

Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung des G₂/M Checkpoints in Fanconi-Anämie-
Zellen durch Analyse der Chromosomeninstabilität in G₂-Phase
und Mitose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Rica Sauer

aus Frankfurt/ Oder

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer. nat. H. Neitzel
 2. Prof. Dr. med. H. U. Wahn
 3. Priv.-Doz. Dr. H. Tönnies

Datum der Promotion: 01.02.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	4
2.1 Der Zellzyklus	4
2.1.1 Die Phasen des Zellzyklus	4
2.1.2 Zellzykluskontrolle	5
2.2 Die Fanconi-Anämie	6
2.2.1 Das Krankheitsbild der Fanconi-Anämie	6
2.2.2 Chromosomale Veränderungen und Diagnostik	8
2.2.3 Therapie	9
2.2.4 Pathway der FA-Proteine	10
2.3 Vorzeitige Chromosomenkondensation durch Calyculin A	12
3 Methodik.....	14
3.1 Methodischer Ansatz	14
3.2 Materialien	14
3.2.1 Kulturmedien und Zusätze	14
3.2.2 Standardpuffer und Lösungen	14
3.2.3 Reagenzien und deren Hersteller	15
3.2.4 Apparaturen und Hilfsmittel	17
3.3 Zytogenetische Methoden	18
3.3.1 Zellkultivierung	18
3.3.1.1 Zellmaterial	18
3.3.1.2 Lymphozytenkultur und Induktion von Chromosomenbrüchen	20
3.3.2 Fibroblastenkultivierung	21
3.3.3 Aufarbeitung der Kulturen - Chromosomenpräparation	21
3.3.4 Auswertung und Dokumentation	22
3.3.5 Chromosomenbruchanalyse	23
3.4 Molekularzytogenetische Methoden	25
3.4.1 Bacterial artificial chromosome (BAC)	25
3.4.1.1 Nick translation	26
3.4.1.2 Fällung der BAC-Sonde	26
3.4.2 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)	27

3.4.2.1	RNAse Verdau der Chromosomenpräparationen	29
3.4.2.2	Denaturierung.....	29
3.4.2.3	Hybridisierung	29
3.4.2.4	Wachschritte.....	30
3.4.2.5	DAPI Gegenfärbung und Fixierung.....	30
3.4.3	Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse.....	30
3.4.4	Darstellung und Definition der Aberrationsereignisse	31
3.5	Statistische Methoden	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Darstellung der Chromosomen nach Behandlung der Zellen mit Colcemid und Calyculin A.....	34
4.2	Vergleich der Mitose- und G ₂ -PCC-Indices.....	36
4.3	Konventionelle Zytogenetik	42
4.3.1	Brüche pro Zelle	42
4.3.2	Aberrante Zellen in %.....	45
4.3.3	Verteilung der Aberrationstypen.....	49
4.4	Molekularzytogenetik.....	50
4.4.1	Brüche pro Zelle	50
4.4.2	Aberrante Zellen in %.....	54
4.4.3	Verteilung der Aberrationstypen.....	57
4.4.4	Relative Bruchhäufigkeiten.....	58
4.5	Korrelation von konventioneller Zytogenetik und WCP-Assay.....	60
5	Diskussion	63
5.1	Evaluierung des Calyculin A induzierten PCC in Fanconi-Anämie-Zellen	63
5.2	Der G ₂ /M Checkpoint in Fanconi-Anämie-Zellen	65
5.2.1	Die Mitose- und G ₂ -PCC-Indices der Lymphozytenkulturen	65
5.2.2	Die Chromosomenbrüchigkeit der Lymphozytenkulturen	67
5.2.3	Der G ₂ /M Checkpoint in Ataxia-Telangiektasia-Zellen (AT).....	69
5.2.4	Der G ₂ /M Checkpoint der Fibroblastenkulturen	70
5.3	Reparaturvorgänge in der G ₂ -Phase des Zellzyklus	71
5.4	Ausblick	75
6	Zusammenfassung.....	76
	Literaturverzeichnis	78
	Danksagung	87
	Lebenslauf.....	88
	Eigenständigkeitserklärung.....	89

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aplastische Anämie
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ace	azentrisches Fragment
AML	Akute Myeloische Leukämie
AT	Ataxia Telangiektasie
bp	Basenpaare
BRCA 2	Breast Cancer Type 2 susceptibility protein
bsp.	beispielsweise
bt	balancierte Translokation
ca.	circa
Cal A	Calyculin A
Cdk	Cyclin dependent kinase
CGH	Comparative genomic hybridization
csb	Chromosomenbruch
Col	Colcemid
Cot-DNA	hochrepetitive menschliche DNA
ctb	Chromatidbruch
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEB	Diepoxybutan
del	Deletion
dest.	destilliert
dic	dizentrisches Chromosom
DNA	desoxyribonucleic acid
dup	Duplikation
EV11	Ecotropic Viral Integration Site 1
FA	Fanconi-Anämie
FANC	Fanconi Anemia (Complementation Group)
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HR	Homologe Rekombination
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature

K	Kontrolle
Konv	Konventionelle Zytogenetik
Mb	Megabasen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMC	Mitomycin C
Mol. Zyt.	Molekularzytogenetik
MPF	Mitosis promoting factor
n.d.	nicht durchgeführt
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
OA	Okadeinsäure
OT	Objekträger
PALB2	partner and localizer of BRCA2
PCC	premature chromosome condensation
rb ik	inkomplette Reunionsfigur
rb k	komplette Reunionsfigur
rpm	rounds per minute
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute (Medium)
SLX4	Synthetic Lethal of Unknown
SSC	standard saline citrate
ssDNA	single strand DNA
t	Translokation
Tab.	Tabelle
TLS	Translesion synthesis
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Iso-Thiocyanat
ub	ubiquitiniert
USP1	ubiquitin specific peptidase 1
ut	unbalancierte Translokation
wcp	whole chromosome painting

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus	5
Abb. 2: Schematische Darstellung des Fanconi-Anämie-Pathways	12
Abb. 3: Beispiele für häufige strukturelle Chromosomenaberrationen.....	24
Abb. 4: Multiaberrante Metaphase.....	25
Abb. 5: BAC-Sonde auf Chromosom 3q.....	28
Abb. 6: Whole Chromosome Painting + BAC 3q	31
Abb. 7: Darstellung der Chromosomen im Konventionellen Colcemid-Block	35
Abb. 8: Calyculin A induziertes vorzeitiges Kondensieren der Chromosomen	36
Abb. 9: Mitose- und G ₂ -PCC Indices der FA- und Kontroll-Lymphozytenkulturen	38
Abb. 10: Mitose- und G ₂ -PPC-Indices der Fibroblastenkulturen.....	41
Abb. 11: Brüche pro Zelle der Lymphozytenkulturen (Konventionell)	44
Abb. 12: Brüche pro Zelle der Fibroblastenkulturen (Konventionell).....	45
Abb. 13: Aberrante Zellen der Lymphozytenkulturen in % (Konventionell).....	47
Abb. 14: Aberrationsverteilung der Lymphozytenkulturen in absoluten Zahlen	50
Abb. 15: Brüche pro Zelle der Lymphozytenkulturen (Molekularzytogenetik)	53
Abb. 16: Brüche pro Zelle der Fibroblastenkulturen (Molekularzytogenetik)	54
Abb. 17: Aberrante Zellen der Lymphozytenkulturen in % (Molekularzytogenetik).....	56
Abb. 18: Aberrationsverteilung der Lymphozytenkulturen (Molekularzytogenetik)	58
Abb. 19: Relative Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 in %	59
Abb. 20: FA-Lymphozytenkulturen im Vergleich.....	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Kulturen	19
Tab. 2: Pro Patient verwendete Konzentrationen von MMC und Calyculin A	20
Tab. 3: Beispiel für die Mitomycin C Verdünnung	21
Tab. 4: Schematische Darstellung der zu vergleichenden Ergebnisse	33
Tab. 5: Beispielrechnung gewichtetes Mittel: Mitose-Index der FA-Kulturen ohne Zusatz von MMC	37
Tab. 6: Mitose- und G ₂ -PCC-Indices pro Kultur in %	39
Tab. 7: Mitose- und G ₂ -PCC-Indices der Fibroblastenkulturen	40
Tab. 8: Brüche pro Zelle in den Lymphozytenkulturen der FA-Patienten und der Kontrollen (Konventionell)	43
Tab. 9: Brüche pro Zelle der Fibroblastenkulturen (Konventionell)	44
Tab. 10: Aberrante Zellen in % - Lymphozytenkulturen (Konventionell)	46
Tab. 11: Aberrante Zellen der Fibroblastenkulturen in % (Konventionell)	47
Tab. 12: Brüche pro Zelle der Lymphozytenkulturen (Molekularzytogenetik)	52
Tab. 13: Brüche pro Zelle der Fibroblastenkulturen (Molekularzytogenetik)	53
Tab. 14: Aberrante Metaphasen in % - Lymphozytenkulturen (Mol. Zyt.)	55
Tab. 15: Aberrante Metaphasen der Fibroblastenkulturen in % (Mol. Zyt.)	56
Tab. 16: Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizienten von Konventioneller Methode und WCP- Assay der Lymphozytenkulturen	60
Tab. 17: Beispiel P2-65 Colcemid - Brüche pro Zelle	61

1 Einleitung

Die Fanconi-Anämie (FA) ist ein seltenes autosomal oder X-chromosomal rezessiv vererbtes Chromosomeninstabilitätssyndrom, das in den Formenkreis der angeborenen aplastischen Anämien klassifiziert wird (Niemeyer 2006). Die FA ist mit 1-5 Neuerkrankungen pro 1 Million Geburten eine seltene Erkrankung (Schröder 1976, Schindler 2007). Das Chromosomeninstabilitätssyndrom ist durch eine deutliche Sensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen, wie Mitomycin C (Sasaki 1972) oder Diepoxybutan (Auerbach 1993) gekennzeichnet und äußert sich klinisch sehr heterogen, vor allem durch angeborene Fehlbildungen, fortschreitendes Knochenmarksversagen und der Prädisposition, frühzeitig Leukämien und solide Tumoren zu entwickeln (Rosenberg 2003).

Die Fanconi-Anämie ist genetisch heterogen: bis heute wurden 15 Gene identifiziert, deren Genprodukte in die DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen und DNA-Strangvernetzungen einbezogen sind. Mutationen in einem dieser 15 FA-Gene führen zu einer erhöhten chromosomalen Instabilität, die für alle FA-Komplementationsgruppen kennzeichnend ist und als ursächlich für die hohe Krebsdisposition angesehen wird. Klinisch lassen sich FA-Patienten der einzelnen Komplementationsgruppen, mit Ausnahme von Patienten, die biallelische Mutationen in FANCD1 (BRCA2) und FANCN (PALB2) tragen und einen sehr schweren klinischen Verlauf zeigen, nicht voneinander abgrenzen.

Die Identifikation der FA-Gene und die Analyse der zugrunde liegenden Pathways führten zu einem besseren Verständnis der intrazellulären DNA-Reparaturmechanismen. Der Fanconi-Anämie-Pathway stellt demnach einen Schlüsselmechanismus zur Erhaltung der genomischen Integrität dar. DNA-Schäden, wie beispielsweise chemisch induzierte DNA-Strangvernetzungen, sogenannte *crosslinks*, verursachen eine Signalkaskade bei der ein Kernproteinkomplex aus mehreren FA-Proteinen dafür zuständig ist DNA-Reparaturproteine zu ubiquitinieren und somit zu aktivieren. Die spezifischen Funktionen der FA-Proteine im DNA-Reparaturprozess bleiben aber bis heute weitestgehend ungeklärt (Moldovan 2009). Allerdings deuten viele Studien daraufhin, dass der FA-Pathway vor allem die Homologe Rekombination von Doppelstrangbrüchen reguliert (Kennedy 2005, Patel 2007, Moldovan 2009).

Neben der auch diagnostisch genutzten induzierten Chromosomenbrüchigkeit, weisen die Fanconi-Anämie-Zellen bereits spontan eine erhöhte Instabilität der Chromosomen auf (Schröder 1964). Die Diagnostik der FA erfolgt überwiegend zytogenetisch mittels einer Bruchanalyse. Darüber hinaus kann eine Durchflusszytometrie die für die FA typische Arretierung der Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus nachweisen (Schindler 1985, Seyschab 1995). Diese prolongierte G₂-Phase deutet darauf hin, dass die Fanconi-Anämie-Zellen aufgrund einer defizienten DNA-Reparatur längere Zeit benötigen, um DNA-Schäden zu beseitigen. Der G₂/M Checkpoint verhindert, dass Zellen mit DNA-Schäden in die Mitose eintreten. Bisher konnte die G₂-Phase-Blockierung von FA-Zellen nur mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden. Dabei wird der DNA-Gehalt der Zellpopulation gemessen. Sind die Zellen in der G₂-Phase blockiert, so ist der Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2n, 4c erhöht. Eine zytogenetische Untersuchung hinsichtlich der DNA-Schäden findet bei der Durchflusszytometrie nicht statt.

In dieser Arbeit sollen Chromosomenaberrationen in der G₂-Phase des Zellzyklus analysiert werden, nachdem mit Hilfe des Phosphataseinhibitors Calyculin A (Cal A) eine vorzeitige Chromosomenkondensation induziert wurde. Calyculin A inhibiert die Aktivität der Serin/Threonin Proteinphosphatasen PP1 und PP2A und löst so die vorzeitige Chromosomenkondensation aus (Gotoh 1995). Dadurch ist es möglich, Chromosomen nicht nur in der Metaphase des Zellzyklus zu untersuchen, sondern je nach Zeitpunkt der Zugabe von Cal A, auch in der G₁- und G₂-Phase (Bezrookove 2003). Hinsichtlich der Chromosomeninstabilitätssyndrome wurde bereits eine Analyse der G₂-Phase des Zellzyklus durch Calyculin A induzierte, vorzeitig kondensierte Chromosomen von Ataxia Telangiektasia-Zellen (AT) durchgeführt (Terzoudi 2005). Dabei ergaben sich in der G₂-Phase keine Unterschiede in der Chromosomenbrüchigkeit zwischen Kontrollzellen und AT-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in der Metaphase eine vierfach höhere Brüchigkeit in den AT-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen. Das heißt, dass AT-Zellen einen erheblichen Checkpointdefekt aufweisen, weil die Zellen G₂/M passieren können, obwohl sie noch massive DNA-Schäden aufweisen. Inwiefern der G₂/M Checkpoint in Fanconi-Anämie-Zellen den Mitoseeintritt zulässt, stellt die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit dar. Zytogenetische Untersuchungen der Fanconi-Anämie-Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus erlauben demnach DNA-Schäden spezifisch zu detektieren und Aussagen darüber zu treffen, ob der G₂/M Checkpoint intakt ist. Es wird untersucht, wie

sich die Chromosomenbrüchigkeit in Bezug auf Kontrollzellen und hinsichtlich der Mitosearretierung der Zellen durch das Spindelgift Colcemid unterscheidet. Weiterhin soll die Analyse der G₂-Phase Aufschluss über DNA-Reparaturmechanismen geben. Neben der konventionellen zytogenetischen Analyse wird eine molekularzytogenetische Analyse der Chromosomen 1, 3 und 7 mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Ebenso wird spezifisch die Region 3q26 mittels BAC-Sonde untersucht.

