnurblut wurden Stammzellen für die Transplantation der erkrankten Schwester gewonnen. Obwohl dieses Vorgehen letztendlich erfolgreich war, mussten gesunde Embryonen zerstört werden, da sie nicht HLA-identisch mit der Schwester waren. Zudem konnten etliche implantierte Embryonen nicht ausgetragen werden, da sie *in utero* starben [73].

1.6. Therapie

Da die Mutation im betroffenen FA-Gen bei einem Patienten in jeder Körperzelle vorhanden ist, ist eine kurrative Therapie kaum möglich. Mittels einer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation lässt sich zwar das hämatologische Geschehen aufhalten, jedoch verhindert sie nicht das Auftreten anderer Tumoren.

1.6.1. Androgene, Zytokine

Initialtherapie bei beginnendem Knochenmarkversagen ist eine Therapie mit Androgenen und/oder Wachstumsfaktoren. Welcher Wirkungsmechanismus hinter der Androgenwirkung steht, ist noch nicht eindeutig erbracht worden [74]. Am häufigsten wird das orale Oxymetholon eingesetzt. Obwohl diese Therapie das Knochenmarkversagen um einige Zeit aufschieben kann, ist sie mit vielfältigen Nebeneffekten besetzt. Maskulinisierung, Akne, Wachstumsstillstand aufgrund frühzeitigem Schluss der Epiphysenfugen, erhöhte Leberwerte und ein erhöhtes Risiko für hepatische Adenome sind nicht zu vernachlässigende Nebenwirkungen. Unter allen Zytokinen, die

in der Behandlung von FA eingesetzt wurden, hat sich nur G-CSF als erfolgreich bewiesen.

1.6.2. Transplantationen: KMT, SCT, Nabelschnurblut

Kann das Knochenmarkversagen mit einer Androgentherapie nicht weiter aufgehalten werden, so kann mittels Transplantation versucht werden, das blutbildende System wieder zu repopularisieren. FA war die erste Erkrankung, bei der Stammzellen aus Nabelschnurblut transplantiert wurden [72]. FA-Patienten sind sensitiv gegenüber Strahlung und der Dosierung konventioneller Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen. Aus diesem Grund wurden alternative Schemata entwickelt. Die Prognose bei einem nicht passenden Spender war mit 33% Überleben nach 3 Jahren eher schlecht. Erste ermutigende Ergebnisse liefern Studien mit Fludarabin und ohne Bestrahlung.

1.6.3. Gentherapie

Die Beobachtungen über spontane Mosaikbildung in hämatopoetischen Zellen (siehe Kapitel 4.3.) zeigten, dass selbstkorrigierte Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den FA-Zellen haben und so das Knochenmark repopulieren können. Neben den vielen Nachteilen der Konditionierung bei einer konventionellen Transplantation wäre eine Gentherapie von hämatopoetischen Stammzellen *ex vivo* mit Replantation eine sinnvolle Alternative, da auf eine Konditionierung verzichtet werden könnte. Mittels onkoretroviralem, foamyviralem oder lentiviralem Gentransfer *in vitro* in die Stammzelle kann in Mausmodellen ähnlich wie bei der Diagnostik mittels retroviralem Gentransfer der FA-Phänotyp beseitigt werden. Diese korrigierte Stammzelle würde nach der Replantation das Knochenmark sukzessive repopulieren. Augenblicklich laufen in den USA einige Gentherapiestudien für FA-Patienten der Untergruppen FA-A und FA-G [75].

1.6.4. Supportive Chirurgie

Neben der Therapie der hämatologischen Komponente ist die Therapie anderer Malignome eine große Herausforderung. Hier wird vor allem auf chirurgische Therapien gesetzt, da jede Chemotherapie und Bestrahlung das Risiko erhöht, an einem Zweitmalignom zu erkranken. Im Mund- und Rachenraum sollten möglichst bereits Krebsvorstufen exzidiert werden, da so die radikale Entfernung invasiver Tumoren vermieden werden kann.

Darüber hinaus können plastische Operationen der kongenitalen Fehlbildungen, beispielsweise der Hand oder des Radius, die funktionelle Nutzung dieser deutlich verbessern. Ebenso können Fehlbildungen innerer Organe, beispielsweise am Herzen, den Nieren oder dem Darm, chirurgisch therapiert werden.

1.7. Einleitung Teil 2: Kandidatengene

Die Tatsache, dass allein in den letzten vergangenen vier Jahren fünf neue FA-Gene identifiziert werden konnten, zeigt, wie schnell das Wissen über die molekularen Grundlagen der FA wächst. Obwohl bereits 12 Komplementationsgruppen identifiziert und 11 Gene kloniert werden konnten, wissen wir, dass noch mehr Gene zu dem FA-Stoffwechsel zuzurechnen sind. Diese Annahme wird von der Tatsache unterstützt, dass einige Patienten bisher noch keiner Komplementationsgruppe zugeordnet werden konnten. FAAP100 konnte bisher noch nicht näher identifiziert werden und auch das Gen der Komplementationsgruppe FA-I ist noch nicht entdeckt. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene und deren physiologische Funktion näher beschrieben: RAD51, seine Homologe RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3; XPF, ERCC1, hSNM1, RAD54B und BRCA1.

1.7.1. FA und DNA-Reparatur

Obwohl der exakte Mechanismus des FA-Stoffwechselweges noch nicht endgültig aufgeklärt werden konnte, wird aufgrund des zellulären Phänotyps der FA-Zellen eine Funktion innerhalb der DNA-Reparatur angenommen. Die Beobachtung, dass Schäden, die durch DNA-quervernetzende Reagenzien wie Mitomycin C gesetzt werden, in FA-Zellen nicht adäquat repariert werden können, ist nicht nur ein diagnostisches Mittel [56]. Es wird angenommen, dass diese Art von DNA-Schäden über die Bildung von Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination (HR) behoben werden, wobei die FA-Proteine mit involviert sind [76]. Es werden prinzipiell zwei unterschiedliche zelluläre Reparaturwege, mit denen DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) repariert werden können, unterschieden: Die homologe Rekombination und die nicht homologe End-zu-End-Verknüpfung von freien DNA-Enden (non-homologous-end-joining, NHEJ) [77, 78].

1.7.2. Nicht homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ)

Die nicht homologe End-zu-End-Verknüpfung (non homologous end joining = NHEJ) ist eine einfache Verknüpfung von gebrochenen DNA-Enden, die in der G0/G1-Phase des Zellzyklus stattfindet. Dieser Prozess ist nicht unbedingt exakt und es können durch diese Art der Reparatur Deletionen begünstigt werden. Die wichtigsten Proteine der NHEJ sind die DNA-Proteinkinasen, die aus der katalytischen Untereinheit und dem Heterodimer aus KU80 und KU70 bestehen. Sie erkennen den DSB und prozessieren die Enden. Im zweiten Schritt werden diese markierten doppelsträngigen Enden mittels XRCC4-DNA-Ligase-IV-Komplex und dem Trimer Rad50-Mre11-Nbs1 zusammengefügt und ligiert (siehe auch Abbildung 1.15) [79].

Kürzlich wurde ein weiteres Protein (Cernunnos-XLF) beschrieben, über dessen Funktion noch wenig bekannt ist, das jedoch in den letzten Schritten der NHEJ zu liegen scheint [80-82].

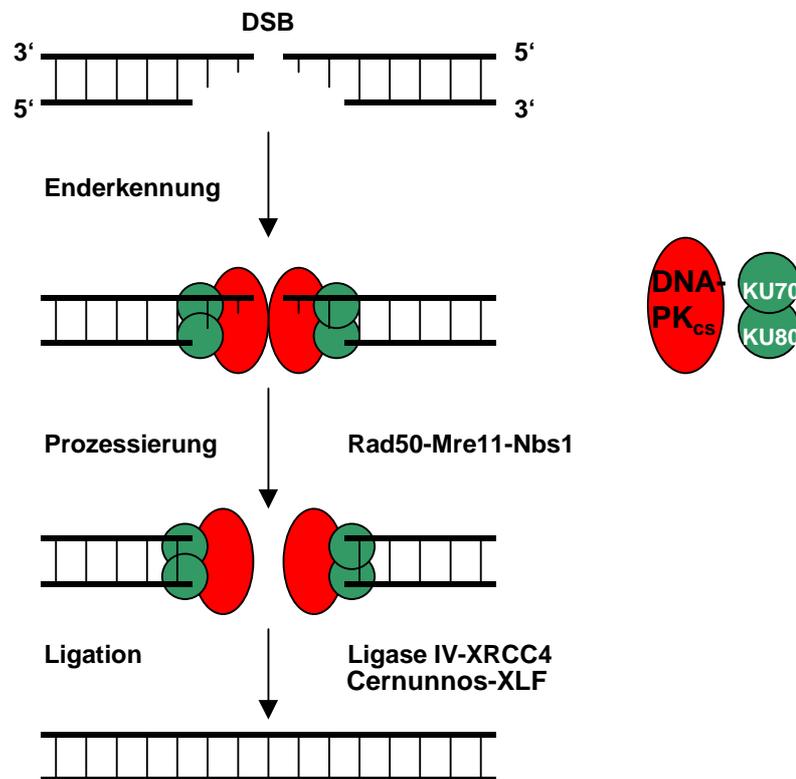


Abb. 1.15: DSB-Reparatur durch nicht homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ). Die Erkennung der DSB erfolgt durch die Proteine KU70 und KU80, die an die freien DNA-Enden binden und ihrerseits einen Komplex mit der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PK_{cs}) eingehen. Die geschädigten DNA-Enden werden durch den Trimer RAD50-Mre11-Nbs1 prozessiert. Hierdurch können einige Basenpaare verloren gehen. Die Ligation zum kontinuierlichen DNA-Molekül erfolgt mittels eines Komplexes aus LigaseIV und XRCC4. Die genaue Funktion von Cernunnos-XLF ist noch nicht näher bekannt. Modifiziert nach [83].

1.7.2.1. Schritte der NHEJ

Der Heterodimer KU70/80 bindet an die geschädigten DNA-Enden und rekrutiert die katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase [84], die weitere Proteine phosphoryliert und damit aktiviert. Die Zusammenfügung der markierten Enden erfordert den trimeren Komplex aus RAD50, Mre11 und Nbs1, welcher diese Enden prozessiert [85]. Im Gegensatz zur HR wird hier jedoch kein Einzelstrang gebildet, sondern die DNA bleibt in der doppelsträngigen Struktur. Lediglich die geschädigten Enden werden proteolytisch abgebaut. Genau an diesem Schritt jedoch gehen einige Nucleotide verloren, was im schlimmsten Fall eine Deletion in einem wichtigen DNA-

Abschnitt zur Folge hat. Anschließend katalysiert der XRCC4-DNA-Ligase-IV-Komplex den Ligationsschritt zwischen diesen beiden DNA-Enden [86].

1.7.2.2. Bedeutung der NHEJ

NHEJ wird hauptsächlich zur Reparatur von exogenen Schäden wie ionisierender Strahlung angewandt. Jedoch hat die NHEJ auch physiologische Funktion, beispielsweise in der V(D)J-Rekombination [87]. Wird in Mäusen die NHEJ gestört, so weisen diese eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung auf. Des Weiteren war der erste DNA-Reparaturdefekt, der in der Maus identifiziert wurde, ein Defekt in der V(D)J-Rekombination was zum Phänotyp des SCID führte [88].

1.7.3. Homologe Rekombination (HR)

Die homologe Rekombination ist ein sehr genauer Mechanismus, bei dem der intakte homologe DNA-Abschnitt des homologen Chromosoms als Grundlage der Reparatur genommen wird. Sie findet in der S/G2-Phase des Zellzyklus statt. Die HR ist jedoch nicht nur zur Reparatur von DSB oder DNA-quervernetzenden-Schäden verantwortlich, sondern auch für die Reparatur von kollabierten Replikationsgabeln [89, 90]. Ebenso ist sie an dem Schwester-Chromatid-Austausch beteiligt [91]. Der homologe Abschnitt für die HR stammt entweder vom Schwesterchromatid, welches nach der Replikation der DNA in der G2-Phase zur Verfügung steht oder vom homologen Chromatid. Grob kann die HR in drei Phasen gegliedert werden. Im ersten Schritt wird der DSB erkannt und die DNA-Enden werden prozessiert, so dass 3'-Überhänge entstehen [92]. Im nächsten Schritt finden die homologe Paarung und der Strang austausch statt. Im letzten Schritt nach erfolgter Reparatur werden die entstandenen Verbindungen (Holliday-Verbindungen) wieder gelöst. (siehe auch Abbildung 1.16).

1.7.3.1. Bindung und Prozessierung der Enden

Die initiale Erkennung von DSB scheint durch RAD52 zu erfolgen und damit gleichzeitig auch zwischen dem HR- oder dem NHEJ-Pfad zu entscheiden [93, 94]. Die DNA-Enden werden von dem tetrameren Komplex aus RAD50, Mre11 und Nbs1 prozessiert. Im Gegensatz zum NHEJ bleibt die DNA jedoch nicht in der doppelsträngigen Struktur, sondern aus dem Doppelstrangbruch entstehen 3'-Einzelstränge [95].

1.7.3.2. Homologe Paarung und Strangaustausch

Der eigentlich zentrale Schritt in der HR ist die homologe Paarung. RAD51 polymerisiert auf einzelsträngige DNA zu helikalen Nukleoproteinfilamenten, welche die Ein-

wanderung in doppelsträngige DNA mediiert [96]. Jedoch ist dieses Protein nur in der Interaktion mit weiteren Proteinen wirksam. RAD52 scheint die komplementäre einzelsträngige DNA zu binden und mit Hilfe von RPA die Bindung von RAD51 zu erleichtern [97]. Des Weiteren sind fünf RAD51-ähnliche Proteine, auch RAD51-Paraloge genannt, (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) nötig, damit RAD51 effektiv arbeiten kann sowie deren Interaktionen mit BRCA1, BRCA2 sowie FANCD1/BRIP1 [98, 99]. Ebenso stimuliert auch RAD54 die RAD51-katalysierte Austauschreaktion [100] und scheint dafür verantwortlich zu sein, dass der homologe Abschnitt auf der doppelsträngigen DNA gefunden wird. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Modelle. Nach Ristic [101] findet RAD54 den homologen Abschnitt an gepaarter Doppelstrang-DNA. Mazin hingegen [102] postuliert, dass die DNA lokal zuerst separiert wird, damit RAD54 den homologen Abschnitt findet. Erwähnenswert ist, dass BRCA2 direkt RAD51 über sogenannte BRC-Repeats bindet [103, 104] und die Oligomerisierung von RAD51 reguliert [105, 106]. Nach erfolgter Paarung der homologen Abschnitte wird mittels DNA-Polymerase der Defekt aufgefüllt.

1.7.3.3. Auflösung der Holliday-Verbindung.

Ein Heterodimer aus MUS81 und MMS4 mediiert die Auflösung der Holliday-Verbindung, so dass wieder zwei homologe Stränge entstehen und der DSB ohne Informationsverlust repariert werden kann [107].

1.7.3.4. Regulation der HR

Die Regulation der HR ist ein sehr komplexer und streng regulierter Prozess. Interessant an dieser Stelle ist, dass monoubiquitiniertes FANCD2 mit BRCA1, aber auch mit RAD51, kolokalisiert und direkt interagiert [21, 108]. Auch FANCD1/BRCA2 interagiert mit RAD51 [109]. Es scheint hierbei zwei Funktionen zu haben: die Unterdrückung unerwünschter HR und die Stimulierung im Bedarfsfall.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine nehmen eine zentrale Funktion in der Reparatur von DNA-quervernetzenden Schäden ein, besonders im Hinblick auf die HR. FA-Zellen zeichnen sich gerade durch einen Defekt in der Reparatur dieser Schäden aus. Die Identifikation von BRCA2 als ein FA-Gen und seine zentrale Position in dem FA-Stoffwechselweg bestätigte die Annahme, dass FA-Proteine an der HR beteiligt sind. Diese Parallelität macht jedes der erwähnten Proteine zu einem potentiellen Kandidatengen für die noch fehlenden FA-Gene.

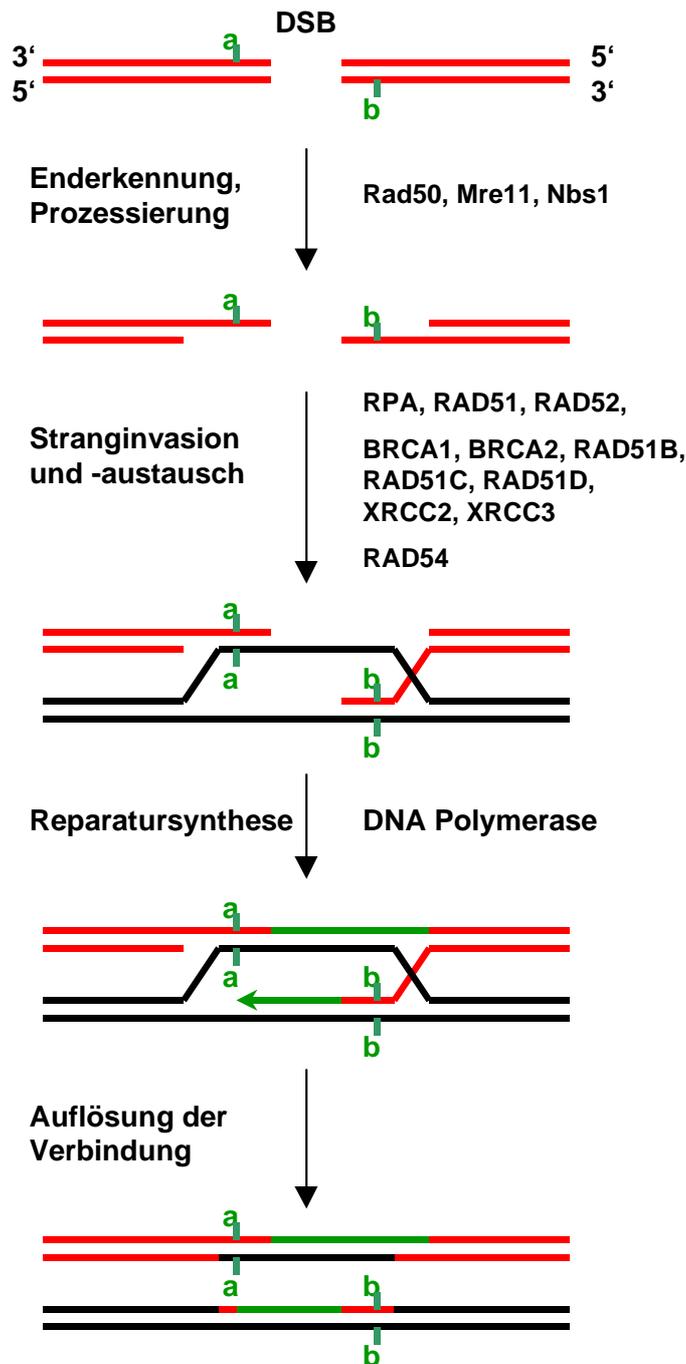


Abb. 1.16: Doppelstrangbruchreparatur mittels homologer Rekombination (HR). Die unterschiedlichen Farben stellen die doppelsträngige DNA mit der homologen Sequenz dar. Die Buchstaben a und b markieren als Beispiel zwei zueinander homologe Loci. Im ersten Schritt der HR wird der DSB erkannt und mittels RAD52 markiert. Der trimere Komplex RAD50-Mre11-Nbs1 prozessiert diesen DSB, indem er mittels nukleolytischen Verdau 3'-Überhänge produziert. An diese Einzelstränge polymerisiert das RAD51-Protein mit Hilfe einer Reihe anderer Proteine: RPA (= Replikationsprotein A), RAD52, BRCA1 und BRCA2 sowie die RAD51 Homologen XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C, RAD51D. RAD54 suchen auf dem Schwesterchromatid nach dem homologen DNA-Abschnitt und das Nucleoproteinfilament invadiert die doppelsträngige DNA. Nach dem Strangaustausch und der Paarung zwischen den homologen Abschnitten wird die DNA-Synthese von der DNA-Polymerase und ihren zugehörigen Faktoren ermöglicht und der Bruch wird aufgefüllt. Über die sogenannte Holliday-Verbindung lösen sich die zwei DNA-Stränge wieder voneinander und nach der Ligation ist der DSB ohne Verlust an Information repariert worden. Modifiziert nach [83].

1.8. Aufgabenstellung

Diese Arbeit hat zwei unterschiedliche Schwerpunkte. Einerseits wurden neu diagnostizierte Patienten subtypisiert, d.h. es wurde versucht, sie einer der bereits bekannten Komplementationsgruppen zuzuordnen.

Da darüber hinaus einige Patienten bisher keiner der bekannten Komplementationsgruppen zugeordnet werden konnten, gehen wir davon aus, dass noch mehr als die bisher bekannten Komplementationsgruppen existieren. Daher war das zweite Ziel dieser Untersuchung, Kandidatengene für FA anhand der noch nicht klassifizierten Patienten zu untersuchen. Die gewählten Kandidatengene sind alle DNA-Reparaturgene und in der homologen Rekombination involviert (RAD51, seine Homologe RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3; XPF, ERCC1, hSNM1, RAD54B und BRCA1). Nach der retroviralen Klonierung dieser Kandidatengene wurden primäre Fibroblasten dieser Patienten mit ihnen transduziert. Im Folgenden wurden sie analog zum Subtypisierungsprotokoll mit der DNA-quervernetzenden Substanz MMC behandelt und ihr Zellzyklusverhalten analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer beschrieben, die nach dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) angefertigt wurden.

2.1.1. Chemikalien

Angesetzt wurden Lösungen und Puffer mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Millipore GmbH, Eschborn) und für 20 min bei 121°C und 2-3 bar autoklaviert sofern sie für Bakterienkultivierungen eingesetzt wurden. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden, wenn notwendig, durch Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Corning Costar, Bodenheim) filtriert. Wenn nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien der Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Serva (Heidelberg) mit dem Reinheitsgrad p.a. verwendet.

2.1.1.1. Plasmid-DNA Isolierung:

Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3
50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 100 mg/l RNase	0,2 N NaOH 1% SDS	60 ml 5 M Kalium Acetat 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H ₂ O

1x TAE-Puffer	1x TE-Puffer
40 mM Tris-Acetat, pH 7,5 1 mM EDTA 10 mM EDTA, pH 8,0 100 mg/l RNase	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

Transformationspuffer 1	Transformationspuffer 2
100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM KAc 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerol	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 15% Glycerol
Einstellen pH auf 5,8 mit Eisessig	Einstellen pH auf 6,8 mittels NaOH

2.1.2. Plasmide

2.1.2.1. Kandidatengene

Von Prof. Detlev Schindler:

pCMVTag3B/RAD51A
pCMVTag3B/RAD51B
pCMVTag3B/RAD51C
pCMVTag3B/RAD51D
pCMVTag3B/XRCC2
pCMVTag3B/XRCC3
pS11ERCC1IEG
pS11RAD54BIEG
pS11DCL1AIEG (=hSNM1)
pS11XPFIEG
pS11FL*IEG

von Prof. Ronald Kanaar

pcDNA3/SNM1
pcDNA3/XPF

Von Prof. Dieter Niederacher

pCR3/BRCA1

pS11IEG3
pS11IN
pS11EGIN
pgMEG5AB

2.1.2.2. Env-Expressionsplasmide

Für die transiente Virusherstellung in HEK 293T-Zellen wurden folgende Env-Expressionsplasmide verwendet:

pHIT60 *gag-pol*-Expressionskonstrukt [110]
pczVSV-G Expressionskonstrukt für das Glykoprotein G von VSV [111]

Beide Plasmide wurden von Herrn PD Dr. Dirk Lindemann, Institut für Virologie der Universität Dresden, zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Nukleinsäuren und Oligonukleotide

2.1.3.1. Größen- und Molekulargewichtsstandards

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

2.1.3.2. Oligonukleotide für Sequenzierung

S11IEG3 5'MCS: CGCGTCTTGTCTGCTGCAGC

IRES 3': AGCGGCTTCGGCCAGTAACGT

MWG, Biotec Ebersberg

2.1.4. Kits

Rapid DNA Ligation Kit: Roche, Mannheim

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

Template suppression reagent: Applied Biosystems, Foster City,

POP-6, Applied Biosystems

Plasmid-Maxi-Preparation-Kit: Qiagen, Hilden

DyeEx 2.0 Spin Kit: Qiagen, Hilden

NucleoSpin Extract Kit: Macherey-Nagel, Düren

2.1.5. Zellen

2.1.5.1. Adhärent wachsende Zelllinien

293T humane embryonale Nierenzellen, die stabil das SV40 Large-T-Antigen exprimieren [112]. Die Zellen wurden von Herrn Prof. Dr. Rethwilm, Institut für Virologie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

HT1080 humane Fibrosarkomzelllinie, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig)

2.1.5.2. Retrovirus-Produzentenzelllinie

Für die stabile Produzentenzelllinie wurde pgMEG5AB, eine auf pg13-Zellen [113] basierte stabile Produzentenzelllinie benutzt, die GALV-pseudotypisierte EGFP-exprimierende MLV-Partikel freisetzt [58]. Als Vektor dient hier der MSCV 2.1 [114].

2.1.5.3. Primäre Zellen

Die Fibroblasten von FA-Patienten wurden in einer Kooperation mit Prof. Dr. Arleen Auerbach, IFAR, New York, anonymisiert zur Verfügung gestellt oder stammten von Prof. Dr. Detlev Schindler, Humangenetik, Würzburg. Alle Patienten bzw. deren An-

gehörigen haben sich damit einverstanden erklärt, dass die Zellen für die Forschung verwendet werden.

2.1.6. Medien und Zusätze

Die zur Kultur der eukaryotischen Zelllinien verwendeten Medien wurden vor ihrer Verwendung mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS; Gibco/BRL, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco/BRL) und 2 mM Glutamin (Gibco/BRL) versetzt. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose (Gibco/BRL) wurde zur Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien benutzt. Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Sigma) wurde bei der Kultivierung von 293T-Zellen und pgMEG5AB-Produzentenzellen bei der Virusproduktion eingesetzt.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Techniken

2.2.1.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmide wurden die *E. coli*-Stämme GM48, SCS110 und DH5α verwendet. Aus einer bei -80°C gelagerten Glycerinkultur wurde ein Vereinzelausstrich dieser *E. coli*-Stämme auf einer LB-Agarplatte (Sigma) durchgeführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 5 ml LB-Medium (Sigma) über Nacht bei 37°C und 180 rpm (rounds per minute) inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml dieser Vorkultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 (A_{600}) inkubiert. Danach blieben die Bakterien für 5 Minuten auf Eis und wurden daraufhin sedimentiert (10 Minuten, 750 x g, 4°C). Dieses Sediment wurde in 40 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert, für 90 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde in 8 ml Transformationspuffer 2 aufgenommen und zu je 100 µl aliquotiert. Diese Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.2. Transformation von Bakterien

Transformationskompetente Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut (ca. 10 min), mit $\leq 0,1$ µg Plasmid-DNA bzw. mit 7 µl eines Ligationsansatzes versetzt, vorsichtig vermischt und weitere 20 min auf Eis gelassen. Der Hitzeschock für die Aufnahme der Vektoren in die Zellen erfolgte für 90 sec bei 42°C. Anschließend wurden sie sofort auf Eis abgekühlt, 800 µl vorgewärmtes LB-Medium wurden hinzu gegeben und bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Nach einer Stunde wurden 200 µl dieses Ansatzes auf eine vorgewärmte Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibioti-

kum ausgestrichen. Als Selektionsmarker für erfolgreich transformierte Bakterien wurden Ampicillin bzw. Kanamycin verwendet (100 µg/ml, Serva). Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C über Nacht, bis deutlich sichtbare Einzelkolonien zu identifizieren waren.

2.2.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Es wurden zwei Methoden angewandt, um high-copy-Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren. Wurden größere Mengen benötigt, wurde die präparative Aufreinigung dieser Plasmid-DNA mit dem „Plasmid Maxi-Preparation Kit“ der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Das Sediment wurde in TE-Puffer aufgenommen.

Wurde die Plasmid-DNA für einen analytischen Verdau zur Identifizierung positiver Klone nach Transformation benötigt (Mini-Prep), so wurde sie nach dem Protokoll in dem Laborhandbuch „Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) isoliert. Hierzu wurden 2 ml Bakterienkultur zentrifugiert (1 min, 15.000 x g) und das Sediment in 300 µl des Puffers 1 resuspendiert. 300 µl von Puffer 2 wurden hinzugefügt, vorsichtig vermischt und 5 min bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden 300 µl von Puffer 3 zugegeben und nach 10 min Inkubation auf Eis bei 4°C für 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß umgefüllt und die darin enthaltene Plasmid-DNA mit 600 µl Isopropanol präzipitiert. Nach 30 min Zentrifugation (Raumtemperatur, 15.000 x g) wurde der Überstand erneut umgefüllt und mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde 10 min bei Raumtemperatur und 15.000 x g zentrifugiert und das Sediment in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer resuspendiert.

2.2.1.4. DNA-Mengenbestimmung durch Absorptionsmessung

Die Konzentration der verwendeten DNA-haltigen Lösungen wurde mittels Absorption in einem Spektralphotometer gemessen. Nach Durchtritt der Strahlung durch eine Quarzküvette von 1 cm Dicke entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Darstellung der Absorption zwischen 210 und 310 nm erlaubte Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA, wobei das Maximum dieser Kurve bei 260 nm liegen sollte. Der Quotient bei 260 nm und 280nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.5. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde sowohl bei der Kontrolle von Klonierungen als auch zum Design neuer Plasmide eingesetzt (Enzyme und Puffer von New England Bio-

labs, Frankfurt). Dazu wurden bis zu 1 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl in dem entsprechenden Reaktionspuffer mittels Restriktionsenzym 1 h lang verdaut. Die Temperatur war abhängig von dem verwendeten Enzym. War die eingesetzte DNA-Menge größer, wurde das Reaktionsvolumen und die Inkubationszeit entsprechend verlängert.

Zur Kontrolle nach einer Klonierung wurde einerseits ein Einzelverdau durchgeführt. Hier wurde ein Enzym gewählt, dessen Schnittstelle im entsprechenden Insert lag und das nur dann das Plasmid linearisierte, wenn es das Insert enthielt. Sollte zusätzlich die Orientierung des Insertes untersucht werden, wurden entweder mehrere Enzyme oder ein Enzym mit mehreren Schnittstellen eingesetzt. Dabei wurden die Enzyme so ausgesucht, dass der Verdau mit ihnen je nach Orientierung des Inserts unterschiedlich große Fragmente lieferte. Die Beurteilung der Fragmentlänge erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (Agarose von Biozym, Hessisch Oldendorf).

2.2.1.6. Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese diente sowohl der Identifizierung von DNA-Fragmentengrößen nach Restriktionsverdau als auch zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und anschließender Isolierung für weitere Klonierungsexperimente.

Die Agarosekonzentration wurde zwischen 0,8 und 2% gewählt, je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Die Agarose wurde in der entsprechenden Menge TAE-Puffer durch Kochen gelöst und anschließend mit 100 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Das Gel wurde in dem dafür vorgesehen Gelträger gegossen und nach dem Erstarren in eine Kammer mit TAE-Laufpuffer gelegt. Die zu analysierenden Proben wurden mit einem Ladepuffer aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer angelegten Feldstärke von ca. 5 V/cm. Nach Anregung im UV-Licht konnten die DNA-Banden aufgrund ihrer Wanderungstrecke im Vergleich zu einem Längenstandard identifiziert werden.

2.2.1.7. DNA-Elution aus Agarosegelen sowie Aufreinigung von DNA

Um DNA aus Agarosegelen zu eluieren oder nach enzymatischem Verdau aufzureinigen, wurde das „NucleoSpin Extract Kit“ von Macherey-Nagel, Düren, nach Anweisung des Herstellers, benutzt.

2.2.1.8. Dephosphorylieren der Vektorenden

Wurde der Vektor für Klonierungsexperimente nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten, bestand die Gefahr, dass er während der Ligationsreaktion wieder mit sich selbst ligierte. Um dies zu verhindern, wurde mittels alkalischer Phosphatase die

Phosphatgruppe am 5'-Ende entfernt. Da eine Bindung zwischen zwei DNA-Fragmenten nur unter Abspaltung einer freien Phosphatgruppe ausgebildet werden kann, wurde so eine Re-Ligation verhindert und es entstanden im Idealfall nur rekombinierte Plasmide mit einem Insert. Anschließend wurde das Restriktionsenzym durch Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

2.2.1.9. Ligation

Vor dem Einsatz der Vektoren und DNA-Fragmente in der Ligation wurden diese aufgereinigt (s.o.) und mit 30 µl Elutionspuffer eluiert. Die Ligation wurde mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ der Firma Roche, Mannheim, nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden Vektor-DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:2 eingesetzt.

2.2.1.10. Sequenzierung

Für die Sequenzierung der zuvor in Bakterien amplifizierten und durch eine Plasmidpräparation gewonnenen DNA der rekombinanten Plasmide wurde das „Big Dye® Terminator v1.1 cycle sequencing kit“ in einem Gesamtvolumen von 20 µl genutzt. Die anschließende Reaktion erfolgte im Biometra Thermocycler mit Heizdeckel nach folgendem Schema: 26 Zyklen, 96°C 30 sec, 55°C 30 sec, 60°C 4 min, 4°C Pause.

Zur Aufreinigung des Produktes wurde das „DyeEx 2.0 Spin Kit“ von Qiagen eingesetzt. Das entstandene Sediment wurde für 5 min in einer Speed-Vac-Zentrifuge (Plus SC110A, Savant) getrocknet und in 30 µl "template suppression reagent" aufgenommen. Die Denaturierung der Proben erfolgte für 2 min bei 90°C. Die Sequenzierung erfolgte mit der Matrix POP-6 im ABI Prism® 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems.

2.2.2. Zellkulturtechniken

2.2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Zellen wurden in Zellkulturgefäßen (Corning Costar, Bodenheim; BD Falcon, Bedford, MA, USA) mit Kulturmedium in dafür vorgesehenen Inkubatoren bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit Ca²⁺/Mg²⁺-freier Phosphatgepufferter Saline (PBS; PAA, Cölbe) gewaschen und für 8 – 10 Minuten mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02% w/v; PAA) im Brutschrank inkubiert. Die abge-

lösten Zellen wurden in Medium resuspendiert und 1:4 bis 1:20 (bezogen auf die Ausgangszellzahl) in neue Zellkulturflaschen überführt.

Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte nach Trypanblau (Sigma)-Ausschlussfärbung und Auszählung lebender Zellen in einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.2.2. Kryokonservierung adhärent wachsender eukaryotischer Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die mit Trypsin abgelösten Zellen zentrifugiert (200 x g, 5 Minuten, RT) und in Medium resuspendiert ($1 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml). Nach Zusatz von 5% (v/v) Dimethylsulfoxid (Sigma, St. Louis, USA) wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen (Corning Costar, Bodenheim) überführt und in Isopropanolgefüllten Einfriercontainern (Nalgene Labware, Rochester, USA) zunächst bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt. Die Röhrchen wurden in den Stickstofftanks nach Möglichkeit in der Gasphase gelagert. Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und unmittelbar nach dem Auftauen in eine Flasche oder Platte mit Kulturmedium überführt. Nach 8–24 Stunden wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

2.2.2.3. Transiente Herstellung retrovirushaltiger Überstände

Für die Transfektion wurden ecoFNX sowie 293T-Zellen verwandt. Die 293T-Zellen wurden mit drei Plasmiden kotransfiziert, welche die für die Viruspartikelbildung notwendigen Gene und den Transfervektor mit dem gewünschten Transgen enthielten. Es wurden ein *gag-pol*-Expressionskonstrukt, ein *env*-Expressionskonstrukt und ein retroviraler Vektor, der das Transgen enthielt, verwendet. Die Verteilung der benötigten Gene auf verschiedene Plasmide diente dazu, die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass sich durch Rekombination replikationsfähige Retroviren bilden können. Für die Transfektion der 293T-Zellen wurde das Reagenz FuGENE 6 (Roche, Indianapolis) verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden $4,5 \times 10^6$ 293T-Zellen in einem Volumen von 10 ml in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Für die Transfektion wurden dann 940 μl zusatzfreies Medium (DMEM; Gibco/BRL, Karlsruhe) 45 μl Transfektionsreagenz (FuGENE 6, Roche) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden je 5 μg Plasmid-DNA hinzugegeben und nach 15 min Inkubation auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Statt DMEM wurde Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco/BRL, Karlsruhe) verwendet, denn dieses HEPES-haltige Medium besitzt eine größere Pufferkapazität und verringert somit die Gefahr einer Virusdegeneration durch einen sauren pH-Wert. 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurde das virushaltige Medium von den Platten abgenommen und filtriert (Filter von Millipore, Schwalbach, oder Corning Costar, Porengröße 0,45 μm), um einen zellfreien, virushaltigen Überstand

zu generieren. Der so gewonnene Überstand wurde entweder frisch verwendet oder bei -80°C eingefroren.

Des Weiteren wurden für die Produktion von onkoretroviralen Vektoren sogenannte Verpackungszellen benutzt (ecoFNX) [115], die stabil die viralen Proteine Gag, Pol und das ecotrope Env exprimieren. In diese Zellen wird der Vektor mit dem eigentlichen Zielgen transient eingebracht und es können hochtitrige Überstände geerntet werden. Dabei wurde nach dem oben genannten Protokoll verfahren, jedoch wurden in 960 μl zusatzfreies Medium 30 μl Transfektionsreagenz gemischt und nach 5 min Inkubation 10 μg Plasmid-DNA hinzugegeben.

2.2.2.4. Erzeugung virushaltiger Überstände mit stabilen Produzentenzelllinien

Es wurden 50.000 pg13-Zellen je Vertiefung einer 6-Loch-Platte, welche vorher gelatinisiert wurde [0,1% (w/v); Sigma], ausgesät. Am nächsten Tag wurden diese Zellen mit virushaltigen Überständen transduziert, wobei 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protaminsulfat (Sigma) zugegeben wurde. Protaminsulfat ist ein Polykation, von dem gezeigt wurde, dass es die Transduktionseffizienz erhöht [116]. Man nimmt an, dass die initiale unspezifische Bindung zwischen Retrovirus und Zielzelle durch Polykationen erhöht wird, indem diese die elektrostatische Abstoßung zwischen den Membranen aufheben [117]. 24 Stunden nach der Transduktion wurde das Medium gewechselt. Waren die Zellen 80% bis 90% konfluent, wurde anstelle von DMEM IMDM als Medium zur Virusernte verwendet (s.o.). 24 Stunden nach diesem Mediumwechsel wurde das virushaltige Medium abpipettiert und filtriert. Die zellfreien Überstände wurden entweder sofort eingesetzt oder bis zu einer Verwendung aliquotiert bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden mit frischem Medium versorgt. Diese Transduktion der Zellen wurde bis zu dreimal wiederholt. Master-aliquots der Zellen wurde eingefroren und bei Bedarf rekultiviert, um erneut virushaltigen Überstand zu gewinnen.

2.2.2.5. Titration

Der Virustiter ist ein Maß dafür, wie viele Viruspartikel pro Volumeneinheit im Überstand enthalten sind. Die Titer der hergestellten Überstände wurden funktionell durch die Resistenz von transduzierten Zellen aufgrund der Expression des Resistenzgens gegen das Neomycinanalog G418 ermittelt. Als Zielzellen für die Titration wurden HT1080-Zellen verwendet. 35.000 HT1080-Zellen wurden je Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zielzellen mit zunehmenden Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-6} -verdünnt, 1 ml/Loch) der Überstände transduziert und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protaminsulfat (Sigma) zugegeben. 24 Stunden nach der Transduktion erfolgte ein Mediumwechsel und 72 Stunden nach der Transduktion wurde dem Medium das Neomycinanalogon G418 (Gibco/BRL, Karlsruhe) in einer Konzentration von 0,6 - 0,8 mg/ml aktive Substanz zugesetzt. Die Selektion auf G418-resistente Zellen erfolgte

über einen Zeitraum von 7 -10 Tagen mit einem Medium/G418- Wechsel alle 48 – 72 Stunden. Innerhalb dieser Zeit waren alle nicht transduzierten Zellen einer Kontrollplatte abgestorben.

Die Auswertung des Titers erfolgte mittels Methylenblaufärbung der gewachsenen Kolonien. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit einer 33%igen Methylenblaulösung gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Kolonien gezählt, wobei sich der Titer aus der Verdünnung und der Anzahl der Kolonien errechnet (Einheit: colony forming unit (CFU/ml)).

2.2.2.6. Transduktion von Patientenfibroblasten

Die Mehrzahl der verwendeten Patientenfibroblasten wurden aus flüssigem Stickstoff aufgetaut (s.o.) und auf gelatinierte 10 cm-Platten expandiert. Fibroblasten, die auf dem Postweg die Klinik erreichten, wurden noch am selben Tag auf neue gelatinierte 10 cm-Platten umplattiert und auf diesen expandiert. Einen Tag vor der Transduktion wurden die Zellen in gelatinierte T25-Zellkulturflaschen umgesiedelt. Dabei wurde die Anzahl der auszusäenden Zellen so gewählt, dass sie 50% des Flaschenbodens bedeckten. Die Transduktion erfolgte mit virushaltigem Überstand, wobei 2,5 – 4 ml pro T25-Zellkulturflasche verwandt wurden. Zusätzlich wurden 10 µg/ml Protaminsulfat hinzugegeben. 24 Stunden nach der Transduktion erfolgte ein Mediumwechsel und 48 - 72 Stunden nach der Transduktion wurde bei einigen Konstrukten dem Medium G418 in einer Konzentration von 0,8 mg/ml zugesetzt. Die Selektion auf G418-resistente Zellen erfolgte solange, bis auf der Kontrollplatte (nicht transduzierte Zellen) alle Zellen abgestorben waren. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche passagiert.

2.2.2.7. MMC-Behandlung von Patientenfibroblasten

Nach der G418-Selektion wurden die Fibroblasten erneut gesplittet und am folgenden Tag dem Medium Mitomycin C in einer Konzentration von 10 ng/ml (= 33 nM) zugegeben. Die Inkubation erfolgte über drei Tage. Anschließend wurden die Zellen für die Zellzyklusanalyse geerntet.

2.2.2.8. Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Da bei der Zellzyklusanalyse der DNA-Gehalt der Zellen gemessen wird, sind nur die Zellkerne der Fibroblasten mittels Durchflusszytometrieanalyse nötig. Um diese zu erhalten, wurden die Zellen wie folgt verarbeitet. Im ersten Schritt wurden die Zellen intensiv gewaschen und anschließend mittels Trypsin von den Kulturplatten gelöst. Die trypsinierten Zellen wurde mit 600 µl BSA-Lösung (1 %ig in PBS) gewaschen. Die Zellen wurden abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 10

min bei 7°C und 500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 300 µl BSA-Lösung resuspendiert und anschließend wieder sedimentiert. Dieses Sediment wurde in 300 µl eiskaltem PBS aufgenommen. Unter ständigem Vortexen wurden insgesamt 800 µl 98%iger Ethanol zur Fixation hinzugegeben. Die Lagerung der Zellkerne erfolgte bei –20°C für mindestens 24h. Nach dieser Lagerung wurden die Zellkerne sedimentiert (10 min, 600 x g, 4°C) und in 300 µl RNase-Lösung (100 µg/ml RNase) resuspendiert. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellkerne 10 min bei 10°C und 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment gevortext. Abhängig von der Größe dieses Sediments wurde es in 100 bis 200 µl FACS-Puffer [0,5% BSA (w/v) in PBS, 10 µg/ml Propidiumiodid (PI; Sigma)] aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach Überführen in FACS-Röhrchen (BD Falcon) erfolgte die Messung mit einem FACScan oder FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Je nach Fragestellung wurden 10.000 bis 20.000 Ereignisse bei maximal 300 events/sec aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „CellQuest“ (Becton Dickinson); die Analysen dieser Daten mittels ModFit® (Verity Software House).

2.2.2.9. Fluoreszenzmikroskopie

Um zu überprüfen, ob eine Transfektion oder Transduktion erfolgreich war, wurde die EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem inversen Durchlichtmikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen), das mit einer Quecksilberlampe ist. Die Transfektionsrate bzw. die Transduktionsrate – also der Anteil an grün leuchtenden Zellen – wurde mittels FACS ermittelt.

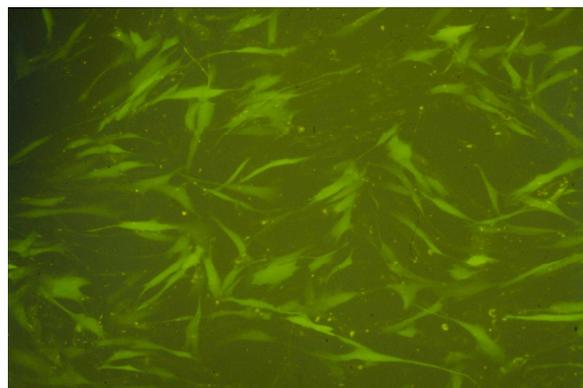


Abb. 2.1: Grün fluoreszierende Fibroblasten: Menschliche Fibroblasten in Zellkultur, die mit dem S111EG3-Vektor transduziert wurden und das grün fluoreszierende Proteine EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) exprimieren.

3. Ergebnisse

3.1. Typisierung

3.1.1. Transduktion von Patientenfibroblasten und Typisierung

Die Transduktion von Fibroblasten erfolgte in T25-Zellkulturflaschen mit virushaltigem Überstand, der von stabilen Produzentenzelllinien gewonnen wurde. 24 Stunden nach der Transduktion erfolgte ein Mediumwechsel.

Patienten mit neu diagnostizierter Fanconi-Anämie werden möglichst schnell einer Komplementationsgruppe (siehe Einleitung) zugeordnet. Hierzu standen alle bisher bekannten Fanconi-Anämie-Gene (*FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCL*), in Retroviren eingebaut, zur Verfügung. Mit retrovirushaltigen Überständen wurden die Patientenzellen transduziert. Als Zielzellen können sowohl Fibroblasten als auch lymphoide Zellen (B- und T-Zellen) verwendet werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Fibroblasten untersucht, die aus Amnionflüssigkeit, der Haut oder dem Knochenmark gewonnen wurden.

3.1.2. Transduktionsschema:

3.1.2.1. G418-Selektion

Sämtliche Retroviren mit FA-Genen, außer dem S11FLIEG-Vektor, enthalten ein Neomycin-Resistenz-Gen (siehe Vektorkarten, Abbildung 3.1 und 3.2). Mit Hilfe dieses Resistenzgenes kann eine Selektion zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen vorgenommen werden. Hierbei sterben die nicht transduzierten Zellen unter G418-Therapie ab, da sie das Neomycinanalogon nicht abbauen können. Die Selektion mit G418 wird solange durchgeführt, bis alle Fibroblasten abgestorben sind, die mit einem Retrovirus transduziert worden sind, welches keine G418-Resistenz (= NEO-R) trägt (MEG5AB). Diese Selektion dauert im Schnitt eine Woche. Als zweite Selektionskontrolle werden die Fibroblasten zeitgleich in einem weiteren Kulturgefäß mit einem Retrovirus transduziert, welches eine NEO-R sowie ein EGFP-Gen trägt (S11EGIN). EGFP ist ein Protein, welches unter UV-Anregung grün leuchtet. Nach der einwöchigen Selektion mit G418 müssen alle Fibroblasten, die mit S11EGIN transduziert wurden und noch leben, nach Anregung mit blauem Licht grün leuchten. Mit dieser G418-Selektion wird erreicht, dass bei den folgenden Untersuchungen dieser Fibroblasten gewährleistet ist, dass alle Zellen mit einem Retrovirus infiziert wurden und auch das zu testende FA-Gen enthalten. Somit können nicht-infizierten Zellen das Ergebnis nicht verfälschen. Der Vektor mit *FANCL* enthält keine Neo-R, d.h. hier kann keine G418-Selektion vorgenommen werden. Die Transduktionseffizienz wird in diesem Fall über den prozentualen Anteil an grün leuchtenden Zellen im FACS ermittelt.

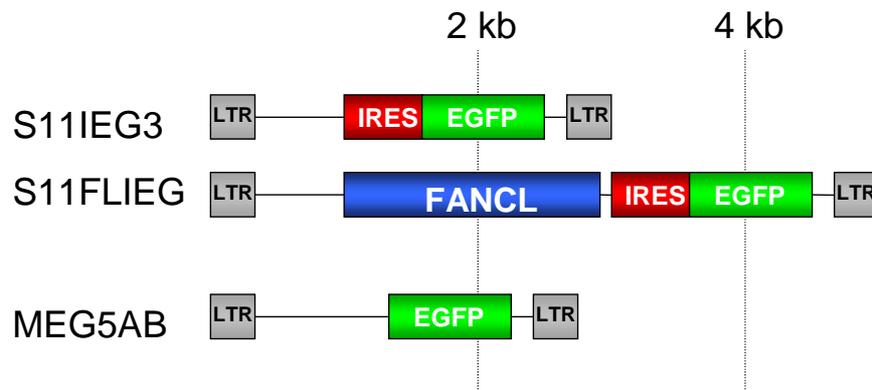


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des FANCL-Retrovirus und seinen Kontrollen. Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Fanconi-Anämie-Genen wurde das FANCL-Gen nicht in einen Vektor mit einem Neomycinresistenzgen kloniert. Als Markergen enthalten diese Konstrukte das grün fluoreszierende Protein (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*). Es stammt von dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) des Jellfisches *Aequorea victoria*.

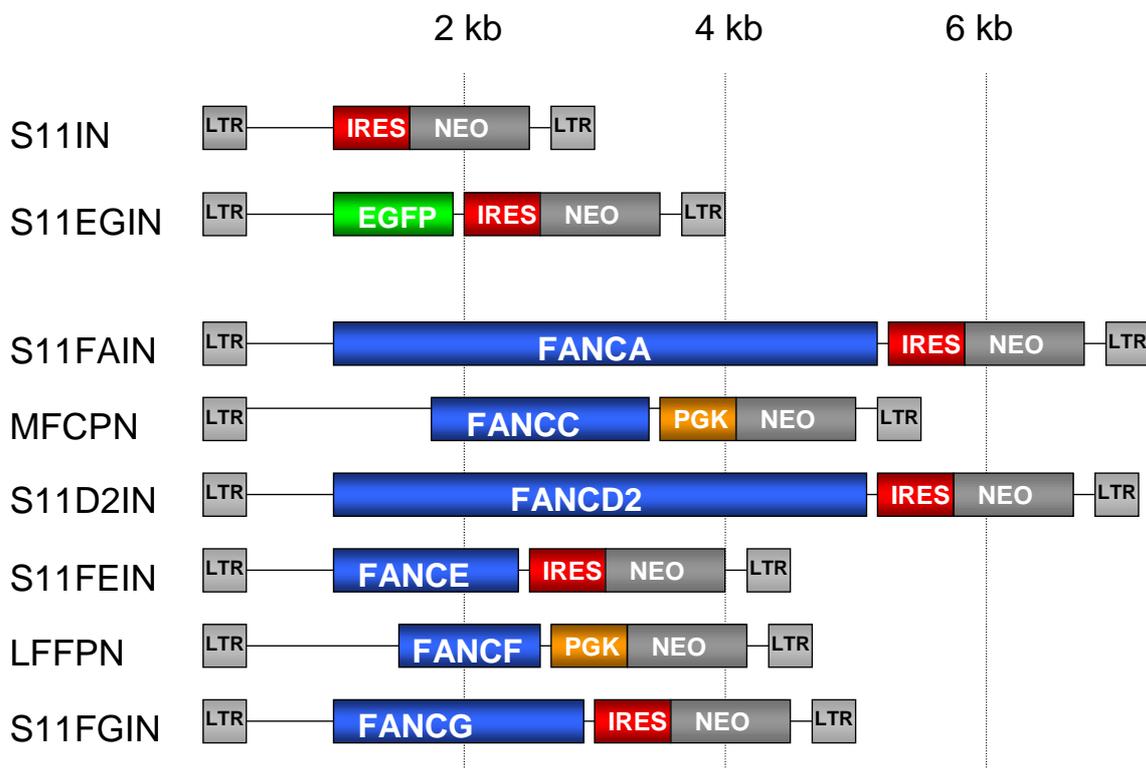


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der verwandten Retroviren: Die proviralen Genome werden zu beiden Seiten von den im Laufe der reversen Transkription gebildeten „*long terminal repeats*“ (LTRs) abgeschlossen. Die einzelnen Gene sind durch Rechtecke dargestellt. Fanconi-Anämie-Gene sind blau gekennzeichnet. NEO steht für Neomycinphosphotransferase, welches das Neomycinanalogon G418 abbaut.

3.1.2.2. MMC-Selektion

3.1.2.2.1. Theorie

FA-Zellen zeichnen sich durch eine Hypersensitivität gegen DNA-quervernetzende Reagenzien wie z.B. Mitomycin C (MMC) und Cisplatin aus. Dabei wird angenommen, dass MMC als bivalentes Addukt an die DNA bindet und damit den DNA-Stoffwechsel schädigt. FA-Zellen können diesen Schaden nicht reparieren. Die Folge dieser Hypersensitivität der FA-Zellen, oder dieser Unfähigkeit den entstandenen Schaden zu reparieren, ist ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase (siehe Einleitung 1.4.2).

3.1.2.2.2. Praktische Durchführung

Nach der G418-Selektion wurden die Fibroblasten 3 Tage mit 33 nmol MMC inkubiert, anschließend fixiert und der relative DNA-Gehalt der Zellen mittels FACS gemessen. Hypersensitiv wurden die Zellen bezeichnet, wenn sie nach Behandlung mit MMC einen G2-Arrest aufwiesen (siehe auch Kapitel 1.4.2.2.). Abhängig von der Korrektur der MMC-Hypersensitivität wurden die Patienten den Komplementationsgruppen A, C, D2, E, F, G, L zugeordnet. Korrigiert bezeichnete den Zustand, wenn ein Virus mit einem Fanconi-Anämie-Gen die MMC-Hypersensitivität aufhebt. Konnte keine Zuordnung erfolgen, das heißt, korrigierte kein Virus die Zellen, so wurden sie der Gruppe nonACD2EFGGL zugeordnet.

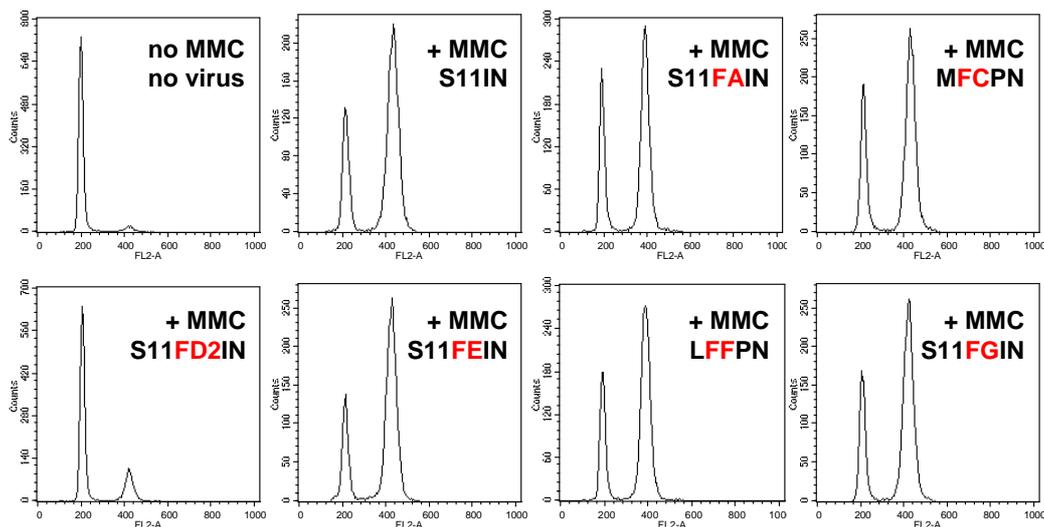


Abb. 3.3: Typisierung von Patientenfibroblasten: Hier dargestellt ist ein Patient mit einem Gendefekt in dem Fanconi-Anämie-Gen D2 (= *FANCD2*). In der ersten Abbildung ist der normale Zellzyklus der Fibroblasten ohne Behandlungen gezeigt. Die folgenden Abbildungen stellen dieselben Zellen nach der Behandlung mit einem Retrovirus dar. Allein im Fall von *FANCD2* kann eine Korrektur des Zellzyklusarrestes nachgewiesen werden.

3.1.3. Kontrollen

Da die Aussagen über Hypersensitivität und Korrektur aus diesem Typisierungsprotokoll relative Aussagen sind, kommt den Kontrollen in dieser Klassifikation besondere Bedeutung zu.

Gen	Vektoren	1. Selektion	2. Selektion	Fragestellung
∅	Kein Virus	∅	∅	G2-Arrest?
<i>EGFP</i>	MEG5AB	∅	∅	Transduktionseffizienz?
<i>EGFP</i>	MEG5AB	G418	∅	100% tot?
<i>EGFP, Neo</i>	S11EGIN	G418	∅	100% grün?
<i>EGFP, Neo</i>	S11EGIN	G418	∅	G2-Arrest?
<i>Neo</i>	S11IN	G418	MMC	G2-Arrest/Korrektur?
<i>FANCA, Neo</i>	S11FAIN	G418	MMC	G2-Arrest/Korrektur?
<i>FANCC, Neo</i>	MFCPN	G418	MMC	G2-Arrest/Korrektur?
<i>FANCD2, Neo</i>	S11FD2IN	G418	MMC	G2-Arrest/Korrektur?
<i>FANCE, Neo</i>	S11FEIN	G418	MMC	G2-Arrest/Korrektur?
<i>FANCF, Neo</i>	LFFPN	G418	MMC	G2-Arrest/Korrektur?
<i>FANCG, Neo</i>	S11FGIN	G418	MMC	G2-Arrest/Korrektur?
<i>EGFP</i>	S11IEG3	∅	∅	Transduktionseffizienz?
<i>EGFP</i>	S11IEG3	∅	MMC	G2-Arrest/Korrektur?
<i>FANCL, EGFP</i>	S11FLIEG	∅	MMC	G2-Arrest/Korrektur?

Tab. 3.1: Transduktionsschema des Typisierungsprotokolls mit Kontrollen. Typisierungsprotokoll, um einen Patienten der Komplementationsgruppen FA-A, -C, -D2, -E, -F, -G oder -L zuordnen zu können. ∅ = keine Behandlung.

3.1.3.1. Fibroblastenkontrolle

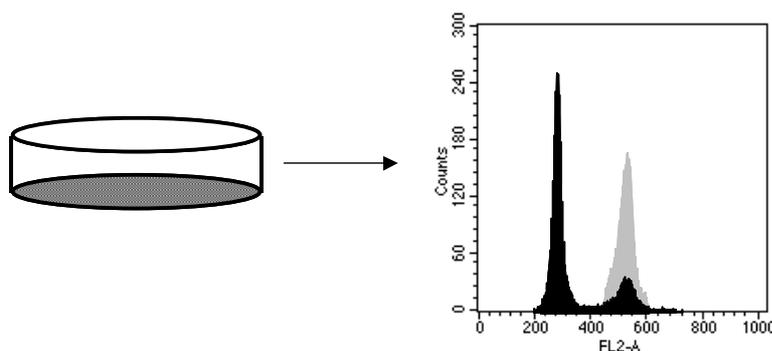


Abb. 3.4: Fibroblastenkontrolle. Die kultivierten Zellen werden in einem unbehandelten Zustand auf ihren prozentualen DNA-Gehalt hin untersucht.

Die erste Kontrolle betrifft die Fibroblasten und deren Wachstumsverhalten. Sie werden unbehandelt (weder mit Neo noch MMC) fixiert und auf ihren DNA-Gehalt untersucht. Zellen, die in diesem unbehandelten Zustand einen G2-Arrest aufweisen, sind für das vorliegende Typisierungsprotokoll nicht geeignet.

3.1.3.2. Transduktionseffizienz

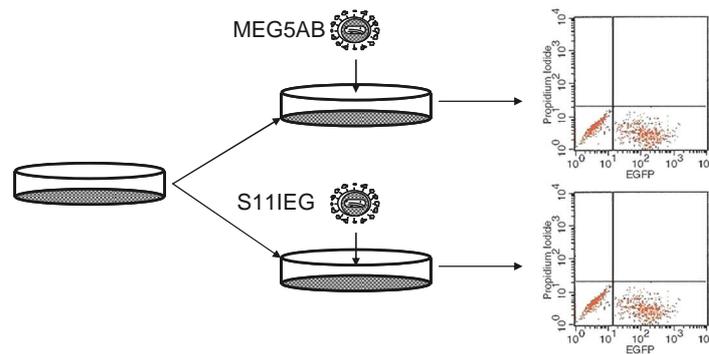


Abb. 3.5: Transduktionseffizienz: Über die Transduktion mittels der grün fluoreszierenden Viren MEG5AB und S11IEG konnte die Transduktionseffizienz über FACS ermittelt werden.

Die Transduktionseffizienz, d.h. wie viele Fibroblasten von einem Virus transduziert wurden, wurde mittels des prozentualen Anteils an grün fluoreszierenden Zellen bestimmt. Verwendet wurden die Vektoren MEG5AB und S11IEG3 ohne jede weitere Behandlung.

3.1.3.3. G418-Selektionskontrolle

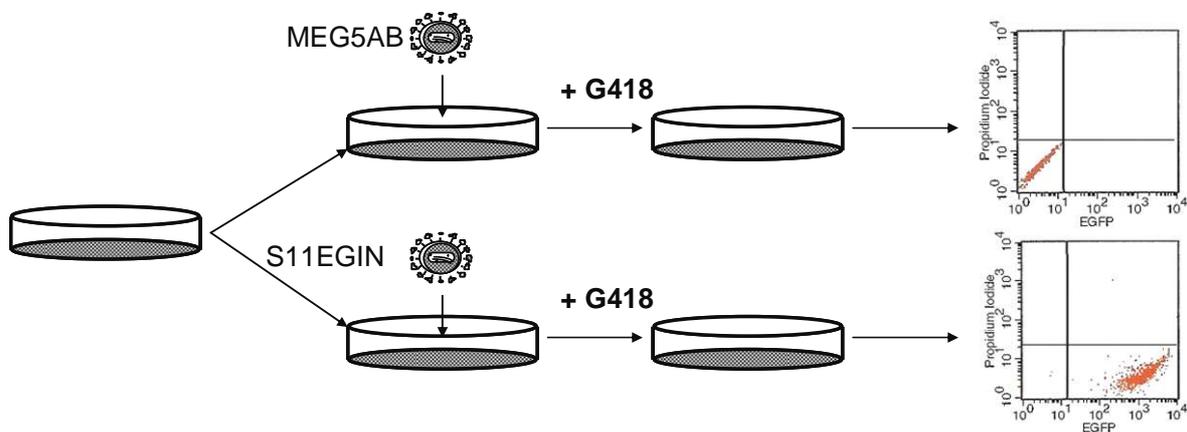


Abb. 3.6: G418-Selektionskontrolle: Negativkontrolle zur Dauer der G418-Behandlung. Der prozentuale Anteil an lebenden Zellen wurde mittels FACS ermittelt.

Die negative Selektionskontrolle für die G418-Behandlung stellten MEG5AB-transduzierte Fibroblasten dar. Diese müssen nach der einwöchigen Selektion gestorben sein, da sie kein Gen enthalten, das G418 abbaut und ihnen somit eine Resistenz verleihen würde. Eine positive Selektionskontrolle erfolgte über den Anteil der grün fluoreszierenden Zellen, die mit dem S11IEGIN Vektor transduziert wurden und nach der G418-Selektion noch leben. Hier sollen 100% grün fluoreszieren.

3.1.3.4. Gentransferkontrolle

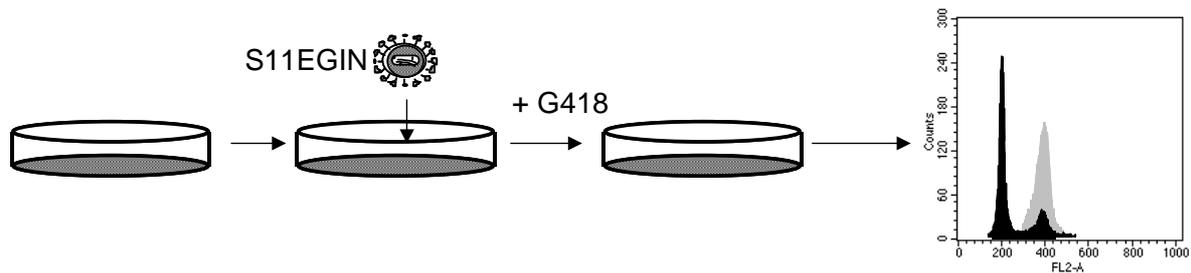


Abb. 3.7: Gentransferkontrolle: Test der Retroviren ohne Fanconi-Anämie-Gene, ob sie das Zellzyklusverhalten der Patientenfibroblasten verändern.

S11EGIN wurde auch zur Gentransferkontrolle verwendet, bei der untersucht wird, ob die Transduktion mit einem Virus und die G418-Behandlung das Zellzyklusverhalten der Zellen verändern. Fibroblasten, die mit S11EGIN transduziert und G418-selektiert waren, werden auf ihr Zellzyklusverhalten untersucht. Zeigen Zellen in diesem Stadium einen G2/M-Arrest, kann dieser Patient ebenfalls nicht für dieses Typisierungsprotokoll verwendet werden.

3.1.3.5. Vektornegativkontrolle

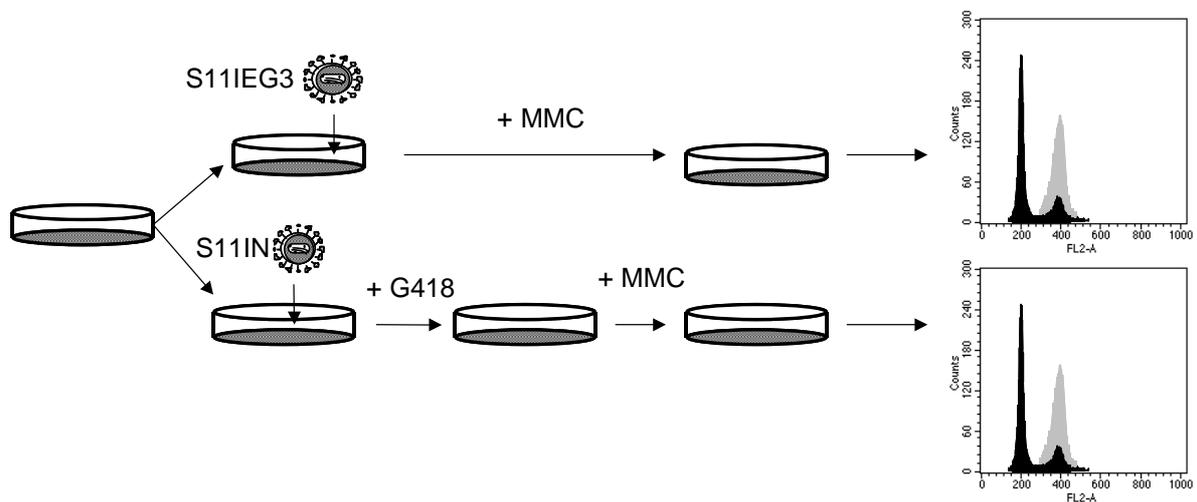


Abb. 3.8: Negativkontrolle: Untersuchung der Ausgangsvektoren

Ziel der Vektornegativkontrolle ist es, sicherzustellen, dass der Ausgangsvektor, in den die Fanconi-Anämie-Gene kloniert wurden, die MMC-Hypersensitivität nicht aufhebt. Sie ist somit die Negativkontrolle für die Vektoren. Für die FA-Gene *FANCA*,

FANCC, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* war dies der S11IN Vektor. Für *FANCL*, der in den S11IEG3-Vektor kloniert wurde, war die Negativkontrolle der S11IEG3-Vektor.