2 Grundlagen

2.1 Der Zellzyklus

2.1.1 Die Phasen des Zellzyklus

Der Zellzyklus bildet die Grundlage dafür, dass eukaryote Zellen sich vermehren und somit Wachstum von Geweben stattfinden kann. Schon Rudolf Virchow bekräftigte dieses im 19. Jahrhundert entstandene Dogma mit der prägnanten Formulierung „*Omnis cellula e cellula*“ (Hajdu 2005 nach Virchow 1855).

Die Vermehrung von Zellen bedarf eines präzisen Ablaufs von im Zellzyklus stattfindenden komplexen biochemischen Vorgängen. So lässt sich der Kreislauf in vier Phasen unterteilen (Abb. 1), in denen jeweils spezifische Anforderungen erfüllt werden müssen, um in die nächste Phase einzutreten. Die Einteilung erfolgt in G₁- (Gap), S- (Synthese), G₂- und M- (Mitose) Phase, wobei in der Mitose die eigentliche Zellteilung stattfindet. Die anderen drei Phasen werden als sogenannte Interphase zusammengefasst und dienen der Vorbereitung zur Mitose (Abb. 1, blaue Pfeile). Nur während der Mitose liegen die Chromosomen kondensiert vor und können zytogenetisch untersucht werden. Die DNA liegt hier in Nukleosomen organisiert, die aus einem oktameren Histonproteinkomplex bestehen. In der Interphase hingegen liegen die Chromosomen dekontensiert vor. In der G₁-Phase muss die Zelle zunächst wachsen, das heißt, sie produziert Zellorganellen und Zytosol. Auch werden Enzyme produziert, die in der darauffolgenden S-Phase von Bedeutung sind. In der Synthesephase erfolgt die Verdopplung des Genoms durch Replikation. Jede somatische Zelle weist ein diploides Genom (2n), das heißt 2 mal 23 Chromosomen auf. In der G₁-Phase des Zellzyklus weist jedes Chromosom eine Chromatide (2n, 2c) auf, die in der S-Phase repliziert wird, so dass anschließend alle Chromosomen zwei Chromatiden haben (2n, 4c). Die G₂-Phase wiederum dient der Vorbereitung auf die Mitose und der Synthese von Proteinen, die zur Zellteilung benötigt werden. Darüber hinaus werden in der späten S-Phase und in der G₂-Phase Fehler der Replikation beseitigt. Letztendlich teilt sich die Zelle und verteilt ihr Genom zu je 2n, 2c auf zwei Tochterzellen. Entweder durchläuft die Tochterzelle dann wieder einen weiteren Zellzyklus oder sie tritt in die sogenannte G₀-Phase, eine Ruhephase, ein. In der

Zellkultivierung können jene Zellen durch Stimulation wieder zur Teilung angeregt werden (Löffler 2007).

2.1.2 Zellzykluskontrolle

Der fehlerfreie Ablauf des Zellzyklus wird vor allem durch Komplexe aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen-Kinasen (*cyclin dependent kinases* - Cdk) gewährleistet. Dabei bilden die Cdk die katalytischen und die Cycline die regulatorischen Untereinheiten der Komplexe (Abb. 1). Die Cycline werden phasenspezifisch synthetisiert und unterscheiden sich demnach in jeder Phase.

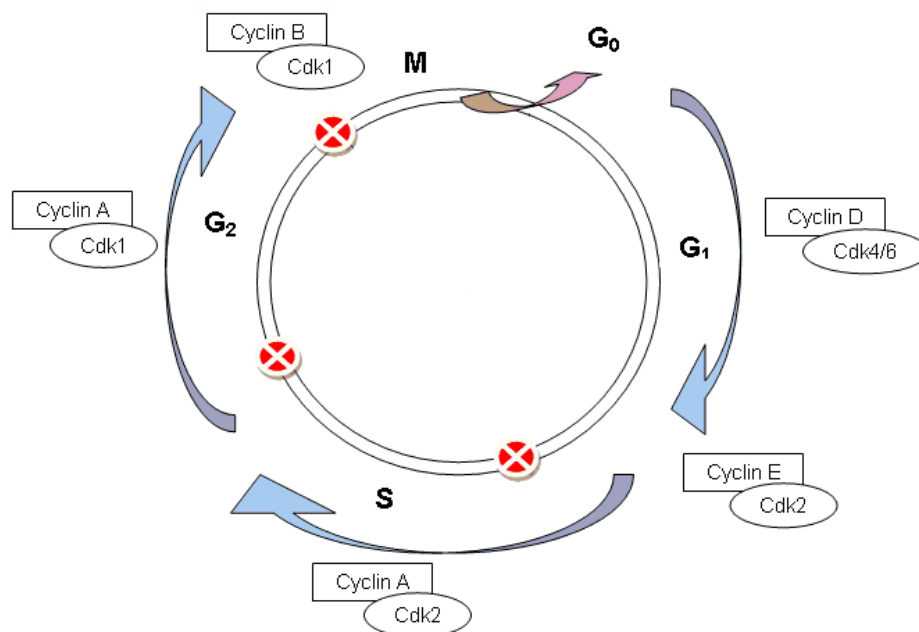


Abb. 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus (modifiziert nach Rassow 2006)

Für den Übergang von der G₂-Phase in die Mitose ist beispielsweise der Komplex Cyclin B-Cdk1 verantwortlich, für den Übergang von der S-Phase in die G₂-Phase die Kombination von Cdk2 und Cyclin A. Nicht nur die Übergänge zwischen den Zellzyklusphasen sind abhängig von der Aktivierung jener Cyclin/Cdk-Komplexe, sondern auch die Abläufe innerhalb der jeweiligen Phasen. In der G₂-Phase ist beispielsweise der Komplex aus Cyclin A und Cdk1 aktiviert (Morgan 1995). Um sicher zu gehen, dass jede Phase abgeschlossen ist, bevor die Zelle in die nächste übergeht, sind die, unter anderem, durch Cyclin/Cdk-Komplexe regulierten spezifischen Kontrollpunkte, die sogenannten Checkpoints, von besonderer Bedeutung (Abb. 1, rote Markierung). So gewährleistet der G₂/M Checkpoint die letzte Möglichkeit zur Reparatur

von DNA-Schäden, bevor die Zelle sich teilt. Die Progression des Zellzyklus wird durch die Checkpoints aufgehalten, um der Zelle die Möglichkeit zu geben, Schäden zu reparieren oder den Zelltod, die sogenannte Apoptose, einzuleiten (Zhou und Elledge 2000). Wird der CyclinB/Cdk1 Komplex, auch *mitosis promoting factor* (MPF) genannt, bei vorhandenen DNA-Schäden nicht dephosphoryliert, kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade, die eine Zellzyklusarretierung zur Folge hat (Morgan 1995). Darüber hinaus spielt der Tumorsuppressor p53 eine zentrale Rolle in der Regulierung des Zellzyklus. Dieser Transkriptionsfaktor ist dafür verantwortlich, dass abhängig von der Größe der DNA-Schäden entweder eine Zellzyklusarretierung oder die Apoptose eingeleitet wird (Sionov 1999).

2.2 Die Fanconi-Anämie

2.2.1 Das Krankheitsbild der Fanconi-Anämie

Die Fanconi-Anämie (FA) ist ein autosomal oder X-chromosomal rezessiv vererbbares Chromosomeninstabilitätssyndrom. 1927 beschrieb der Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi erstmals das Krankheitsbild anhand dreier Brüder im Alter zwischen 5 und 7 Jahren, welche Geburtsfehler und „eine eigenartige Anämie“ aufwiesen (Velleuer 2005 nach Fanconi 1927). Kennzeichnend für das Krankheitsbild der Fanconi-Anämie sind diverse kongenitale Fehlbildungen und eine Panzytopenie. Darüber hinaus besteht bei den Patienten eine erhöhte Prädisposition Leukämien und solide Tumoren zu entwickeln (Rosenberg 2003). Die kongenitalen Fehlbildungen können sehr heterogen sein und jedes Organsystem betreffen. Des Weiteren variieren diese im Ausprägungsgrad. So weist ein Drittel der Patienten milde beziehungsweise keine angeborenen Fehlbildungen auf (Giampietro 1997). Diese Patienten können typische Hautpigmentationen, sogenannte *Café-au-lait* Flecken besitzen, hypoplastische Thenarmuskulatur und eine Mikrophthalmie aufweisen. Darüber hinaus sind Wachstumsverzögerungen, geringe Kopfumfänge und Hörstörungen häufige Auffälligkeiten. Fanconi-Anämie-Patienten können neben Wirbelsäulendefekten, Radius- und Daumenfehlbildungen, kardialen und renalen Fehlbildungen auch tracheoösophageale Fisteln und Analtresien aufweisen (Giampietro 1993). Zu weiteren schweren kongenitalen Fehlbildungen werden Fehlbildungen des zentralnervösen Systems, des Gastrointestinaltrakts und des Skelettsystems gezählt (Auerbach 2009).

Kennzeichnend für die Fanconi-Anämie sind darüber hinaus Hypogonadismus, vorwiegend bei männlichen Patienten, und Infertilität (Tischkowitz 2003).

Klinisch sehr bedeutsam sind die hämatologischen Veränderungen. Diese können sich ebenso vielfältig, wie schwerwiegend präsentieren und sind hauptursächlich verantwortlich für die hohe Mortalität der Fanconi-Anämie-Patienten. Statistisch liegt die Lebenserwartung bei 23 Jahren (Auerbach 2009). Im Median zeigen sich hämatologische Verschlechterungen im Alter von 7 Jahren (Butturini 1994). Es können sich rasch eine Thrombozytopenie und Neutropenie, bis hin zur Panzytopenie entwickeln (Tischkowitz 2003). Klinisch fallen die Patienten meist durch Schwäche, blasse Schleimhäute, Blutungen oder häufige Infektionen auf. Im Median erkranken sie mit 11,3 Jahren an Leukämie (Rosenberg 2003). Anders als bei Nicht-FA-Patienten, bei denen im Kindesalter vor allem akute lymphatische Leukämien auftreten, haben FA-Patienten fast ausschließlich akute myeloische Leukämien (AML). Außerdem tritt bei FA-Patienten das Myelodysplastische Syndrom (MDS) gehäuft auf. Dieses kann, muss sich aber nicht zur Leukämie entwickeln (Alter 2001). Die kumulative Inzidenz an einer MDS oder AML zu erkranken liegt im Alter von 40 Jahren bei 52% (Butturini 1994). Laut Internationalem Fanconi-Anämie-Register liegt die kumulative Inzidenz mit 40 Jahren ein Knochenmarksversagen zu erleiden sogar bei 90% (Auerbach 2009).

Fanconi-Anämie-Patienten haben ein 500 bis 700 fach höheres Risiko Plattenepithelkarzinome, insbesondere von Kopf und Hals zu entwickeln (Kutler 2003). Meist treten diese nicht-hämatologischen Malignitäten später auf als die Blutbildveränderungen. Die kumulative Inzidenz einen soliden Tumor auszubilden liegt im Alter von 28 Jahren bei 9% und steigt im Alter von 34 schon auf 29% (Rosenberg 2003). Neben den Kopf- und Hals-Karzinomen sind der Ösophagus und die anogenitale Region besonders häufig betroffen (Alter 2001; Rosenberg 2003). Darüber hinaus beobachtete man im Deutschen Fanconi-Anämie-Register ein hohes Vorkommen von Gehirn- und Brustkrebs (Rosenberg 2008).

Differentialdiagnostisch ergibt sich aus dem heterogenen Spektrum kongenitaler Fehlbildungen und hämatologischer Probleme ein weites Feld ähnlicher Syndrome. Neben erworbenen aplastischen Anämien durch Medikamente, ionisierender Strahlung oder Virusinfektionen sind andere kongenitale aplastische Anämien, wie zum Beispiel das Blackfan-Diamond-Syndrom mit isolierter Störung der Erythropoese in Erwägung zu ziehen. Ebenso können Patienten mit Dyskeratosis congenita eine Panzytopenie

entwickeln (Niemeyer 2006). Weiterhin kommen Knochenmarksinfiltrationen durch Leukämien, malignen Lymphomen oder Karzinomen in Betracht. Bei chronischer Anämie muss unter anderem an Nephritiden, Kollagenosen und Endokrinopathien gedacht werden.

Epidemiologisch geht man von einer Geburtsprävalenz von schätzungsweise 5 bis 10 pro 1 Million Geburten aus. Die Heterozygotenfrequenz in der Gesamtbevölkerung in Deutschland sowie in den USA dürfte bei circa 0,5% liegen (Schröder 1976, Schindler 2007, Auerbach 2009, Rosenberg 2011). Allerdings sind in Populationen, bei denen in der Vergangenheit Foundereffekte aufgetreten sind, deutlich höhere Heterozygotenfrequenzen beschrieben (Rosenberg 2011).

2.2.2 Chromosomale Veränderungen und Diagnostik

Da das klinische Bild der Fanconi-Anämie allein ein unzureichendes diagnostisches Kriterium darstellt, wird bei klinischem Verdacht eine Chromosomenbruchdiagnostik durchgeführt. Die Zellen der Fanconi-Anämie-Patienten zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber zytostatischen Wirkstoffen, die Interstrang-Crosslinks induzieren, wie Mitomycin C (MMC) (Sasaki 1973) oder Diepoxybutan (DEB) (Auerbach 1993). Darüber hinaus weisen die Zellen eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit auf (Schröder 1964). Neben T-Lymphozyten werden Fibroblasten für die Analyse der Chromosomenbrüchigkeit verwendet. Diese eignen sich besonders bei Verdacht auf Mosaikbildung und hämatopoetischer Reversion (Pinto 2009). Dabei entsteht durch spontane Rückmutationen oder mitotische Rekombination ein korrigiertes FA-Allel. Folglich kommt es zur Normalisierung des zellulären Phänotyps mit geringer Chromosomenbrüchigkeit (Lo Ten Foe 1997, Gregory 2001, Pinto 2009). Weiterhin wird routinemäßig die Durchflusszytometrie angewendet, um zwischen Nicht-Fanconi- und Fanconi-Anämie-Patienten unterscheiden zu können. Zellen mit einem intakten G₂/M-Checkpoint arretieren den Zellzyklus in der G₂-Phase, wenn DNA-Schäden vorliegen. In den Zellen von Nicht-FA-Personen können diese DNA-Schäden relativ schnell repariert werden und die Zellen setzen den Zellzyklus danach wieder fort und treten in die Mitose ein. Im Gegensatz dazu ist die Reparatur von DNA-Schäden in FA-Zellen erschwert und somit verzögert. In der Durchflusszytometrie zeigt sich die dadurch bedingte längere Verweildauer in G₂ in

einem erhöhten, relativen Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4c, der dem der G₂-Phase-Zellen entspricht (Schindel 1985, Seyschab 1995).