3.1.3.6. FANCL

Da mit S11FLIEG keine G418-Selektion möglich ist, mussten die Endergebnisse auf die Transduktionseffizienz umgerechnet werden. Mittlerweile existiert ein S11FLIN-Vektor, der ebenso wie die anderen Fanconi-Anämie-Gene über G418 selektiert werden kann, was die Effektivität und die Trennschärfe der Aussagen deutlich erhöht. Die Typisierungen in dieser Arbeit wurden mit dem S11FLIEG-Vektor ausgeführt.

3.2. Ergebnisse der Typisierung

In dieser Arbeit wurden insgesamt 12 Patienten während des Zeitraumes von einem Jahr erstmals auf Fanconi-Anämie untersucht.

Num- mer	% DNA-Gehalt der G2/M-Phase nach Gentransfer von cDNA								spezifische Korrektur [%]	Ergebnis
	S11IN	A	C	D2	E	F	G	L		
1	55,5	13,0	x	x	x	x	x	x	42,5	A
2	55,0	24,1	59,3	58,1	55,2	56,8	60,2	69,4	31,1	A
3	54,6	27,1	59,2	58,0	67,6	72,2	57,3	x	30,2	A
4	74,6	67,7	71,2	19,8	78,5	70,7	70,4	x	47,9	D2
5	58,9	60,2	58,4	11,7	57,3	63,7	63,6	x	45,6	D2
6	73,8	68,4	74,1	24,4	67,5	69,4	68,7	x	43,1	D2
7	64,2	62,4	63,1	27,7	60,6	64,0	60,3	69,7	32,6	D2
8	54,3	52,8	x	14,4	x	x	x	x	38,4	D2
9	58,9	54,6	x	34,8	x	x	x	57,1	19,8	D2
10	40,2	x	x	26,5	x	x	x	x	13,7	D2
11	18,2	13,7	6,5	10,2	2,9	4,1	2,5	x	1,6	nonFA
12	30,9	31,0	30,3	47,2	41,7	37,8	31,5	x	0,6	nonFA

Tab. 3.2: Übersicht über die Ergebnisse der Typisierung. Eine Typisierung, d.h. eine Zuordnung zu einer Komplementationgruppe, wird über die spezifische Korrektur bestimmt. Unter spezifischer Korrektur wird das Aufheben des G2/M-Arrestes verstanden, der sich in einem geringeren prozentualen DNA-Gehalt in dieser Zellzyklusphase detektieren lässt. Die spezifische Korrektur errechnet sich aus der Differenz des prozentualen DNA-Gehaltes der G2/M-Phase mit dem zweitniedrigsten G2/M-Arrest und den korrigierten Zellen. Beispiel anhand Nummer 4: Zweitniedrigster G2/M-Arrest bei S11FAIN, korrigierte Zellen bei S11D2IN: $67,7 - 19,8 = 47,9$. Patienten, bei denen keine Daten zu dem *FANCL*-Gen vorhanden sind, wurden vor der Veröffentlichung der Sequenz von *FANCL* typisiert. A = S11FAIN, C = MFCPN, D2 = S11D2IN, E = S11FEIN, F = LFFPN, G = S11FGIN, L = S11FLIEG.

3.2.1. Patienten der Komplementationsgruppe A

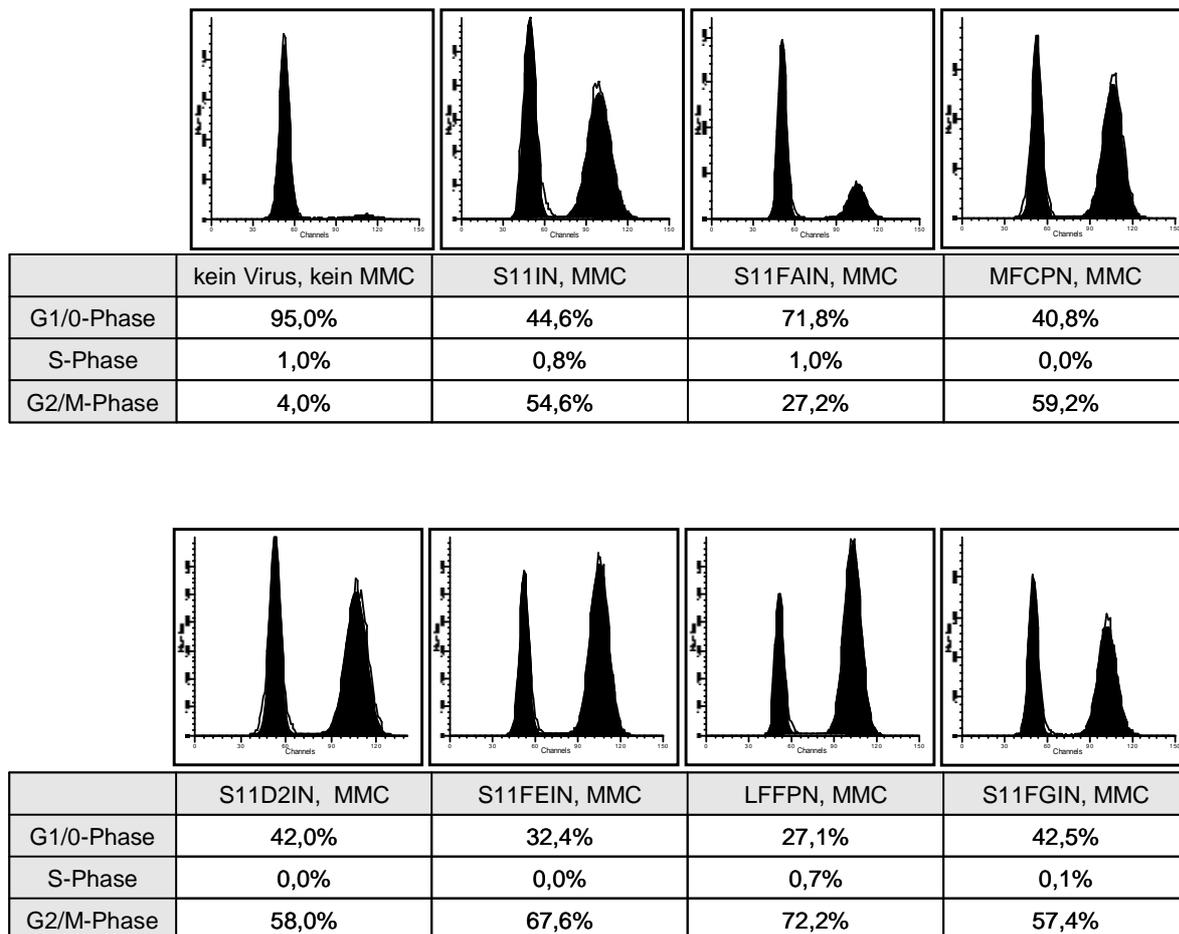


Abb. 3.9: Typisierung von Patient 3. Deutlich ist die Korrektur bei den Zellen zu erkennen, die mit der *FANCA*-cDNA transduziert wurden. In diesem Beispiel beträgt die spezifische Korrektur 30,2% (Differenz aus dem prozentualen DNA-Gehalt der G2/M-Phase von den Zellen, die mit S11FGIN und denen, die mit S11FAIN transduziert wurden).

Patient 1 wurde nur mit der *FANCA*-cDNA transduziert, da ein älteres Kind dieser Familie ebenfalls mit Fanconi-Anämie des Subtyps FA-A diagnostiziert war.

Abbildung 3.9 stellt exemplarisch die FACS-Ergebnisse eines Patienten der Komplementationsgruppe FA-A dar. Deutlich ist der G2/M-Arrest in den Fibroblasten nach MMC-Behandlung erkennbar (siehe Abbildung 1.9). Die Transduktion mit den FA-Genen der anderen Subtypen kann diesen G2/M-Arrest im Gegensatz zu der *FANCA*-cDNA nicht aufheben.

3.2.2. Patienten der Komplementationsgruppe D2

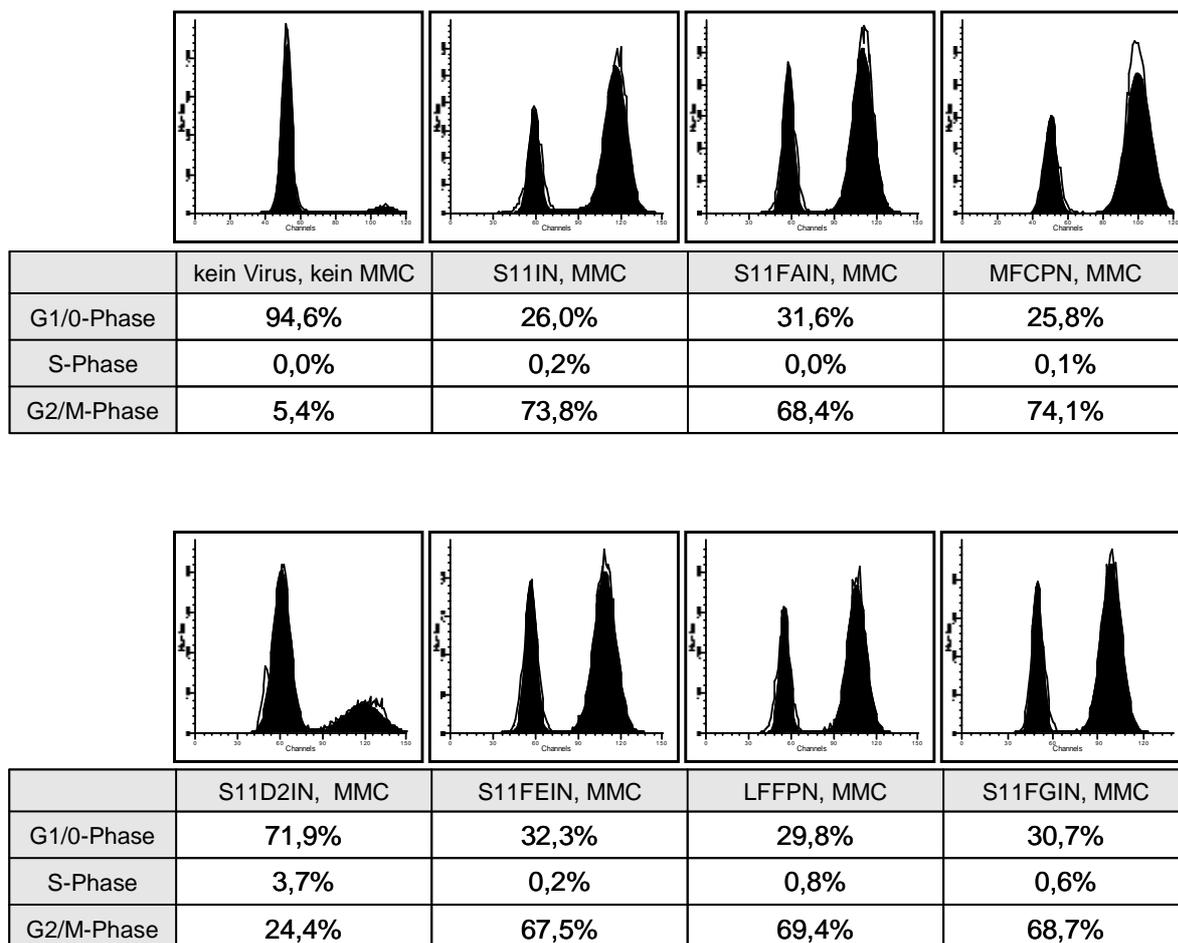


Abb. 3.10: Typisierung von Patient 6. Deutlich ist die Korrektur bei den Zellen zu erkennen, die mit der *FANCD2*-cDNA transduziert wurden. In diesem Beispiel beträgt die spezifische Korrektur 43,1% (Differenz aus dem prozentualen DNA-Gehalt der G2/M-Phase von den Zellen, die mit S11FEIN und denen, die mit S11D2IN transduziert wurden).

Bei Patienten 7, 9 und 10 haben Geschwister Fanconi-Anämie der Komplementationsgruppe D2, so dass diese Patienten jeweils nur mit *FANCD2* bzw. zusätzlich noch mit *FANCA* transduziert wurden. Wie aufgrund des X-chromosomal-rezessiven und autosomal-rezessiven Erbgangs der Fanconi-Anämie anzunehmen ist, haben alle diese Patienten den gleichen, die Krankheit verursachenden, Gendefekt wie ihre Geschwister.

3.2.3. Patienten 11 und 12 – nonFA

Bei diesen zwei Patienten konnte die klinische Verdachtsdiagnose „Fanconi-Anämie“ mit der hier dargestellten Technik nicht bestätigt werden. Alle beide wiesen keine MMC-Sensitivität auf, d.h. eine Behandlung mit MMC führte nicht zu einem Zellzyklusarrest. Diese Patienten wurden auf Fanconi-Anämie-ähnliche Krankheiten, wie zum Beispiel das Nijmegen-breakage-Syndrom (= NBS) weiter untersucht, was jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

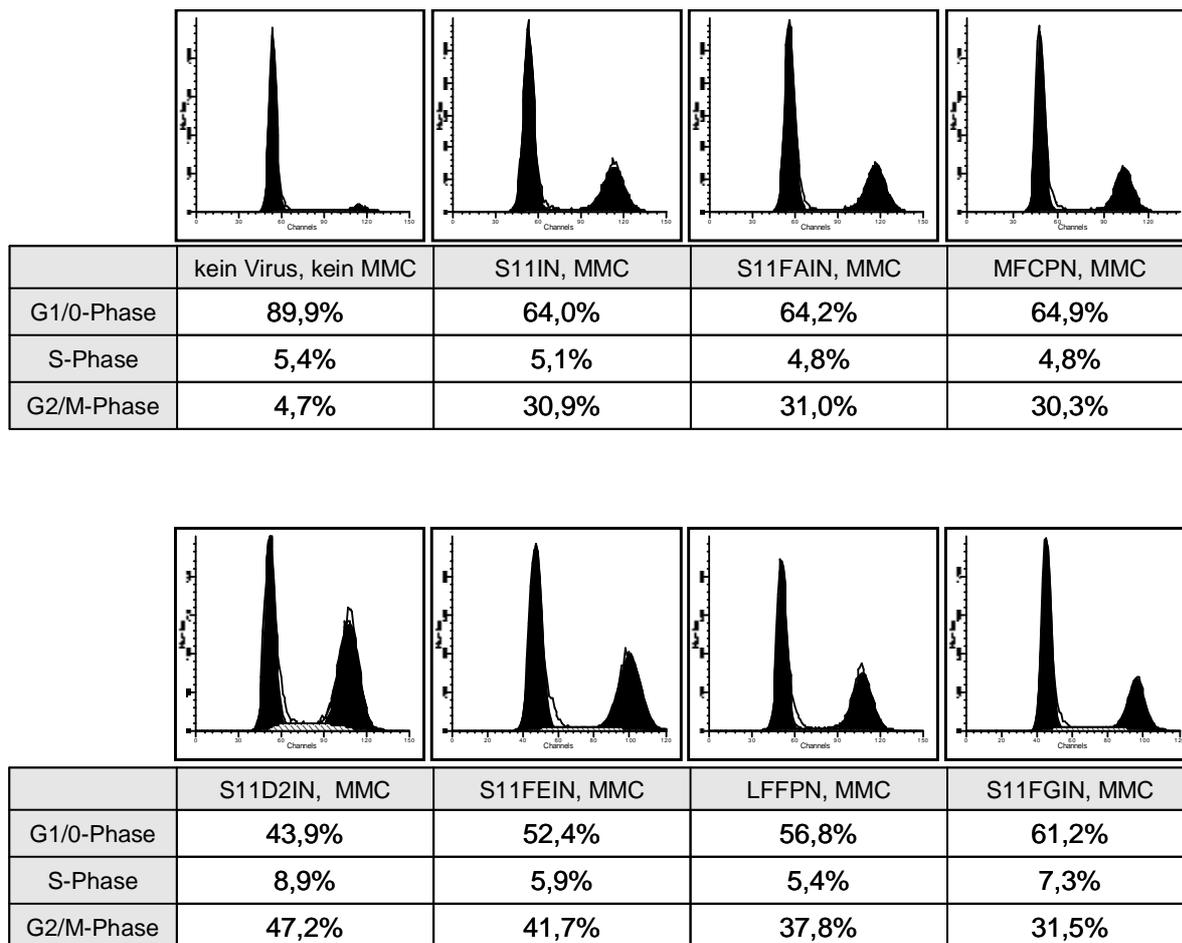


Abb. 3.11: Typisierung von Patient 12. Deutlich ist zu erkennen, dass eine Behandlung mit MMC nicht zu einem G2/M-Arrest führt. Im Durchschnitt ist jedoch der DNA-Gehalt in der G2/M-Phase der Zellen, die mit MMC behandelt wurden, im Vergleich zur Negativkontrolle (= kein Virus, kein MMC) um bis zu 31,1% höher. Dieser höhere Prozentsatz stellt keinen G2/M-Arrest dar, sondern die Zellen bleiben länger in der G2/M-Phase, da hier der gesetzte Schaden repariert wird.

3.2.4. Zusammenfassung der Typisierung

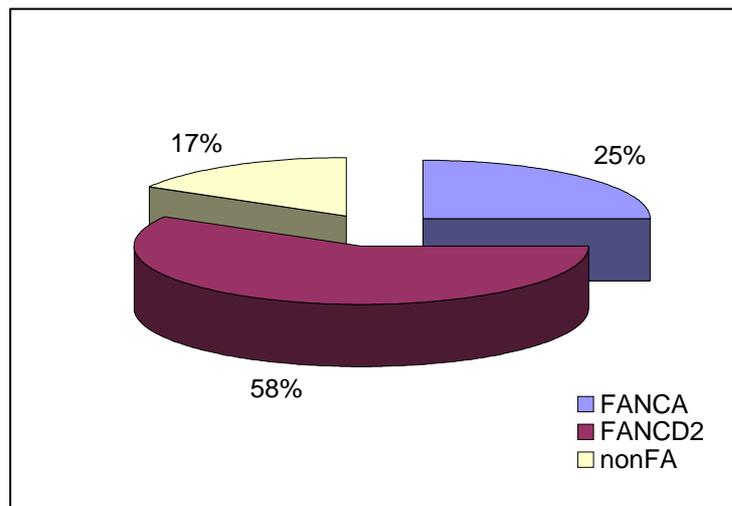


Abb. 3.12: Primär typisierte Patientenfibroblasten in Düsseldorf im Zeitraum von einem Jahr. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Typisierungsergebnisse von den in dieser Arbeit untersuchten 12 Patienten.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 12 Patienten während des Zeitraums von einem Jahr primär typisiert, d.h. auf Fanconi-Anämie untersucht und, wenn möglich, einem Subtyp zugeordnet. Von diesen konnten drei Patienten der Komplementationsgruppe FA-A zugeordnet werden. Der weitaus größte Anteil wurde jedoch mit der Komplementationsgruppe FA-D2 typisiert. Bei zwei Patienten konnte die klinische Verdachtsdiagnose „Fanconi-Anämie“ mit der hier dargestellten Technik nicht bestätigt werden. Sie reagierten auf die MMC-Behandlung mit keinem G2/M-Arrest.

Die hier dargestellte statistische Verteilung spiegelt nicht die allgemeine Häufigkeit von Mutationen in den *FANCA*- und *FANCD2*-Genen wieder (siehe Tabelle 1.1. in Kap. 1.2).

3.3. Komplementationsgruppe FA-L

Da das *FANCL*-Gen erst im Oktober 2003 publiziert wurde, wurden alle Patienten, auf die das oben genannte Suchkriterium zutraf, vor jeder weiteren Verwendung untersucht, ob sie der Komplementationsgruppe FA-L zugeordnet werden konnten. Dies geschah analog zu dem beschriebenen Typisierungsprotokoll mit den dazugehörigen Kontrollen. Die Auswertung erfolgte über den Vergleich des G2/M-Arrests. Dabei wurden die Fibroblasten, die mit dem *FANCL*-Gen transduziert und mit MMC behandelt wurden, verglichen mit den Fibroblasten desselben Patienten, die mit der Kontrolle (S11IEG3) transduziert und mit MMC behandelt wurden. Der prozentuale DNA-Gehalt in den Zellzyklusphasen wurde mit dem Programm ModFit® ermittelt.

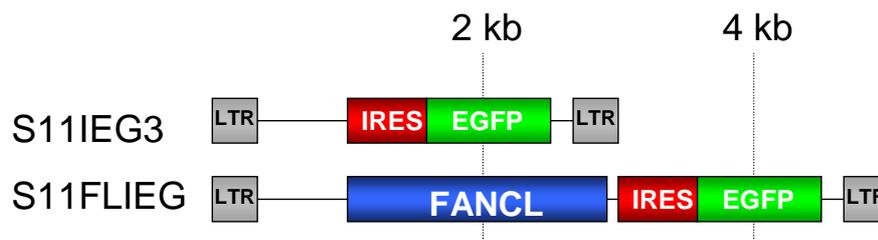


Abb. 3.13: Schematische Darstellung des FANCL-Retrovirus. Markergen des S11FLIEG-Vektors ist das grün fluoreszierende Protein (EGFP). Die entsprechende Negativkontrolle ist der Ausgangsvektor S11IEG.

3.3.1. Ergebnisse der Typisierung mit dem *FANCL*-Gen

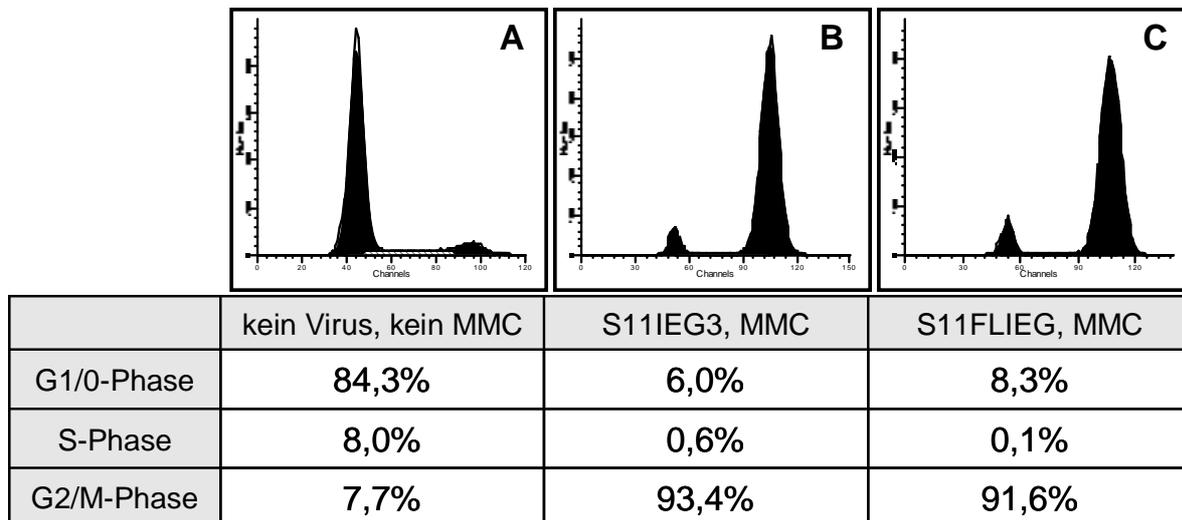


Abb. 3.14: Messdaten zur FANCL-Typisierung anhand von Fibroblasten eines FA-Patienten. Abbildung A stellt den prozentualen DNA-Gehalt der nicht behandelten Fibroblasten dar. In Abbildung B sind die Kontrollen aufgeführt, die mit MMC behandelt wurden, nachdem sie mit dem Kontrollvektor S11IEG3 transduziert wurden. Abbildung C zeigt die zu untersuchende Bedingung dieser Messreihe. Hier sind die Fibroblasten mit S11FLIEG transduziert und mit MMC behandelt worden. In der Tabelle unterhalb der jeweiligen Abbildung ist der prozentuale DNA-Gehalt dieser Zellen nach den Zellzyklusphasen aufgelistet.

Deutlich ist anhand dieser Abbildung 3.14 zu erkennen, dass sich die Zellen, die weder transduziert noch mit MMC behandelt wurden, hauptsächlich (84,3%) in der G1-Phase und nur zu 7,7% in der G2/M-Phase befinden (Abbildung A). Diese Abbildung stellt den klassischen Zustand einer sich in Kultur befindlichen Zellpopulation dar. Wurden die Fibroblasten mit MMC behandelt, so treten sie in den G2/M-Arrest ein, was in Abbildung B (= Kontrolle) zu sehen ist. Hier befinden sich nur 6,0% der Zellen

in der G0/G1-Phase, während 93,4% in der G2/M-Phase anzutreffen sind. In diesem Beispiel kann eine Transduktion mit dem *FANCL*-Gen (Abbildung C) diesen G2/M-Arrest nicht aufheben, und es befinden sich weiterhin die meisten Zellen (91,6%) in der G2/M-Phase. Dies sind nur 1,8% weniger als im Vergleich zur Kontrolle. Es wurde also keine Komplementation mit dem *FANCL*-Gen erreicht, und es kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem Patienten keine Mutation im *FANCL*-Gen ursächlich für die FA ist. Da in dieser Arbeit nur Patienten untersucht wurden, die bisher als nonFAACD2EFG klassifiziert waren, muss der Defekt bei diesem Patienten in einem der anderen bekannten FA-Gene (B, D1, I, J und M) oder in einem bisher noch nicht identifizierten Gen liegen.

Patient	G2/M-Phase [%]			Differenz zur Kontrolle [%]
	kein Virus, kein MMC	S11IEG3	S11FLIEG	
1	7,7	93,4	91,6	-1,8
2	3,2	30,1	29,5	-0,6
3	47,9	45,7	48,8	3,1
4	7,7	40,1	39,1	-1,0
5	24,2	71,0	73,6	2,6
6	23,9	65,8	68,0	2,2
7	3,8	44,4	52,3	7,9
8	9,8	57,6	64,1	6,5
9	6,7	52,0	44,5	-7,5
10	2,1	62,1	55,0	-7,1
11	9,1	53,0	63,4	10,4
12	8,0	66,0	64,7	-1,3
13	2,9	75,6	78,0	2,4
14	1,2	66,8	69,7	2,9
15	7,3	58,9	57,1	-1,8
16	3,5	73,1	68,9	-4,2
17	8,7	83,0	57,8	-25,2
18	24,1	55,0	69,4	14,4

Tab. 3.3: Ergebnisse der Typisierung mit dem *FANCL*-Gen. Aufgeführt sind die prozentualen DNA-Gehalte der G2/M-Phasen von den untersuchten Patienten zu folgenden Bedingungen: „kein Virus, kein MMC“, „MMC und Transduktion mit dem Kontrollvektor S11IEG3“ sowie „MMC und Transduktion mit dem zu untersuchenden Vektor S11FLIEG“. Differenz zur Kontrolle = prozentualer DNA-Gehalt der G2/M-Phase der Zellen, die mit MMC behandelt wurden und mit S11FLIEG transduziert wurden abzüglich des prozentualen DNA-Gehaltes der G2/M-Phase der Zellen, die mit MMC behandelt wurden, jedoch nur mit dem Kontrollvektor S11IEG3 transduziert wurden. Ergebnisse mit einem positiven Vorzeichen sind demzufolge transduzierte Zellen, die mit einem stärkeren G2/M-Arrest auf die Behandlung mit MMC reagieren, als unter Kontrollbedingungen. Eine Korrektur im Sinne der Komplementation wäre gegeben, sobald diese Differenz deutlich negativ wäre (Schnittpunkt -10%).

Die Spalte „Differenz zur Kontrolle“ der Tabelle 3.3 verdeutlicht, dass einige Patientenzellen (Patienten 3, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14 und 18) auf die MMC-Behandlung mit einem etwas stärkeren G2/M-Arrest in den *FANCL*-transduzierten Zellen reagierten, als die entsprechende Kontrolle (positives Vorzeichen). Die Transduktion mit dem *FANCL*-Gen war somit für diese Zellen eher nachteilig als von Vorteil. Ein Großteil

der übrigen Fibroblasten (Patienten 1, 2, 4, 9, 10, 15 und 16) zeigte einen nur unwesentlich geringeren G2/M-Arrest als ihre Kontrollen, so dass keine dieser Zellen der Komplementationsgruppe L zugeordnet werden konnte. Auffällig ist Patient 17, bei dem sich nach der Transduktion mit dem *FANCL*-Gen deutlich weniger Zellen in der G2/M-Phase befinden, als unter Kontrollbedingungen.

Die folgende Abbildung stellt die oben beschriebene Tabelle graphisch dar. Hier ist besonders gut zu erkennen, dass sich die meisten Patienten nach einer Behandlung mit MMC in der G2/M-Phase befinden und zwar unabhängig davon, ob sie mit dem Kontrollvektor oder mit dem S11FLIEG-Vektor transduziert waren. Einzig Patient 17 weist in den mit S11FLIEG transduzierten Zellen einen deutlich geringeren prozentualen Anteil der Zellen in der G2/M-Phase als unter Kontrollbedingungen auf.

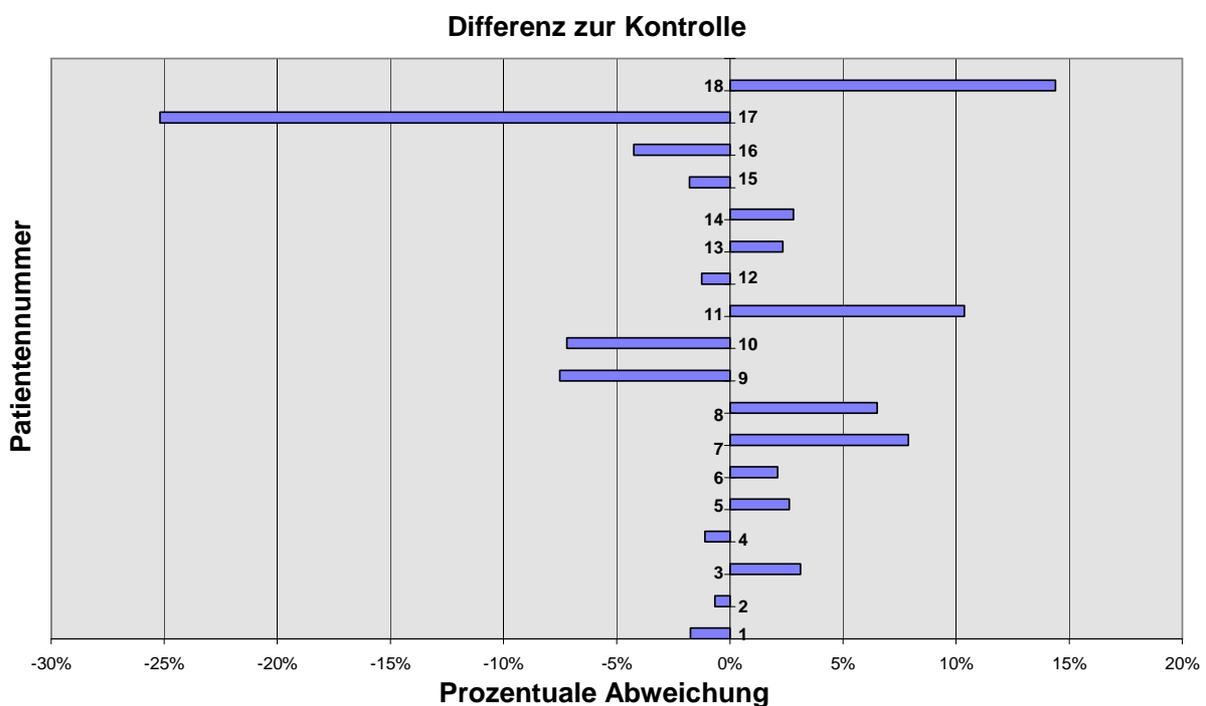


Abb. 3.15: Graphische Darstellung der Differenz der untersuchten Fibroblasten zur Kontrolle: Diese Abbildung stellt graphisch die in Tabelle 3.3. aufgeführten „Differenzen zur Kontrolle“ der mit dem S11FLIEG-Vektor transduzierten Patientenfibroblasten zur Kontrolle dar. Eine positive prozentuale Abweichung deutet auf einen stärkeren G2/M-Arrest der transduzierten Zellen hin. Patient 17 zeigt eine Differenz von -25,2%, was eine Korrektur im Sinne der Komplementation bedeutet.

3.3.2. Patient 17

Auffällig ist der Patient 17, der in den *FANCL*-transduzierten Fibroblasten (57,8%) einen 25,2%igen geringeren MMC-induzierten G2/M-Arrest als unter der Kontrollbedingung (83,0%) aufweist (Tab. 3.3, Abb. 3.15). Eine Transduktion mit dem *FANCD2*-Gen führte zu einem MMC-induzierten G2/M-Arrest von 76,9%, was in einem ähnlichen Größenwert wie von der Kontrolle liegt (Abb. 3.16).

3.3.2.1. FANCD2-Westernblot aus Fibroblasten

Um diese Daten zu verifizieren, wurden weitere Untersuchungen angeschlossen. Die folgenden Daten, insbesondere die Westernblots und Sequenzierungen, wurden in Kooperation mit Dipl. Biol. Reinhard Kalb und Prof. Detlev Schindler, Würzburg durchgeführt. Wie oben erläutert, ist FANCL die Ubiquitinligase, welche FANCD2 monoubiquitiniert. Diese Monoubiquitinierung lässt sich mit dem FANCD2-Immunoblotting nachweisen. Auf diesem Westernblot sind im Fall der Ubiquitinierung zwei Banden zu erkennen: monoubiquitiniertes FANCD2 als lange Form (FANCD2-L) und nicht monoubiquitiniertes FANCD2 als kurze Form (FANCD2-S).