Die Zellen der Fanconi-Anämie-Patienten weisen Fehlfunktionen hinsichtlich der Fähigkeit auf, DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren. In Zellen mit hoher Proliferationsrate, wie die des Knochenmarks, kann diese Fehlfunktion zu chromosomalen Translokationen führen (Povirk 2006). Im Falle klonaler Veränderungen gehen diese mit einem erhöhten Risiko einher an hämatologischen Komplikationen zu erkranken (Butturini 1994). Dabei treten bestimmte Aberrationen gehäuft auf. Vor allem Trisomien von Chromosom 1q und Monosomien von Chromosom 7, sowie Deletionen des langen Arms von Chromosom 7 und 5 werden in vielen Fällen gefunden (Auerbach 1991, Alter 2000). Darüber hinaus wird häufig ein partieller Zugewinn des Chromosoms 3q detektiert. Auch bezüglich dieser klonalen Aberration konnte auf einen Zusammenhang mit dem klinischen Schweregrad hingewiesen werden (Tönnies 2003). Mit Hilfe von molekular-zytogenetischen Methoden, wie der *Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung* und der *vergleichenden genomischen Hybridisierung* können diese chromosomalen Veränderungen speziell detektiert und analysiert werden.

2.2.3 Therapie

Bei den meisten FA-Patienten steht die Therapie der hämatologischen Probleme im Vordergrund. Der Großteil der FA-Patienten, ca. 90%, wird durch die Entwicklung eines Knochenmarkversagens diagnostiziert. Bluttransfusionen mit Erythrozyten und Thrombozyten werden als supportive Maßnahmen eingesetzt, wenn deutliche klinische Symptome vorliegen. Darüber hinaus werden Androgene zur Therapie der aplastischen Anämie eingesetzt. Sie führen bei einem Teil der Patienten (ca. 50%) zu einem signifikanten Anstieg von peripheren Blutzellen, vor allem der erythropoetischen Reihe (Shahidi 1961). Nebenwirkungen, wie Maskulinisierung der Mädchen, Wachstumsschübe und vor allem die Entstehung von Leberadenomen (Alter 2001, Ozenne 2008) fordern eine genaue Indikationsstellung und regelmäßige Laborkontrollen der Leberwerte. Wachstumsfaktoren, wie G-CSF (Rackoff 1996) und GM-CSF (Guinan 1994) werden eingesetzt, um Neutropenien zu behandeln. Dabei muss vor Applikation beachtet werden, dass keine klonalen Zellen im Knochenmark

vorliegen, die durch die Zytokintherapie positiv beeinflusst werden könnten (Taniguchi 2002).

Generell stellt die Stammzelltransplantation die einzig kurative Therapie der hämatologischen Symptome dar. Dabei wurden in den letzten Jahren veränderte Therapieprotokolle bezüglich der Konditionierung vor einer Stammzelltransplantation von FA-Patienten entwickelt. So wird heute meist Fludarabine, Biusulfan und Cyclophosphamid ohne vorherige Bestrahlung eingesetzt (Medeiros 2000). Allgemein wird die Konditionierung an Stadium, Alter und Organschäden individuell angepasst. Unterschieden wird zwischen HLA-identischen Geschwisterspendern und Fremdspendern. Ein erhöhtes Graft-Versus-Host-Disease (GVHD) Risiko bei Fremdspendern kann durch T-Zelldepletion reduziert werden. Während noch vor 10 Jahren die Überlebensraten nach Stammzelltransplantation von HLA-identischen Geschwister-Knochenmark deutlich besser waren als die mit Fremdspenderknochenmark (Guardiola 2000, Gluckmann 1995), bestehen heute durch die veränderten Konditionierungsregime praktisch keine Unterschiede mehr zwischen HLA-identen Geschwisterspendern und HLA-gematchten Fremdspendern (W. Ebell, persönliche Mitteilung, Mehta 2010). Ein Einfluss auf nicht-hämatologische Probleme der Fanconi-Anämie besteht allerdings nicht. Nach erfolgreicher Transplantation haben die Patienten weiterhin ein hohes Risiko an soliden Tumoren zu erkranken (Frohnmayr 2005). Zusammenfassend ist eine erfolgreiche Therapie davon abhängig, dass die FA-Patienten frühzeitig durch ein Zentrum betreut werden.

2.2.4 Pathway der FA-Proteine

Pathogenetisch ist der defekte FA-Pathway verantwortlich für die Hypersensitivität der Zellen gegenüber quervernetzenden Substanzen und somit einer erhöhten Chromosomeninstabilität. Die spezifische Funktion des FA-Pathways (Abb. 2) in normalen Zellen ist dabei nicht vollständig geklärt. Allerdings deuten viele Studien darauf hin, dass dieser eine wichtige Rolle im DNA-Reparaturprozess, vor allem im Hinblick auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch Homologe Rekombination besitzt (Kennedy, D'Andrea 2005; Patel, Joenje 2007, Moldovan, D'Andrea 2009). Bisher sind 15 Proteine identifiziert worden (de Winter 1998, 2000; Howlett 2002; Levitus 2005; Lo Ten Foe 1996; Meetei 2003/10, 2004, 2005; Reid 2007; Smogorzewska 2007; Stoepker 2011; Strathdee 1992; Timmers 2001; Vaz 2010),

welche jeweils einer genetischen Subgruppe der Fanconi-Anämie zugeordnet werden können. Acht der Proteine (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM) bilden den sogenannten FA-Core-Komplex (Medhurst 2006, Meetei 2003 und 2005). Die katalytische Einheit dieses Komplexes bildet das FANCL Protein (Meetei 2004), mit dessen Hilfe die Proteine FANCD2 und FANCI (Smogorzewska 2007) monoubiquitiniert werden. Ubiquitinierung bedeutet Modifikation von Proteinen hinsichtlich deren Funktion und Regulation von Signalkaskaden, wie den hier beschriebenen Fanconi-Anämie-Pathway. Der Komplex wird nach vorangegangener DNA-Quervernetzung und somit aufgehaltener Replikationsgabel aktiv (Higuera 2001) (Abb. 2). Zeitlich eingeordnet geschehen sowohl Monoubiquitinierung des FANCD2 Proteins, als auch Deubiquitinierung durch die Ubiquitin-spezifische-Peptidase USP1 (Nijman 2005) in der S-Phase des Zellzyklus (Taniguchi 2002). Im Zytoplasma bilden zunächst FANCA, FANCG, FANCB und FANCL einen Komplex, um, stabilisiert durch FANCF, FANCE und FANCC, den Komplex im Inneren des Zellkerns mit der sich dort befindlichen Endonuklease FANCM zu ergänzen (Levitus 2006). Der Komplex aus monoubiquitiniertem FANCD2 und FANCI transloziert folgend in die Chromatinfraction des Kerns (Wang 2004, Smogorzewska 2007), um dort mit anderen sogenannten Downstream-Proteinen, wie FANCD1/BRCA2 (Hussein 2004, Wang 2004) und FANCN/PALB2 (Reid 2007), in einem komplexen DNA-Reparaturnetzwerk an die Stelle des DNA-Schadens zu binden. Andere DNA-Reparaturproteine, wie RAD51 (Wang 2004, Vaz 2010) sind ebenso beteiligt. Dabei spielt dieses eine besondere Rolle in der Beseitigung von Crosslinks. Ein anderes FA Protein, FANCI, ist als DNA-Helikase BRIP1 identifiziert worden (Levitus 2005, Litman 2005) und wird ebenso mit dem Downstream des FA-Pathways in Verbindung gebracht (London 2008, Wu 2009).

Die Zuordnung der Patienten zu einer Komplementationsgruppe ist wichtig, weil die verschiedenen Gendefekte zum Teil mit prognostisch unterschiedlichen Verläufen korrelieren. Defekte der Proteine des Core Komplexes äußern sich dabei als der „klassische“ FA Phänotyp. Dahingegen haben die Patienten mit der Komplementationsgruppe D1 und N besonders schwere Verläufe und können an AML, soliden Tumoren, wie Medulloblastomen und Wilmstumoren schon im Alter von unter 5 Jahren erkranken. Darüber hinaus werden diese Patienten meist mit schweren kongenitalen Defekten geboren (Wagner 2004). Auch weisen Patienten der Komplementationsgruppe C eine schlechtere Prognose auf, als die der Gruppen A und G (Kutler 2003). Insgesamt gehören circa 66% der Patienten der

Komplementationsgruppe A, 10% der FA-C und 9% der FA-G an (Levitus 2004, Shimamura 2006). Alle übrigen Komplementationsgruppen kommen deutlich seltener vor.

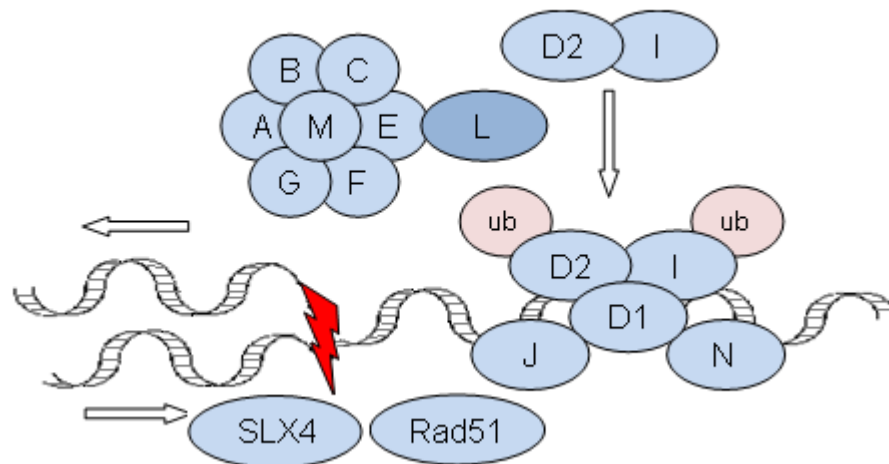


Abb. 2: Schematische Darstellung des Fanconi-Anämie-Pathway (ub - ubiquitiniert, modifiziert nach Moldovan 2009 und Su 2011)

2.3 Vorzeitige Chromosomenkondensation durch Calyculin A

Die konventionelle Zytogenetik ermöglicht die Analyse von Chromosomen allein in der Mitose des Zellzyklus. Durch Blockierung des Spindelapparats der Zellen mittels Colcemid oder Colchizin kann der Mitoseindex deutlich erhöht werden, so dass mehr Metaphasen untersucht werden können. Für die Analyse von Tumorzellen, vor allem epithelialen Ursprungs stellt sich diese Methode als unzureichend dar (Bezrookove 2003). Durch Entwicklung der *Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung* (FISH) und der *vergleichenden genomischen Hybridisierung* (CGH) können dagegen auch Interphasekerne untersucht werden. Für die Chromosomenbruchdiagnostik sind Interphase-FISH und CGH allerdings ungeeignet.

Die Methode der Vorzeitigen Chromosomenkondensation (*Premature Chromosome Condensation* - PCC) stellt eine Möglichkeit dar, Chromosomen spezifisch in der G₁ und G₂ Phase des Zellzyklus zu untersuchen (Bezrookove 2003). Die Chromosomen, welche in der Interphase als nicht kondensiertes Chromatin vorliegen, können durch ein vorzeitiges Kondensieren in jener Phase sichtbar gemacht werden. Erstmals wurde PCC 1970 durch Zellfusion mittels Virus ermöglicht (Johnson 1970). Auch

Polyethylenglycol konnte zur Zellfusion genutzt werden (Pantelias 1983). Bei der Zellfusion werden Mitose-Zellen mit Interphase-Zellen verschmolzen. Durch die hohe Konzentration von Cyclin-CDK1 (*mitosis promoting factor*) in den Mitose-Zellen erfolgt nach der Verschmelzung die Induktion der Chromosomenkondensation in den Interphase-Zellen. Später entdeckte Ishihara, dass Calyculin A (Cal A) und Okadeinsäure (OA) potente Phosphataseinhibitoren sind (Ishihara 1989), die ebenfalls PCC induzieren. 1995 wurde Calyculin A erstmals zur vorzeitigen Induktion der Chromosomenkondensation eingesetzt (Gotoh 1995). Calyculin A, natürlich im Meeresschwamm *Discodermia calyx* vorkommend, inhibiert die Aktivität der Serin/Threonin Proteinphosphatase PP1 und PP2A. Im Gegensatz zu OA, welche weniger Einfluss auf PP1 hat, kann Calyculin A beide Phosphatasen potent hemmen (Ishihara 1989, Resjo 1999). Cal A hat durch die Hemmung der Myosin-Leichte Ketten-Phosphatase einen aktivierenden Einfluss auf den Spindelapparat der Zelle und ermöglicht so das vorzeitige Kondensieren der Chromosomen (Fabian 2007). Demnach ist der PCC-Index weitaus höher und ermöglicht eine effektive Analyse der Chromosomen in den verschiedenen Zellzyklusstadien (Bezrookove 2003).

Calyculin A wurde bisher viel in der Strahlenbiologie verwendet. Durch PCC konnten die, nicht den G₂/M Block passierenden, stark beschädigten Zellen in der Interphase untersucht werden (Gotoh 1996, Johnson 1999, Kanda 1999, Shovman 2008). Weiterhin wurde Cal A dazu verwendet, optimierte Protokolle zur Analyse von Chromosomen in der Pränataldiagnostik zu entwickeln (Srebniak 2005, Kramer 2008). Essentiell ist belegt worden, dass Cal A keine strukturellen oder numerischen Veränderungen an den Chromosomen hervorruft (Kowalska 2003, Bezrookove 2003) und so die Möglichkeit zur Analyse und Diagnostik gegeben ist.

Es ist möglich neben Fibroblasten, Lymphozyten und lymphoblastoiden Zellen auch verschiedene Tumorzelllinien und sogar Tumorgewebeproben hinsichtlich G₁ und G₂ Phase zytogenetisch darzustellen. Chromosomale Instabilität als Ursache für Aberrationen in Tumorgewebe kann demnach mittels PCC erleichtert untersucht werden (Bezrookove 2003).

3 Methodik

3.1 Methodischer Ansatz

Neben der konventionellen zytogenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchung der Chromosomen durch eine Colcemid-induzierte Arretierung der Zellen in der Mitose, wird Calyculin A verwendet, um die Chromosomen in der G₂-Phase des Zellzyklus zu analysieren. So ergeben sich pro verwendete Zellkultur vier verschiedene Untersuchungsmethoden. Es wird die spontane Chromosomenbrüchigkeit, sowie die durch Mitomycin C induzierte Brüchigkeit untersucht. Dabei werden verschiedene MMC-Konzentrationen verwendet, ähnlich der diagnostischen Chromosomenbruchanalyse. Die Zellen der in die Untersuchung einbezogenen Patienten weisen unterschiedliche Komplementationsgruppen auf. Eventuelle Differenzen unter Verwendung von Calyculin A können so detektiert werden. In dieser Arbeit werden neben Lymphozyten zusätzlich Fibroblasten als Ausgangsmaterial verwendet.