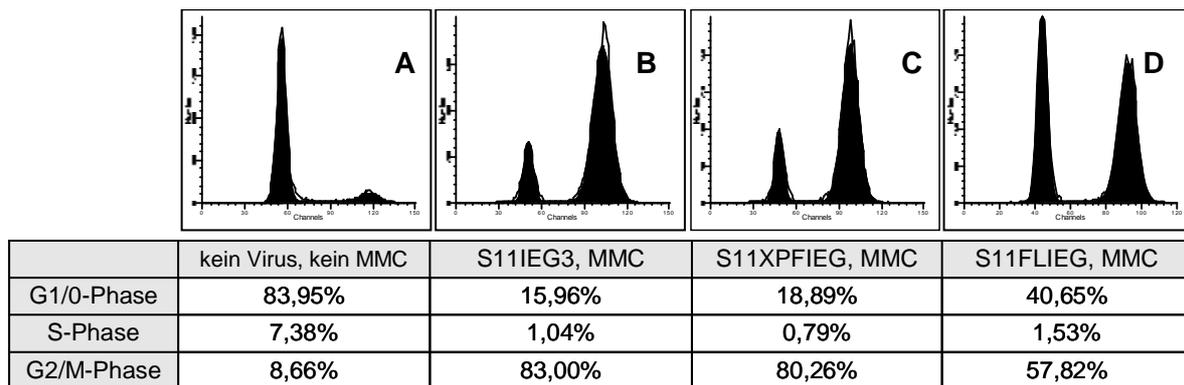


Abb. 3.16: Messdaten von Patient 17, Fibroblasten. Diese FACS-Analyse zeigt den FA-typischen MMC-induzierten G2/M-Arrest in Fibroblasten (B und C). Dieser wird durch den Transfer von *FANCL*-cDNA korrigiert (D).

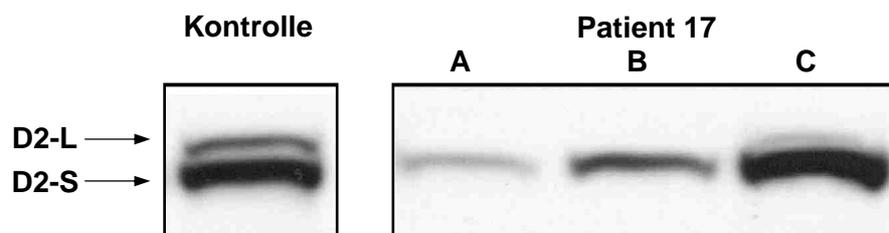


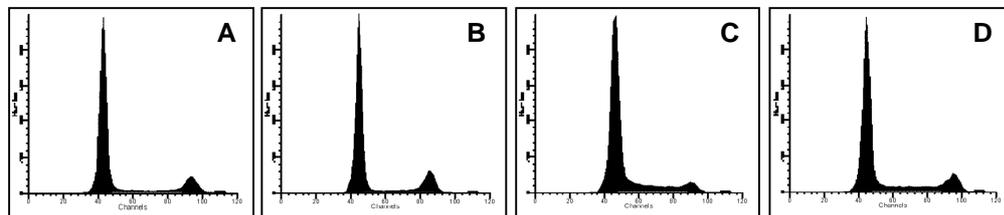
Abb. 3.17: FANCD2-Immunoblot von Patient 17. Kontrolle: Fibroblasten eines gesunden Probanden nach Behandlung mit MMC. Gut sichtbar sind die zwei FANCD2-Banden. D2-L = FANCD2-L, D2-S = FANCD2-S. Patient 17, A: keine Transduktion, MMC Behandlung. B: Transduktion mit dem Kontrollvirus S11IEG3, MMC-Behandlung. C: Transduktion mit der *FANCL*-cDNA und MMC-Behandlung.

Abbildung 3.17A bietet das typische Bild eines FA-Patienten mit einem Defekt in einem der Gene des FA-Kernkomplexes. Da durch ein Defekt in einem dieser Gene der Komplex nicht aktiv ist, kann FANCD2 nicht monoubiquitiniert werden und im Immunoblot ist nur FANCD2-S detektierbar. Ebenso ist in Abbildung 3.17B auch nur die FANCD2-S-Bande sichtbar. Die Transduktion nur mit dem Kontrollvirus führt also wie erwartet zu keiner Beeinflussung der MMC-induzierten FANCD2-

Monoubiquitinierung. Im Gegensatz zu diesen zwei Proben ist in Abbildung 3.17C deutlich die FANCD2-L-Bande sichtbar. Hier konnte die Transduktion der *FANCL*-cDNA die Monoubiquitinierung von FANCD2 wiederherstellen. Diese Daten aus dem FANCD2-Immunoblotting sind somit deckungsgleich mit den FACS-Daten und sprechen für eine Komplementation des Patienten 17 durch die *FANCL*-cDNA.

3.3.2.2. Zellzyklusanalyse der Lymphozyten

Die gleichen Untersuchungen wurden nicht nur an Fibroblasten dieses Patienten, sondern auch an hämatopoetischen Zellen und einer lymphoblastoiden Zelllinie durchgeführt.



	Kontrolle, kein MMC	Kontrolle, MMC	Patient 17, kein MMC	Patient 17, MMC
G1/0-Phase	76,2%	73,7%	67,9%	62,9%
S-Phase	12,5%	10,6%	26,3%	27,6%
G2/M-Phase	11,3%	15,7%	5,8%	9,5%

Abb. 3.18: Messdaten von Patient 17, Lymphozyten. Abbildung A und B stammen von einem Patienten ohne FA. Gesunde Zellen können den durch MMC verursachten Schaden reparieren, so dass sie keine Veränderung ihres Zellzyklus zeigen. Abbildung C stellt den Zellzyklus von Patient 17 dar, der nicht mit MMC behandelt wurde. Abbildung D stellt die Lymphozyten von Patient 17 nach der Behandlung mit MMC dar. Erstaunlicherweise reagiert er nicht mit einem für FA typischen G2/M-Arrest.

In den Lymphozytendaten fällt auf, dass Patient 17 nach der Behandlung mit MMC nicht mit einem FA-typischen G2/M-Arrest reagiert. Dies implementiert, dass seine Lymphozyten den gesetzten Schaden reparieren können. Diese Ergebnisse weichen jedoch von den Daten der Fibroblasten ab, in denen ein G2/M-Arrest nach der Exposition mit MMC zu beobachten ist. Demnach muss bei diesem Patienten ein Mosaik vorliegen, bei dem die Fibroblasten den FA-verursachenden Gendefekt tragen, die Lymphozyten jedoch nicht. Um diese Daten weiterhin zu validieren, wurden die Lymphozyten weiter untersucht. Da *FANCL* für die Monoubiquitinierung von FANCD2 zuständig ist, wurde auf Proteinebene untersucht, ob Lymphozyten dieses Patienten zu dieser Monoubiquitinierung fähig sind. Wäre das *FANCL*-Gen wie aus den Zellzyklusanalysen zu vermuten ist, intakt, so müssten in den Lymphozyten zwei FANCD2 Banden detektierbar sein, in den Fibroblasten hingegen nur eine.

3.3.2.3. FANCD2-Westernblot aus Lymphozyten

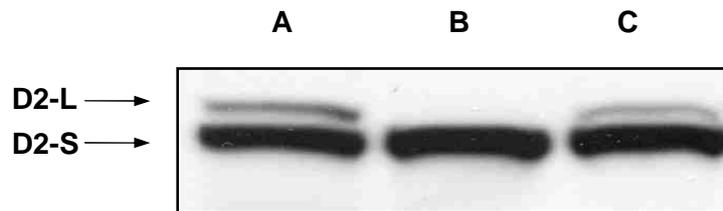


Abb. 3.19: FANCD2-Immunoblot von Patient 17 anhand von Lymphozyten. A: Lymphozyten eines gesunden Probanden nach Behandlung mit MMC. Gut sichtbar sind die zwei FANCD2-Banden. D2-L = FANCD2-L, D2-S = FANCD2-S. B: Patient 17, keine Transduktion, keine MMC Behandlung. Deutlich ist nur die erwartete FANCD2-S-Bande sichtbar. C: Patient 17, keine Transduktion, MMC-Behandlung, 2 FA-D2-Banden. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von R. Kalb, Würzburg.

Auch im FANCD2-Westernblot unterscheiden sich die Lymphozyten von Patient 17 nicht von gesunden Zellen. Wie in Abbildung C zu sehen ist, monoubiquitinieren sie nach MMC-Exposition FANCD2 und es kann sowohl die kurze als auch die lange Form von FANCD2 detektiert werden. Der FA-Kernkomplex muss also aktiv sein und die Monoubiquitinligase FANCL kann ihre Funktion ausführen. Ebenso wie die Daten von der Zellzyklusanalyse suggerieren diese Daten ein Mosaik des Patienten.

3.3.2.4. Sequenzierung

Im nächsten Schritt wurde genomische DNA aus Fibroblasten sowie hämatopoetischen Zellen von Patient 17 gewonnen. Anschließend wurde das *FANCL*-Gen sequenziert und auf Mutationen untersucht.

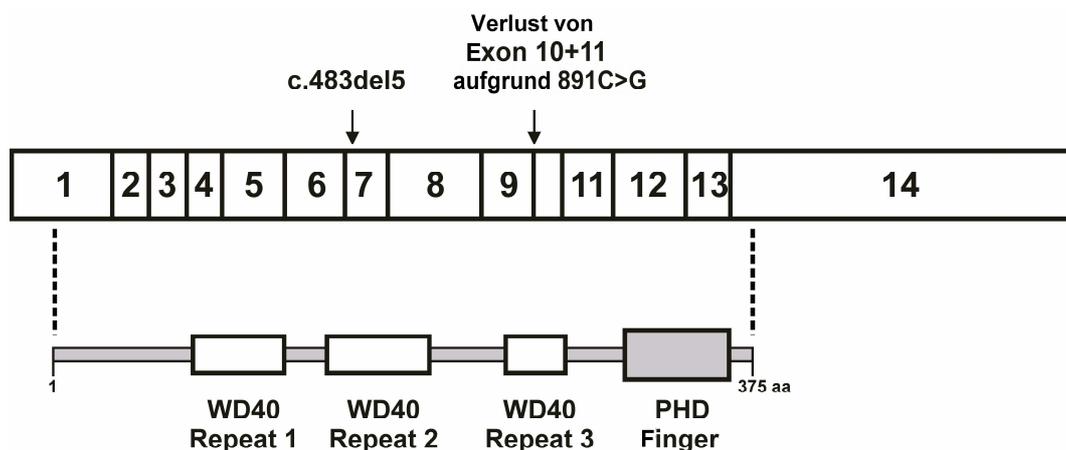


Abb. 3.20: Schematische Darstellung der *FANCL*-Mutationen in Fibroblasten. Eingezeichnet ist die Deletion in Exon 7 an der Nukleotidposition 483 sowie der Basenaustausch in Exon 11. Unten ist die Proteinstruktur mit den Strukturelementen schematisch dargestellt.

In den Fibroblasten wurden dabei zwei *FANCL*-Mutationen gefunden. Fünf Aminosäuren waren in Exon 7 verloren gegangen (483delATCAC). In Exon 11 hatte an der Nukleotidstelle 891 ein Basenaustausch stattgefunden (891C>G). Die Mutation in Exon 11 führt zu einer Zerstörung einer potentiellen Bindungsstelle des SR-Proteins SC35, das eine „enhancer“ Funktion beim alternativen Splicen wahrnimmt [118, 119]. Gleichzeitig wird ein vermutetes SRp40 Motiv verstärkt, so dass auf RNA-Ebene Exon 10 und 11 übersprungen werden. Genauso wie in den Fibroblasten kann in den Lymphozyten und anderen hämatopoetischen Zellen, die aus dem Knochenmark des Patienten gewonnen wurden, der Verlust der fünf Nukleotiden ATCAC in Exon 7 nachgewiesen werden.

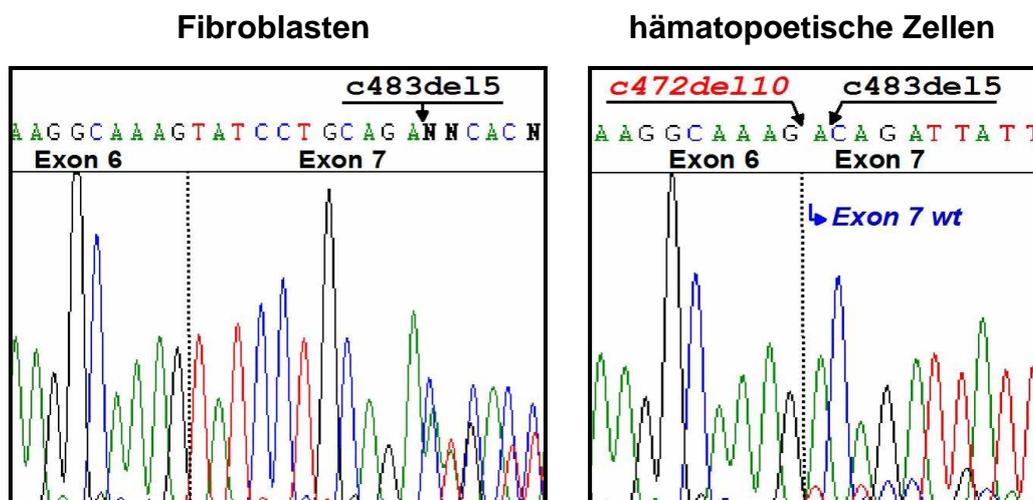


Abb. 3.21: Sequenzierung von *FANCL* in Fibroblasten und hämatopoetischen Zellen von Patient 17. An der Nukleotidposition 483 im Exon 7 fehlen sowohl in Fibroblasten als auch in hämatopoetischen Zellen die fünf Nukleotide ATCAC (c483del15). Zusätzlich ist in den Lymphozyten jedoch noch eine Deletion der ersten 10 Nukleotide des Exons 7 zu erkennen. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von R. Kalb, Würzburg.

Wird die Sequenz aus den Fibroblasten mit der aus hämatopoetischen Zellen verglichen, so ist zu erkennen, dass zusätzlich zu der Deletion 483ATCAC die ersten 10 Nukleotide von Exon 7 in den hämatopoetischen Zellen fehlen. Die Deletion dieses Abschnitts in Exon 7 ist auf eine kompensatorische Mutation im Intron 6 zurückzuführen. Durch die Deletion der fünf Nukleotide in den Fibroblasten wird das ursprüngliche Leseraster verschoben, woraus keine funktionstragende Proteinsequenz resultiert. In den Lymphozyten ist im Intron 6 ein Austausch einer Base zu beobachten; Arginin wird gegen Thymin ausgetauscht (IVS6-2A>T). Durch diesen Austausch wird der Spliceakzeptor am Ende des Introns zerstört. Alternativ wird die AG-Sequenz im Exon 7 benutzt. Hierdurch werden die ersten 10 Nukleotide dieses Exons übersprungen. In Kombination mit der Deletion 483ATCAC führt das Fehlen der 15 Nukleotide jedoch dazu, dass das ursprüngliche Leseraster wieder hergestellt wird.

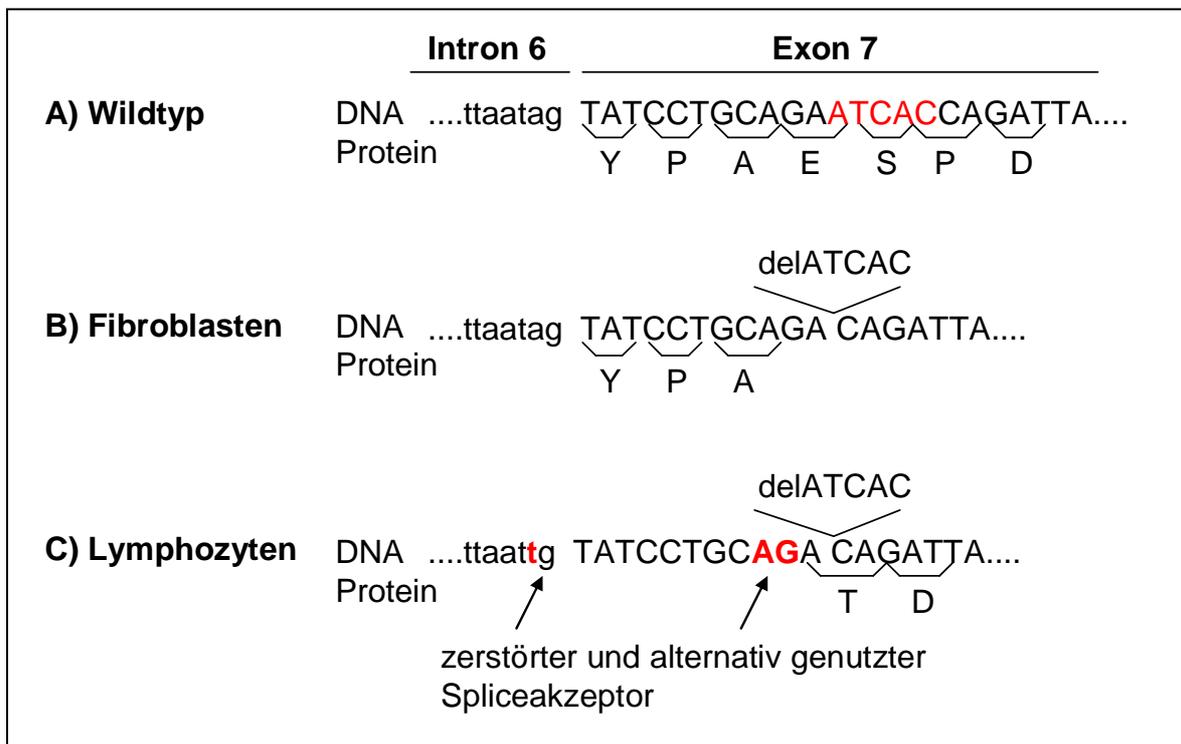


Abb. 3.22: Gegenüberstellung der Mutationen im *FANCL*-Gen. Gegenübergestellt sind jeweils die genomischen DNA-Sequenzen sowie die daraus resultierenden Proteinsequenzen. Verglichen ist die Wildtypsequenz (A) mit den isolierten Sequenzen aus den Fibroblasten (B) und den hämatopoetischen Zellen (C).

FANCL	EHLITLKLKAKYPAESP	DYFVDFPVPFCA	175
FANCL*	EHLITLKLKAKT - - -	DYFVDFPVPFCA	170
	.150.....160.....	170.....	

Abb. 3.23: Gegenüberstellung der Proteinsequenz von *FANCL*. *FANCL*: Wildtyp. *FANCL**: Proteinsequenz resultierend aus den Mutationen in den hämatopoetischen Zellen.

Wie in Abbildung 3.23 zu erkennen ist, führen die Mutationen in den hämatopoetischen Zellen des Patienten 17 auf Proteinebene lediglich zu einem Austausch einer Aminosäure (T158Y) und einem Verlust von 5 Aminosäuren. *FANCL** unterscheidet sich also nur in sechs Aminosäuren von dem Wildtypprotein. Sowohl die Daten aus den Zellzyklusuntersuchungen als auch die Daten aus dem *FANCD2*-Westernblot suggerieren, dass in den hämatopoetischen Zellen von Patient 17 ein intaktes *FANCL*-Protein vorliegt. Um zu untersuchen, ob die Veränderung dieser sechs Aminosäuren die Funktionalität von *FANCL* beeinflusst, wurde das mutierte *FANCL*-Gen (= *FANCL**) des Patienten in ein Retrovirus kloniert.

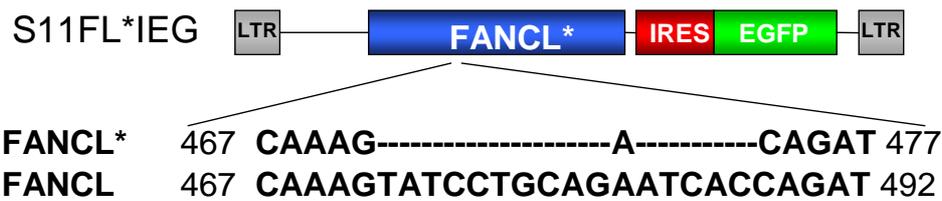


Abb. 3.24: Sequenz des Retrovirus mit dem veränderten *FANCL*-Gen. *FANCL*: Wildtyp. *FANCL**: Nukleotidsequenz resultierend aus den Mutationen in den hämatopoetischen Zellen mit c472del10 und 483del5.

Mit diesem modifizierten *FANCL*-Vektor S11FL*IEG wurden die Fibroblasten des Patienten infiziert. Nach der Exposition mit MMC wurde das Zellzyklusverhalten der Fibroblasten untersucht.

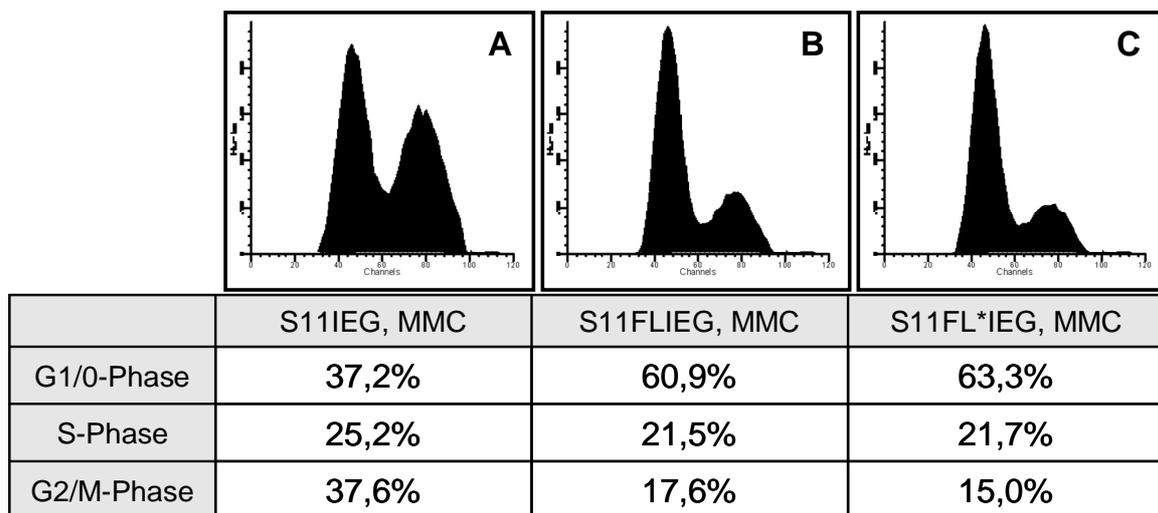


Abb. 3.25: Messdaten der Fibroblasten von Patient 17. A: Transduktion mit dem Kontrollvirus S11IEG und MMC-Exposition. B: Transduktion mit der Wildtyp *FANCL*-cDNA und MMC-Exposition. C: Transduktion mit der mutierten *FANCL*-cDNA und MMC-Exposition.

Der modifizierte Vektor S11FL*IEG war ebenso wie der Wildtypvektor S11FLIEG fähig, die Fibroblasten zu komplementieren, wie in dem Aufheben des G2/M-Arrestes nach MMC-Exposition zu erkennen ist. Somit ist die Mutation IVS6-2A>T mit dem Verlust der nachfolgenden 10 Nukleotide eine kompensatorische Mutation, die zu einem funktionstüchtigen Protein führt.

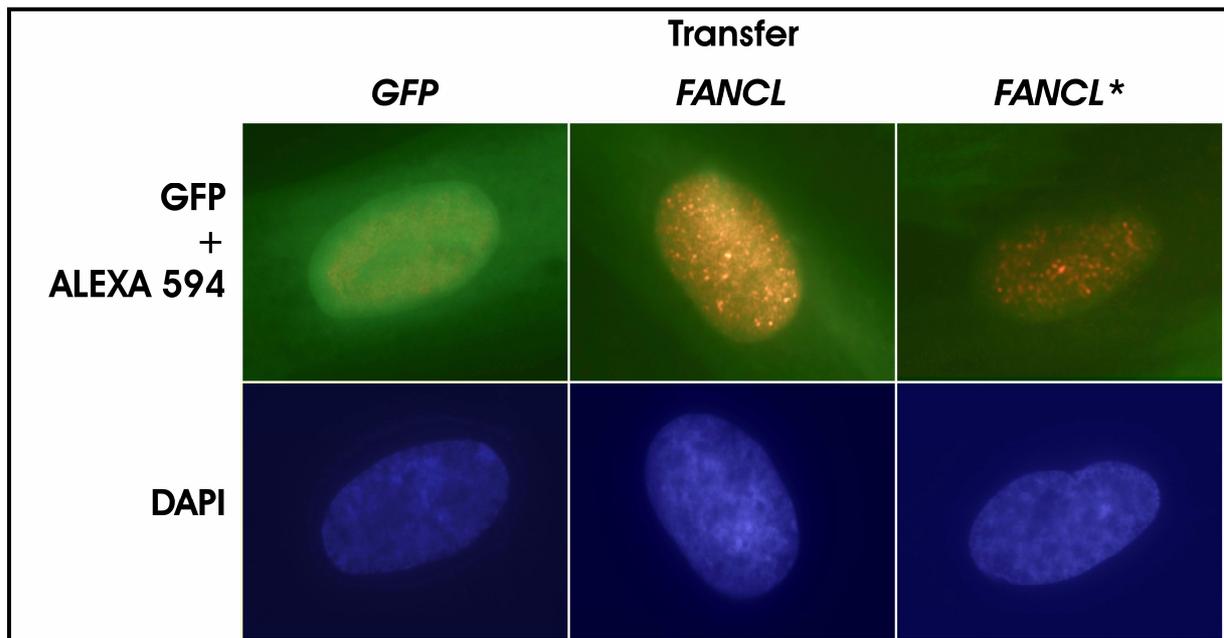


Abb. 3.26: FANCD2-Foci in Fibroblasten von Patient 17. Obere Reihe: Darstellung der Zellkerne, die mit Alexa-594 gekoppelten Antikörper gegen FANCD2 gefärbt wurden. Untere Reihe: Kontrolle, dass die Foci tatsächlich im Zellkern lokalisiert sind. Standardzellkernfärbung mit DAPI. Die Fibroblasten waren transduziert mit dem Kontrollvektor S11IEG (= *GFP*), dem Wildtyp tragenden Virus S11FLIEG (= *FANCL*) sowie dem Virus, welches die cDNA mit der kompensatorischen Mutation S11FL*EG (= *FANCL**) trägt und anschließend MMC exponiert. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Paula Rio.

Fibroblasten von Patient 17 waren nach MMC-Exposition nicht in der Lage, FANCD2-Reparaturfoci zu bilden (Abb. 3.25, linke Spalte). Ein FANCD2-Focus ist eine Stelle, an der mit Hilfe des monoubiquitinierten Proteins FANCD2 ein DNA-Schaden repariert wird. Diese Focusbildung konnte wiederhergestellt werden, wenn die Fibroblasten mit dem *FANCL*-Wildtyp tragenden Virus S11FLIEG transduziert wurden (mittlere Spalte). Ebenso konnte der S11FL*IEG-Vektor, der die cDNA mit dem komplexen Rearrangement aus den hämatopoetischen Zellen trägt, diese Focusbildung wiederherstellen (rechte Spalte).

Sowohl diese Ergebnisse als auch die Daten aus den Untersuchungen des Zellzyklus (Abb. 3.24) zeigen, dass die somatische IVS6-2A>T Mutation in der Hämatopoese kompensatorisch und das mutierte *FANCL*-Protein voll funktionsfähig ist.

Patient 17 ist demnach der Komplementationsgruppe FA-L zu zuordnen. Bei ihm liegt ein Mosaik vor, bei dem in den hämatopoetischen Zellen eine kompensatorische Mutation stattgefunden hat, die übrigen Körperzellen jedoch noch Träger des defekten *FANCL*-Proteins sind. Im Übrigen hat der Patient schwere FA-typische Fehlbildungen und entwickelte schon im jungen Alter von 13 Lebensjahren nach einer allogenen Knochenmarktransplantation ein Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle mit bereits einem Rezidiv desselben.

Diese Ergebnisse sind insofern sehr interessant, da Patient 17 erst der zweite Patient weltweit ist, der der Komplementationsgruppe FA-L zugeordnet werden konnte. Im Gegensatz zu dem ersten Patienten dieser Gruppe konnte diese Diagnose noch zu Lebzeiten gestellt werden. Somit ist der hier beschriebene Patient der erste lebende Patient dieser Komplementationsgruppe.

3.4. Kandidatengene

Alle in dieser Arbeit untersuchten Patientenfibroblasten wurden aus flüssigem Stickstoff aufgetaut und in 10cm-Platten expandiert. Suchkriterium war, dass die Diagnose „Fanconi-Anämie“ gesichert war und die Patienten als nonFAACD2EFG klassifiziert waren, also bis zu diesem Zeitpunkt keiner Komplementationsgruppe zugeordnet werden konnten.

3.4.1. Klonierungen

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene (siehe Einleitung) wurden mittels Restriktionsverdau aus den jeweiligen Ausgangsplasmiden ausgeschnitten und in das S11IEG3-Plasmid kloniert (siehe Tabelle 3.4). Dabei wurden sämtliche Ausgangsplasmide von Prof. Schindler, Würzburg zur Verfügung gestellt. Nach der Ligation wurden die neu konstruierten Plasmide in DH5 α -Bakterien transformiert und dort vervielfältigt. Sämtliche neu generierte Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Die Plasmide S11ERCC1IEG, S11RAD54BIEG und S11FLIEG wurden von Prof. Schindler zur Verfügung gestellt.

Gen	Ausgangsvektor	Enzyme	Zielvektor	Enzyme	Ergebnis
<i>RAD51</i>	pCMVTag3B/RAD51A	<i>Bam</i> HI	pS11IEG3	<i>Bam</i> HI	S11RAIEG
<i>RAD51B</i>	RAD51B=L1/pCMV3B	<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I	pS11IEG3	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	S11RBIEG
<i>RAD51C</i>	RAD51C/pCMV3B	<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I	pS11IEG3	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	S11RCIEG
<i>RAD51D</i>	RAD51D/pCMV3B	<i>Eco</i> RI	pS11IEG3	<i>Eco</i> RI	S11RDIEG
<i>XRCC2</i>	pCMV/XRCC2	<i>Eco</i> RI	pS11IEG3	<i>Eco</i> RI	S11XRCC2IEG
<i>XRCC3</i>	pCMV/XRCC3	<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I	pS11IEG3	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	S11XRCC3IEG
<i>hSNM1</i>	pcDNA3/SNM1	<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I	pS11IEG3	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	S11DCLR1AIEG
<i>XPF</i>	pcDNA3/XPF	<i>Not</i> I/ <i>Psp</i> OMI	pS11IEG3	<i>Not</i> I	S11XPFIEG

Tab. 3.4: Klonierung. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Enzyme, die für die einzelnen Klonierungen verwandt wurden. Dargestellt sind die Ausgangsvektoren und die Enzyme, die verwandt wurden, um das Gen aus dem Ausgangsvektor herauszuschneiden. Ebenso sind der Zielvektor und die Enzyme aufgeführt, die verwandt wurden, um das Gen in diesen Zielvektor hineinzuklonieren. Die letzte Spalte enthält den Namen des entstandenen Plasmids.

3.4.1.1. S11IEG3 und S11IN-Konstrukte

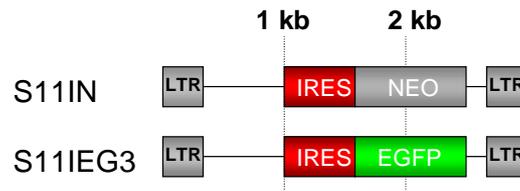


Abb. 3.27: Die Vektoren S11IEG3 und S11IN im Vergleich. S11IN trägt das Neomycinphosphotransferase-Gen und S11IEG3 das *EGFP*-Gen als Markergen.

Die Konstrukte mit den Genen *RAD51*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* und *XRCC3* wurden in einem zweiten Schritt aus dem S11IEG3-Plasmid in das verwandte S11IN-Plasmid umkloniert. Das S11IEG3-Plasmid trägt als Markergen das *EGFP*-Gen, welches von der Qualle stammt und nach Anregung unter UV-Licht grün leuchtet. S11IN ist analog aufgebaut wie der S11IEG3-Vektor, trägt jedoch anstelle des *EGFP*-Gens ein Neomycin-Resistenz-Gen. Mit Hilfe dieses Resistenzgens kann eine Selektion transduzierter Zellen vorgenommen werden, wobei die nichttransduzierten Zellen unter der Behandlung mit G418 absterben. Sämtliche neu konstruierte Plasmide wurden vor ihrer weiteren Verwendung mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung kontrolliert (siehe Abbildung 3.28).

Gen	Ausgangsvektor	Enzyme	Zielvektor	Enzyme	Ergebnis
<i>RAD51</i>	S11RAIEG	<i>NotI/AvrII</i>	S11IN	<i>NotI/AvrII</i>	S11RAIN
<i>RAD51B</i>	S11RBIEG	<i>NotI/AvrII</i>	S11IN	<i>NotI/AvrII</i>	S11RBIN
<i>RAD51C</i>	S11RCIEG	<i>NotI/AvrII</i>	S11IN	<i>NotI/AvrII</i>	S11RCIN
<i>RAD51D</i>	S11RDIEG	<i>NotI/AvrII</i>	S11IN	<i>NotI/AvrII</i>	S11RDIN
<i>XRCC2</i>	S11XRCC2IEG	<i>NotI/AvrII</i>	S11IN	<i>NotI/AvrII</i>	S11XRCC2IN
<i>XRCC3</i>	S11XRCC3IEG	<i>NotI/AvrII</i>	S11IN	<i>NotI/AvrII</i>	S11XRCC3IN

Tab. 3.5: Klonierung. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Enzyme, die für die einzelnen Klonierungen verwandt wurden, um *RAD51* und seine Homologe von dem S11IEG3-Vektor in den S11IN-Vektor umzuklonieren.