3.2 Materialien

3.2.1 Kulturmedien und Zusätze

RPMI (Blutkulturmedium)	Hersteller
AmnioMax basal medium	Hersteller
AmnioMax-C100 supplement	Hersteller

3.2.2 Standardpuffer und Lösungen

Calyculin A-Stammlösung (10 µM)	Hersteller
Colcemid-Stammlösung (10 µg/ml)	Hersteller
dTTP-Mix	1 µl 100 mM dTTP, Li-Salz 199 µl Nukleotid-Mix-Puffer
Dye	20 g Saccharose 0,125 g Bromphenolblau 50 ml Aqua bidest. steril
Fixativ	Methanol (ml) : Eisessig (ml) = 3 : 1

Formamidlösungsansatz	7 ml Aqua bidest. 3,5 ml 20x SSC 24,5 ml Formamid (100%) 17 µl HCl (37%) – pH 7
Giemsa-Färbelösung	15 ml Giemsa 80 ml Phosphatpuffer
Mastermix	20% Dextransulfat in 4 x SSC
10x Nick-Translationspuffer	500 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM MgCl ₂ 0,5 mg/ml nucleasefreies BSA
Nukleotid-Mix-Puffer	500 mM Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM MgCl ₂
Phosphatpuffer pH 6,88	11,13 g Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 8,5 g KH ₂ PO ₄ 500 ml Aqua dest.
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat-2-hydrat
2 x SSC	Verdünnung von 20 x SSC (1:10) mit Aqua dest.
4 x SSC	Verdünnung von 20 x SSC (1:5) Mit Aqua dest.
0,4 x SSC/0,3% IGEPAL (Waschlösung)	100 ml 2 x SSC 400 ml Aqua dest. 1,5 ml IGEPAL
2 x SSC/0,1% IGEPAL (Waschlösung)	50 ml 20 x SSC 450 ml Aqua dest. 0,5 ml IGEPAL
Trypsin-EDTA (0,05%)	Hersteller

3.2.3 Reagenzien und deren Hersteller

Agarose	Life Technologies
Amniomax	Gibco
Antifading	Vectashield

Aqua dest.	Braun
Bromphenolblau	Sigma/Merck
Calyculin A	Sigma
Colcemid	Gibco
Cot -1 DNA	Roche
DAPI	Sigma-Aldrich
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP	Promega
Dextransulfat	Merck
DNase	Boehringer Mannheim
Eindeckmittel (Vitro-Clud, Vectashield)	Langenbrinck
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck
Ethanol 100%	Merck
Fixogum	Marabu
Fötale Kälberserum	Biochrom
Floureszenz-dUTP (Spectrum green)	Vysis
Formamid	Merck
Giemsa-Färbelösung (Azur-Eosin-Methylenblau/Phophatpuffer; 4%)	Merck
Glykogen	Boehringer Mannheim
HCl	Merck
IGEPAL	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Bac-Klon RP11-82c9	Wellcome Trust Sanger Institute (UK)
Methanol	Baker J.T.
MgCl ₂	Merck
Mitomycin C	Sigma
Natriumacetat	Sigma
NaCl	Merck
NaHCO ₃	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
RNAse	Boehringer Mannheim
RPMI 1640	Gibco
Saccharose	Merck

20x SSC	Merck
Streptomycin	Biochrom
Tris	Gibco/BRL
Trypsin	Gibco
WCP DNA Sonden	Metasystems

3.2.4 Apparaturen und Hilfsmittel

Begasungsbrutschrank 6220	Heraeus
Brutschrank 37°C	Kötterman
Deckgläser	Menzel
Einmalglaspipetten, Pasteurpipetten,	Brand
Elektrophoresekammer	Renner
Falcon Kulturflaschen	Becton Dickinson
Fixogum	Marabu
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer	IKA-Labortechnik
Micropositioner	Berliner Glas KGaA
Objektträger	Menzel
PCR Maschine	Eppendorf
Photomikroskop	Zeiss Axioskop
Pipetten	Gilson Eppendorf
Pipettenspitzen	Gilson Eppendorf
Probengefäße (0,5ml)	Sarstedt
Schüttler IKA Vibrofix VF1	IKA-Labortechnik
Vortex	IKA-Labortechnik
Wärmeplatte	Medax
Wärmebäder	GFL
Wasserbad	Eppendorf
Zentrifugen	Heraeus
Zentrifugenröhrchen	Greiner/Falcon

3.3 Zytogenetische Methoden

3.3.1 Zellkultivierung

Die Analyse von Chromosomen setzt Zellkulturen mit hohen Proliferationsraten voraus, da die Chromosomen nur in der Mitose untersucht werden können.

Diese hohen Proliferationsraten werden durch künstlich geschaffene, optimale Umweltbedingungen erreicht. Dem hier verwendeten heparinisierten Vollblut der Patienten werden Nährmedien zugesetzt, welche optimale Bedingungen zur Kultivierung herstellen. Sie bestehen aus einer isotonen Salzlösung und enthalten fötales Kälberserum, Vitamine, Aminosäuren, Hormone, Puffersubstanzen und Antibiotika. Zu dem ist den Nährmedien der pH-Indikator Phenolrot zugesetzt. Wenn der optimale pH von 7,2 - 7,4 durch anfallende Metabolite, wie zum Beispiel Laktat in den sauren Bereich fällt, schlägt die Farbe des Mediums zu gelb um. Nicht nur der beinhaltenete Bikarbonatpuffer, sondern auch eine CO₂ Ventilation im Brutschrank begünstigt das pH-Optimum einzuhalten. Steriles Arbeiten wird vorausgesetzt. Darüber hinaus sollen Antibiotika Besiedlung bzw. Kontamination der Blutkulturen verhindern (Wegner 1999). Weiterhin sorgt der Inkubator für eine konstante und optimale Luftfeuchtigkeit und verhindert so eine Erhöhung der Salzkonzentration durch Verdunstung des Mediums.

3.3.1.1 Zellmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Zellmaterial entstammt peripherem heparinisierten Blut von Patienten mit diagnostisch gesicherter Fanconi-Anämie sowie von gesunden Kontrollpersonen. T-Lymphozyten lassen sich gut kultivieren und können so ideal für Chromosomenanalysen verwendet werden. Daneben wird die Chromosomenbrüchigkeit von Fibroblasten ohne Verwendung des Quervernetzlers Mitomycin C untersucht. Die folgende Tabelle stellt eine Übersicht der verwendeten Lymphozyten- und Fibroblastenkulturen dar.

Tab. 1: Verwendete Kulturen (KG - Komplementationsgruppe; AA - Aplastische Anämie; MDS - Myelodysplastisches Syndrom; o.p.B - ohne pathologischen Befund; Stabil - hämatologisch auf niedrigem Niveau stabil)

Bezeichnung	Art	KG	Klinik	Kultivierte Zellen
P1 - 09	Patient	A	AA	Lymphozyten
K1 - 71	Kontrolle			
P2 - 65	Patient	A	Stabil	Lymphozyten
P3 - 66	Patient	A	Stabil	
P4 - 17	Patient	C	MDS	
K2 - 30	Kontrolle			
P5 - 64	Patient	A	Stabil	Lymphozyten
K3 - 03	Kontrolle			
P6 - 98	Patient	A	Stabil	Lymphozyten
K4 - 99	Kontrolle			
P7 - 17	Patient	D1	Hirntumor	Fibroblasten
P8 - 59	Patient	D2	O.p.B.	
K5 - 00	Kontrolle			
K6 - 09	Kontrolle			
K7 - 52	Kontrolle			

Pro Kultivierung und folgender Aufarbeitung der Zellen wird neben einer oder mehrerer Patientenproben auch mindestens eine Kontrollprobe zur qualitativen Sicherung der Methodik verwendet. So ergibt sich die unterschiedliche Zahl von Patienten gegenüber Kontrollen. Klinische Aussagen zum Zeitpunkt der Blutentnahme und Komplementationsgruppen der Patienten waren vor Aufnahme der Versuche bereits bekannt. Neben den Lymphozytenkulturen werden zwei Fibroblastenkulturen verwendet. Die Patienten gehören den Downstream-Komplementationsgruppen an und ermöglichen es, vergleichende Aussagen hinsichtlich Zellreparaturmechanismen in der G₂-Phase zu treffen.

3.3.1.2 Lymphozytenkultur und Induktion von Chromosomenbrüchen

In diesem Versuchsaufbau wird nicht nur die Chromosomenbrüchigkeit in Abhängigkeit von der zugeführten Mitomycin C (MMC) Konzentration untersucht, sondern auch unter Einfluss von Calyculin A.

Tab. 2: Pro Patient verwendete Konzentrationen von Mitomycin C und Calyculin A

MMC	MMC + Calyculin A
0 MMC – 0ng MMC/ml	0 MMC + 5 µg Calyculin A
10 MMC – 10 ng MMC/ml	10 MMC+ 5 µg Calyculin A
50 MMC – 50 ng MMC/ml	50 MMC+ 5 µg Calyculin A
100 MMC – 100 ng MMC/ml	100 MMC+ 5 µg Calyculin A

Dem heparinisierten Blut der Patienten und Kontrollpersonen wird ein Blutkulturmedium mit oben genannten Eigenschaften hinzugefügt. Die Kulturen werden bei 37°C und 5%iger CO₂ Ventilation im Brutschrank für 48 h inkubiert.

Die Mitomycin C Zugabe erfolgt nach 48 h. Die Kulturen werden vorher in Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände wurden je 5 ml Kulturmedium mit den verschiedenen MMC Konzentrationen (Tab. 3) hinzugefügt. Resuspendiert können die Kulturen wieder in die Falconflaschen überführt werden und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

Tab. 3: Beispiel für die Mitomycin C Verdünnung

MMC [c]	1 Patient + 1 Kontrolle
1:100 (100 ng/ml)	19,8 ml BKM + 0,2 ml MMC Stock
1:50 (50 ng/ml)	6 ml BKM + 6 ml aus 1:100
1:10 (10 ng/ml)	9 ml BKM + 1 ml aus 1:100

3.3.2 Fibroblastenkultivierung

Den Hautzellen werden als wachstumsfördernde Medien Amniomax Basal Medium und AmnioMax-C100 Supplement hinzugefügt. Neben dem Antibiotikum Gentamycin sind L-Glutamin und fetales Kälberserum zur Wachstumsförderung der Zellen enthalten. Die Kultivierung erfolgt ebenso bei 37°C und 5%iger CO₂ Ventilation im Brutschrank. Fibroblasten wachsen adhärent und stellen das Wachstum ein, wenn der Boden der Kulturflasche bedeckt ist. Die Teilungsfähigkeit der Zellen wird dadurch stark herabgesetzt und bedarf ein häufiges Aufteilen der Kulturen in weitere Falconflaschen. Insgesamt sind durchschnittlich 50 Passagen möglich (Mammone 2006). Dafür müssen die Zellen mit Hilfe von 0,5 ml Trypsin-Lösung von der Innenschicht der Kulturflaschen gelöst werden. Anschließend werden die abgelösten Zellen in Medium resuspendiert und in neue Flaschen aufgeteilt. Ziel dabei ist die Bildung eines gleichmäßigen Zellrasens, um eine möglichst synchrone Zellteilung zu erreichen.

3.3.3 Aufarbeitung der Kulturen - Chromosomenpräparation

Um die Lymphozyten in der Metaphase zu arretieren wird der Hälfte der Kulturen 1,5 h vor Aufarbeitung je 25 µl Colcemid zugefügt. Dies führt dazu, dass der Spindelapparat der Zellen nicht mehr ausgebildet wird. Darüber hinaus wird der anderen Hälfte 30 min vor Aufarbeitung je 5 µl Calyculin A zugesetzt. Die Konzentration im Endmedium beträgt 10 nM.

Nachdem die Proben 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert wurden, werden die Überstände abgenommen und verworfen. Anschließend werden die Zellpellets in je 5ml der vorher auf 37°C erwärmten 0,4%iger KCl Lösung resuspendiert und für 10 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die hypotone Lösung führt zum Anschwellen der Zellen und somit zum Platzen von Erythrozyten, sowie zum räumlichen Auseinanderweichen der Chromosomen in den Lymphozyten. Nach erneutem Zentrifugieren, werden die Überstände bis auf circa 1 ml Restüberstand abpipettiert und verworfen. Anschließend wird kaltes Fixativ langsam bis zu 4-5 ml in die Proben getropft. Nach gutem Durchmischen der Proben werden diese wieder zentrifugiert. Der Fixativwechsel wird folgend noch 2x durchgeführt, bevor die Suspensionen letztendlich auf die Objektträger gebracht werden können.

Pro Suspension wird ein Tropfen auf einen mit Alkohol gereinigten, trockenen und waagrecht gehaltenen Objektträger im Abstand von circa 20 cm aufgetragen. So erreicht man ein Platzen der Lymphozyten und damit auch eine gute Darstellung der Chromosomen. Der OT wird für ein paar Sekunden über Wasserdampf gehalten und anschließend unter einer Lampe auf ein feuchtes Tuch gelegt und getrocknet. Anschließend können die Präparate im Phasenkontrast eines Lichtmikroskops mit einem 10er Objektiv betrachtet und begutachtet werden. Pro Suspension werden zwei Objektträger angefertigt. Im Anschluss wird einer der beiden für die konventionelle Zytogenetik in 4%iger Giemsa-Lösung 15 min gefärbt. Im letzten Schritt wird ein großes Deckglas (24x 60 mm) mit Hilfe des Eindeckmittels Vitro-Clud auf den OT gebracht.

Die Aufarbeitung und Chromosomenpräparation der Fibroblastenkulturen erfolgt in Analogie zu der obig beschriebenen Methode.

3.3.4 Auswertung und Dokumentation

Die mikroskopische Auswertung erfolgt an einem Photomikroskop der Firma Zeiss. Pro Suspension wird der Mitose- bzw. G₂-PCC-Index bestimmt. Dazu müssen mindestens 1000 Objekte pro Chromosomenpräparat gezählt werden. Der Index gibt Auskunft darüber, wie viele Metaphasen bzw. PCC-Kerne sich pro Interphasekerne auf dem Objektträger befinden. Mit folgenden Formeln können die Indices ermittelt werden.

$$\text{Mitose-Index[\%]} = \frac{\text{Anzahl Metaphasen}}{\text{Anzahl Metaphasen} + \text{Anzahl Interphasekerne}} \times 100$$

$$\text{G}_2\text{-PCC-Index[\%]} = \frac{\text{Anzahl PCC-Kerne}}{\text{Anzahl PCC-Kerne} + \text{Anzahl Interphasekerne}} \times 100$$

Weiterhin werden pro Objektträger 50 Metaphasen analysiert. In die Untersuchung werden nur diejenigen Metaphasen mit einbezogen, welche in ihrem Chromosomensatz vollständig waren. Pro Patient bzw. pro Kontrolle werden je 4 Präparate der verschiedenen Mitomycin C Konzentrationen, sowie je 4 Präparate der MMC Konzentrationen und Calyculin A untersucht. Demnach beinhaltet die konventionelle Zytogenetik in dieser Arbeit die Analyse von 400 Metaphasen pro Patient bzw. Kontrolle. Für jede Suspension wird ein Auswertungsprotokoll angefertigt, welches neben den verschiedenen Möglichkeiten der Chromosomenaberrationen auch den Mitose- bzw. G₂-PCC-Index beinhaltet. Die genaue Position der Metaphasen auf dem Objektträger wird mittels eines Mikropositioners bestimmt und ebenso auf dem Protokoll festgehalten. Zur qualitativen Sicherung werden die einzelnen Objektträger verschlüsselt analysiert.