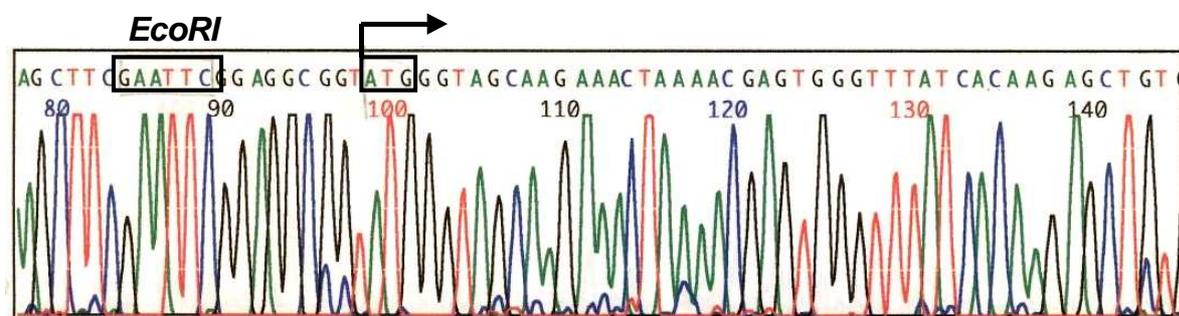


Abb. 3.28: Beispielhafte Darstellung einer Sequenzierung. Die hier dargestellte Sequenz stammt von dem S11RBIEG-Plasmid. Markiert sind die *EcoRI*-Schnittstelle und die Startsequenz des Gens *RAD51B*.

3.4.1.2. BRCA1

Die Klonierung für *BRCA1* erfolgte über einige Zwischenschritte. Als Zwischenvektor diente S11FAIEG, der mit *BsrGI* geschnitten und wieder religiert wurde. Das herausgeschnittene 3194 basenpaargroße Fragment enthielt eine von zwei *HindIII* Schnittstellen des Ausgangsvektors, so dass das religierte Endprodukt „S11FAIEG/BsrG“ nur noch über eine *HindIII*-Schnittstelle verfügte. Mittels eines Doppelverdaus mit *HindIII* und *EcoRI* wurden die ersten 918 Basen des *BRCA1*-Genes aus dem pCR3/*BRCA1*-Vektor herausgeschnitten und in den S11FAIEG/BsrG-Vektor kloniert (=S11FAIEG/BsrG-5' *BRCA1*). Die restlichen 4807 Basen wurden mittels *EcoRI* und *XhoI* aus dem pCR3/*BRCA1*-Vektor geschnitten und in den S11IEG3 Vektor kloniert, der mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten war (= S11*BRCA1a*). Der 5'-Teil von *BRCA1* wurde mit *NgoMIV* und *EcoRI* aus S11FAIEG/BsrG-5' *BRCA1* herausgeschnitten und in S11*BRCA1a* kloniert. Das Endprodukt „S11*BRCA1IEG*“ wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung kontrolliert.

Ausgangsvektor	Enzyme	Zielvektor	Enzyme	Ergebnis
S11FAIEG	<i>BsrGI</i>		religiert	S11FAIEG/BsrG
pCR3/ <i>BRCA1</i>	<i>HindIII-EcoRI</i>	S11FAIEG/BsrG	<i>HindIII-EcoRI</i>	S11FAIEG/BsrG-5' <i>BRCA1</i>
pCR3/ <i>BRCA1</i>	<i>EcoRI-XhoI</i>	pS11IEG3	<i>EcoRI-SalI</i>	S11 <i>BRCA1a</i>
S11FAIEG/BsrG-5' <i>BRCA1</i>	<i>NgoMIV-EcoRI</i>	S11 <i>BRCA1a</i>	<i>NgoMIV-EcoRI</i>	S11 <i>BRCA1IEG</i>

Tab. 3.6: Zusammenfassende Darstellung der Klonierung von *BRCA1*. Die einzelnen Zeilen geben die verschiedenen Klonierungsschritte wieder.

3.4.2. Virusproduktion

EcoFNX-Zellen exprimieren stabil die viralen Proteine Gag, Pol und ein ecotrophes Env. Diese Zellen wurden allein mit dem Plasmid transfiziert, welches das eigentliche Zielgen enthält.

Des Weiteren wurden 293T-Zellen als Zielzellen benutzt. Bei diesem Verfahren wurden alle für die Viruspartikelbildung benötigten Gene durch Kotransfektion von mehreren Plasmiden in 293T-Zellen eingebracht. Es wurden ein *gag-pol*-Expressionskonstrukt (pHIT60), ein *env*-Expressionskonstrukt (pczVSV-G) und ein Plasmid, das das Transgen enthielt, verwendet. Tabelle 3.7 gibt darüber Auskunft, welche Produzentenzellen mit welchen Plasmiden transfiziert wurden.

3.4.3. Stabile Produzentenzelllinien

Zur Herstellung dieser stabilen Produzentenzelllinien wurden pg13-Zellen mit dem virushaltigen Überstand von 293T- und ecoFNX-Zellen transduziert. Pg13-Zellen, die mit einem Konstrukt transduziert waren, das eine G418-Resistenz trug, wurden vor der Virusernte mit G418 selektioniert. Der geerntete virushaltige Überstand wurde

sofort filtriert und entweder sofort eingesetzt oder bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde er unmittelbar vor der Transduktion aufgetaut.

Gen	Vektor	Produzentenzellen	Gen	Vektor	Produzentenzellen
<i>RAD51</i>	S11RAIEG	ecoFNX	<i>RAD51</i>	S11RAIN	ecoFNX
<i>RAD51B</i>	S11RBIEG	ecoFNX	<i>RAD51B</i>	S11RBIN	ecoFNX
<i>RAD51C</i>	S11RCIEG	ecoFNX	<i>RAD51C</i>	S11RCIN	ecoFNX
<i>RAD51D</i>	S11RDIEG	ecoFNX	<i>RAD51D</i>	S11RDIN	ecoFNX
<i>XRCC2</i>	S11XRCC2IEG	ecoFNX	<i>XRCC2</i>	S11XRCC2IN	ecoFNX
<i>XRCC3</i>	S11XRCC3IEG	ecoFNX	<i>XRCC3</i>	S11XRCC3IN	ecoFNX
<i>BRCA1</i>	S11BRCAIEG	ecoFNX	<i>RAD54B</i>	S11RAD54BIEG	293T/VSV-G
<i>XPF</i>	S11XPFIEG	293T/VSV-G	<i>FANCL</i>	S11FLIEG	293T/VSV-G
<i>ERCC1</i>	S11ERCC1IEG	293T/VSV-G	<i>hSNM1</i>	S11DCLR1AIEG	293T/VSV-G

Tab. 3.7: Auflistung der Produzentenzelllinien für die einzelnen Vektoren

3.4.4. Kontrolle der Retroviren

Die strukturelle Kontrolle der Retroviren erfolgte über die Sequenzierung derselben. Funktionell wurden die Retroviren über die Expression ihrer Markergene *EGFP* und *NEO* kontrolliert. Für alle untersuchten Kandidatengene existieren keine menschlichen *knock-out*-Zellen, in denen die funktionelle Kontrolle der in die Retroviren eingebrachten Kandidatengene hätte erfolgen können. Des Weiteren wären funktionelle Tests in Surrogaten wie DT40- (vom Huhn) oder murine *knock-out*-Zellen denkbar.

3.4.5. Titerbestimmung der generierten Retroviren

Nach der Produktion von virushaltigen Überständen wurden diese auf ihren Titer, d.h. auf ihre Fähigkeit, Zellen infizieren zu können, funktionell durch die Expression des Markergens in transduzierten Zielzellen untersucht. Tabelle 3.8. gibt eine Übersicht über die Titer der Neomycin-Konstrukte.

Retrovirus	Virustiter [CFU/ml]
S11RAIN	1×10^5
S11RBIN	2×10^6
S11RCIN	7×10^6
S11RDIN	2×10^6
S11XRCC2IN	1×10^6
S11XRCC3IN	1×10^6

Tab. 3.8: Titer der NEO-Konstrukte. Aufgelistet sind die Virustiter der virushaltigen Überstände NEO-Konstrukte. CFU = colony forming unit.

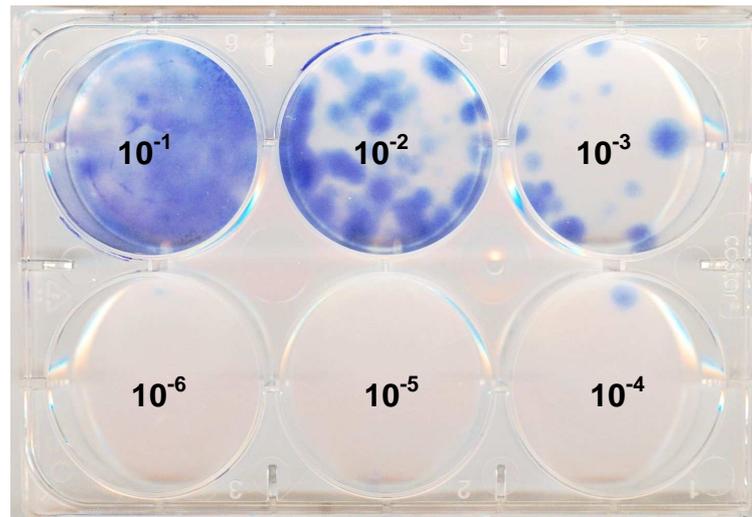


Abb. 3.29: Titerbestimmung der NEO-Konstrukte. HT1080-Zellen wurden in zunehmender Verdünnungsreihe mit den jeweiligen Retroviren transduziert. Nach der G418-Selektion wurden die überlebenden Kolonien mittels Methylenblau angefärbt.

3.4.6. Virusproduktion von S11BRCA1IEG, S11DCLR1AIEG, S11RAD54BIEG

Bei der transienten Herstellung der Retroviren ließ sich bei den Konstrukten, die ein *EGFP*-Gen enthielten, die Effizienz der Transduktion mittels der Expression von EGFP unter dem Fluoreszenzmikroskop nach 24 - 48 Stunden erkennen. Bei den Konstrukten S11BRCA1IEG, S11DCLR1AIEG und S11RAD54BIEG war die Expression von EGFP auch nach 48 Stunden sehr schwach. Nachdem die pg13-Zellen mit diesem Überstand transduziert waren, konnten einige Kolonien detektiert werden, die das *EGFP*-Gen exprimierten. Diese Kolonien wurden gepickt und auf neuen Zellkulturplatten kultiviert. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese grünen Zellen ein Selektionsnachteil gegenüber den nicht transduzierten Zellen aufwiesen und abstarben. Dieser Sachverhalt war auch bei Wiederholung der Experimente zu beobachten. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Überexpression der Gene *BRCA1*, *hSNM1* und *RAD54B* mittels Retroviren toxisch ist und diese Gene so nicht als Kandidatengene getestet werden können.

3.4.8. Kandidatengene – *RAD51* und seine Homologe

Das Suchkriterium der zu untersuchenden Fibroblasten bestand darin, dass die Diagnose „Fanconi-Anämie“ gesichert war und die Patienten als FA-nonACD2EFGK klassifiziert waren.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Patientenfibroblasten wurden aus flüssigem Stickstoff aufgetaut und in 10cm-Platten expandiert. Die Transduktion erfolgte, ähnlich wie

bei der Typisierung, in einer 50%igen Dichte in T25-Zellkulturflaschen ca. 16 Stunden nach der Trypsinisierung (siehe auch Tabelle 3.9).

Wenn die Gentransferrate bei den grünen Konstrukten nicht mindestens über 80% liegt, so besteht die Gefahr, dass schlecht wachsendene „seneszentene“ Fibroblasten die Zellzykluskorrektur nach Exposition gegenüber MMC überlagern. Deshalb wurden für die Mehrzahl der Kandidatengene Vektoren mit dem Neomycinphosphotransferase-Gen, auch Neomycinresistenz-Gen bezeichnet, konstruiert. So exprimierten 100% der analysierten Zellen das zu untersuchende Kandidatengen.

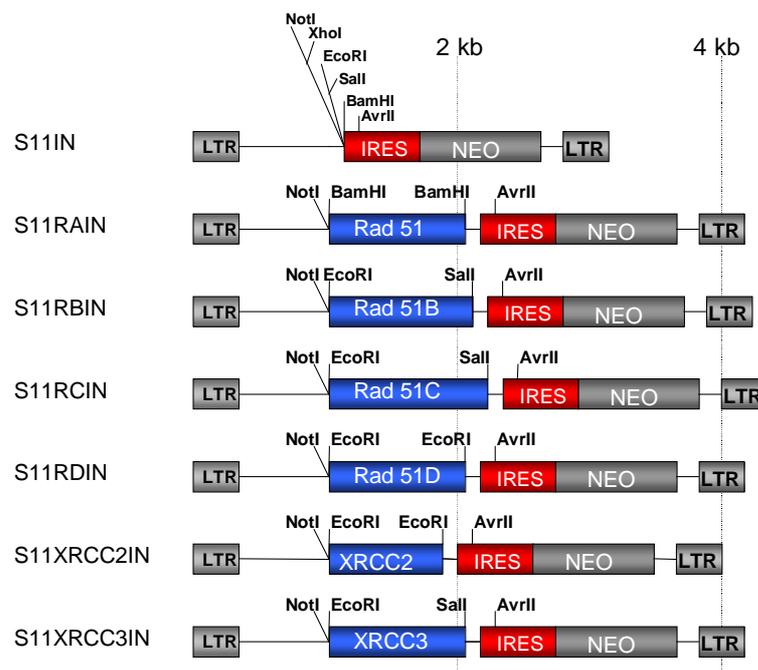


Abb. 3.30: Konstrukte, die ein Neomycinresistenzgen tragen.

3.4.9. G418-Selektion

Die in Abb. 3.30 gezeigten Retroviren enthalten ein Neomycinresistenzgen, so dass bei diesen Konstrukten nach der Transduktion der Patientenfibroblasten eine Selektion mit G418 vorgenommen werden konnte. Diese Selektion dauerte im Schnitt eine Woche.

3.4.10. Grüne Konstrukte

Fibroblasten, die mit einem grünen Konstrukt aus Abb. 3.31 transduziert wurden, konnten keiner G418-Selektion unterzogen werden. Hier wurde die Gentransferrate mittels Durchflusszytometrie bestimmt und es wurden nur Zellen weiter untersucht, bei denen die Gentransferrate über 80% lag, um Verfälschungen bei der Auswertung der Zellzykluskorrektur durch nicht transduzierte Zellen zu vermeiden.

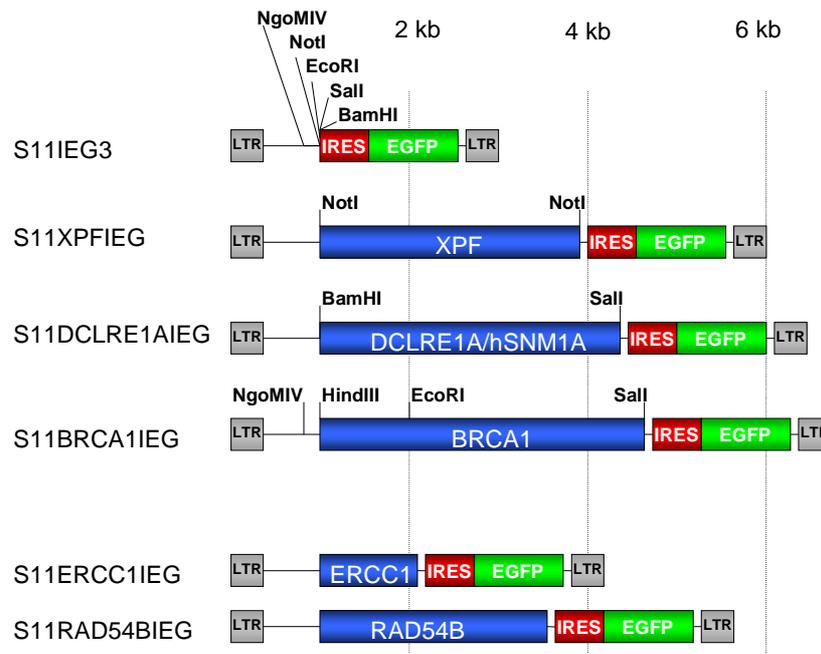


Abb. 3.31: Konstrukte, die ein EGFP-Gen als Markergen tragen. S11ERCC1IEG und S11RAD54BIEG wurden von Prof. Schindler, Würzburg zur Verfügung gestellt.

Nach der Transduktion wurden die Fibroblasten drei Tage mit 33 nmol MMC inkubiert, anschließend fixiert und es wurde der relative DNA-Gehalt der Zellen mittels FACS gemessen. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm ModFit® (Verity Software House).

Gen	Vektoren	1. Selektion	2. Selektion	Fragestellung
∅	Kein Virus	∅	MMC	CC-Arrest?
EGFP	MEG5AB: Infektionskontrolle	∅	∅	Wie viele grün?
EGFP	MEG5AB: Selektionskontrolle (-)	G418	∅	Alle tot?
EGFP, Neo	S11EGIN: Selektionskontrolle (+)	G418	∅	alle grün?
	S11EGIN: Gentransferkontrolle	G418	MMC	CC-Arrest?
NEO	S11IN: Negativkontrolle	G418	MMC	CC-Arrest?
RAD51, Neo	S11RAIN	G418	MMC	Korrektur?
RAD51B, Neo	S11RBIN	G418	MMC	Korrektur?
RAD51C, Neo	S11RCIN	G418	MMC	Korrektur?
RAD51D, Neo	S11RDIN	G418	MMC	Korrektur?
XRCC2, Neo	S11XRCC2IN	G418	MMC	Korrektur?
XRCC3, Neo	S11XRCC3IN	G418	MMC	Korrektur?
EGFP	S11IEG3: Infektionskontrolle	∅	∅	Wie viele grün?
EGFP	S11IEG3: Negativkontrolle	∅	MMC	CC-Arrest?
XPF, EGFP	S11XPFIEG	∅	∅	Wie viele grün?
XPF, EGFP	S11XPFIEG	∅	MMC	Korrektur?
ERCC1, EGFP	S11ERCC1IEG	∅	∅	Wie viele grün?
ERCC1, EGFP	S11ERCC1IEG	∅	MMC	Korrektur?

Tab. 3.9: Transduktionsschema der Kandidatengene mit den zugehörigen Kontrollen. Zur Erläuterung der Kontrollen siehe Abschnitt 3.1.3, ∅ = kein Gen oder keine Selektion, CC-Arrest = Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase, Korrektur = Korrektur der MMC-Hypersensitivität und Verlust des FA-typischen G2/M-Arrests.

3.4.11. Ergebnisse der Typisierung mit den Kandidatengen

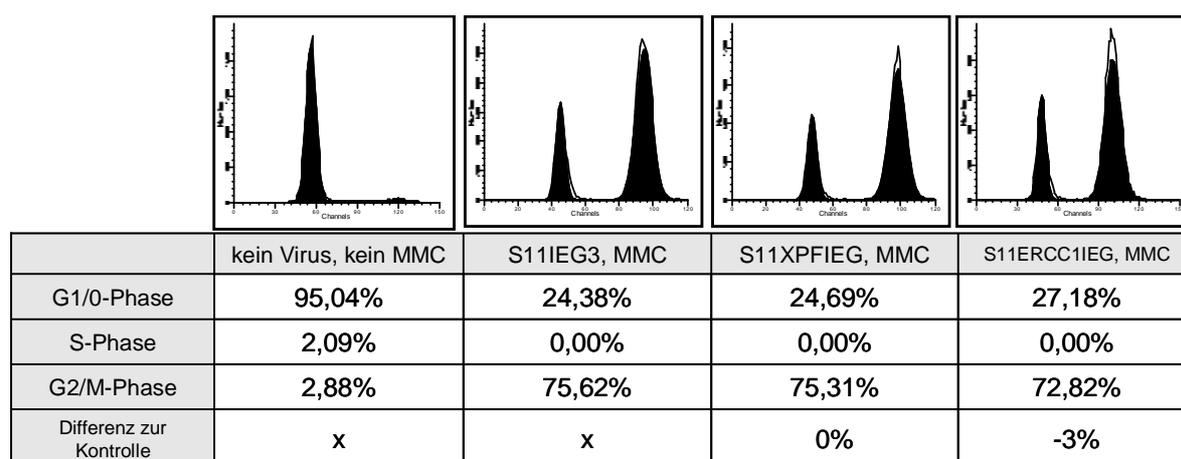
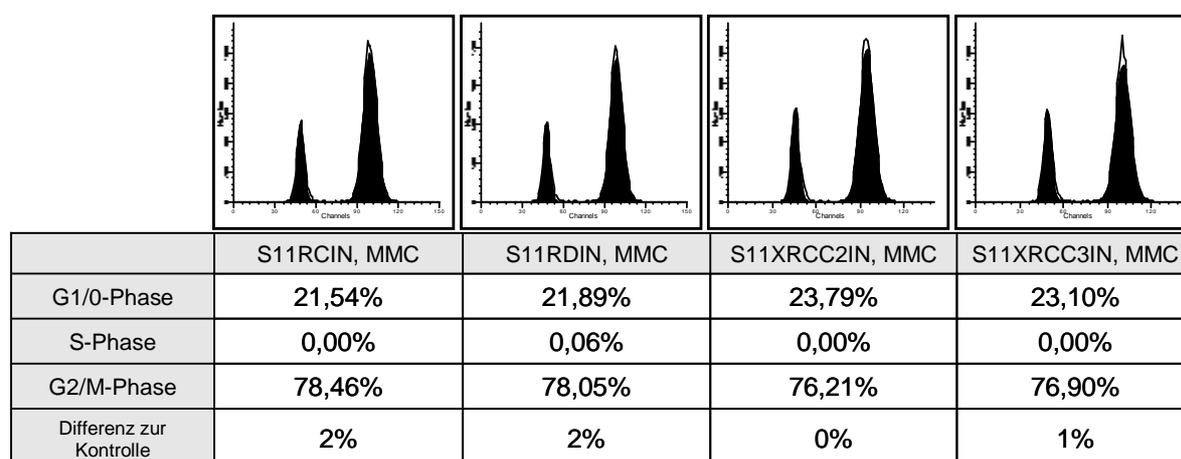
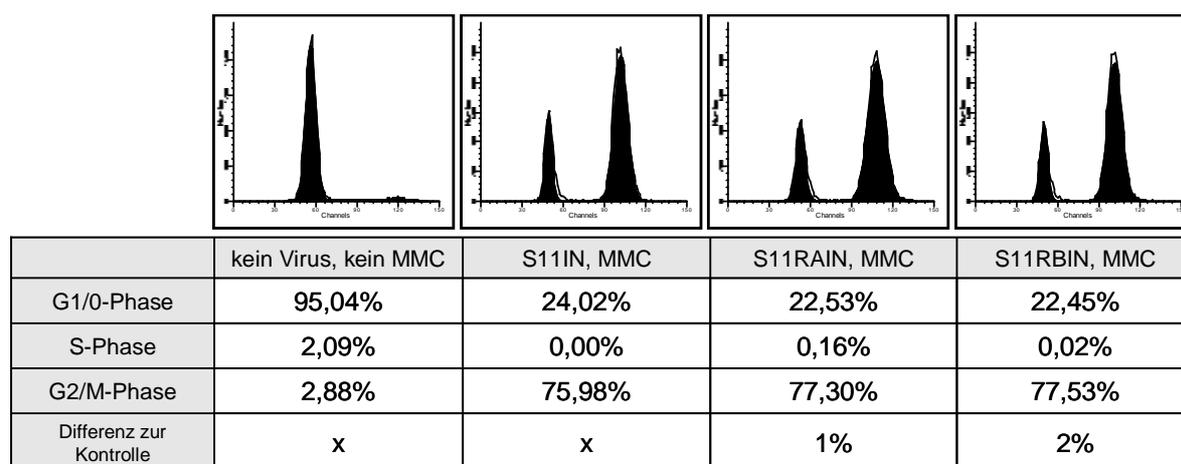


Abb. 3.32: Messdaten zur Untersuchung der Kandidatengene. Exemplarische Darstellung der Messdaten anhand Patient 14. Kontrolle für die Neomycin-Konstrukte (S11RAIN, S11RBIN, S11RCIN, S11RDIN, S11XRCC2IN, S11XRCC3IN) ist S11IN. Kontrolle für die EGFP-Konstrukte (S11XPFIIEG und S11ERCC1IEG) ist S11IEG3.

In Abb. 3.32 sind die prozentualen DNA-Gehalte der Zellzyklusphasen der unterschiedlich behandelten Fibroblasten eines Patienten dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass Zellen, die nicht mit MMC behandelt wurden, keinen G2/M-Arrest aufweisen. Dagegen trat bei allen Fibroblasten, die mit MMC behandelt wurden, ein G2/M-Arrest ein. Dies ist bei allen angewandten Transgenen zu beobachten. Kein Gen war fähig, diesen Arrest aufzuheben und die Zellen zu korrigieren. Auch ist zu erkennen, dass sich die Höhe des G2/M-Arrestes in den verwandten Konstrukten nicht von der Höhe der jeweiligen Kontrollen unterscheidet (siehe Zeile „Differenz zur Kontrolle“ in Abb. 3.32).

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die gesamten Kandidatengentestungen der einzelnen Patienten. Aufgeführt ist nur die prozentuale Differenz zwischen dem G2/M-Arrest der Kontrolle und der jeweiligen Konstrukte. Die Spalte "Differenz zur Kontrolle" in Tabelle 3.10 verdeutlicht, dass transduzierte Zellen einiger Patienten auf die MMC-Behandlung mit einem etwas stärkeren G2/M-Arrest als die entsprechende Kontrolle (positives Vorzeichen) reagierten. Dies kann durch die Überexpression des jeweiligen Kandidatengens mit verursacht sein.

Nummer	Prozentualer Unterschied zur Kontrolle							
	RA	RB	RC	RD	XRCC2	XRCC3	XPF	ERCC1
1	-4%	-3%	-2%	-4%	-2%	-6%	-1%	-2%
2	3%	-1%	6%	0%	-1%	1%	6%	6%
3	2%	11%	0%	3%	3%	5%	-2%	-3%
4	-9%	3%	-2%	0%	-1%	1%	2%	5%
5	-5%	11%	-5%	-2%	-3%	15%	0%	-4%
6	-7%	3%	2%	-1%	-3%	-4%	7%	7%
7	-8%	-4%	-4%	-5%	-3%	-5%	5%	3%
8	2%	6%	4%	3%	4%	8%	6%	11%
9	2%	12%	1%	-1%	-3%	6%	8%	1%
10	-6%	-2%	-1%	-3%	-1%	-2%	-8%	-9%
11	-9%	-5%	-7%	-7%	-9%	-4%	-8%	-5%
12	-6%	-10%	-3%	0%	-2%	3%	9%	8%
13	3%	7%	3%	2%	8%	7%	-1%	-1%
14	1%	2%	2%	2%	0%	1%	0%	-3%
15	3%	3%	1%	3%	7%	0%	-3%	0%
16	0%	0%	0%	-2%	-5%	0%	-2%	-3%
17	-5%	-4%	-2%	1%	-2%	-2%	-3%	-2%

Tab. 3.10: Prozentualer Unterschied der untersuchten Gene zu ihren jeweiligen Kontrollen. RA = *RAD51*, RB = *RAD51B*, RC = *RAD51C*, RD = *RAD51D*; die Kontrolle zu *RAD51* und seinen Homologen war der Vektor S11IN; Kontrolle zu *XPF* und *ERCC1* war S11IEG3 (siehe auch Abb. 3.30 und 3.31).

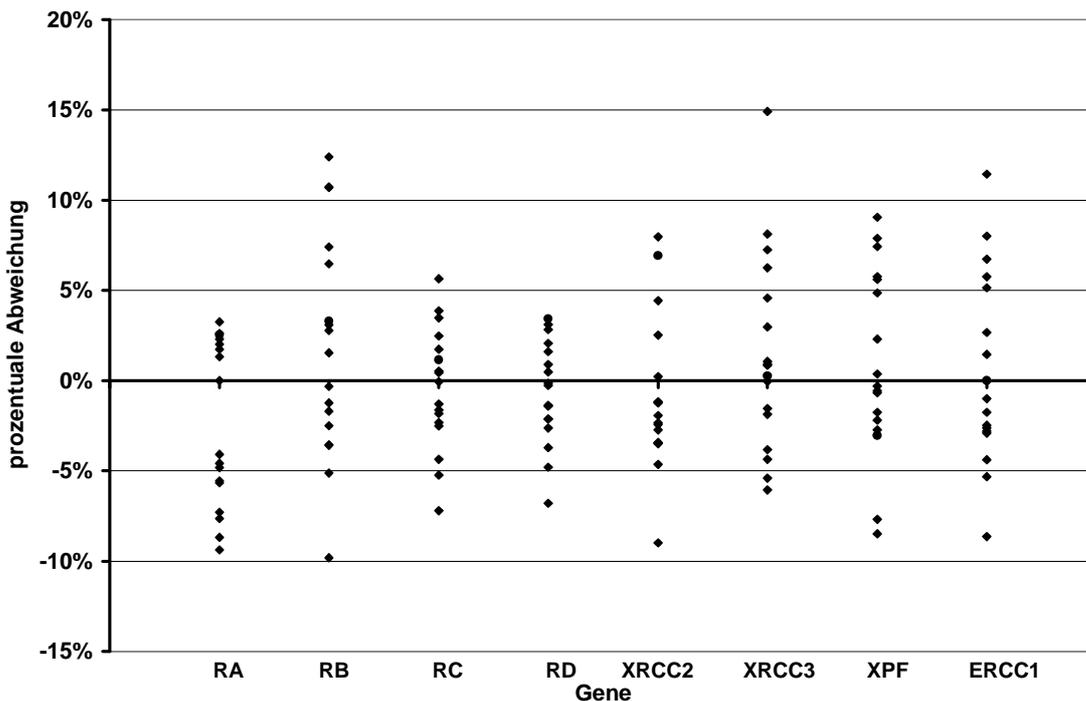


Abb. 3.33: prozentuale Abweichung der Höhe des G2/M-Arrestes der einzelnen untersuchten Gene in Bezug auf ihre Kontrollen. RA (*RAD51*), RB (*RAD51B*), RC (*RAD51C*), RD (*RAD51D*), XRCC2 und XRCC3 sind NEO-Konstrukte; XPF und ERCC1 sind grüne Konstrukte.

Abbildung 3.33 stellt die Ergebnisse der Tabelle 3.10 graphisch dar. Ein Punkt in dieser Graphik steht für einen untersuchten Patienten mit dem entsprechenden Kandidatengen (der x-Achse zu entnehmen). Auf der y-Achse ist die prozentuale Abweichung dieser Ergebnisse von den jeweiligen Kontrollvektoren aufgetragen. Eine negative Abweichung über 10% hinaus würde auf eine eventuelle Korrektur hinweisen.

Aus Graphik 3.33 wird ersichtlich, dass keines der hier untersuchten Kandidatengene von den Kontrollen im Sinne einer Korrektur des G2/M-Arrests abweicht. Somit ist in keiner der jeweils transduzierten FA-Zellen ein Defekt in diesen Genen für den FA-Phänotyp verantwortlich.

4. Diskussion

4.1. DNA-Doppelstrangbrüche

DNA-Schäden sind keine FA-spezifischen Ereignisse, sondern sie treten jeden Tag in jeder Zelle von jedem Menschen auf. Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichsten DNA-Schäden, ihre Häufigkeiten und deren Ursachen. Die Anzahl dieser Ereignisse ist sehr hoch und die Integrität des Genoms kann nur dadurch gewährleistet werden, dass jede Zelle über ein diffiziles Netzwerk von unterschiedlichsten DNA-Reparatur-Mechanismen verfügt. Bemerkenswert ist, dass DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) im Vergleich zu anderen DNA-Schäden nur relativ selten sind. Gleichzeitig ist dies jedoch auch der gefährlichste DNA-Schaden, da die Kontinuität der DNA unterbrochen ist. In Hefezellen konnte gezeigt werden, dass ein einziger nicht reparierter Doppelstrangbruch zum Zelltod führen kann [120].

Schäden	Häufigkeit/Zelle/Tag	Ursache
Basenverlust		
Purine	14.000	spontan
Pyrimidine	1.000	spontan
Basendesaminierung	350	spontan
Basenalkylierung	85.000	5-Adenosylmethionin
Basendimerisierung	50.000	UV
Basenoxidation	3.000	oxidativer Metabolismus
Doppelstrangbrüche	9	spontan
Einzelstrangbrüche	55.000	spontan

Tab. 4.1: Abschätzung täglich auftretender DNA-Schäden in menschlichen Fibroblasten [121, 122].

Die Ursachen für DNA-Doppelstrangbrüche können unterschiedlich sein. Physiologischerweise treten sie beispielsweise in lymphatischen Zellen bei der V(D)J-Rekombination, dem Wechsel zwischen unterschiedlichen Immunglobulinklassen bei der Immunantwort und der somatischen Hypermutation auf [77]. Ebenso sind sie bei der Meiose zu beobachten. Endogene Ursachen für DSB sind freie Radikale, kollabierte Replikationsgabeln [89] oder nicht reparierte Einzelstrangbrüche während der DNA-Replikation. Ionisierende Strahlung und Chemikalien sind die häufigsten exogenen Ursachen für DNA-DSB.

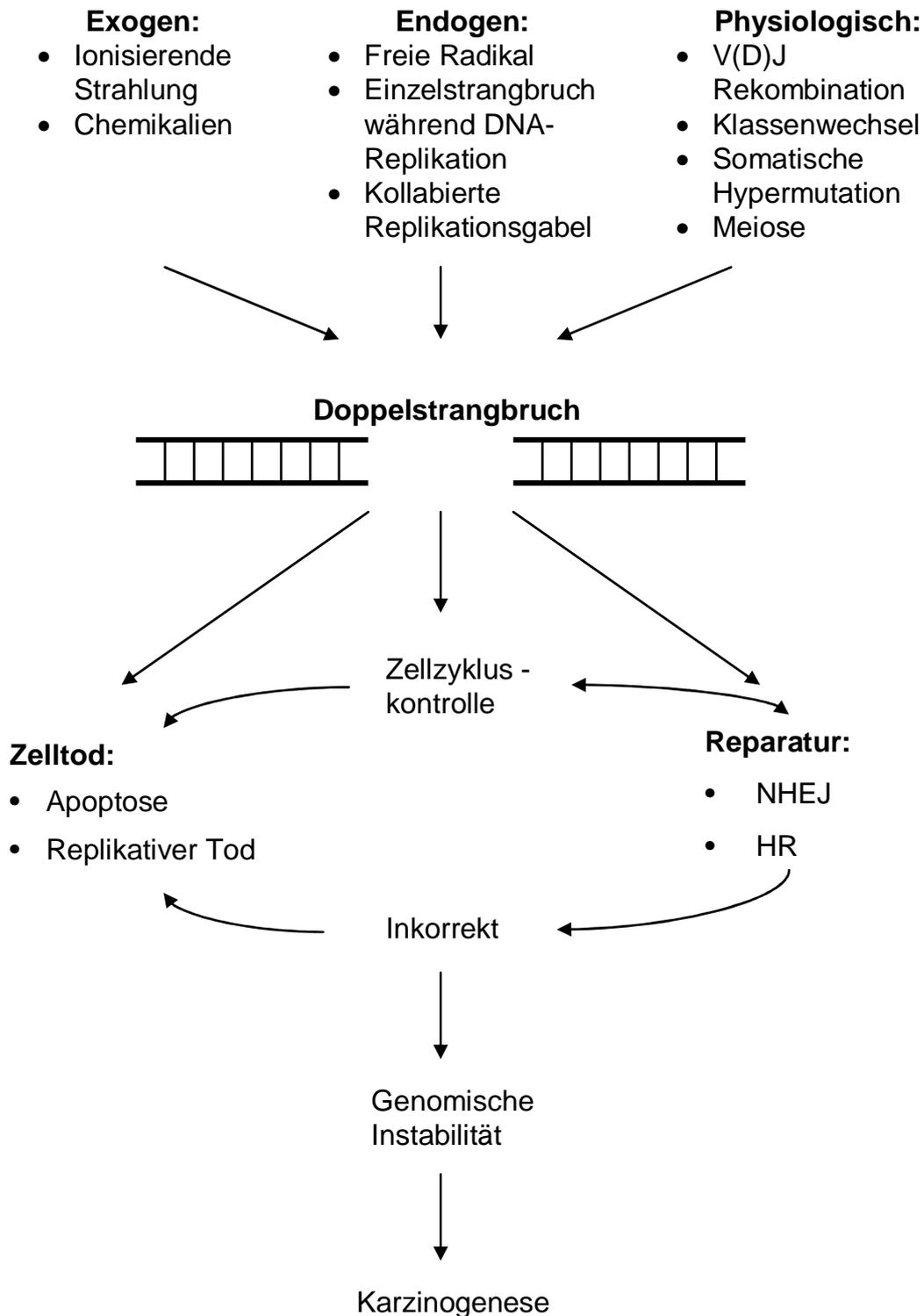


Abb. 4.1: Ursache, zelluläre Antwort und Konsequenz auf DNA-Doppelstrangbrüche. Doppelstrangbrüche entstehen nicht nur durch exogene, sondern auch durch endogene Schäden. Des Weiteren treten sie auch als Nebeneffekt von normalen physiologischen Vorgängen auf. Zellen haben eine Vielzahl an Möglichkeiten, auf diese DSB zu reagieren, wobei die Kontrolle des Zellzyklus im Mittelpunkt der Koordination steht. Kann der Schaden nicht adäquat repariert werden oder die Regulation des Zellzyklus läuft falsch, so kann dies die Entstehung eines Tumors zur Folge haben. Graphik angelehnt an [77].

4.2. Doppelstrangbruchinduktion durch DNA-quervernetzende Reagenzien

Werden FA-Zellen mit MMC behandelt, so weisen diese eine deutliche Zunahme an DSB in der Metaphase auf, verglichen mit Zellen von Normalprobanden (= hypersensibel). Diese Beobachtung wird unter anderem zur Diagnostik der FA benutzt. Jedoch ist der Mechanismus zwischen der Interaktion von DNA-quervernetzenden Reagenzien, DSB und deren Reparatur durch FA-Proteine noch nicht bekannt. Ein Modell nimmt an, dass die Replikationsgabel an Stellen mit DNA-quervernetzenden Reagenzien geblockt wird [123, 124]. Mittels spezifischen Endonukleasen (ERCC1/XPF) wird der quervernetzte DNA-Abschnitt exzidiert. Da dadurch in der G₀/G₁-Phase beide DNA-Stränge gleichzeitig geschädigt sind, ist kein ungeschädigtes Substrat mehr vorhanden, das für eine Reparatur zur Verfügung stehen könnte. Dieser so entstandene DSB kann auf zwei unterschiedliche Weisen repariert werden, entweder mit der homologen Rekombination (HR) oder der nicht homologen End-zu-End-Verknüpfung (non-homologous-end-joining, NHEJ). Zellen von FA-Patienten zeichnen sich dadurch aus, dass sie diesen DSB nicht adäquat reparieren können. Die Untersuchung des Zellzyklusverhaltens von mit FA- oder Kandidatengen transduzierten Zellen nach Exposition gegenüber MMC bietet eine schnellere und technisch einfachere Möglichkeit, als die klassischen Komplementationanalysen mittels Zellfusion.

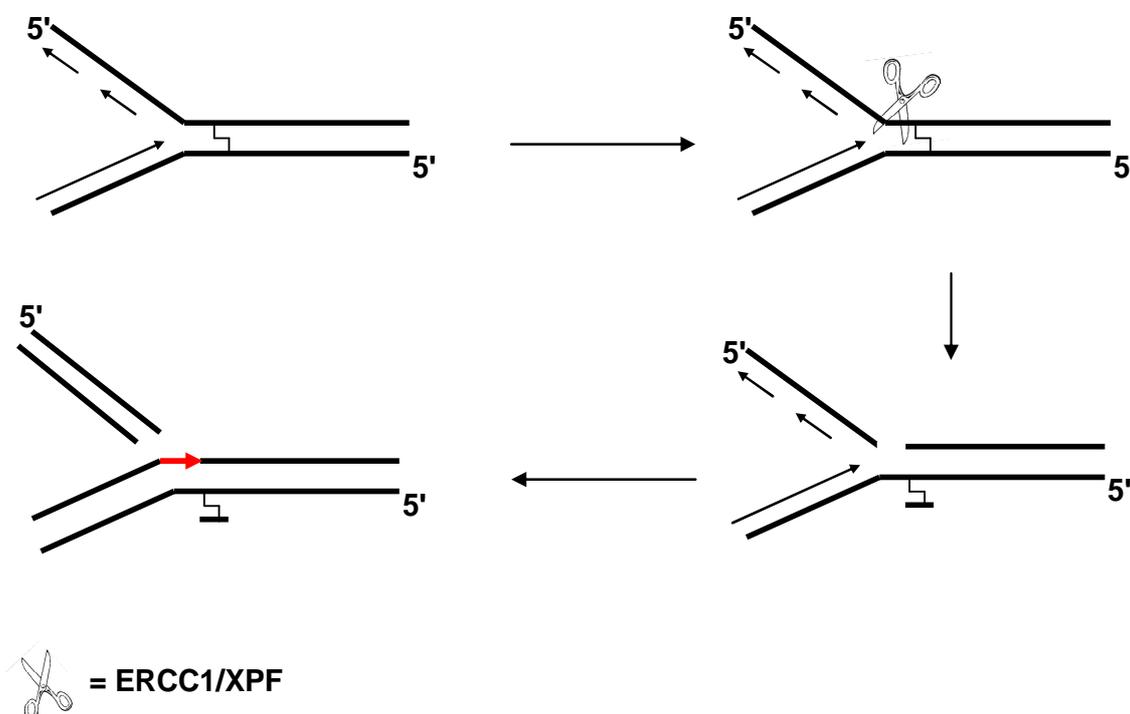


Abb. 4.2.: Generierung von DSB als Reaktion auf DNA-quervernetzende Reagenzien. Das Modell von Rothfuss und Grompe [125] nimmt an, dass DSB bei der Reparatur von Schäden, die durch DNA-quervernetzenden Reagenzien verursacht wurden, durch zelleigene Enzyme generiert werden. NER = nucleotid excision repair. Modifiziert nach [62, 124, 125].

In dieser Arbeit wurden 12 neue FA-Patienten hinsichtlich der Komplementationsgruppenzugehörigkeit untersucht. Für diese Primärdiagnostik wurden alle bekannten und klonierten FA-Gene mittels retroviralen Vektoren in die Fibroblasten dieser Patienten eingebracht. Anschließend wurden sie mit MMC behandelt und auf ihr Zellzyklusverhalten untersucht. Bei keinem dieser 12 Patienten versagte die Methode. Drei Patienten konnten der Komplementationsgruppe FA-A und sieben der Komplementationsgruppe FA-D2 zugeordnet werden. Zwei Patienten zeigten keinen Zellzyklusarrest nach MMC, waren also keine FA-Patienten, sondern möglicherweise Träger einer FA-ähnlichen Erkrankung wie beispielsweise dem Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS).

Von 18 Patienten, die hinsichtlich der Zugehörigkeit zu der FA-L Gruppe untersucht wurden, konnte eine Patientin zu FA-L zugeordnet werden. Dies ist umso bedeutsamer, da bisher kein lebender Patient mit einer Mutation im *FANCL*-Gen beschrieben worden ist. Die schlecht wachsende und nur schwach MMC-empfindliche Referenzzelllinie zur FA-L-Komplementationsgruppe (EUFA868) stammt von einem bereits verstorbenen FA-Patienten, bei dem retrospektiv die Zuordnung zu dieser Komplementationsgruppe erfolgte. Die hier dargestellten Untersuchungen zeigen eindeutig die Zugehörigkeit dieser Patientin zu der Komplementationsgruppe FA-L. Die hier identifizierte Patientin ermöglicht es anhand der primären Fibroblasten, mehr über die physiologische Funktion des Proteins zu erfahren. Des Weiteren können klinische Daten gesammelt werden, um auch für diese Komplementationsgruppe prognostische und therapeutische Aussagen treffen zu können.

4.3. Mosaik

Ein wichtiger Aspekt sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie und Prognose von FA ist die somatische Mosaikbildung im Knochenmark von FA-Patienten [52, 126-128]. Unter einem somatischen Mosaik wird die Reversion des pathogenen Allels zurück zum Wildtypallel verstanden, so dass der Patient unterschiedliche Zellpopulationen besitzt: einerseits Zellen mit der Mutation und defektem Gen und andererseits Zellen mit dem Wildtypallel und somit mit normalem Gen. Diese revertierte Stammzelle des Knochenmarks erhält einen Wachstumsvorteil und kann das Knochenmark repopulieren, so dass der FA-Phänotyp der MMC-Hypersensitivität zurück zum Normalfall revertiert. Insgesamt 10 – 25% der FA-Patienten können so eine gemischte T-Lymphozytenpopulation besitzen [129], was auch gerade in der Diagnostik anhand von Lymphozyten Probleme bereiten kann.

In Fibroblasten ist eine Mosaikbildung bisher nicht beschrieben worden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit nur Fibroblasten als Ausgangssubstrat sowohl für die

Typisierung neu diagnostizierter FA-Patienten als auch für die Untersuchungen von Kandidatengeneten verwandt, um die Ergebnisse eindeutig interpretieren zu können.

Allerdings sind Mosaikbildung in der Hämatopoese für einen Patienten nicht immer negativ. Sie werden für einen milderen FA-Phänotyp, oder im Extremfall, nämlich bei kompletter Repopulation des Knochenmarks, für normale Blutwerte verantwortlich gemacht, womit eines der Hauptprobleme von FA-Patienten beseitigt ist. Ein weiterer Aspekt dieser Mosaikbildung ist die Tatsache, dass dieses Phänomen auch als natürliche Gentherapie charakterisiert werden kann. Somit wäre eine Gentherapie, bei der *ex vivo* das gesunde Gen mittels Vektor in eine hämatopoetische Stammzelle eingebracht werden würde, kein neuer Ansatz, sondern ein von der Natur bereits genutzter Lösungsansatz. Aufgrund der Patienten mit komplett normaler Hämatopoese geht man davon aus, dass diese einzelne korrigierte Stammzelle einen Wachstumsvorteil erhält und im Laufe der Zeit das Knochenmark vollständig repopulieren kann [127].

Die Mechanismen, wie diese somatischen Mosaikbildung entstehen, sind noch nicht komplett aufgeklärt. Jedoch konnten bisher drei Möglichkeiten identifiziert werden. Viele FA-Patienten sind compound-heterozygot für eine Mutation [129]. Erfolgt in der Mitose eine Rekombination (cross-over) in einer Stammzelle, so dass beide Mutationen auf ein Allel fallen, entsteht auf dem anderen Allel ein neues funktionstüchtiges Gen ohne Mutationen [17]. Eine weitere Möglichkeit der Mosaikbildung ist die spontane Reversion einer Mutation [128]. Auch eine sekundäre Sequenzalteration in cis wurde beschrieben, die jedoch in einer transformierten Zelllinie beobachtet wurde [130]. Dies ist bei den hämatopoetischen Zellen von Patientin 17 der Fall.

Ein weiterer Aspekt der Mosaikbildung ist die Frage, wann eine Mosaikbildung auftritt. Eine Reversion *in utero* [52] oder kurz nach der Geburt kann bei ansonsten unauffälligem Phänotyp dazu führen, dass diese Patienten nicht als FA-Patienten identifiziert werden, da sie kein Knochenmarkversagen aufweisen. Problematisch daran ist jedoch, dass die Mutation noch in allen anderen Körperzellen vorhanden ist und diese kein normales Allel besitzen. Eine der Charakteristika der FA ist, dass FA-Patienten eine erhöhte Tumorzinzidenz haben und dass sie sensibler auf DNA-quervernetzende Agentien reagieren. Ist ein Patient mit FA diagnostiziert worden, so sollte er ein besonders intensives Tumorscreening erhalten. Patienten, die aufgrund der Mosaikbildung hämatologisch nicht auffällig werden und somit nicht mit FA diagnostiziert wurden, erhalten demnach dieses intensive Screening nicht, was wiederum ein deutlicher prognostischer Nachteil ist. Des Weiteren erhalten FA-Patienten bei der Behandlung von Tumoren möglichst keine Chemotherapie und eine angepasste Bestrahlung, da sie die bei der sonst üblichen Therapie entstehenden DNA-Schäden kaum reparieren können. FA-Patienten mit einem Malignom und früher Mosaikbil-

derung erhalten diese angepasste Therapie nicht, da sie häufig nicht mit FA diagnostiziert wurden [52].

Dieser Aspekt macht weiterhin deutlich, dass eine exakte Typisierung der Patienten nicht nur für den Patienten selbst außerordentlich wichtig sein kann, sondern auch für seine Geschwister. Zwei in dieser Arbeit untersuchte Patienten wiesen keine Auffälligkeiten im Blut auf, ihre Geschwister waren jedoch eindeutig als FA-Patienten diagnostiziert. Die Untersuchungen der Lymphozyten konnten bei diesen zwei Patienten FA nicht bestätigen. In der hier dargestellten Typisierung von Fibroblasten konnte jedoch nachgewiesen werden, dass beide Patienten der selben Komplementationsgruppe wie ihre Geschwister zuzuordnen sind. Da sie ein Mosaik hatten, waren sie im Blut unauffällig und die Diagnose FA mittels Lymphozytenuntersuchungen nicht zu bestätigen. Die korrekte Diagnosestellung und Einordnung war in diesem Fall nur mittels Fibroblastenuntersuchungen möglich.

Besonders wichtig ist des Weiteren eine korrekte Typisierung der Patienten, da diese Ergebnisse unter Umständen auch Auswirkungen auf ihre Eltern haben. Patienten, die der Komplementationsgruppe FA-D1 zuzuordnen sind, tragen einen Defekt in *BRCA2* auf beiden Allelen. Demzufolge müssen die Eltern dieser Kinder heterozygote Träger der gleichen Mutation sein. Dies prädisponiert sie mit einem deutlich erhöhten Risiko, an Brust-, Ovarial- und Pankreastumoren zu erkranken [131, 132]. Des Weiteren ist die Zuordnung zu dem x-chromosomal lokalisierten *FANCB*-Gen interessant, da aufgrund der zufälligen X-Chromosomeninaktivierung 50% der Körperzellen FA-Zellen sein müssten. Allerdings liegt der Anteil der FA-Zellen im Blut von Müttern von FA-Patienten der Komplementationsgruppe FA-B nur bei < 1%.

4.4. Die Funktion von BRCA2 im FA-Stoffwechselweg

2002 konnte das Brustkrebsgen *BRCA2* als das Gen der Komplementationsgruppe FA-D1 identifiziert werden. Ein gängiges Modell für die Funktion von *FANCD1/BRCA2* ist, dass es nach der *FANCD2*-Monoubiquitinierung aktiviert wird. Einer der Gründe für diese Annahme war, dass *FANCD1*-Zellen einen intakten Kernkomplex haben und *FANCD2* monoubiquitinieren können. Die wesentliche Funktion von *BRCA2* ist die Teilnahme an der Homologen Rekombination mittels direkter Regulation von *RAD51* [105, 106, 133]. Zellen, die einen Defekt in *FANCD2* oder einem der Kernkomplex-Gene besitzen, sind nicht in der Lage, *RAD51*-Foci zu bilden. Dies können *BRCA2*-negative Zellen ebenfalls nicht [134-136]. Da *BRCA2* direkt mit *RAD51* interagiert, wird angenommen, dass der FA-Kernkomplex über die *FANCD2*-Monoubiquitinierung *FANCD1/BRCA2* und damit indirekt die *RAD51*-Focus-Bildung reguliert [108, 137]. Neuere Untersuchungen haben herausgefunden, dass monoubi-

quitiniertes FANCD2 an Chromatin bindet und so eine BRCA2-Bindung über direkte Interaktion bewirken kann [135].

Dass jedoch die FA-BRCA-Interaktion nicht so linear ist, wie oben beschrieben, ist inzwischen gezeigt [63]. Auch interagieren FANCA und FANCG direkt mit BRCA2. Unter anderem wird eine parallele Interaktion diskutiert. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass FANCD1-Patienten einen etwas anderen Phänotyp haben, als alle anderen FA-Patienten [38]. Unklar ist auch, was genau die Monoubiquitinierung von FANCD2 bewirkt und wie diese die Reparatur von DNA-quervernetzenden Schäden koordiniert [63].

Neuerdings verlagert sich die Sichtweise von einer direkten DNA-Reparatur durch die FA-Proteine hin zu einer Mediatorfunktion, wobei die FA-Proteine die DNA-Reparatur zwar nicht selbst ausführen, aber überhaupt erst ermöglichen. Hussain et al. [137, 138] beschrieben ein Modell, in dem der FA-Kernkomplex mittels FANCD2-Monoubiquitinierung die homologe Rekombination ermöglicht. Nach ihrem Modell würde BRCA2 die Replikationsgabel stabilisieren und so eine RAD51 Einzelstrangbindung ermöglichen. Dieses Modell der Stabilisierung von zerstörten oder blockierten Replikationsgabeln wird durch die Tatsache unterstützt, dass DNA-quervernetzende Substanzen die Replikation, Transkription und Rekombination behindern [123]. FA-Proteine führen zu einer Stabilisierung dieser zerstörten Replikationsgabeln, so dass RAD51 an die Einzelstränge binden und den Defekt mittels homologer Rekombination reparieren kann. Würde diese blockierte oder zerstörte Replikationsgabel nicht stabilisiert werden, so würden freie DNA-Enden entstehen, die wiederum Substrate für Translokationen sein können. Des Weiteren kann der Schaden nicht mittels der fehlerfreien homologen Rekombination repariert werden, sondern müsste mittels der nicht-homologen-End-zu-End-Verknüpfung (non homologous end joining, NHEJ) angegangen werden. Dieses ist jedoch eine fehlerhafte Reparatur, bei der unter Umständen wichtige Information verloren geht oder Deletionen entstehen können.

4.5. Kandidatengene

Obwohl bisher 12 unterschiedliche Komplementationsgruppen identifiziert werden konnten, ist der zelluläre Phänotyp aller FA-Zellen sehr ähnlich. Jede Komplementationsgruppe zeichnet sich durch eine Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Reagentien aus. Aufgrund dieser Beobachtung wurde angenommen, dass die FA-Proteine in einem gemeinsamen Stoffwechselweg interagieren, der in der DNA-Reparatur involviert ist. Da quervernetzende DNA-Schäden mittels homologer Rekombination repariert werden, wurde vermutet, dass die Hauptfunktion der FA-Proteine hier zu finden ist [123]. Als 2002 das Brustkrebsgen *BRCA2* als das Gen der Komplementationsgruppe FA-D1 kloniert wurde, schienen diese Vermu-

tungen bestätigt, da BRCA2 mit dem DNA-Reparaturprotein RAD51 interagiert. RAD51 ist eines der zentralen Proteine, die an der homologen Rekombination beteiligt sind. Knock-out-Mäuse zeigen darüber hinaus ähnlich wie FA-Zellen eine MMC-Überempfindlichkeit.

4.5.1. RAD51

RAD51 ist ein Homolog des bakteriellen RecA-Proteins, welches in der Rekombination und in der Reparatur von DNA-Schäden involviert ist [139]. Ebenso nimmt es eine zentrale Position in der Wiederherstellung von zerstörten Replikationsgabeln ein [89, 140]. Die Brustkrebsgene *BRCA1* und *BRCA2* bilden einen Komplex mit RAD51. Wie oben dargestellt, ist RAD51 ein Schlüsselprotein in der Reparatur von DSB mittels HR. Homozygote *RAD51* Nullmutante sind lethal, was die wichtige zelluläre Funktion widerspiegelt [80].

4.5.2. RAD51-Homologe

Insgesamt konnten fünf *RAD51* Homologe in Vertebraten identifiziert werden, die zu ungefähr 20-30% identisch mit *RAD51* sind: *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* und *XRCC3*. Diese Homologe bilden untereinander verschiedene Multiproteinkomplexe.

Ein Komplex aus vier Untereinheiten setzt sich jeweils aus den Heterodimeren XRCC2-RAD51D und RAD51B-RAD51C zusammen [141-145] wobei XRCC2 nur mit RAD51D direkt interagiert [143]. Des Weiteren konnte eine direkte Interaktion zwischen RAD51C und XRCC3 nachgewiesen werden [143, 144, 146, 147]. Möglicherweise gehört RAD51 selbst noch zu diesem Komplex [143], wobei es direkt mit XRCC3 interagiert [143, 148].

4.5.2.1. RAD51B

Für RAD51B konnte eine Interaktion mit RAD51C nachgewiesen werden [143, 149]. Dieser Heterodimer ist ein Bestandteil des Tetramers aus XRCC2-RAD51B-RAD51C-RAD51D mit einer Stöchiometrie von 1:1:1:1 [143].

4.5.2.2. RAD51C

Der gereinigte RAD51C-XRCC3-Komplex kann einzelsträngige DNA, nicht aber doppelsträngige DNA binden [146]. Mutationen in einem dieser beiden Gene führen zu Veränderungen in der Holliday-Verbindung und Depletion von RAD51C verhindert die Stranginvasion [147].

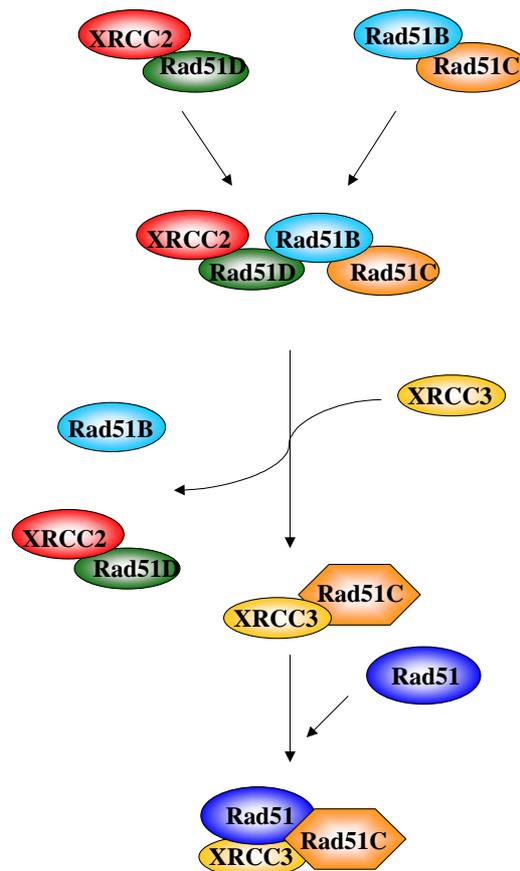


Abb. 4.3: Vermutete Interaktionen zwischen den RAD51-Homologen. Es wird angenommen, dass XRCC2 und RAD51D sowie RAD51B und RAD51C jeweils einen Dimer bilden. Diese beiden Dimere bilden über eine Interaktion zwischen RAD51D und RAD51B einen Komplex. XRCC3 verdrängt in einem nächsten Schritt RAD51B aus seiner Bindung mit RAD51C und geht selber mit diesem Protein eine Verbindung ein, wodurch RAD51C seine Konformation ändert. Diese Konformationsänderung ermöglicht RAD51, eine Bindung mit XRCC3 und RAD51C zum aktiven Komplex einzugehen. Nach [141].

4.5.2.3. RAD51D

Für RAD51D wird eine doppelte Rolle in der Zelle angenommen, wobei die zweite Funktion neben der Reparatur von DSB in dem Schutz von Telomeren gegen Fusion postuliert wird [150].

4.5.2.4. XRCC2

X-ray repair complementing defective in chinese hamster 2

XRCC2 ist essentiell für die Reparatur von DSB [151] mittels HR zwischen den Schwesterchromatiden. Hamsterzellen, die defekt in XRCC2 sind, weisen eine 100-fach niedrigere Rate an HR auf.

4.5.2.5. XRCC3

X-ray repair complementing defective in chinese hamster 3

XRCC3 spielt sowohl bei den ersten Schritten der HR als auch zu späteren Zeitpunkten eine zentrale Rolle. Es stabilisiert Heteroduplex DNA. Zellen mit einem Defekt in XRCC3 weisen genomische Instabilität auf [152].

4.5.3. Mutanten von *RAD51* und seinen Paralogen

Mutationen von *RAD51* und seinen Paralogen zu untersuchen, erwies sich als schwere Aufgabe. Mäuse und Zellen mit defizientem *RAD51* sind letal, was u.a. auf die essentielle Funktion dieses Proteins hinweist [80]. In Hühnerzellen, in denen das Vorhandensein dieses Proteins konditionell steuerbar ist, konnte eine direkte Rolle von *RAD51* in der Erhaltung genomischer Stabilität gezeigt werden. Hier führte eine unterdrückte Expression zu erhöhter chromosomaler Brüchigkeit [153]. Drei weitere Mausmodelle mit Defekten in den *RAD51*-Paralogen *XRCC2*, *RAD51B* und *RAD51D* zeigten ebenfalls frühe embryonale Letalität [154, 155]. Knock-out-Zellen von einem der fünf Paralogen hingegen sind jedoch lebensfähig. So konnten alle fünf Paralogen in Hühnerzellen (DT40 B-Lymphozyten) selektiv ausgeschaltet werden und der zelluläre Phänotyp untersucht werden [156, 157]. Dabei zeigte sich, dass die Zellen ein vermindertes Wachstum aufwiesen und 20-30% mehr Zellen starben. Die Länge des Zellzyklus war jedoch gleich lang im Vergleich zu der Kontrolle. Es konnte kein Arrest in G1 oder G2/M nachgewiesen werden. Dies kann jedoch auch daran liegen, dass das p53-Protein in diesen Zellen aus technischen Gründen ausgeschaltet werden musste. Die Hühnerzellen wiesen alle erhöhte spontane chromosomale Abnormalitäten (v.a. Chromosomenbrüche) auf, wobei die *RAD51D*^{-/-}-Zellen besonders schwer betroffen waren. Nach Behandlung mit DNA-quervernetzenden Reagenzien konnten keine *RAD51*-Foci nachgewiesen werden und die HR war in den Knock-out-Zellen von *RAD51D*, *XRCC2* und *XRCC3* um das 30-fache erniedrigt. Dabei waren die Zellen besonders empfindlich gegenüber Cisplatin. In Hamsterzellen konnte sogar eine 60 bis 70-fach erhöhte Sensitivität gegenüber MMC festgestellt werden [158]. Schwesterchromatidaustausch wurde in jeder der Knock-out-Zellen nur in reduzierter Anzahl beobachtet und selbst auf Behandlung mit MMC stiegen diese kaum an.

Werden diese Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, so kann festgestellt werden, dass in Knock-out-Zellen der *RAD51*-Paralogen ähnliche zelluläre Auffälligkeiten zu finden sind wie in Fanconi-Anämie-Zellen. Dabei sind diese Defekte sowohl in Hühnerzellen als auch in Hamsterzellen nachweisbar [148, 159]. Die Gemeinsamkeiten erstrecken sich von einer erhöhten chromosomalen Instabilität [160] über Defekte in der HR und einer erhöhten Sensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Reagenzien. Besonders auffällig sind diese Ähnlichkeiten, wenn die oben beschriebenen Knock-out-Zellen mit Zellen von Patienten der Komplementationgruppe

FA-D1 verglichen werden [161]. In diesen Zellen, in denen das *BRCA2*-Gen defekt ist, lassen sich ebenso wie in den Knock-out-Zellen der *RAD51*-Paralogen keine *RAD51*-Foci nachweisen [162].

Aufgrund dieser Ähnlichkeit des zellulären Phänotyps von Fanconi-Anämie-Zellen und Zellen mit Defekten in *RAD51* und seinen Paralogen stellen diese Gene besonders interessante Kandidatengene für die noch fehlenden FA-Gene dar. In dieser Arbeit wurden *RAD51* und alle seine Paralogen mittels retroviralem Gentransfer in Fibroblasten von FA-Patienten transferiert. Da sich die Gentransfereffizienz als ein Problem darstellte, wurde die Überexpression in allen Zellen durch den Einbau eines Selektiongens erreicht. Die untersuchten Patientenzellen konnten alle keiner Komplementationsgruppe zugeordnet werden, so dass anzunehmen ist, dass sie einen Gendefekt in einem noch nicht identifizierten FA-Gen tragen. Nach der Infektion wurden diese Zellen anschließend mittels MMC behandelt und untersucht, ob die eingebrachten Gene eine funktionelle Komplementation vermitteln. Dabei konnte keines der sechs Gene aus der *RAD51*-Familie bei einem der 17 Patienten eine Korrektur des zellulären Phänotyps bewirken. Alle Patienten zeigten nach der Transduktion und der Behandlung mit MMC weiterhin einen G2/M-Arrest auf. Aufgrund dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass in keinem der 17 Patienten ein Defekt in *RAD51* oder seinen Homologen vorliegt. In Anbetracht der Tatsache, dass Mäuse mit einem Defekt in *RAD51* frühe embryonale Letalität aufweisen, könnte angenommen werden, dass auch beim Menschen ein Defekt in diesen Genen ebenfalls letale Folgen haben kann. Ein Defekt in diesen zentralen Proteinen der HR stellt möglicherweise einen zu großen Funktionsverlust für die Zelle dar, der das Überleben des Individuums nicht mehr gewährleisten würde. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von *RAD51D* Zellen von Mäusen und von Menschen nicht wachstumsfähig sind [163].

Eine mögliche Erklärung für die Ähnlichkeit im zellulären Phänotyp zwischen FA-Patienten und Knock-out-Zellen der *RAD51*-Familie könnte die Interaktion von *BRCA2* mit *RAD51* sein. Da *BRCA2* den FA-Stoffwechselweg mit der HR verknüpft, scheinen diese beiden Stoffwechselwege essentiell für die Reparatur von DNA-Schäden zu sein. Ein Defekt in dem FA-Stoffwechselweg scheint eine inadäquate Interaktion mit den *RAD51*-Proteinen zur Folge zu haben, so dass auf zellulärer Ebene ähnliche Symptome präsentiert werden.

Obwohl die dargestellten Ergebnisse für *RAD51* und seine Homologe alle eindeutig negativ ausfallen, sei darauf hingewiesen, dass nur ein Bruchteil der noch nicht klassifizierten FA-Patienten untersucht werden konnte. Nicht von allen FA-Patienten sind Fibroblasten vorhanden, die Ausgangsmaterial dieser Untersuchung waren. Aufgrund der Zunahme an Wissen über die essentielle physiologische Funktion dieser

Gene ist jedoch davon auszugehen, dass ein Defekt in diesen Genen nicht mit dem Überleben des Individuums zu vereinbaren wäre. Demnach wird aufgrund dieser Untersuchungen davon ausgegangen, dass trotz vieler Parallelen zwischen FA-Zellen und Knock-out-Zellen von *RAD51* und seiner Paraloge diese Gene keine FA-Gene sind.