3.3.5 Chromosomenbruchanalyse

Die Chromosomen der Fanconi-Anämie-Patienten weisen eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit auf. Außerdem sind die Zellen sensibler gegenüber Quervernetzern wie Mitomycin C. Man unterscheidet zwischen Chromatidaberrationen, wie Chromatidbrüchen und Reunionsfiguren, und Chromosomenaberrationen, zu denen Chromosomenbrüche, azentrische Fragmente, dizentrische Chromosomen und Translokationen gehören (Abb.3). Im Folgenden sollen die häufigsten Aberrationen entsprechend der internationalen Nomenklatur (ISCN) näher beschrieben werden.

Chromatidgap: Eine Chromatide ist gebrochen, ohne dass es zu einer Dislokation des Bruchstücks kommt.

Chromatidbruch: Eine Chromatide ist gebrochen, wobei sich das Bruchstück unmittelbar in der Nähe des Restchromosoms befindet, es aber die Orientierung im Raum ändern kann.

Chromosomenbruch: Es sind beide Chromatiden vom Restchromosom getrennt, aber zugehörig lokalisiert.

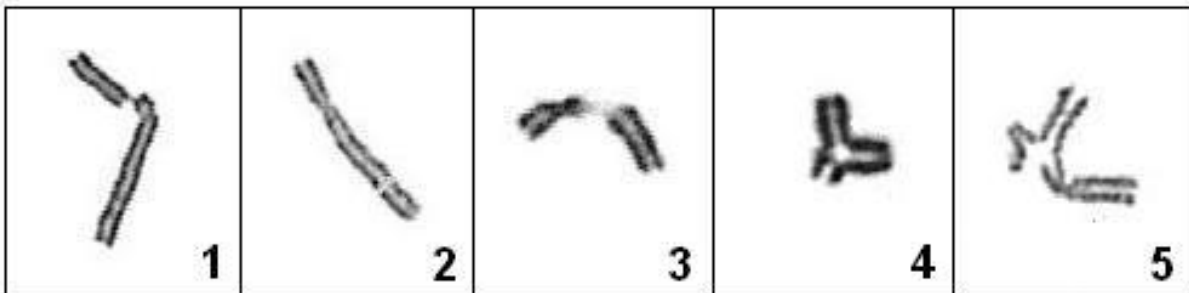
Azentrisches Fragment: Das Zentromer geht durch ein Bruchereignis verloren und es entstehen Fragmente.

Dizentrisches Chromosom: Nach Bruchereignissen an zwei Chromosomen fusionieren diese zu einer Reunionsfigur mit zwei Zentromeren.

Komplette Reunionsfigur: Der Zusammenschluss der Chromosomen entsteht durch falsche Reparatur von bereits gebrochenen Chromatiden. Es sind alle Chromatiden zweier oder mehrerer Chromosomen miteinander verbunden.

Inkomplette Reunionsfigur: Es sind nicht alle Chromatiden zu einer Austauschfigur miteinander verbunden.

Translokationen lassen sich am besten mittels *Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung* analysieren und werden in dem zugehörigem Abschnitt erläutert.



*Abb. 3: Beispiele für häufige strukturelle Chromosomenaberrationen 1-5:
1 Chromatidbruch; 2 Gap; 3 Chromosomenbruch; 4 komplette Reunionsfigur;
5 inkomplette Reunionsfigur*

In der hier durchgeführten Chromosomenbruchanalyse werden Reunionsfiguren, Deletionen und Translokationen mit jeweils zwei Brüchen gewertet. Multiaberrante Zellen, das heißt bei vorhandenen Brüchen > 8 , werden mit jeweils einem Bruchereignis gleichgesetzt (Abb. 4). Der zu analysierende Wert ist definiert als *Anzahl der Brüche pro Zelle* (n Brüche/50 ausgewertete Zellen). Darüber hinaus wird der Wert *aberrante Zellen in Prozent* ermittelt.

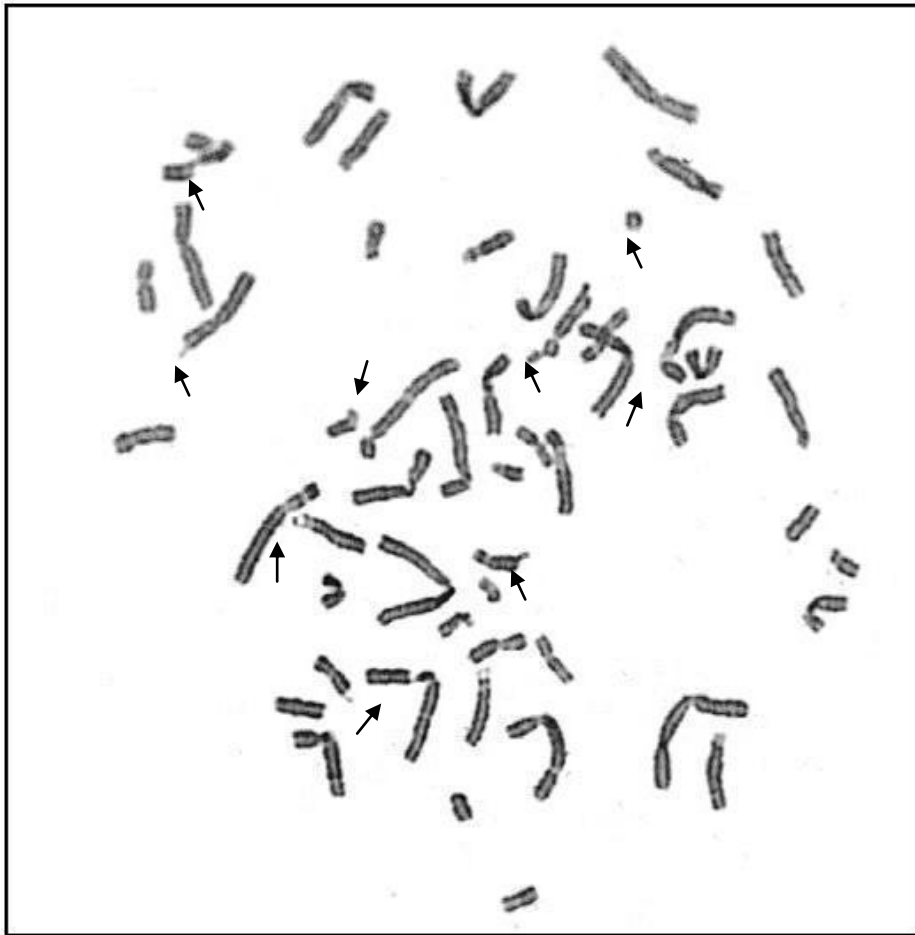


Abb. 4: Multiaberrante Metaphase (>8 Chromosomenbrüche - siehe Pfeile)

3.4 Molekularzytogenetische Methoden

3.4.1 Bacterial artificial chromosome (BAC)

Künstliche Bakterienchromosomen (*bacterial artificial chromosomes*) dienen als Vektoren und erlauben die Klonierung von größeren Genomabschnitten. Es handelt sich um F-Plasmide, die so verändert wurden, dass in ihnen bis zu 300 kb große DNA-Fragmente aufgenommen werden können (Shizuya 1992).

So ist es mit Hilfe der BACs möglich DNA-Sonden herzustellen. In dieser Arbeit wurde der Klon EVI1 (RP11-82c9) verwendet, um 3q26 Aberrationen (Vgl. Abb. 5) nachzuweisen (Ensemble Genome Browser).

Die Isolierung der BAC-DNA erfolgte am Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik - Campus Virchow Klinikum, Berlin.

3.4.1.1 Nick translation

Die *nick translation* ist eine DNA Markierungstechnik, welche die Exonuklease- und Polymeraseaktivität der DNA Polymerase 1 ausnutzt, um markierte Nukleotide in die Ziel DNA einzubauen (Rigby 1977). Als Markierung können sowohl radioaktive oder fluoreszierende Stoffe, als auch kleine Moleküle wie Biotin oder Digoxigenin dienen. Die Intensität der Markierung, wie beispielsweise der in dieser Arbeit genutzten fluoreszierenden dTTPs, hängt von der Konzentration der DNase I ab. Diese verursacht Strangbrüche, sogenannte *nicks*, an denen die DNA-Polymerase ansetzt und mittels ihrer Exonuklease-Aktivität zunächst Nukleotide entfernt, um sie anschließend durch markierte Nukleotide zu ersetzen.

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurde die Methode der *nick translation* zur Markierung der BAC-Sonde verwendet.

Die extrahierte Bakterien DNA wird mit Spectrum green dUTP markiert. Zu dem Ansatz gehören außerdem 10x Nicktranslationspuffer, ein dNTP Mix, ein dTTP Mix, Aqua dest., sowie das Enzym DNA Polymerase I. Der gut gemischte Gesamtansatz mit dem Volumen von 50 µl wird 8 h in einem Eppendorf-Wasserbad bei 15°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 70°C gestoppt. Von dem abgekühlten Nicktranslationsprodukt werden 8 µl abgenommen und zur Fragmentgrößenbestimmung genutzt. Die Probe wird für 3 min bei 98°C in der PCR Maschine erhitzt, bevor ihr abgekühlt 3 µl des DNA Dye (Bromphenolblau) hinzugefügt werden. Einzelsträngig wird das Produkt nun auf ein 1%iges Agarosegel pipettiert. Die DNA Länge sollte zwischen 400 und 2000 bp liegen, um für die FISH eingesetzt zu werden.

3.4.1.2 Fällung der BAC-Sonde

Zur Suppression unspezifischer Hybridisierungen ist es nötig, sämtliche hochrepetitive Sequenzen zu sättigen. Diese repetitiven Bereiche, wie zum Beispiel in Nähe der Chromosomenzentromere verursachen ein sehr starkes Hybridisierungssignal und erschweren die Auswertung. Daher wird der BAC-Sonde eine ausreichende Menge an repetitiver Kompetitions-DNA in Form von Cot-1-Human-DNA hinzugefügt (Pinkel 1988).

Abhängig von der Menge der markierten DNA werden die zur Fällung verwendeten Materialien ins Verhältnis gesetzt. So brauchen 10 µl der Ausgangs-DNA 8 µl Cot-1-DNA, sowie 2 µl Natriumacetat (3 M). Der Ansatz bedarf unabhängig der Menge der markierten DNA 1 µl Glykogen. Diesem Gemisch werden 25 µl eiskaltes Ethanol hinzugefügt. Die Fällung erfolgt bei -20°C für 30 min. Alkohol und niedrige Temperaturen verhindern hierbei, dass die DNA in wässriger Lösung gehalten wird. Anschließend wird der Ansatz bei 14000 rpm und 4°C für 25 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgegossen wurde, kann 1 ml Ethanol (70%) zugegeben werden. Erneut wird das Gemisch bei 14000 rpm und 4°C für 12 min zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Vorhandene Restflüssigkeit kann vorsichtig abpipettiert werden. Um in der folgenden Hybridisierung die Sonden-DNA durch Hitze denaturieren zu können, ist es notwendig die Schmelztemperatur zu senken. Mit Hilfe von 10 µl, auf 37°C erwärmtem Formamidlösungsansatz, werden die Doppelbindungen destabilisiert. Unspezifische Bindungen der Sonden-DNA an die Ziel-DNA sollen außerdem verhindert werden. Darüber hinaus erzielt das im Mastermix vorhandene Volumenausschlussmittel Dextransulfat eine erhöhte Hybridisierungsempfindlichkeit durch lokale Konzentrierung der Sonde und Beschleunigung der Reaktion (Amasino 1986). Davon werden dem Ansatz 10 µl hinzugefügt. Die gefällte Sonden-DNA kann nun bei -20°C aufbewahrt werden.

3.4.2 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

Unter *Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung* versteht man eine Vielzahl von Untersuchungen, die es möglich machen, submikroskopische Chromosomenaberrationen zu erkennen. So können Veränderungen bis zu 100 kb erfasst werden, wohingegen zytogenetische Methoden nur eine Auflösung von 4 Mb und mehr haben. Es können nicht nur einzelne Gene oder Chromosomensegmente nachgewiesen werden, sondern es ist auch möglich, einzelne Chromosomen anzufärben (Pinkel 1988). Darüber hinaus kann der gesamte menschliche Karyotyp via Multi-Color-Fish dargestellt werden (Schröck, Speicher 1996). Weiterhin unterscheidet man die in situ-Hybridisierung hinsichtlich des Zeitpunkts im Zellzyklus. So ist es möglich, Chromosomensegmente nicht nur in der Metaphase, sondern auch in der Interphase anzufärben (Lichter 1988).

Prinzip der FISH ist die Hybridisierung von einzelsträngiger, mit fluoreszierenden Farbstoffen markierter Sonden-DNA und ebenso einzelsträngig vorliegender Ziel-DNA auf einem Objektträger (in situ). Vorausgesetzt wird, dass beide Stränge komplementär zueinander sind und die Sonde im Überschuss vorliegt.

Durch die spezifische Markierung einzelner Chromosomen im *whole chromosome assay* ist es möglich, Translokationen und Insertionen zu erfassen, sowie sogenannte Markerchromosomen zu identifizieren. Methodisch wird die markierte genomische DNA einzelner Chromosomen auf Metaphasechromosomen hybridisiert (Abb. 6).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl mit kommerziellen *whole chromosome painting* Sonden (Metasystems) (Abb. 6), als auch mit einer durch *nick translation* markierten BAC-Sonde gearbeitet (Abb. 5). Im Fokus der FISH Untersuchung liegen die Chromosomen 1, 3 und 7, welche im Gesamten gefärbt werden, sowie der Chromosomenbereich 3q26, der durch ein BAC-Signal detektiert werden kann.

In diesem Versuchsaufbau wurden BAC-Sonde und WCP Sonden gleichzeitig hybridisiert.



Abb. 5: BAC-Sonde auf Chromosom 3q (Pfeile) Rot: wcp-3, grün: BAC

3.4.2.1 RNase Verdau der Chromosomenpräparationen

Dieser Schritt ist notwendig zur Vorbehandlung der Chromosomenpräparate. Die RNase reduziert Hintergrundsignale, welche die Auswertung der BAC-Signale erschweren würden.

Die RNase wird in der Verdünnung 1:200 benötigt. 995 µl 2x SSC und 5 µl werden in dieser Reihenfolge in ein Probengefäß pipettiert. Es werden circa 160 µl der frisch hergestellten RNase Verdünnung pro OT aufgebracht und diese mit einem 24x 60mm Deckglas versehen. Danach erfolgt für 30 min die Inkubation der OT in einer feuchten Kammer bei 37°C. Folgend werden die Deckgläser entfernt und die OT 3x 5 min mit 2x SSC auf einem Schüttler gewaschen.

3.4.2.2 Denaturierung

Zur Hybridisierung muss die chromosomale Ziel DNA einzelsträngig vorliegen. Dafür ist die Denaturierung in einer Formamidlösung aus 20x SSC, H₂O, Formamid und HCl-Lösung (siehe 3.2.2 Standardpuffer und Lösungen) nötig.

Nach dem RNase Verdau erfolgt die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe. Die OT werden je 2 min aufsteigend in 70%, 85% und 100%iger Ethanollösung dehydriert und anschließend auf der Wärmeplatte getrocknet.

Die Denaturierung erfolgt in 69°C heißem Formamidlösungsansatz in der die OT für 1,15 min gestellt werden. Erneut durchlaufen die OT die aufsteigende Alkoholreihe.

3.4.2.3 Hybridisierung

Auch die Sonden müssen einzelsträngig vorliegen und demnach denaturiert werden. Dies geschieht bei 73°C. Die Sonden werden anschließend auf die Hybridisierungsfläche pipettiert, die OT mit Deckgläsern versehen und mit Hilfe von Fixogum luftdicht verschlossen. Die Menge der Sonde pro OT hängt von der Größe des Hybridisierungsfeldes ab, welches vorher via Lichtmikroskop festgelegt wurde. Die Hybridisierung erfolgt bei 37°C in der feuchten Kammer über Nacht (15-20h).

3.4.2.4 Waschschritte

Überschüssige, nicht gebundene Sonden-DNA wird vom OT entfernt. So werden eventuelle Signalartefakte in der Auswertung vermindert.

Das Fixogum wird vorsichtig vom Deckglas entfernt. Wenn die 0,4x SSC/0,3% Igepal Waschlösung im Wasserbad eine Temperatur von 73°C erreicht hat, kann auch das Deckglas vom Objektträger entfernt werden. Nun wird der OT in der Waschlösung geschwenkt und bleibt für 2 min darin stehen. Folgend wird der OT in der zweiten Waschlösung 2x SSC/0,1%Igepal bei Raumtemperatur bewegt.

3.4.2.5 DAPI Gegenfärbung und Fixierung

Die Objektträger werden im letzten Schritt mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt und mit Vectashield eingedeckt. Die Farbstoffe sollen so vor dem Ausbleichen bei der anschließenden Fluoreszenz-Mikroskopie geschützt werden.

Nachdem die OT die zweite Waschlösung durchlaufen haben, werden sie für 14 min mit DAPI im Dunklen gegengefärbt. Anschließend werden die OT in zwei Küvetten mit Aqua dest. nacheinander gespült und zum Trocknen 2 min in 50 ml Röhrchen bei 1000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss erfolgt die Zugabe von Vectashield auf die OT, bevor diese mit 24x 60 mm Deckgläsern versehen werden. Vor der Auswertung können die fertigen Objektträger in einem 4°C kalten Kühlschrank gelagert werden.

3.4.3 Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse

Ziel war es, pro Objektträger 150 Mitosen auszuwerten und zu dokumentieren. Mit Hilfe der Software Metafer kann eine schnelle Erfassung von Aberrationen und Translokationen erfolgen. In dieser Arbeit wurden die Chromosomen 1, 3 und 7 analysiert. Andere Chromosomen werden nicht auf Vollständigkeit oder Brüchigkeit untersucht.

Dem Programm wird ein manuell ersuchter Punkt, egal ob Mitose oder Artefakt, präsentiert. Dieser Punkt wird als fixe Position genutzt, um gespeicherte Objekte wieder zu finden. Jedes dieser Objekte kann angefahren und genauer untersucht werden. Folgende Kriterien müssen für eine Auswertung erfüllt sein: Die Hybridisierungssignale sollten eindeutig und gleichmäßig entsprechend der verwendeten Sonden abgebildet

sein. Darüber hinaus sollten möglichst wenige Hintergrundsignale und Artefakte zu sehen sein. Bezüglich der Chromosomen sollten diese der Metaphase zugehörig sein und die Chromatiden klar auseinander zu halten zu sein. Folgende Filter werden verwendet:

- DAPI
- FITC/Spectrum green
- TRITC/Spectrum orange

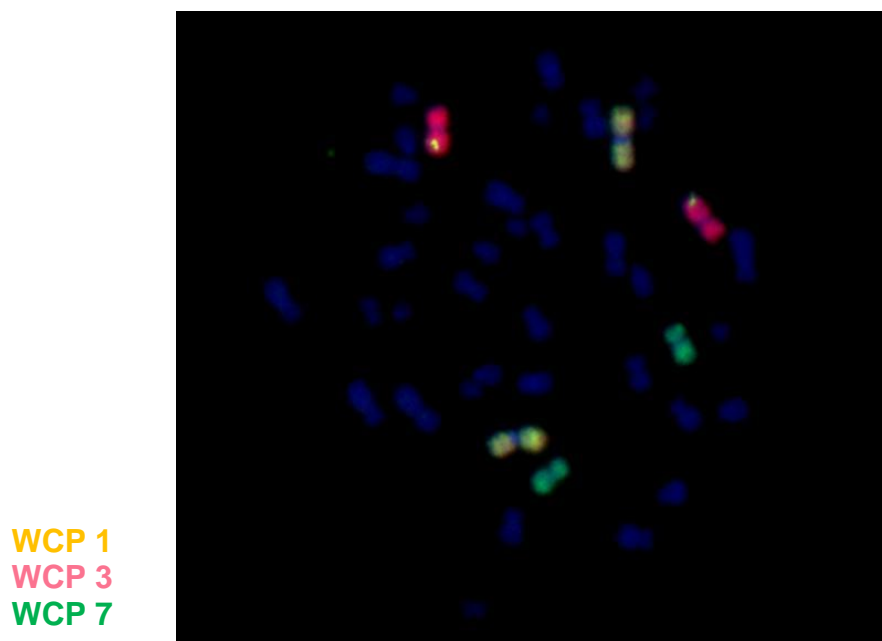


Abb. 6: Whole Chromosome Painting + BAC 3q (gelb)

3.4.4 Darstellung und Definition der Aberrationsereignisse

Durch die Fluoreszenzmarkierung der Chromosomen 1, 3 und 7 können Translokationen, Duplikationen und Deletionen von Teilabschnitten der Chromosomen detektiert werden. Im Folgenden sollen diese entsprechend der ISCN beschrieben werden.

Balancierte Translokation: Genetisches Material wird zwischen zwei oder mehreren nicht-homologen Chromosomen ausgetauscht, ohne dass es zu einem Verlust von Material kommt.

Unbalancierte Translokation: Durch Zellteilung können einst balancierte Translokationen in unbalancierte resultieren. Dabei geht genetisches Material verloren.

Deletion: Verlust von Genmaterial entweder innerhalb eines Chromosoms oder in der Telomerregion. Meist werden azentrische Fragmente während der Zellteilung vom Spindelapparat nicht erkannt und werden zufällig auf Tochterzellen verteilt oder gehen verloren. Mikrodeletionen können mit Hilfe von FISH und BAC-Sonden detektiert werden.

Duplikation: Verdopplung von genetischem Material durch zufällige Aufteilung eines azentrischen Fragments in eine bereits diploide Tochterzelle.

3.5 Statistische Methoden

Trotz des kleinen Stichprobenumfangs von acht Fanconi-Anämie-Patienten kann eine deskriptive und graphische Auswertung der Daten erfolgen. Es werden Gruppen (Tab. 4) miteinander verglichen. Die zu vergleichende abhängige Variable stellt die Chromosomenbrüchigkeit, definiert als *Anzahl der Brüche pro Zelle* (n Brüche/50 bzw. n Brüche/150) dar. In erster Linie werden die Spontanbrüchigkeiten, das heißt die ermittelten *Brüche pro Zelle* ohne Verwendung von Mitomycin C analysiert.

Tab. 4: Schematische Darstellung der zu vergleichenden Ergebnisse

Methoden	MMC	MMC + Calyculin A
Konventionell	A	B
WCP-Assay	C	D

Darüber hinaus ist der Vergleich der Bruchergebnisse hinsichtlich der Verwendung von Calyculin A vordergründig. Es werden die Ergebnisse zwischen A und B und zwischen C und D verglichen. Darüber hinaus werden die Werte hinsichtlich der zytogenetischen Methoden, A zu C und B zu D verglichen (Tab. 4). Dabei muss beachtet werden, dass durch die unterschiedliche Anzahl der untersuchten Chromosomen, konventionell zytogenetisch 46 pro Metaphase und molekularzytogenetisch nur 6 pro Metaphase analysiert werden, nämlich die Chromosomenpaare 1, 3 und 7. Die physikalische Größe dieser drei Chromosomen macht etwa 20,6% des Gesamtgenoms aus (Matise 2007).

Unter der Annahme, dass die Brüche gleichmäßig über das Genom verteilt sind, ergibt sich ein Multiplikator von 4,94 um die molekularzytogenetischen Daten auf das Gesamtgenom zu berechnen (Matise 2007). Die Nullhypothese „es gibt keine Unterschiede“ zwischen den Gruppen, kann mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft werden. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein parameterfreier statistischer Test und kann auch bei kleinen Stichprobenumfängen angewandt werden. Die ermittelten p-Werte (Bedeutungswerte) gelten als signifikant, wenn $p < 0,05$.

Darüber hinaus werden konventionelle Zytogenetik und WCP-Methode miteinander korreliert, um die Aussagefähigkeit beider Methoden zu prüfen. Der Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizient r wird dafür genutzt.

Weiterhin wurden die Mitose- bzw. G₂-PCC-Indices, welche in der konventionellen Bruchanalyse ermittelt wurden, bestimmt. Die relativen Bruchhäufigkeiten der Chromosomen 1, 3 und 7 werden ebenso miteinander verglichen. Analog zur obigen Analyse wird die Variable Chromosomenbrüchigkeit als *aberrante Zellen pro Zelle* ausgewertet. Darüber hinaus wird die Verteilung der Aberrationstypen in den verschiedenen Methoden dargestellt.

Die Analysen und Graphiken wurden mit Hilfe der Software Excel 2007 und StartPlus 2007 erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Darstellungen der Chromosomen nach Behandlung der Zellen mit Colcemid und Calyculin A

Da die Auflösung der konventionell zytogenetisch dargestellten Chromosomen höher ist als in der WCP-Analyse wird hier der Vergleich zwischen vorzeitig kondensierten Chromosomen (im Folgenden als G₂-PCCs bezeichnet) und den Metaphasenchromosomen auf Grundlage der konventionellen Zytogenetik bevorzugt.

Die G₂-PCCs weisen eine typische Charakteristik auf, die sich von den in der Mitose kondensierenden Chromosomen unterscheidet.

Die unten abgebildeten Darstellungen der Chromosomen (Abb. 7 und 8) verdeutlichen die Unterschiede. Als Beispiel dienen die mit Colcemid- bzw. Calyculin A- behandelten Kulturen des Fanconi-Anämie-Patienten P2 - 65. Die Bilder A, B und C zeigen die verschiedenen Stadien der Kondensation. Vor Teilung der Zellen in der Mitose werden die Chromosomen erheblich kürzer und dicker, was auch unter Calyculin A Behandlung ähnlich ist. Allerdings handelt es sich bei den G₂-PCCs um eine vorzeitige Kondensation, ohne dass die Chromosomen in die Zellteilung eingetreten sind. Der Phosphataseinhibitor Calyculin A bewirkt ein sogenanntes *Centromer-Splitting*, was bedeutet, dass sich das Zentromer auflöst (Terzoudi 2005, Shovman 2008). Chromosomen, bei denen der Zusammenhalt der Chromatiden nicht gewährleistet ist, kommen nach Calyculin A Behandlung häufiger vor. In den unten dargestellten Abbildungen (Abb. 8), welche die Mehrheit der Calyculin A beeinflussten Chromosomen repräsentieren, ist dieses Problem nicht sehr ausgeprägt. Allerdings zeigt sich, je stärker die Chromosomen kondensieren, wie in Abbildung 8C ersichtlich, desto deutlicher ist der Zentromerverlust.

Trotz der charakteristischen Unterschiede nach Calyculin A Behandlung der Chromosomen, zeigen die Beispielbilder, dass eine Bruchanalyse durchführbar ist. In Abbildung 8B sind neben mehreren Chromatidbrüchen (ctb und Pfeile) und azentrischen Fragmenten (ace) auch eine inkomplette Reunionsfigur (ik Rb) nachweisbar. In den durch Colcemid arretierten Metaphasen in Abb. 7 befinden sich keine Chromosomenbrüche. Abbildung 8C weist allerdings nur 44 Chromosomen auf.

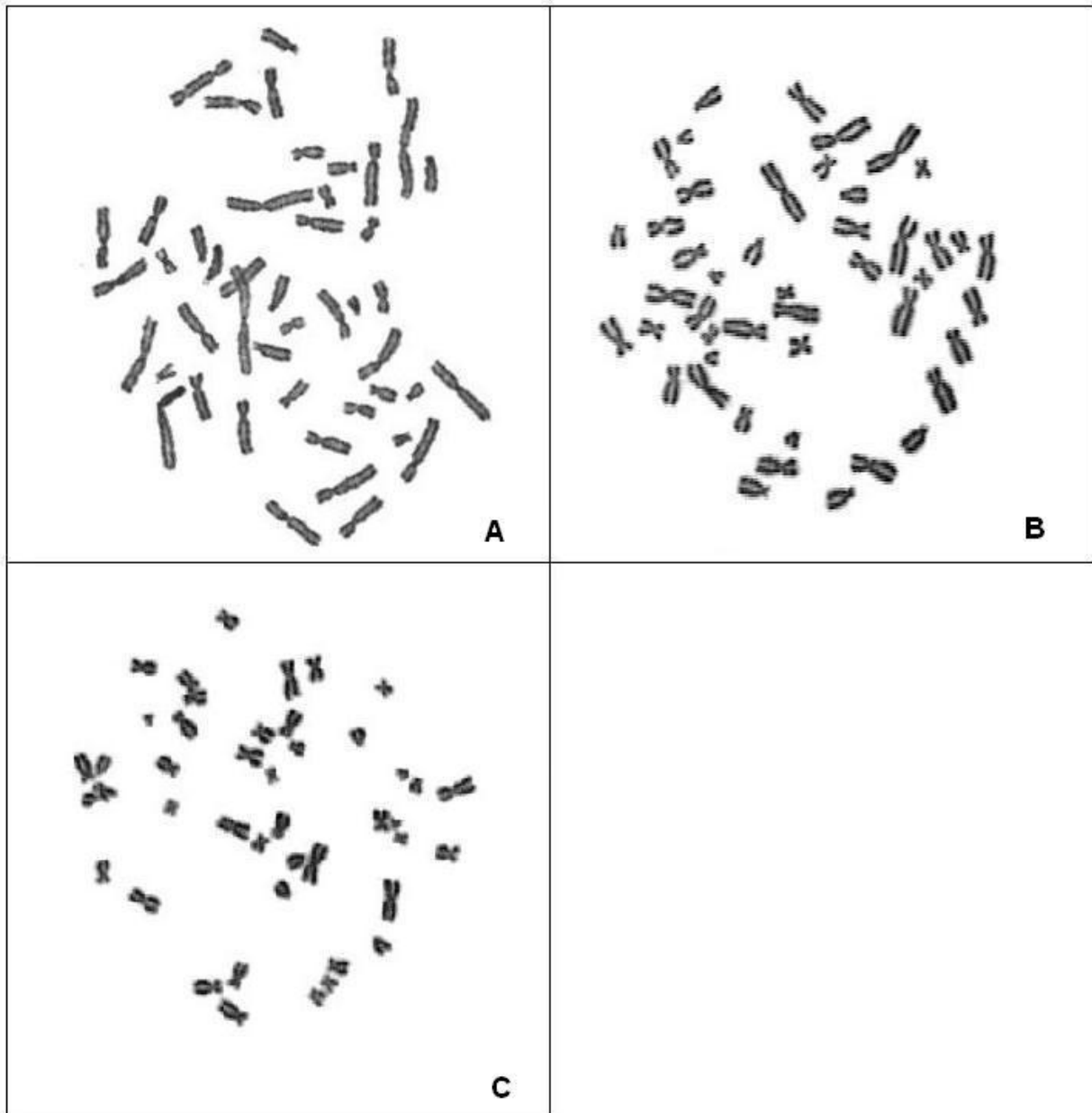


Abb. 7: Darstellung der zunehmenden Chromosomenkondensation nach konventionellem Colcemid-Block