2005 konnte eine mit BRCA1 interagierende Helikase - *BRIP1* oder auch *BACH1* (BRCA1-associated C-terminal helicase 1) genannt - als das defekte Gen des Subtypes FA-J identifiziert werden [30]. Interessanterweise liegt dieses genau neben *RAD51C* auf Chromosom 17q23.

4.5.4. **RAD54B**

RAD54B ist ein Homolog zu *RAD54* [164] und wird bei DNA-Schäden mit *RAD51*, *RAD54* und *BRCA1* rekrutiert [165], wobei *RAD51* und *RAD54B* im Gegensatz zu *RAD54* nicht direkt miteinander interagieren. Es verfügt über ATPase-Aktivität, um doppelsträngige DNA binden zu können [166]. Anhand einer Kolonkarzinomzelllinie mit einem Defekt in *RAD54B* konnte gezeigt werden, dass dieses Protein eine kritische Rolle bei der Schwesterchromatidaustauschreaktion und in der Sensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Agenzien besitzt [167].

RAD54-defiziente Mäuse waren bislang ein Säugermodell mit einem echten Defekt in der Rekombination. Embryonale Stammzellen dieser Mäuse sind sensitiv gegenüber ionisierender Strahlung und MMC. Ausgewachsene Mäuse sind nur noch sensitiv gegenüber MMC, aber nicht mehr für ionisierende Strahlung [168]. Über *RAD54B* selbst ist bisher noch wenig bekannt, es wird aber angenommen, dass es keine so zentrale Stellung in der HR hat, wie sein Homolog *RAD54* [140, 169].

In dieser Arbeit war die Überexpression von *RAD54B* in Kombination mit EGFP toxisch für die Produzentenzellen, so dass keine funktionsfähigen Viren hergestellt werden konnten. Somit konnte dieses Gen in der vorliegenden Arbeit mit dem verwandten Analysesystem nicht als Kandidatengen getestet werden.

4.5.5. **BRCA1, Breast cancer 1 gene**

BRCA1 verfügt über eine Vielzahl an Funktionen und Interaktionen. Hier soll nur auf die für diese Arbeit interessanten Eigenschaften eingegangen werden.

Eine wesentliche Funktion von *BRCA1* liegt in der Reparatur von DNA-Schäden [170]. Mit vielen Proteinen, auch solchen des FA-Stoffwechselweges, sind vielfältige Interaktionen beschrieben worden. *BRCA1* und *FANCD1/BRCA2* interagieren in einem gemeinsamen Stoffwechselweg im Rahmen der Aktivierung von DSB-Reparatur

und der HR [171]. Monoubiquitiniertes FANCD2 kolokalisiert mit BRCA1 und RAD51 in nucleären Reparatur-Foci [21, 108, 172]. Ebenso konnten *in vitro* und *in vivo* Interaktionen zwischen BRCA1 und RAD50 aus dem RAD50-Mre11-Nbs1-Komplex gezeigt werden. Nach Bestrahlung von Zellen konnten im Zellkern Foci detektiert werden, in denen RAD50 mit BRCA1 kolokalisierte [173]. Darüber hinaus wurden direkte Interaktionen zwischen FANCA und BRCA1 demonstriert [174].

BRCA1 wird als "caretaker" der genomischen Integrität angesehen [170]. BRCA1-knock-out-Mäuse weisen ebenso wie Knock-out-Mäuse der RAD51-Familie embryonale Letalität auf [175-183]. Intrauterin sind bei diesen BRCA1-knock-out-Mäusen eine Wachstumsretardierung, eine erhöhte Apoptoserate und Defekte im Zellzyklus nachweisbar. Lebensfähige Mäuse mit verändertem *BRCA1*-Gen tragen eine hypomorphe Mutation, so dass noch ein Teil des Proteins Funktionsträger ist. Diese Mäuse weisen eine erhöhte Rate an Lymphomen [184] und Brustkrebs [185, 186] auf. Besonders der G2/M-Checkpoint im Zellzyklus weist Abnormalitäten auf [170].

Da Patienten mit einem hypomorphen D1-Allel lebensfähig sind [16], ist BRCA1 ein besonders interessantes Kandidatengen für die noch fehlenden FA-Gene. Leider konnte in dieser Arbeit dieses Gen nicht näher untersucht werden. Ebenso wie RAD54B erwies es sich bei der Virusproduktion als toxisch. Alle EGFP-positiven Zellen starben nach einiger Zeit ab. Im Rahmen anderer Untersuchungen wurde das EGFP-Gen im BRCA1-Vektor gegen ein Neomycin-Resistenz-Gen ausgetauscht. Dieses Konstrukt war im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit etablierten Vektor stabil expressionsfähig, so dass die Toxizität auf die Kombination von BRCA1 und EGFP zurückzuführen ist. Anstehende Untersuchungen werden dieses Konstrukt als Ausgangssubstrat nutzen, um BRCA1 als FA-Kandidatengen näher zu untersuchen.

4.5.6. XPF/ERCC1

Excision-repair complementing defective in chinese hamster 1

Xeroderma pigmentosum complementation group F

XPF und ERCC1 bilden einen Heterodimer mit Endonukleaseaktivität an der Übergangsstelle von einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA [187]. Ihre zentrale Funktion liegt mit einer Reihe anderer Proteine in der Nukleotidexzisionsreparatur. Jedoch sind Hamsterzellen mit einem Defekt in ERCC1 und XPF im Gegensatz zu anderen Proteinen aus der Nukleotidexzisionsreparatur extrem sensitiv gegenüber Cisplatin, einem DNA-quervernetzenden Reagenz [188, 189]. Da DNA-quervernetzende Schäden mittels HR repariert werden, wird eine duale Funktion des ERCC1-XPF-Komplexes sowohl in der Nukleotidexzisionsreparatur als auch in der HR angenommen [83, 190]. In der Tat konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass der ERCC1-XPF-Komplex eine Rolle in der HR spielt, wobei dieser für die Exzision des

DNA-quervernetzenden Schadens zuständig sein soll [125, 191-194]. Ein weiterer Hinweis, dass diese beiden Proteine an der Reparatur von DNA-quervernetzenden Schäden beteiligt sind, stammt aus der Interaktion mit dem FANCA-Protein. Werden Normalzellen mit Psoralen behandelt, so lassen sich nukleäre Foci nachweisen, in denen FANCA mit XPF kolokalisiert. Darüber hinaus zeigen FA-A-Zellen weniger XPF-Focus-Bildung [195].

Diese Interaktion mit FANCA und die Tatsache, dass der ERCC1-XPF-Komplex für die Reparatur DNA-quervernetzender Schäden zuständig sein soll, machen diese beiden Gene zu potentiellen Kandidatengenen. Bislang wurde kein Defekt in ERCC1 beim Menschen beschrieben, obwohl sein Interaktionspartner XPF eine Komplementationsgruppe der Hauterkrankung Xeroderma pigmentosum (= XP) darstellt. Patienten mit Mutationen in XPF weisen einen sehr milden Phänotyp dieses Krankheitsbildes auf [83]. Bei ERCC1-Mäusen hingegen zeigt sich ein deutlich stärker ausgeprägter Phänotyp als bei Mäusen mit klassischem XP-Phänotyp [196, 197]. Knock-out-Mäuse für ERCC1 sterben entweder im Uterus oder einige Monate nach der Geburt. Die geborenen Mäuse sind kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister, leiden an Leber- und Nierenfehlbildungen und altern vorzeitig. Dieser Phänotyp ähnelt dem Phänotyp von FA-Patienten, die im Schnitt auch etwas kleiner sind und häufig an Fehlbildungen der inneren Organe leiden.

Fibroblasten von FA-Patienten, in denen der Gendefekt bisher noch nicht identifiziert werden konnte, waren auch hier Ausgangsmaterial für die Untersuchungen. Dabei wurden die Zellen von 17 Patienten jeweils mit einem Retrovirus, der ERCC1 oder XPF enthielt, infiziert. Als Markerprotein diente EGFP. Nach erfolgter Transduktion wurden die Zellen mit MMC behandelt und auf ihr Zellzyklusverhalten untersucht. Alle Patientenzellen zeigten in der Kontrolle einen G2/M-Arrest. Dieser Arrest konnte weder von dem ERCC1- noch von dem XPF-Vektor korrigiert werden. Aufgrund dieser Beobachtung ist davon auszugehen, dass in diesen 17 Patienten weder ein Defekt in ERCC1 noch in XPF vorliegt, da sich durch das Einbringen dieser beiden Gene das Zellzyklusverhalten sowie die Hypersensitivität der FA-Zellen gegenüber MMC nicht verändert. Die Vermutung, dass *ERCC1* oder *XPF* ein FA-Gen sein könnten, bestätigte sich nicht.

4.5.7. hSNM1A = DCLRE1A

DNA cross-link repair protein 1A, DCLRE1A

hSNM1 ist eines von drei Homologen des *S. cerevisia* Gens *PSO2* [198]. Embryonale Stammzellen von Mäusen mit einem Defekt in mSNM1 zeigen einen zweifachen Anstieg ihrer Sensitivität gegenüber MMC [199]. Des Weiteren verursacht Bestrahlung die Bildung von Reparaturfoci im Zellkern, in denen hSNM1 mit einem weiteren

Protein der DNA-Reparatur kolokalisiert [200]. hSNM1C ist auch bekannt unter dem Namen ARTEMIS, welches für die V(D)J-Rekombination essentiell ist. Ein Defekt in diesem Gen kann einen schweren Immundefekt, die „Severe Combined Immunodeficiency“ (SCID) verursachen [201]. Zudem konnten Parallelen im zellulären Phänotyp von Zellen mit einem Defekt in *hSNM1B* zu dem Phänotyp von FA-Zellen festgestellt werden, so dass bei *hSNM1B* über eine mögliche Funktion im FA/BRCA-Stoffwechselweg diskutiert wird [191]. Obwohl die exakte biochemische Funktion von hSNM1 noch nicht geklärt ist, ist anzunehmen, dass diese in der Reparatur von DSB liegt [191].

In dieser Arbeit konnte *hSNM1* im Zusammenhang mit Zellen von FA-Patienten nicht untersucht werden, da sich die Expression von hSNM1 mit EGFP als Markerprotein in den Produzentenzellen als toxisch erwies. Nach Transfektion zeigten sich nur wenige EGFP+ Zellen, die jedoch schon abstarben. Ebenso wie *RAD54B* wurde dieses Gen nicht weiter verwandt und das Problem der Toxizität nicht näher untersucht.

5. Ausblick

Die Identifizierung der betroffenen Gene in Patienten mit FA ist angesichts der großen klinischen Variabilität nur mit Hilfe molekularer Ansätze möglich. Die daraus abzuleitenden Phänotyp-Genotyp-Korrelationen sind sowohl für das allgemeine Verständnis der FA als auch für die Prognose des einzelnen Patienten wichtig. So zeigen z. B. Patienten der Komplementationsgruppe FA-D1 mit Keimbahnmutationen in dem *BRCA2*-Gen einen wesentlich schwereren klinischen Verlauf ihrer Erkrankung als Patienten aller anderen Untergruppen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Eltern der betreffenden Patienten bisher in allen Fällen heterozygote Träger der jeweiligen Mutation sind. Diese *BRCA2*-heterozygoten Individuen sind klinisch gesund, tragen aber ein sehr hohes Risiko, bis zum Alter von 80 Jahren ein *BRCA2*^{-/-} Malignom an Brust, Ovar oder Pankreas zu erleiden.

Da FA eine seltene Erkrankung ist, ist die kontinuierliche Zuordnung aller bekannten Patienten zu der jeweiligen Komplementationsgruppe notwendig, um statistisch sichere Aussagen und prognostische Auswertungen vornehmen zu können. Die beste Lösung wäre ein internationales FA-Register, in dem alle klinische Daten und Verläufe sowie die Zugehörigkeit zu der Komplementationsgruppe, die Mutationen und auch die jeweilige Therapie gespeichert und dynamisch aktualisiert werden. Dieses Register zu etablieren ist sicherlich für die zukünftige ideale Betreuung und Erforschung der FA eine gewaltige Herausforderung und wäre nur in einer engen Zusammenarbeit von vielen FA-Forschern, -Ärzten, -Selbsthilfegruppen und -Patienten möglich.

Gerade aus der sukzessiven Datensammlung und Auswertung haben sich bereits in der Vergangenheit vielfältige Konsequenzen für die Behandlung von Patienten mit FA ergeben. Durch die systematische Erhebung der Resultate und Überlebensraten von unterschiedlichen Konditionierungsprotokollen vor einer KMT, sowie die Veröffentlichung dieser Ergebnisse, erfolgte eine konsequente Anpassung dieser Protokolle. So konnten unerwünschte Nebenwirkungen verringert und das geringe Überleben durch die hohe Toxizität kontinuierlich verbessert werden.

Durch diese an die Besonderheiten der Erkrankung angepassten Transplantationsregime erreichen heutzutage erfreulicherweise mehr FA-Patienten ein höheres Lebensalter. Da mit einer KMT jedoch nur die hämatologische Komponente der Erkrankung therapiert werden kann und bei dieser Therapieform noch zusätzliche Schäden gesetzt werden, stehen wir in Zukunft bei der Betreuung unserer Patienten ganz neuen Problemen gegenüber. Plattenepithelkarzinome des oberen aerodigestiven und anogenitalen Traktes sind die Hauptprobleme, mit denen FA-Patienten in einem Alter über 20 Jahre fast alle konfrontiert sind. So haben diese FA-Patienten z. B. ein 500- bis 1000-fach erhöhtes Risiko, an Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Hals-

bereiches - besonders der Mundhöhle - zu erkranken [39, 202]. Die üblichen Therapieregime zur Behandlung von diesen Tumoren sehen eine Radiatio häufig in Kombination mit DNA-quervernetzenden Substanzen wie z.B. Cisplatin vor. Zellen von FA-Patienten weisen jedoch eine Hypersensitivität gerade gegenüber diesen Substanzen auf, so dass diese DNA-kreuzvernetzenden Substanzen aus Toxizitätsgründen nur sehr vorsichtig bei FA-Patienten eingesetzt werden können. Daher ist es für eine optimale Behandlung solcher Tumoren wichtig, sie so früh wie möglich zu entdecken, um sie möglichst mit alleiniger chirurgischer Intervention/Exzision therapieren zu können. Hierzu benötigen wir in der Zukunft gute Screeningmethoden sowie gut strukturierte Verlaufsbeobachtungen, um möglichst schon präkanzeröse Veränderungen detektieren und mit einer einfachen Biopsie entfernen zu können. Die Entwicklung eines nichtinvasiven Tests auf der Basis von einfachen Bürstenabstrichen der Mundschleimhaut [203, 204] stellt in diesem Zusammenhang eine besonders vielversprechende Früherkennungsmethode dar.

Obwohl die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene alle in einer Beziehung mit dem FA-BRCA-Stoffwechselweg stehen, konnte keines dieser Gene als Fanconi-Anämie-Gen identifiziert werden. Gerade *RAD51* und seine Homologe waren als unmittelbar ausführende Proteine der HR besonders interessante Kandidaten. Bei der Identifizierung des *FANCI*-Gens als BRIP1/BACH1 mittels positionaler Klonierung war unter anderem auch die Tatsache richtungweisend, dass das unmittelbar benachbarte *RAD51C*-Gen im Rahmen dieser Untersuchungen als *FANCI*-Gen ausgeschlossen werden konnte.

In den letzten zwei Jahren wird beispielsweise die Funktion der FA-Proteine zunehmend nicht in einer aktiven Rolle im Rahmen der Reparatur von DSB-Brüchen, sondern eher in einer passiven Funktion der Stabilisierung der DNA-Replikationsgabel gesehen, so dass andere Proteine des DNA-Reparatur-Stoffwechsels die Schäden reparieren können. Da noch einige Patienten keiner der bisher bekannten Komplementationsgruppen zugeordnet werden konnten, wissen wir, dass noch weitere Kandidatengene zu finden sind. Jedes einzelne Gen könnte sehr entscheidend sein, um so die Funktion des FA-Stoffwechselweges in der Zelle besser zu verstehen und vielleicht auch therapeutisch beeinflussen zu können.

Es stellt sich die Frage, ob die hier beschriebene Methode der Überexpression von Genen mittels retroviralem Gentransfer dafür eine geeignete Methode ist. Drei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene konnten mit Hilfe dieses methodischen Ansatzes nicht weiter untersucht werden, da eine Überexpression toxisch für die Zellen war. Daher sind hierzu andere Ansätze nötig, um die noch restlichen FA-Gene zu finden.

Es ist jedoch davon auszugehen, dass die restlichen FA-Gene nur in einer sehr niedrigen Frequenz in der allgemeinen heterogenen Bevölkerung in Europa oder Nordamerika vertreten sind. Daher ist auch hier eine enge internationale Zusammenarbeit von unterschiedlichen FA-Arbeitsgruppen sowie der Austausch sowohl von Patientenmaterial als auch unterschiedlichen methodischen Ansätzen eine wahre *conditio sine qua non*, um die noch fehlenden Gene zu entdecken. Nur durch ein genaues Verständnis des FA-Stoffwechselweges in jeder Zelle ist eine kontinuierliche Verbesserung der Therapie von Patienten mit FA überhaupt möglich, die dann im Idealfall dem einzelnen Patienten eine höhere Lebenserwartung mit einer stark verbesserten Lebensqualität ermöglichen wird.

6. Literatur

1. Lobitz, S. and E. Velleuer, *Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 893-8.
2. Fanconi, G., *Familiäre, infantile, perniziösartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution)*. Jb Kinderheilk, 1927(117): p. 257.
3. Unal, S., N. Ozbek, A. Kara, M. Alikasifoglu, and F. Gumruk, *Five Fanconi anemia patients with unusual organ pathologies*. Am J Hematol, 2004. **77**(1): p. 50-4.
4. Fanconi, G., *Erinnerungen eines Kinderarztes*. 1986, Stäfa-Zürich: Rothenhäusler Verlag.
5. Alter, B.P., *Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001*. Cancer, 2003. **97**(2): p. 425-40.
6. Kutler, D.I., B. Singh, J. Satagopan, S.D. Batish, M. Berwick, P.F. Giampietro, H. Hanenberg, and A.D. Auerbach, *A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1249-56.
7. Verlander, P.C., A. Kaporis, Q. Liu, Q. Zhang, U. Seligsohn, and A.D. Auerbach, *Carrier frequency of the IVS4 + 4 A-->T mutation of the Fanconi anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population*. Blood, 1995. **86**(11): p. 4034-8.
8. Kutler, D. and A. Auerbach, *Fanconi anemia in Ashkenazi Jews*. Fam Cancer, 2004. **3**(3-4): p. 241-8.
9. Morgan, N.V., F. Essop, I. Demuth, T. de Ravel, S. Jansen, M. Tischkowitz, C.M. Lewis, L. Wainwright, J. Poole, H. Joenje, M. Digweed, A. Krause, and C.G. Mathew, *A common Fanconi anemia mutation in black populations of sub-Saharan Africa*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3542-4.
10. Tipping, A.J., T. Pearson, N.V. Morgan, R.A. Gibson, L.P. Kuyt, C. Havenga, E. Gluckman, H. Joenje, T. de Ravel, S. Jansen, and C.G. Mathew, *Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5734-9.
11. Futaki, M., T. Yamashita, H. Yagasaki, T. Toda, M. Yabe, S. Kato, S. Asano, and T. Nakahata, *The IVS4 + 4 A to T mutation of the fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1493-8.
12. Callen, E., J.A. Casado, M.D. Tischkowitz, J.A. Bueren, A. Creus, R. Marcos, A. Dasi, J.M. Estella, A. Munoz, J.J. Ortega, J. de Winter, H. Joenje, D. Schindler, H. Hanenberg, S.V. Hodgson, C.G. Mathew, and J. Surralles, *A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain*. Blood, 2005. **105**(5): p. 1946-9. Epub 2004 Nov 02.
13. Pang, Q., T.A. Christianson, W. Keeble, J. Diaz, G.R. Faulkner, C. Reifsteck, S. Olson, and G.C. Bagby, *The Fanconi anemia complementation group C gene product: structural evidence of multifunctionality*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1392-401.
14. Faivre, L., P. Guardiola, C. Lewis, I. Dokal, W. Ebell, A. Zatterale, C. Altay, J. Poole, D. Stones, M.L. Kwee, M. van Weel-Sipman, C. Havenga, N. Morgan, J. de Winter, M. Digweed, A. Savoia, J. Pronk, T. de Ravel, S. Jansen, H. Joenje, E. Gluckman, and C.G. Mathew, *Association of complementation*

- group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. *European Fanconi Anemia Research Group*. *Blood*, 2000. **96**(13): p. 4064-70.
15. Stewart, G. and S.J. Elledge, *The two faces of BRCA2, a FANCtastic discovery*. *Mol Cell*, 2002. **10**(1): p. 2-4.
 16. Howlett, N.G., T. Taniguchi, S. Olson, B. Cox, Q. Waisfisz, C. De Die-Smulders, N. Persky, M. Grompe, H. Joenje, G. Pals, H. Ikeda, E.A. Fox, and A.D. D'Andrea, *Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia*. *Science*, 2002. **297**(5581): p. 606-9.
 17. Lo Ten Foe, J.R., M.L. Kwee, M.A. Rooimans, A.B. Oostra, A.J. Veerman, M. van Weel, R.M. Pauli, N.T. Shahidi, I. Dokal, I. Roberts, C. Altay, E. Gluckman, R.A. Gibson, C.G. Mathew, F. Arwert, and H. Joenje, *Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance*. *Eur J Hum Genet*, 1997. **5**(3): p. 137-48.
 18. Joenje, H., M. Levitus, Q. Waisfisz, A. D'Andrea, I. Garcia-Higuera, T. Pearson, C.G. van Berkel, M.A. Rooimans, N. Morgan, C.G. Mathew, and F. Arwert, *Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A*. *Am J Hum Genet*, 2000. **67**(3): p. 759-62.
 19. Strathdee, C.A., A.M. Duncan, and M. Buchwald, *Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9*. *Nat Genet*, 1992. **1**(3): p. 196-8.
 20. *Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. The Fanconi anaemia/breast cancer consortium*. *Nat Genet*, 1996. **14**(3): p. 324-8.
 21. Garcia-Higuera, I., T. Taniguchi, S. Ganesan, M.S. Meyn, C. Timmers, J. Hejna, M. Grompe, and A.D. D'Andrea, *Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway*. *Mol Cell*, 2001. **7**(2): p. 249-62.
 22. Meetei, A.R., M. Levitus, Y. Xue, A.L. Medhurst, M. Zwaan, C. Ling, M.A. Rooimans, P. Bier, M. Hoatlin, G. Pals, J.P. de Winter, W. Wang, and H. Joenje, *X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B*. *Nat Genet*, 2004. **36**(11): p. 1219-24.
 23. Strathdee, C.A., H. Gavish, W.R. Shannon, and M. Buchwald, *Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation*. *Nature*, 1992. **356**(6372): p. 763-7.
 24. Timmers, C., T. Taniguchi, J. Hejna, C. Reifsteck, L. Lucas, D. Bruun, M. Thayer, B. Cox, S. Olson, A.D. D'Andrea, R. Moses, and M. Grompe, *Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2*. *Mol Cell*, 2001. **7**(2): p. 241-8.
 25. de Winter, J.P., F. Leveille, C.G. van Berkel, M.A. Rooimans, L. van Der Weel, J. Steltenpool, I. Demuth, N.V. Morgan, N. Alon, L. Bosnoyan-Collins, J. Lightfoot, P.A. Leegwater, Q. Waisfisz, K. Komatsu, F. Arwert, J.C. Pronk, C.G. Mathew, M. Digweed, M. Buchwald, and H. Joenje, *Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene*. *Am J Hum Genet*, 2000. **67**(5): p. 1306-8.
 26. Joenje, H., J.R. Lo ten Foe, A.B. Oostra, C.G. van Berkel, M.A. Rooimans, T. Schroeder-Kurth, R.D. Wegner, J.J. Gille, M. Buchwald, and F. Arwert, *Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype*. *Blood*, 1995. **86**(6): p. 2156-60.
 27. de Winter, J.P., M.A. Rooimans, L. van Der Weel, C.G. van Berkel, N. Alon, L. Bosnoyan-Collins, J. de Groot, Y. Zhi, Q. Waisfisz, J.C. Pronk, F. Arwert, C.G. Mathew, R.J. Scheper, M.E. Hoatlin, M. Buchwald, and H. Joenje, *The Fan-*

- coni anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM.* Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 15-6.
28. de Winter, J.P., Q. Waisfisz, M.A. Rooimans, C.G. van Berkel, L. Bosnoyan-Collins, N. Alon, M. Carreau, O. Bender, I. Demuth, D. Schindler, J.C. Pronk, F. Arwert, H. Hoehn, M. Digweed, M. Buchwald, and H. Joenje, *The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9.* Nat Genet, 1998. **20**(3): p. 281-3.
29. Levitus, M., M.A. Rooimans, J. Steltenpool, N.F. Cool, A.B. Oostra, C.G. Mathew, M.E. Hoatlin, Q. Waisfisz, F. Arwert, J.P. de Winter, and H. Joenje, *Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes.* Blood, 2004. **103**(7): p. 2498-503.
30. Levran, O., C. Attwooll, R.T. Henry, K.L. Milton, K. Neveling, P. Rio, S.D. Batish, R. Kalb, E. Velleuer, S. Barral, J. Ott, J. Petrini, D. Schindler, H. Hanenberg, and A.D. Auerbach, *The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia.* Nat Genet, 2005. **37**(9): p. 931-3.
31. Levitus, M., Q. Waisfisz, B.C. Godthelp, Y. de Vries, S. Hussain, W.W. Wiegant, E. Elghalbzouri-Maghrani, J. Steltenpool, M.A. Rooimans, G. Pals, F. Arwert, C.G. Mathew, M.Z. Zdzienicka, K. Hiom, J.P. De Winter, and H. Joenje, *The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J.* Nat Genet, 2005. **37**(9): p. 934-5.
32. Litman, R., M. Peng, Z. Jin, F. Zhang, J. Zhang, S. Powell, P.R. Andreassen, and S.B. Cantor, *BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI.* Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 255-65.
33. Meetei, A.R., J.P. de Winter, A.L. Medhurst, M. Wallisch, Q. Waisfisz, H.J. van de Vrugt, A.B. Oostra, Z. Yan, C. Ling, C.E. Bishop, M.E. Hoatlin, H. Joenje, and W. Wang, *A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia.* Nat Genet, 2003. **35**(2): p. 165-70.
34. Meetei, A.R., Z. Yan, and W. Wang, *FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination.* Cell Cycle, 2004. **3**(2): p. 179-81.
35. Meetei, A.R., A.L. Medhurst, C. Ling, Y. Xue, T.R. Singh, P. Bier, J. Steltenpool, S. Stone, I. Dokal, C.G. Mathew, M. Hoatlin, H. Joenje, J.P. de Winter, and W. Wang, *A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M.* Nat Genet, 2005. **37**(9): p. 958-63.
36. Tischkowitz, M. and I. Dokal, *Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects.* Br J Haematol, 2004. **126**(2): p. 176-91.
37. Wajnrajch, M.P., J.M. Gertner, Z. Huma, J. Popovic, K. Lin, P.C. Verlander, S.D. Batish, P.F. Giampietro, J.G. Davis, M.I. New, and A.D. Auerbach, *Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry.* Pediatrics, 2001. **107**(4): p. 744-54.
38. Wagner, J.E., J. Tolar, O. Levran, T. Scholl, A. Deffenbaugh, J. Satagopan, L. Ben-Porat, K. Mah, S.D. Batish, D.I. Kutler, M.L. MacMillan, H. Hanenberg, and A.D. Auerbach, *Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia.* Blood, 2004. **103**(8): p. 3226-9.
39. Kutler, D.I., A.D. Auerbach, J. Satagopan, P.F. Giampietro, S.D. Batish, A.G. Huvos, A. Goberdhan, J.P. Shah, and B. Singh, *High incidence of head and*

- neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003. **129**(1): p. 106-12.
40. Koc, A., J.C. Pronk, M. Alikasifoglu, H. Joenje, and C. Altay, *Variable pathogenicity of exon 43del (FAA) in four Fanconi anaemia patients within a consanguineous family.* Br J Haematol, 1999. **104**(1): p. 127-30.
 41. Gillio, A.P., P.C. Verlander, S.D. Batish, P.F. Giampietro, and A.D. Auerbach, *Phenotypic consequences of mutations in the Fanconi anemia FAC gene: an International Fanconi Anemia Registry study.* Blood, 1997. **90**(1): p. 105-10.
 42. Fanconi, G., *Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (F.A.). I. Clinical aspects.* Semin Hematol 1967(4): p. 233-40
 43. Schroeder, T.M., F. Anschutz, and A. Knopp, *[Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy].* Humangenetik, 1964. **1**(2): p. 194-6.
 44. Schroeder, T.M., *[Cytogenetic finding and etiology of Fanconi's anemia. A case of Fanconi's anemia without hexokinase deficiency].* Humangenetik, 1966. **3**(1): p. 76-81.
 45. Schroeder, T.M., *[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): p. 287-316.
 46. Schmid, W., K. Scharer, T. Baumann, and G. Fanconi, *[Chromosomal fragility in familial panmyelopathy (Fanconi type)].* Schweiz Med Wochenschr, 1965. **95**(43): p. 1461-4.
 47. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.* Nature, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
 48. Rich, T., R.L. Allen, and A.H. Wyllie, *Defying death after DNA damage.* Nature, 2000. **407**(6805): p. 777-83.
 49. Zhu, W. and A. Dutta, *An ATR- and BRCA1-mediated Fanconi Anemia pathway is required for activating the G2/M checkpoint and DNA damage repair upon rereplication.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4601-11.
 50. Ball, S.E., F.M. Gibson, S. Rizzo, J.A. Tooze, J.C. Marsh, and E.C. Gordon-Smith, *Progressive telomere shortening in aplastic anemia.* Blood, 1998. **91**(10): p. 3582-92.
 51. Calado, R.T., M.C. Pintao, V. Rocha, R.P. Falcao, M.A. Bitencourt, W.A. Silva, Jr., E. Gluckman, R. Pasquini, and M.A. Zago, *Lack of mutations in the human telomerase RNA component (hTERC) gene in Fanconi's anemia.* Haematologica, 2004. **89**(8): p. 1012-3.
 52. Mankad, A., T. Taniguchi, B. Cox, Y. Akkari, R.K. Rathbun, L. Lucas, G. Bagby, S. Olson, A. D'Andrea, and M. Grompe, *Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia.* Blood, 2006.
 53. Dutrillaux, B., A. Aurias, A.M. Dutrillaux, D. Buriot, and M. Prieur, *The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia.* Hum Genet, 1982. **62**(4): p. 327-32.
 54. Auerbach, A.D. and S.R. Wolman, *Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens.* Nature, 1976. **261**(5560): p. 494-6.
 55. German, J., S. Schonberg, S. Caskie, D. Warburton, C. Falk, and J.H. Ray, *A test for Fanconi's anemia.* Blood, 1987. **69**(6): p. 1637-41.
 56. Auerbach, A.D., *A test for Fanconi's anemia.* Blood, 1988. **72**(1): p. 366-7.
 57. Chandra, S., O. Levran, I. Jurickova, C. Maas, R. Kapur, D. Schindler, R. Henry, K. Milton, S.D. Batish, J.A. Cancelas, H. Hanenberg, A.D. Auerbach,

- and D.A. Williams, *A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients*. *Mol Ther*, 2005. **12**(5): p. 976-84.
58. Hanenberg, H., S.D. Batish, K.E. Pollok, L. Vieten, P.C. Verlander, C. Leurs, R.J. Cooper, K. Gottsche, L. Haneline, D.W. Clapp, S. Lobitz, D.A. Williams, and A.D. Auerbach, *Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(5): p. 410-20.
59. Schindler, D., S. Lobitz, M. Thiel, S. Gräsl, S. Herterich, and H. Hanenberg, *Fanconi anemia (FA) complementation group analysis using retroviral vectors*, in *Eur J Hum Genet*. 2000. p. 149: P-598.
60. Hanenberg, H., S.D. Batish, K.E. Pollok, L. Vieten, P.C. Verlander, C. Leurs, R.J. Cooper, K. Gottsche, L. Haneline, D.W. Clapp, S. Lobitz, D.A. Williams, and A.D. Auerbach, *Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells from patients with retroviral vectors as a diagnostic tool*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(5): p. 410-20.
61. Fei, P., J. Yin, and W. Wang, *New Advances in the DNA Damage Response Network of Fanconi Anemia and BRCA proteins: FAAP95 Replaces BRCA2 as the True FANCB Protein*. *Cell Cycle*, 2005. **4**: p. 1.
62. Kennedy, R.D. and A.D. D'Andrea, *The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd*. *Genes Dev*, 2005. **19**(24): p. 2925-40.
63. Matsushita, N., H. Kitao, M. Ishiai, N. Nagashima, S. Hirano, K. Okawa, T. Ohta, D.S. Yu, P.J. McHugh, I.D. Hickson, A.R. Venkitaraman, H. Kurumizaka, and M. Takata, *A FancD2-Monoubiquitin Fusion Reveals Hidden Functions of Fanconi Anemia Core Complex in DNA Repair*. *Mol Cell*, 2005. **19**(16): p. 3346-55.
64. Taniguchi, T. and A.D. D'Andrea, *The Fanconi anemia protein, FANCE, promotes the nuclear accumulation of FANCC*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2457-62.
65. Meetei, A.R., S. Sechi, M. Wallisch, D. Yang, M.K. Young, H. Joenje, M.E. Hoatlin, and W. Wang, *A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(10): p. 3417-26.
66. Pace, P., M. Johnson, W.M. Tan, G. Mosedale, C. Sng, M. Hoatlin, J. de Winter, H. Joenje, F. Gergely, and K.J. Patel, *FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity*. *Embo J*, 2002. **21**(13): p. 3414-23.
67. Siddique, M.A., K. Nakanishi, T. Taniguchi, M. Grompe, and A.D. D'Andrea, *Function of the Fanconi anemia pathway in Fanconi anemia complementation group F and D1 cells*. *Exp Hematol*, 2001. **29**(12): p. 1448-55.
68. Garcia-Higuera, I., Y. Kuang, D. Naf, J. Wasik, and A.D. D'Andrea, *Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(7): p. 4866-73.
69. Waisfisz, Q., J.P. de Winter, F.A. Kruyt, J. de Groot, L. van der Weel, L.M. Dijkmans, Y. Zhi, F. Arwert, R.J. Scheper, H. Youssoufian, M.E. Hoatlin, and H. Joenje, *A physical complex of the Fanconi anemia proteins FANCG/XRCC9 and FANCA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(18): p. 10320-5.
70. de Winter, J.P., L. van der Weel, J. de Groot, S. Stone, Q. Waisfisz, F. Arwert, R.J. Scheper, F.A. Kruyt, M.E. Hoatlin, and H. Joenje, *The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(18): p. 2665-74.