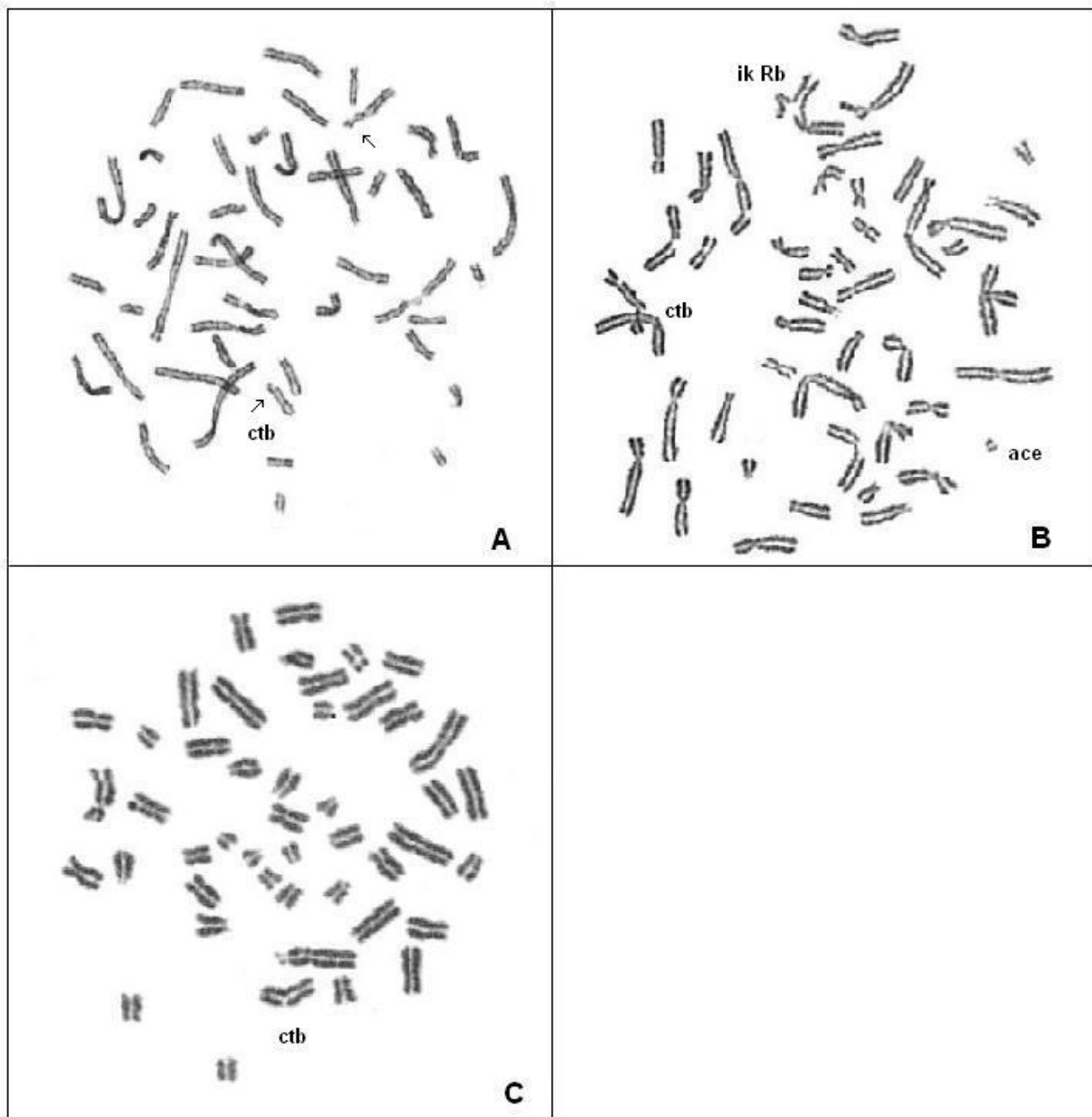


Abb. 8: Calyculin A induzierte G_2 -PCC (ctb und Pfeile - Chromatidbrüche; ik Rb - inkomplette Reunionsfigur; ace - azentrisches Fragment; exemplarische Darstellung)

4.2 Vergleich der Mitose- und G_2 -PCC-Indices

Um die Funktion des G_2 /M Checkpoints zu untersuchen ist es sinnvoll die Mitose- und G_2 -PCC-Indices hinsichtlich der Zellzyklusphasen zu vergleichen. Der Index in der G_2 -Phase wird speziell als G_2 -PCC-Index bezeichnet.

Um die Mitoseindices der FA-Kulturen zusammenfassend darzustellen (siehe Abb. 9) wurde je MMC Konzentration ein gewichtetes Mittel der Mitose- und G_2 -PCC-Indices ermittelt. Hierfür wurden die Interphasekerne der FA- bzw. Kontrollkulturen und folgend

die Metaphasen bzw. PCC-Kerne addiert. Tabelle 5 stellt eine Beispielrechnung zur Ermittlung des gewichteten Mittels dar. Nach unten stehenden Formeln wurden der Mitoseindex für die mit Colcemid-behandelten Kulturen und der G₂-PCC-Index für die mit Calyculin A behandelten Zellen berechnet.

$$\text{Mitose-Index[\%]} = \frac{\text{Anzahl Metaphasen}}{\text{Anzahl Metaphasen} + \text{Anzahl Interphasekerne}} \times 100$$

$$\text{G}_2\text{-PCC-Index[\%]} = \frac{\text{Anzahl PCC-Kerne}}{\text{Anzahl PCC-Kerne} + \text{Anzahl Interphasekerne}} \times 100$$

Tab. 5: Beispielrechnung gewichtetes Mittel: Mitose-Index der FA-Kulturen ohne Zusatz von MMC

FA-Kultur	Metaphasen	Interphasekerne
P1-09	32	1154
P2-65	45	1132
P3-66	48	1109
P4-17	44	1026
P5-64	44	1162
P6-98	94	1126
Summe	307	6709

$$\text{Mitose-Index[\%]} = \frac{307}{307 + 6709} \times 100 = 4,38$$

In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass die Indices im konventionellen Colcemidblock abnehmen, je höher die Konzentration von Mitomycin C gewählt wurde. Der Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizient r ergab einen Wert von -0,71 und bestätigt die negative Korrelation. Anders verhält es sich mit den G₂-PCC-Indices. Mit zunehmender Konzentration des Quervernetzlers steigt der Index an. Der Korrelationskoeffizient zeigt mit $r = 0,88$ eine positive Korrelation. Allerdings stellt die Abbildung die gewichteten Mittelwerte dar. Betrachtet man die Einzelwerte, zeigt sich zwischen den Mitoseindices der mit Colcemid und Calyculin A behandelten Zellen kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test).

Eine Abhängigkeit der Kontrollzellen von der Mitomycin C Konzentration lässt sich nicht feststellen. Die Mitoseindices verhalten sich in etwa gleich. Auch besteht kein signifikanter Unterschied zwischen G₂-Phase und Metaphase. Die Verwendung von Calyculin A bewirkt keine Zunahme der G₂-PCC-Indices bezogen auf die Kontrollzellen. Vergleicht man die FA-Zellen mit den Kontrollzellen in der G₂ - Phase so zeigt sich ein signifikanter Unterschied der G₂-PCC-Indices ($p > 0,05$). Zusammenfassend zeigt sich, dass die FA-Zellen sensitiv auf Mitomycin C reagieren und sich die Mitoseindices verringern je höher die Konzentration des Quervernetzers angesetzt ist. Demgegenüber sind die Mitoseindices der Kontrollzellen nicht abhängig von der MMC Konzentration (Abb. 9).

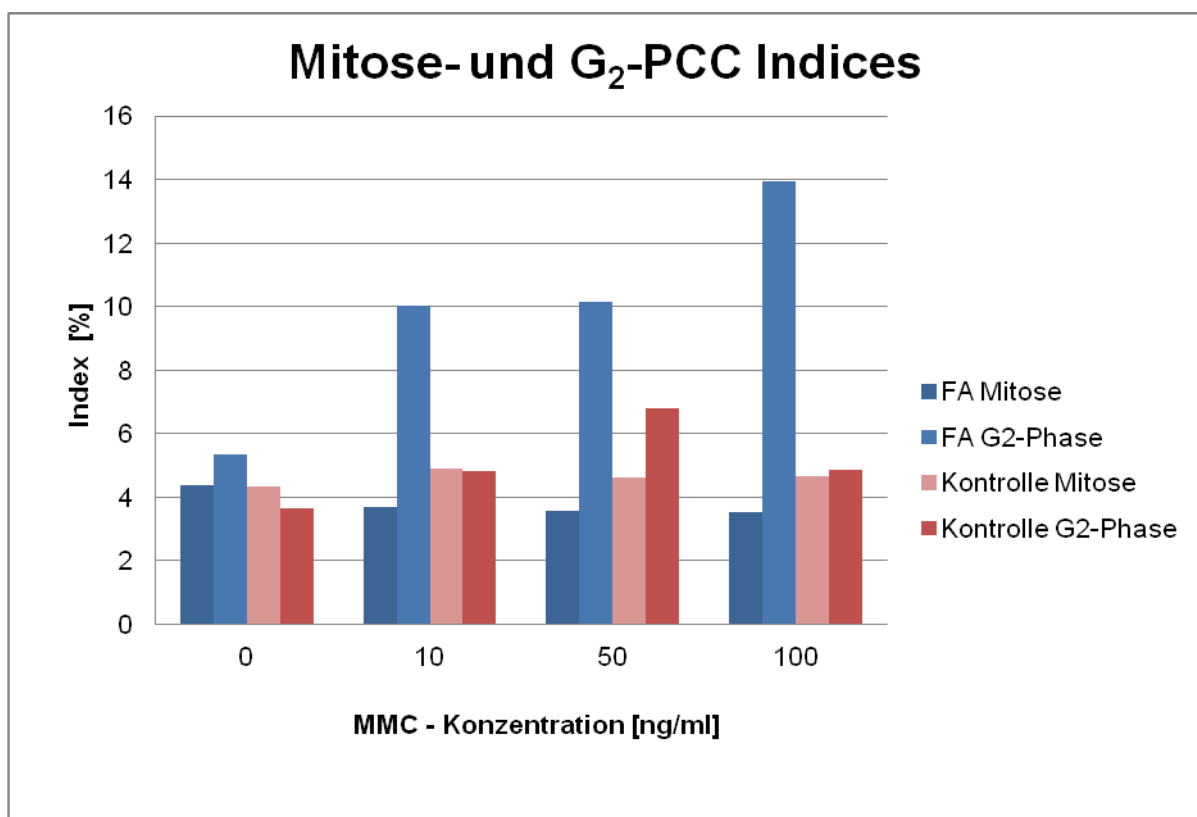


Abb. 9: Mitose- und G₂-PCC Indices der FA- und Kontroll-Lymphozytenkulturen (Darstellung der gewichteten Mittel)

In Tabelle 6 sind die Mitose- und G₂-PCC-Indices pro Kultur, sowie Medianwerte, Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt.

Tab. 6: Mitose- und G₂-PCC-Indices pro Kultur in % (SD-Standardabweichung)

MMC [ng/ml]			MMC [ng/ml]		
	0	0		0	0
FA	Mitose	G2-Phase	Kontrolle	Mitose	G2-Phase
P1-09	2,70	1,84	K1-71	3,46	2,67
P2-65	3,82	7,37	K2-30	4,78	1,92
P3-66	4,15	2,76	K3-03	5,06	4,19
P4-17	4,11	1,27	K4-99	3,99	5,89
P5-64	3,65	4,54			
P6-98	8,35	17,86			
Median	3,97	3,65	Median	4,39	3,43
Mittel	4,46	5,94	Mittel	4,32	3,67
SD	1,98	6,24	SD	0,73	1,76
10			10		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	2,10	1,11	K1-71	5,11	2,33
P2-65	3,67	6,94	K2-30	4,50	2,29
P3-66	3,46	4,11	K3-03	6,58	5,35
P4-17	2,99	4,29	K4-99	3,21	8,88
P5-64	4,04	10,59			
P6-98	6,78	30,56			
Median	3,57	5,62	Median	4,81	3,84
Mittel	3,84	9,60	Mittel	4,85	4,71
SD	1,59	10,75	SD	1,40	3,13
50			50		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	1,36	0,75	K1-71	4,71	4,28
P2-65	4,03	6,78	K2-30	4,21	4,09
P3-66	3,19	4,43	K3-03	5,68	7,43
P4-17	4,26	4,59	K4-99	3,96	11,47
P5-64	2,15	6,17			
P6-98	5,11	31,75			
Median	3,61	5,38	Median	4,46	5,86
Mittel	3,35	9,08	Mittel	4,64	6,82
SD	1,40	11,30	SD	0,76	3,46
100			100		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	0,92	0,75	K1-71	4,92	2,30
P2-65	4,48	4,11	K2-30	5,96	3,57
P3-66	3,06	4,91	K3-03	4,51	4,75
P4-17	3,34	5,02	K4-99	3,10	7,44
P5-64	4,42	10,02			
P6-98	3,99	39,66			
Median	3,67	4,97	Median	4,72	4,16
Mittel	3,37	10,75	Mittel	4,62	4,52
SD	1,33	14,47	SD	1,18	2,19

Unter Calyculin A zeigen sich deutliche Schwankungen der G₂-PCC-Indices. Diese sind umso ausgeprägter, je höher die MMC Konzentration steigt.

Hinsichtlich der Fibroblastenkulturen fällt auf, dass sie insgesamt niedrige Metaphase- als auch G₂-PCC-Indices aufweisen (Tab. 7). Vor allem in der Mitose zeigen die FA-Kulturen deutlich geringere Metaphase-Indices auf, vergleicht man diese mit den Kontrollzellen. Allerdings fällt auch auf, vergleicht man die beiden FA-Kulturen miteinander, dass die FA-Kultur P7-17F mit der Komplementationsgruppe D1/BRCA2 einen deutlich höheren Metaphase-Index als die Kultur P8-59F aufweist. Weiterhin zeigt sich kein deutlicher Unterschied zwischen FA- und Kontrollzellen hinsichtlich des G₂-PCC-Index.