71. Seyschab, H., R. Friedl, Y. Sun, D. Schindler, H. Hoehn, S. Hentze, and T. Schroeder-Kurth, *Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia*. *Blood*, 1995. **85**(8): p. 2233-7.
72. Gluckman, E., H.A. Broxmeyer, A.D. Auerbach, H.S. Friedman, G.W. Douglas, A. Devergie, H. Esperou, D. Thierry, G. Socie, P. Lehn, and 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. **321**(17): p. 1174-8.
73. Grewal, S.S., J.P. Kahn, M.L. MacMillan, N.K. Ramsay, and J.E. Wagner, *Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis*. *Blood*, 2004. **103**(3): p. 1147-51. Epub 2003 Sep 22.
74. Velazquez, I. and B.P. Alter, *Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions*. *Am J Hematol*, 2004. **77**(3): p. 257-67.
75. Williams, D.A., J. Croop, and P. Kelly, *Gene therapy in the treatment of Fanconi anemia, a progressive bone marrow failure syndrome*. *Curr Opin Mol Ther*, 2005. **7**(5): p. 461-6.
76. Dronkert, M.L. and R. Kanaar, *Repair of DNA interstrand cross-links*. *Mutat Res*, 2001. **486**(4): p. 217-47.
77. van Gent, D.C., J.H. Hoeijmakers, and R. Kanaar, *Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(3): p. 196-206.
78. Khanna, K.K. and S.P. Jackson, *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection*. *Nat Genet*, 2001. **27**(3): p. 247-54.
79. Aten, J.A., J. Stap, P.M. Krawczyk, C.H. van Oven, R.A. Hoebe, J. Essers, and R. Kanaar, *Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 92-5.
80. Tsuzuki, T., Y. Fujii, K. Sakumi, Y. Tominaga, K. Nakao, M. Sekiguchi, A. Matsushiro, Y. Yoshimura, and Morita T, *Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(13): p. 6236-40.
81. Ahnesorg, P., P. Smith, and S.P. Jackson, *XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 301-13.
82. Buck, D., L. Malivert, R. de Chasseval, A. Barraud, M.C. Fondaneche, O. Sanal, A. Plebani, J.L. Stephan, M. Hufnagel, F. le Deist, A. Fischer, A. Durandy, J.P. de Villartay, and P. Revy, *Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 287-99.
83. Scharer, O.D., *Chemistry and biology of DNA repair*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003. **42**(26): p. 2946-74.
84. Dynan, W.S. and S. Yoo, *Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(7): p. 1551-9.
85. Haber, J.E., *Partners and pathways repairing a double-strand break*. *Trends Genet*, 2000. **16**(6): p. 259-64.
86. Teo, S.H. and S.P. Jackson, *Lif1p targets the DNA ligase Lig4p to sites of DNA double-strand breaks*. *Curr Biol*, 2000. **10**(3): p. 165-8.

87. Karran, P., *DNA double strand break repair in mammalian cells*. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. **10**(2): p. 144-50.
88. Smith, G.C. and S.P. Jackson, *The DNA-dependent protein kinase*. *Genes Dev*, 1999. **13**(8): p. 916-34.
89. Cox, M.M., M.F. Goodman, K.N. Kreuzer, D.J. Sherratt, S.J. Sandler, and K.J. Mariani, *The importance of repairing stalled replication forks*. *Nature*, 2000. **404**(6773): p. 37-41.
90. West, S.C., *Molecular views of recombination proteins and their control*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(6): p. 435-45.
91. Venkitaraman, A.R., *Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(4): p. 266-76.
92. Kowalczykowski, S.C., D.A. Dixon, A.K. Eggleston, S.D. Lauder, and W.M. Rehauer, *Biochemistry of homologous recombination in Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 1994. **58**(3): p. 401-65.
93. Van Dyck, E., A.Z. Stasiak, A. Stasiak, and S.C. West, *Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein*. *Nature*, 1999. **398**(6729): p. 728-31.
94. Macris, M.A. and P. Sung, *Multifaceted role of the Saccharomyces cerevisiae Srs2 helicase in homologous recombination regulation*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 6): p. 1447-50.
95. Modesti, M. and R. Kanaar, *Homologous recombination: from model organisms to human disease*. *Genome Biol*, 2001. **2**(5): p. REVIEWS1014.
96. Baumann, P. and S.C. West, *Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair*. *Trends Biochem Sci*, 1998. **23**(7): p. 247-51.
97. Benson, F.E., P. Baumann, and S.C. West, *Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair*. *Nature*, 1998. **391**(6665): p. 401-4.
98. Thompson, L.H. and D. Schild, *Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability*. *Mutat Res*, 2001. **477**(1-2): p. 131-53.
99. Thacker, J., *A surfeit of RAD51-like genes?* *Trends Genet*, 1999. **15**(5): p. 166-8.
100. Tan, T.L., J. Essers, E. Citterio, S.M. Swagemakers, J. de Wit, F.E. Benson, J.H. Hoeijmakers, and R. Kanaar, *Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation*. *Curr Biol*, 1999. **9**(6): p. 325-8.
101. Ristic, D., C. Wyman, C. Paulusma, and R. Kanaar, *The architecture of the human Rad54-DNA complex provides evidence for protein translocation along DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8454-60.
102. Mazin, A.V., C.J. Bornarth, J.A. Solinger, W.D. Heyer, and S.C. Kowalczykowski, *Rad54 protein is targeted to pairing loci by the Rad51 nucleoprotein filament*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 583-92.
103. Wong, A.K., R. Pero, P.A. Ormonde, S.V. Tavtigian, and P.L. Bartel, *RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(51): p. 31941-4.
104. Chen, P.L., C.F. Chen, Y. Chen, J. Xiao, Z.D. Sharp, and W.H. Lee, *The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(9): p. 5287-92.

105. Davies, A.A., J.Y. Masson, M.J. McIlwraith, A.Z. Stasiak, A. Stasiak, A.R. Venkitaraman, and S.C. West, *Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein*. Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 273-82.
106. Pellegrini, L., D.S. Yu, T. Lo, S. Anand, M. Lee, T.L. Blundell, and A.R. Venkitaraman, *Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 287-93. Epub 2002 Nov 10.
107. Ogrunc, M. and A. Sancar, *Identification and characterization of human MUS81-MMS4 structure-specific endonuclease*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21715-20. Epub 2003 Apr 9.
108. Taniguchi, T., I. Garcia-Higuera, P.R. Andreassen, R.C. Gregory, M. Grompe, and A.D. D'Andrea, *S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2414-20.
109. Jackson, S.P., *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. Carcinogenesis, 2002. **23**(5): p. 687-96.
110. Soneoka, Y., P.M. Cannon, E.E. Ramsdale, J.C. Griffiths, G. Romano, S.M. Kingsman, and A.J. Kingsman, *A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(4): p. 628-33.
111. Pietschmann, T., M. Heinkelein, M. Heldmann, H. Zentgraf, A. Rethwilm, and D. Lindemann, *Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 2613-21.
112. DuBridge, R.B., P. Tang, H.C. Hsia, P.M. Leong, J.H. Miller, and M.P. Calos, *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379-87.
113. Miller, A.D., J.V. Garcia, N. von Suhr, C.M. Lynch, C. Wilson, and M.V. Eiden, *Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus*. J Virol, 1991. **65**(5): p. 2220-4.
114. Hawley, R.G., F.H.L. Lieu, A.Z.C. Fong, and T.S. Hawley, *Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy*. Gene Therapy, 1994. **1**(2): p. 136-8.
115. Nolan, G.P., *Phoenix cells*. http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html, 1996.
116. Cornetta, K. and W.F. Anderson, *Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy*. J Virol Methods, 1989. **23**(2): p. 187-94.
117. Coelen, R., D. Jose, and J. May, *The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of primate retroviruses SSV1/SSAV1 and BaEV*. Arch Virol, 1983. **75**: p. 307-11.
118. William Roy, S. and W. Gilbert, *The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(3): p. 211-21.
119. Cartegni, L., S.L. Chew, and A.R. Krainer, *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(4): p. 285-98.
120. Paques, F. and J.E. Haber, *Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(2): p. 349-404.
121. Saul, R.L. and B.N. Ames, *Background levels of DNA damage in the population*. Basic Life Sci, 1986. **38**: p. 529-35.
122. Bernstein, C., Bernstein H., *Aging, sex, and DNA repair*,. 1991, San Diego: Academic Press, Inc.

123. Thompson, L.H., J.M. Hinz, N.A. Yamada, and N.J. Jones, *How Fanconi anemia proteins promote the four Rs: Replication, recombination, repair, and recovery*. Environ Mol Mutagen, 2005. **24**: p. 24.
124. Niedernhofer, L.J., A.S. Lalai, and J.H. Hoeijmakers, *Fanconi Anemia (Cross)linked to DNA Repair*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1191-8.
125. Rothfuss, A. and M. Grompe, *Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 123-34.
126. Soulier, J., T. Leblanc, J. Larghero, H. Dastot, A. Shimamura, P. Guardiola, H. Esperou, C. Ferry, C. Jubert, J.P. Feugeas, A. Henri, A. Toubert, G. Socie, A. Baruchel, F. Sigaux, A.D. D'Andrea, and E. Gluckman, *Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi Anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway*. Blood, 2004.
127. Gross, M., H. Hanenberg, S. Lobitz, R. Friedl, S. Herterich, R. Dietrich, B. Gruhn, D. Schindler, and H. Hoehn, *Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction*. Cytogenet Genome Res, 2002. **98**(2-3): p. 126-35.
128. Gregory, J.J., Jr., J.E. Wagner, P.C. Verlander, O. Levran, S.D. Batish, C.R. Eide, A. Steffenhagen, B. Hirsch, and A.D. Auerbach, *Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2532-7. Epub 2001 Feb 13.
129. Tischkowitz, M.D. and S.V. Hodgson, *Fanconi anaemia*. J Med Genet, 2003. **40**(1): p. 1-10.
130. Waisfisz, Q., N.V. Morgan, M. Savino, J.P. de Winter, C.G. van Berkel, M.E. Hoatlin, L. Ianzano, R.A. Gibson, F. Arwert, A. Savoia, C.G. Mathew, J.C. Pronk, and H. Joenje, *Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 379-83.
131. King, M.C., J.H. Marks, and J.B. Mandell, *Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2*. Science, 2003. **302**(5645): p. 643-6.
132. Narod, S.A. and W.D. Foulkes, *BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 665-76.
133. Sharan, S.K., M. Morimatsu, U. Albrecht, D.S. Lim, E. Regel, C. Dinh, A. Sands, G. Eichele, P. Hasty, and A. Bradley, *Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 804-10.
134. Pichierri, P., D. Auerbeck, and F. Rosselli, *DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(21): p. 2531-46.
135. Wang, X., P.R. Andreassen, and A.D. D'Andrea, *Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(13): p. 5850-62.
136. Digweed, M., S. Rothe, I. Demuth, R. Scholz, D. Schindler, M. Stumm, M. Grompe, A. Jordan, and K. Sperling, *Attenuation of the formation of DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi anaemia*. Carcinogenesis, 2002. **23**(7): p. 1121-6.

137. Hussain, S., E. Witt, P.A. Huber, A.L. Medhurst, A. Ashworth, and C.G. Mathew, *Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(19): p. 2503-10.
138. Hussain, S., J.B. Wilson, A.L. Medhurst, J. Hejna, E. Witt, S. Ananth, A. Davies, J.Y. Masson, R. Moses, S.C. West, J.P. de Winter, A. Ashworth, N.J. Jones, and C.G. Mathew, *Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(12): p. 1241-8.
139. Shinohara, A., H. Ogawa, Y. Matsuda, N. Ushio, K. Ikeo, and T. Ogawa, *Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA*. Nat Genet, 1993. **4**(3): p. 239-43.
140. Bannister, L.A. and J.C. Schimenti, *Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis*. Cytogenet Genome Res, 2004. **107**(3-4): p. 191-200.
141. Liu, N., D. Schild, M.P. Thelen, and L.H. Thompson, *Involvement of Rad51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(4): p. 1009-15.
142. Braybrooke, J.P., K.G. Spink, J. Thacker, and I.D. Hickson, *The RAD51 family member, RAD51L3, is a DNA-stimulated ATPase that forms a complex with XRCC2*. J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 29100-6.
143. Masson, J.Y., M.C. Tarsounas, A.Z. Stasiak, A. Stasiak, R. Shah, M.J. McIlwraith, F.E. Benson, and S.C. West, *Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs*. Genes Dev, 2001. **15**(24): p. 3296-307.
144. Dosanjh, M.K., D.W. Collins, W. Fan, G.G. Lennon, J.S. Alcala, Z. Shen, and D. Schild, *Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(5): p. 1179-84.
145. Kurumizaka, H., S. Ikawa, M. Nakada, R. Enomoto, W. Kagawa, T. Kinebuchi, M. Yamazoe, S. Yokoyama, and T. Shibata, *Homologous pairing and ring and filament structure formation activities of the human Xrcc2*Rad51D complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 14315-20. Epub 2002 Feb 7.
146. Masson, J.Y., A.Z. Stasiak, A. Stasiak, F.E. Benson, and S.C. West, *Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8440-6.
147. Liu, Y., J.Y. Masson, R. Shah, P. O'Regan, and S.C. West, *RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells*. Science, 2004. **303**(5655): p. 243-6.
148. Liu, N., J.E. Lamerdin, R.S. Tebbs, D. Schild, J.D. Tucker, M.R. Shen, K.W. Brookman, M.J. Siciliano, C.A. Walter, W. Fan, L.S. Narayana, Z.Q. Zhou, A.W. Adamson, K.J. Sorensen, D.J. Chen, N.J. Jones, and L.H. Thompson, *XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages*. Mol Cell, 1998. **1**(6): p. 783-93.
149. Symington, L.S., *Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(4): p. 630-70, table of contents.
150. Tarsounas, M., P. Munoz, A. Claas, P.G. Smiraldo, D.L. Pittman, M.A. Blasco, and S.C. West, *Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein*. Cell, 2004. **117**(3): p. 337-47.

151. Johnson, R.D., N. Liu, and M. Jasin, *Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination*. *Nature*, 1999. **401**(6751): p. 397-9.
152. Brenneman, M.A., B.M. Wagener, C.A. Miller, C. Allen, and J.A. Nickoloff, *XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination*. *Mol Cell*, 2002. **10**(2): p. 387-95.
153. Sonoda, E., M.S. Sasaki, J.M. Buerstedde, O. Bezzubova, A. Shinohara, H. Ogawa, M. Takata, Y. Yamaguchi-Iwai, and S. Takeda, *Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death*. *Embo J*, 1998. **17**(2): p. 598-608.
154. Shu, Z., S. Smith, L. Wang, M.C. Rice, and E.B. Kmiec, *Disruption of muREC2/RAD51L1 in mice results in early embryonic lethality which can be partially rescued in a p53(-/-) background*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(12): p. 8686-93.
155. Deans, B., C.S. Griffin, M. Maconochie, and J. Thacker, *Xrcc2 is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice*. *Embo J*, 2000. **19**(24): p. 6675-85.
156. Takata, M., M.S. Sasaki, E. Sonoda, T. Fukushima, C. Morrison, J.S. Albala, S.M. Swagemakers, R. Kanaar, L.H. Thompson, and S. Takeda, *The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(17): p. 6476-82.
157. Takata, M., M.S. Sasaki, S. Tachiiri, T. Fukushima, E. Sonoda, D. Schild, L.H. Thompson, and S. Takeda, *Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(8): p. 2858-66.
158. Thompson, L.H. and D. Schild, *The contribution of homologous recombination in preserving genome integrity in mammalian cells*. *Biochimie*, 1999. **81**(1-2): p. 87-105.
159. Tebbs, R.S., Y. Zhao, J.D. Tucker, J.B. Scheerer, M.J. Siciliano, M. Hwang, N. Liu, R.J. Legerski, and L.H. Thompson, *Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(14): p. 6354-8.
160. Patel, K.J., V.P. Yu, H. Lee, A. Corcoran, F.C. Thistlethwaite, M.J. Evans, W.H. Colledge, L.S. Friedman, B.A. Ponder, and A.R. Venkitaraman, *Involvement of Brca2 in DNA repair*. *Mol Cell*, 1998. **1**(3): p. 347-57.
161. Deans, B., C.S. Griffin, P. O'Regan, M. Jasin, and J. Thacker, *Homologous recombination deficiency leads to profound genetic instability in cells derived from Xrcc2-knockout mice*. *Cancer Res*, 2003. **63**(23): p. 8181-7.
162. Yuan, S.S., S.Y. Lee, G. Chen, M. Song, G.E. Tomlinson, and E.Y. Lee, *BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo*. *Cancer Res*, 1999. **59**(15): p. 3547-51.
163. Smiraldo, P.G., A.M. Gruver, J.C. Osborn, and D.L. Pittman, *Extensive chromosomal instability in Rad51d-deficient mouse cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2089-96.
164. Hiramoto, T., T. Nakanishi, T. Sumiyoshi, T. Fukuda, S. Matsuura, H. Tauchi, K. Komatsu, Y. Shibasaki, H. Inui, M. Watatani, M. Yasutomi, K. Sumii, G. Kajiyama, N. Kamada, K. Miyagawa, and K. Kamiya, *Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer*. *Oncogene*, 1999. **18**(22): p. 3422-6.

165. Tanaka, K., T. Hiramoto, T. Fukuda, and K. Miyagawa, *A novel human rad54 homologue, Rad54B, associates with Rad51*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26316-21.
166. Tanaka, K., W. Kagawa, T. Kinebuchi, H. Kurumizaka, and K. Miyagawa, *Human Rad54B is a double-stranded DNA-dependent ATPase and has biochemical properties different from its structural homolog in yeast, Tid1/Rdh54*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(6): p. 1346-53.
167. Miyagawa, K., T. Tsuruga, A. Kinomura, K. Usui, M. Katsura, S. Tashiro, H. Mishima, and K. Tanaka, *A role for RAD54B in homologous recombination in human cells*. Embo J, 2002. **21**(1-2): p. 175-80.
168. Essers, J., R.W. Hendriks, S.M. Swagemakers, C. Troelstra, J. de Wit, D. Bootsma, J.H. Hoeijmakers, and R. Kanaar, *Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination*. Cell, 1997. **89**(2): p. 195-204.
169. Sung, P., L. Krejci, S. Van Komen, and M.G. Sehorn, *Rad51 recombinase and recombination mediators*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 42729-32. Epub 2003 Aug 11.
170. Deng, C.X. and R.H. Wang, *Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer*. Hum Mol Genet, 2003. **12 Spec No 1**: p. R113-23.
171. Chen, J., D.P. Silver, D. Walpita, S.B. Cantor, A.F. Gazdar, G. Tomlinson, F.J. Couch, B.L. Weber, T. Ashley, D.M. Livingston, and R. Scully, *Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 317-28.
172. Scully, R. and D.M. Livingston, *In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 429-32.
173. Zhong, Q., C.F. Chen, S. Li, Y. Chen, C.C. Wang, J. Xiao, P.L. Chen, Z.D. Sharp, and W.H. Lee, *Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response*. Science, 1999. **285**(5428): p. 747-50.
174. Folias, A., M. Matkovic, D. Bruun, S. Reid, J. Hejna, M. Grompe, A. D'Andrea, and R. Moses, *BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(21): p. 2591-7.
175. Xu, X., C. Li, L. Garrett-Beal, D. Larson, A. Wynshaw-Boris, and C.X. Deng, *Direct removal in the mouse of a floxed neo gene from a three-loxP conditional knockout allele by two novel approaches*. Genesis, 2001. **30**(1): p. 1-6.
176. Xu, X., W. Qiao, S.P. Linke, L. Cao, W.M. Li, P.A. Furth, C.C. Harris, and C.X. Deng, *Genetic interactions between tumor suppressors Brca1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis*. Nat Genet, 2001. **28**(3): p. 266-71.
177. Shen, S.X., Z. Weaver, X. Xu, C. Li, M. Weinstein, L. Chen, X.Y. Guan, T. Ried, and C.X. Deng, *A targeted disruption of the murine Brca1 gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability*. Oncogene, 1998. **17**(24): p. 3115-24.
178. Liu, C.Y., A. Flesken-Nikitin, S. Li, Y. Zeng, and W.H. Lee, *Inactivation of the mouse Brca1 gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development*. Genes Dev, 1996. **10**(14): p. 1835-43.
179. Ludwig, T., D.L. Chapman, V.E. Papaioannou, and A. Efstratiadis, *Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal pheno-*

- types of *Brca1*, *Brca2*, *Brca1/Brca2*, *Brca1/p53*, and *Brca2/p53* nullizygous embryos. *Genes Dev*, 1997. **11**(10): p. 1226-41.
180. Gowen, L.C., B.L. Johnson, A.M. Latour, K.K. Sulik, and B.H. Koller, *Brca1* deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet*, 1996. **12**(2): p. 191-4.
181. Hakem, R., J.L. de la Pompa, C. Sirard, R. Mo, M. Woo, A. Hakem, A. Wakeham, J. Potter, A. Reitmair, F. Billia, E. Firpo, C.C. Hui, J. Roberts, J. Rossant, and T.W. Mak, *The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse*. *Cell*, 1996. **85**(7): p. 1009-23.
182. Hohenstein, P., M.F. Kielman, C. Breukel, L.M. Bennett, R. Wiseman, P. Krimpenfort, C. Cornelisse, G.J. van Ommen, P. Devilee, and R. Fodde, *A targeted mouse Brca1 mutation removing the last BRCT repeat results in apoptosis and embryonic lethality at the headfold stage*. *Oncogene*, 2001. **20**(20): p. 2544-50.
183. Ludwig, T., P. Fisher, V. Murty, and A. Efstratiadis, *Development of mammary adenocarcinomas by tissue-specific knockout of Brca2 in mice*. *Oncogene*, 2001. **20**(30): p. 3937-48.
184. Bachelier, R., X. Xu, X. Wang, W. Li, M. Naramura, H. Gu, and C.X. Deng, *Normal lymphocyte development and thymic lymphoma formation in Brca1 exon-11-deficient mice*. *Oncogene*, 2003. **22**(4): p. 528-37.
185. Xu, X., K.U. Wagner, D. Larson, Z. Weaver, C. Li, T. Ried, L. Hennighausen, A. Wynshaw-Boris, and C.X. Deng, *Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation*. *Nat Genet*, 1999. **22**(1): p. 37-43.
186. Brodie, S.G., X. Xu, W. Qiao, W.M. Li, L. Cao, and C.X. Deng, *Multiple genetic changes are associated with mammary tumorigenesis in Brca1 conditional knockout mice*. *Oncogene*, 2001. **20**(51): p. 7514-23.
187. de Laat, W.L., E. Appeldoorn, N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers, *DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(14): p. 7835-42.
188. Hoy, C.A., L.H. Thompson, C.L. Mooney, and E.P. Salazar, *Defective DNA cross-link removal in Chinese hamster cell mutants hypersensitive to bifunctional alkylating agents*. *Cancer Res*, 1985. **45**(4): p. 1737-43.
189. Damia, G., L. Imperatori, M. Stefanini, and M. D'Incalci, *Sensitivity of CHO mutant cell lines with specific defects in nucleotide excision repair to different anti-cancer agents*. *Int J Cancer*, 1996. **66**(6): p. 779-83.
190. De Silva, I.U., P.J. McHugh, P.H. Clingen, and J.A. Hartley, *Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA inter-strand cross-links in mammalian cells*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(21): p. 7980-90.
191. Demuth, I., M. Digweed, and P. Concannon, *Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation*. *Oncogene*, 2004. **23**(53): p. 8611-8.
192. Sargent, R.G., J.L. Meservy, B.D. Perkins, A.E. Kilburn, Z. Intody, G.M. Adair, R.S. Nairn, and J.H. Wilson, *Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(19): p. 3771-8.
193. Wang, X., C.A. Peterson, H. Zheng, R.S. Nairn, R.J. Legerski, and L. Li, *Involvement of nucleotide excision repair in a recombination-independent and*

- error-prone pathway of DNA interstrand cross-link repair. Mol Cell Biol, 2001. 21(3): p. 713-20.*
194. Bessho, T., D. Mu, and A. Sancar, *Initiation of DNA interstrand cross-link repair in humans: the nucleotide excision repair system makes dual incisions 5' to the cross-linked base and removes a 22- to 28-nucleotide-long damage-free strand. Mol Cell Biol, 1997. 17(12): p. 6822-30.*
 195. Sridharan, D., M. Brown, W.C. Lambert, L.W. McMahon, and M.W. Lambert, *Nonerythroid alphaspectrin is required for recruitment of FANCA and XPF to nuclear foci induced by DNA interstrand cross-links. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 5): p. 823-35.*
 196. McWhir, J., J. Selfridge, D.J. Harrison, S. Squires, and D.W. Melton, *Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. Nat Genet, 1993. 5(3): p. 217-24.*
 197. Weeda, G., I. Donker, J. de Wit, H. Morreau, R. Janssens, C.J. Vissers, A. Nigg, H. van Steeg, D. Bootsma, and J.H. Hoeijmakers, *Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. Curr Biol, 1997. 7(6): p. 427-39.*
 198. Demuth, I. and M. Digweed, *Genomic organization of a potential human DNA-crosslink repair gene, KIAA0086. Mutat Res, 1998. 409(1): p. 11-6.*
 199. Dronkert, M.L., J. de Wit, M. Boeve, M.L. Vasconcelos, H. van Steeg, T.L. Tan, J.H. Hoeijmakers, and R. Kanaar, *Disruption of mouse SNM1 causes increased sensitivity to the DNA interstrand cross-linking agent mitomycin C. Mol Cell Biol, 2000. 20(13): p. 4553-61.*
 200. Richie, C.T., C. Peterson, T. Lu, W.N. Hittelman, P.B. Carpenter, and R.J. Legerski, *hSnm1 colocalizes and physically associates with 53BP1 before and after DNA damage. Mol Cell Biol, 2002. 22(24): p. 8635-47.*
 201. Moshous, D., I. Callebaut, R. de Chasseval, B. Corneo, M. Cavazzana-Calvo, F. Le Deist, I. Tezcan, O. Sanal, Y. Bertrand, N. Philippe, A. Fischer, and J.P. de Villartay, *Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. Cell, 2001. 105(2): p. 177-86.*
 202. Rosenberg, P.S., G. Socie, B.P. Alter, and E. Gluckman, *Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. Blood, 2005. 105(1): p. 67-73.*
 203. Bremmer, J.F., B.J. Braakhuis, H.J. Ruijter-Schippers, A. Brink, H.M. Duarte, D.J. Kuik, E. Bloemena, C.R. Leemans, I. van der Waal, and R.H. Brakenhoff, *A noninvasive genetic screening test to detect oral preneoplastic lesions. Lab Invest, 2005. 85(12): p. 1481-8.*
 204. Braakhuis, B.J., R.H. Brakenhoff, and C.R. Leemans, *Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? Oncologist, 2005. 10(7): p. 493-500.*

7. Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Publikationen

Levrán, O., Attwooll, C., Henry, R.T., Milton, K.L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S.D., Kalb, R., **Velleuer, E.**, Barral, S., Ott, J., Petrini, J., Schindler, D., Hanenberg, H., Auerbach, A. D., *The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia*. Nat Genet, 2005. 37(9): p. 931-3.

Velleuer, E., *Guido Fanconi – eine Kurzbiographie*. in: *Fanconi-Anämie: Ein Handbuch für Eltern, Patienten und deren Ärzten*, Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. (Hrsg), 2005

Zwaan, M., **Velleuer, E.**, Joenje, H., *Fanconi anemie – nieuwe ontwikkelingen*. Ned Tijdschr Hematol 2006;3:138-45

Lobitz, S. and **Velleuer, E.**, *Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(11): p. 893-8.

Poster

Rio, P., Linka, Y., **Velleuer, E.**, Hanenberg, H., *Einsatz der Gentherapie am Beispiel einer erblichen Bluterkrankung*, Tag der Gesundheitsforschung, Düsseldorf, 20. Februar 2005

Schindler, D., Kalb, R., Rio, P., **Velleuer, E.**, Linka, Y., Reid, S., Rahman, N., Auerbach, A.D., Hanenberg, H., *A Second Patient of Subtype FA-L: Diagnostic, Molecular and Cellular Findings*, Seventeenth Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium, Genf, 29. September – 2. Oktober 2005

CURRICULUM VITAE

Eunike Velleuer

Angaben zur Person:

Geburtsdatum und –ort 26.02.1980, Hilden
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung:

1986-1990 Gemeinschaftsgrundschule, Mettmann
1990-1999 Gymnasium, Mettmann, Allgemeine Hochschulreife

Universitätsstudium:

1999 - 2006 Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
2001 Physikum
2002 1. Staatsexamen
2004 2. Staatsexamen
2006 3. Staatsexamen

Praktische Ausbildung im Ausland:

08/2003 - 10/2003 Famulatur: Psychiatrie/Psychotherapie, Klinik Sonnenhalde, Riehen, Schweiz
03/2004 Famulatur: Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Widmann, Bozen, Italien
04/2005 - 08/2005 1. PJ-Tertial: Wahlfach Pädiatrie, Sophia Kinderkrankenhaus, Erasmus MC Rotterdam, Niederlande
08/2005 - 12/2005 2. PJ-Tertial: Chirurgie, Spital Lachen, Schweiz

Förderungen:

11/1999 – 06/2006 Vollstipendium der *Studienstiftung des deutschen Volkes*
April – August 2005 Auslandsstipendium der *Studienstiftung des deutschen Volkes*
05/2001 – 10/2003 Stipendiatin von *e-fellows.net*

Auszeichnungen:

30. September 2005 Discovery Award, Fanconi Anemia Research Fund
29. Oktober 2005 Ehreenauszeichnung, Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V.

Dissertation:

2003 - 2006 Labor für Stammzelltransplantation und Exp. Hämato-Onkologie
Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und –Immunologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Universitätsklinikum Düsseldorf
Thema: *Funktionelle Testung von Kandidatengenomen an primären Fibroblasten von Patienten mit Fanconi-Anämie.*

9. Zusammenfassung

Fanconi-Anämie (FA) ist eine genetisch und phänotypisch sehr heterogene autosomal und x-chromosomal rezessive Erkrankung. Sie wird klinisch charakterisiert durch die Trias aus kongenitalen Fehlbildungen, einem chronisch progredientem Versagen der Hämatopoese und einer erhöhten Inzidenz von Malignomen. Auf zellulärer Ebene ist die FA durch eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit sowie eine Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzende Reagenzien charakterisiert. Bei der FA existieren mindestens 13 verschiedene Komplementationsgruppen (FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M, -nonJ), von denen bisher 11 Gene (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL*, *FANCM*) identifiziert wurden. Zellbiologische und biochemische Untersuchungen zeigen, dass diese FA-Proteine bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen miteinander verschiedene Funktionskomplexe bilden, daneben aber auch mit anderen Schlüsselproteinen wie ATM, BRCA1 oder Rad51 direkt interagieren.

Diese Arbeit hatte zwei unterschiedliche Schwerpunkte. Einerseits wurden neu diagnostizierte Patienten retroviral typisiert, d.h. es wurde versucht, sie durch Überexpression des jeweiligen FA-Gens einer der bereits bekannten Komplementationsgruppen zuzuordnen. Bei zwei von 12 untersuchten Patienten konnte die klinische Verdachtsdiagnose FA auf zellulärer Ebene nicht bestätigt werden. Die anderen 10 Patienten verteilten sich überwiegend auf die beiden Komplementationsgruppen FA-A und FA-D2, wobei der Subtyp FA-D2 deutlich überrepräsentiert war.

Hier konnte die zurzeit einzige bekannte lebende Patientin der Gruppe FA-L identifiziert werden. Diese Patientin verfügte über ein beginnendes Mosaik in der Hämatopoese vor Transplantation und fiel klinisch durch einen sehr ausgeprägten Phänotyp mit Kleinwuchs auf und entwickelte Mundhöhlenkrebs schon mit 13 Jahren.

Das zweite Ziel dieser Untersuchung war, Kandidatengene für FA anhand der noch nicht klassifizierten Patienten zu untersuchen. Die gewählten Kandidatengene sind alle DNA-Reparaturgene, die in der homologen Rekombination involviert sind und zum Teil in Knock-out-Mäusen eine Überempfindlichkeit gegenüber Mitomycin C zeigen. Nach der Klonierung dieser Kandidatengene in retrovirale Vektoren wurden primäre Fibroblasten von Patienten mit Defekten in unbekanntenen Genen damit transduziert. Im Folgenden wurden sie analog zum Subtypisierungsprotokoll mit der DNA-quervernetzenden Substanz MMC behandelt und ihr Zellzyklusverhalten in der Durchflusszytometrie analysiert. Keines der hier untersuchten Gene konnte die FA-Zellen komplementieren, d.h. den durch die Behandlung mit MMC induzierten G2/M-Arrest aufheben. Somit wurde der Nachweis geführt, dass es sich bei keinem der hier untersuchten Kandidatengene in den untersuchten FA-Zellen um ein Fanconi-Anämie-Gen handelt.