Tab. 7: Mitose- und G₂-PCC-Indices der Fibroblastenkulturen (Kontrollen gemittelt, KG-Komplementationsgruppe)

MMC [ng/ml]			
0 MMC			
FA	Mitose	G2-Phase	KG
P7-17F	0,89	2,19	D1
P8-59F	0,37	2,52	D2
Kontrolle	Mitose	G2-Phase	
K5-00F	3,19	2,38	
K6-09F	2,65	1,8	
K7-52F	2,25	0,53	
Mittel gewichtet	2,59	1,59	

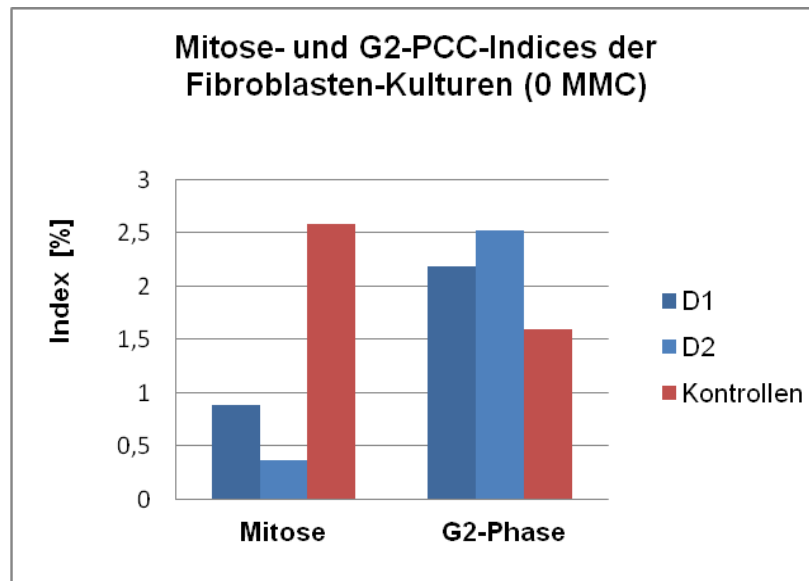


Abb. 10: Mitose- und G₂-PCC-Indices der Fibroblastenkulturen (analog zu Tabelle 7, Kontrollen als gewichtetes Mittel)

4.3 Konventionelle Zytogenetik

4.3.1 Brüche pro Zelle

Im Vordergrund der Ergebnisse steht die signifikant erhöhte Chromosomenbrüchigkeit der mit Calyculin A behandelten Fanconi-Anämie-Lymphozyten. Unabhängig von der jeweiligen Mitomycin C Konzentration zeigen die in der G₂-Phase des Zellzyklus vorzeitig kondensierten Lymphozyten eine deutlich höhere Bruchrate verglichen mit jenen durch Colcemid, in der Mitose arretierten Zellen. Im Mann-Whitney-U-Test konnten jeweils p-Werte < 0,05 ermittelt werden. Werden die Fibroblastenkulturen in die Signifikanzanalyse der Spontanbrüchigkeit, das heißt ohne Zugabe von Mitomycin C, mit einbezogen erhält man sogar $p < 0,01$. Trotz der kleinen Stichprobe sind die Unterschiede der Chromosomenbrüchigkeit der FA-Zellen zwischen G₂-Phase und Mitose sehr bedeutsam. Unterschiede innerhalb der Phasen, ersichtlich durch die Standardabweichung, sind in der G₂-Phase deutlicher ausgeprägt. Auffällig ist hierbei, dass die Abweichung mit steigenden Mitomycin C Konzentrationen zunimmt.

Ebenso zeigen sich Differenzen in der Brüchigkeit bei Betrachtung der Kontrollkulturen. Zwischen den mit Colcemid und Calyculin A behandelten Zellen bestehen überwiegend signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Eine Ausnahme stellt der Vergleich in der Spontanbrüchigkeit der Kontroll-Lymphozytenkulturen dar. Hier lies sich kein signifikanter Unterschied zwischen Colcemid- und Calyculin A-Gruppe ermitteln.

Weiterhin ist ein Vergleich zwischen Fanconi-Anämie-Zellen und Kontrollzellen von besonderer Bedeutung. Unabhängig von Colcemid oder Calyculin A Behandlung sind die Bruchraten zwischen FA-Zellen und Kontrollen signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die FA-Zellen weisen in G₂-Phase und in Mitose eine stärkere Chromosomenbrüchigkeit auf, als die Kontrollzellen. Sowohl Patienten- als auch Kontrollkulturen korrelieren zwischen Mitomycin C Konzentration und Chromosomenbruchrate positiv. So erhöhen sich die Brüche pro Zelle bei steigender Quervernetzer Konzentration. Der Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizient r bezogen auf die FA-Kulturen beträgt dabei $r > 0,94$. Die Kontrollzellen reagieren zwar mit einer signifikanten Erhöhung der Brüchigkeit bei steigenden Mitomycin C Konzentrationen. Insgesamt ist die Chromosomenbrüchigkeit aber deutlich geringer, als die der FA-Zellen. Die folgenden Tabellen stellen die Ergebnisse der konventionellen Bruchanalyse umfassend dar (MMC - Mitomycin C in ng/ml).

Tab. 8: Brüche pro Zelle in den Lymphozytenkulturen der FA-Patienten und der Kontrollen (Konventionell)

Konventionell			Konventionell		
0 MMC			0 MMC		
FA	Mitose	G2-Phase	Kontrolle	Mitose	G2-Phase
P1-09	0,32	0,76	K1-71	0,02	0,10
P2-65	0,38	0,62	K2-30	0,00	0,26
P3-66	0,10	0,50	K3-03	0,02	0,06
P4-17	0,42	0,48	K4-99	0,20	0,32
P5-64	0,20	0,20			
P6-98	0,20	0,50			
Median	0,26	0,50	Median	0,02	0,18
Mittel	0,27	0,51	Mittel	0,06	0,19
SD	0,12	0,19	SD	0,09	0,12
10 MMC			10 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	0,50	1,20	K1-71	0,00	0,20
P2-65	0,64	2,90	K2-30	0,00	0,46
P3-66	0,92	1,56	K3-03	0,06	0,36
P4-17	0,22	1,32	K4-99	0,00	0,64
P5-64	0,60	1,18			
P6-98	0,36	1,38			
Median	0,55	1,35	Median	0,00	0,41
Mittel	0,54	1,59	Mittel	0,02	0,42
SD	0,24	0,66	SD	0,03	0,18
50 MMC			50 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	0,68	1,36	K1-71	0,12	0,52
P2-65	1,74	3,08	K2-30	0,12	0,56
P3-66	1,62	2,62	K3-03	0,16	0,24
P4-17	0,64	3,02	K4-99	0,10	1,60
P5-64	1,38	1,88			
P6-98	0,40	2,64			
Median	1,03	2,63	Median	0,12	0,54
Mittel	1,08	2,43	Mittel	0,13	0,73
SD	0,57	0,68	SD	0,03	0,60
100 MMC			100 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	0,70	1,66	K1-71	0,08	0,48
P2-65	1,42	4,50	K2-30	0,34	1,20
P3-66	1,84	2,74	K3-03	0,32	0,40
P4-17	1,60	3,50	K4-99	0,06	0,76
P5-64	1,82	2,54			
P6-98	1,02	3,80			
Median	1,51	3,12	Median	0,20	0,62
Mittel	1,40	3,12	Mittel	0,20	0,71
SD	0,46	1,01	SD	0,15	0,36

Die Unterschiede zwischen den analysierten Kulturen stellt folgende Abbildung 11 deutlich dar. Zur Veranschaulichung und Repräsentierbarkeit der Ergebnisse wurde der Median dem Mittelwert vorgezogen. Die blauen Balken entsprechen dabei den Fanconi-Anämie-Kulturen.

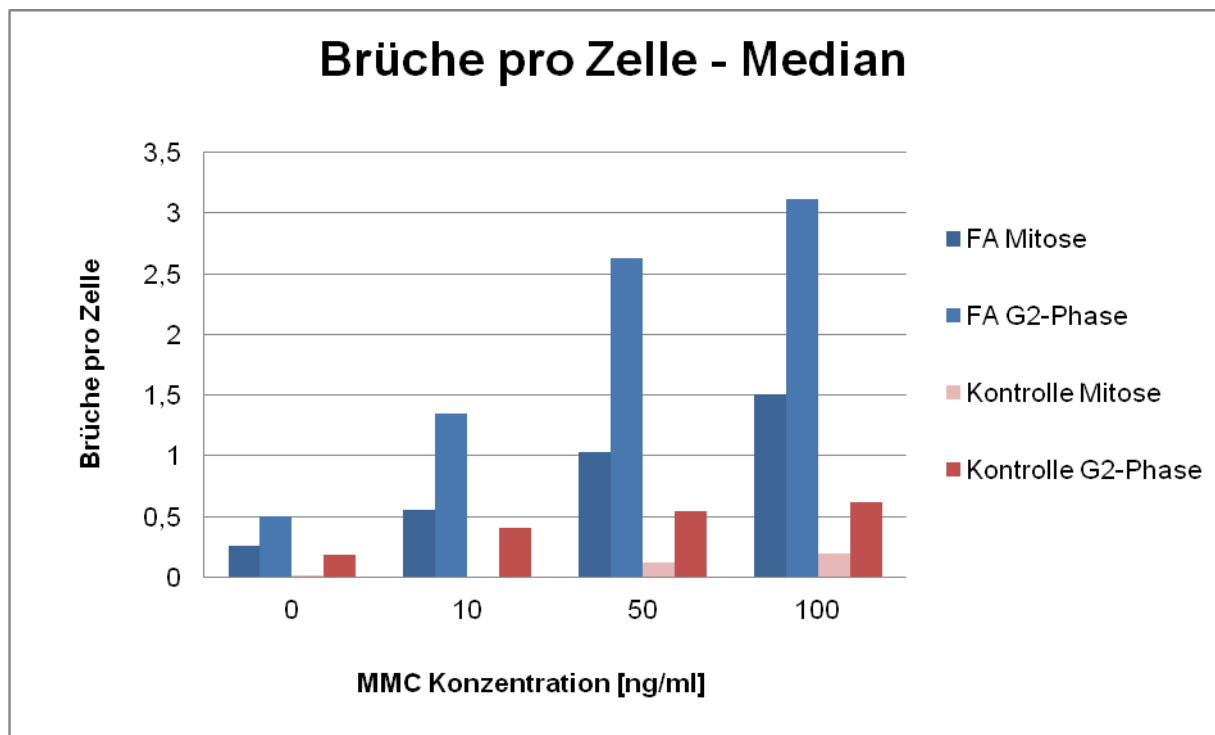


Abb. 11: Brüche pro Zelle der Lymphozytenkulturen im Median (n FA=6; n Kontrollen=4) Konventionelle Zytogenetik

Tab. 9: Brüche pro Zelle der Fibroblastenkulturen (Konventionell)

		MMC [ng/ml]		
		0 MMC		
FA	Mitose	G2-Phase	KG	
P7-17F	0,28	1,44	D1	
P8-59F	0,18	1,18	D2	
Kontrolle	Mitose	G2-Phase		
K5-00F	0,00	0,34		
K6-09F	0,02	0,06		
K7-52F	0,02	0,14		
Median	0,02	0,14		

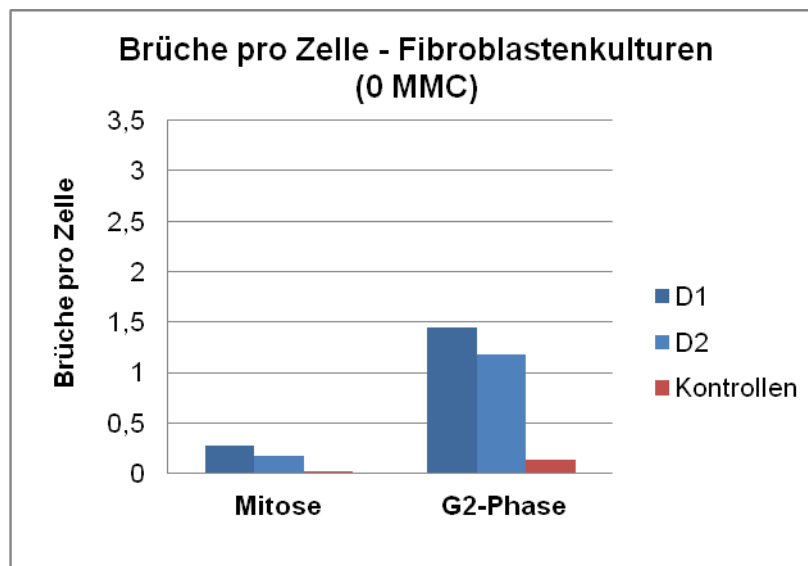


Abb. 12 : Brüche pro Zelle der Fibroblastenkulturen (analog zu Tabelle 9, Kontrollen im Median)

Hinsichtlich der Fibroblastenkulturen fällt auf, dass die FA-Kultur P7-17F mit der Komplementationsgruppe D1/BRCA2 nicht nur einen erhöhten Metaphase-Index aufweist (Tab. 7, Abb. 10), sondern auch eine erhöhte Chromosomenbruchrate, vergleicht man diese mit der anderen FA-Fibroblastenkultur P8-59F.

4.3.2 Aberrante Zellen in %

Neben der Anzahl der *Brüche pro Zelle* kann die Chromosomenbrüchigkeit auch durch die Anzahl der aberranten Zellen pro 50 analysierte Metaphasen bzw. G₂-PCC-Zellen beschrieben werden. So haben Fanconi-Anämie-Zellen meist 5 - 50% aberrante Metaphasen hinsichtlich der spontanen Chromosomenbrüchigkeit. Die Kontrollzellen sollten einen 2% Anteil an aberranten Metaphasen nicht überschreiten (Wegner 1999).

In folgenden Abbildungen sind die Medianwerte der aberranten Zellen je einzelne Mitomycin C Konzentrationen bezogen auf je 50 analysierte Metaphasen bzw. G₂-PCC-Zellen in Prozent dargestellt. Eine Zelle wurde als aberrant detektiert, wenn mindestens ein Chromosom eine Aberration, beziehungsweise einen Bruch aufwies. Einbezogen wurden die Lymphozytenkulturen (n FA=6; n Kontrollen=4) der mit Colcemid und Calyculin A behandelten Zellen.

Tab. 10: Aberrante Zellen in % - Lymphozytenkulturen (Konventionell)

Konventionell			Konventionell		
0 MMC			0 MMC		
FA	Mitose	G2-Phase	Kontrolle	Mitose	G2-Phase
P1-09	22	46	K1-71	2	8
P2-65	22	34	K2-30	0	22
P3-66	10	28	K3-03	2	6
P4-17	22	20	K4-99	2	22
P5-64	18	16			
P6-98	18	34			
Median	20	31	Median	2	15
Mittel	18,67	29,67	Mittel	1,50	14,50
SD	4,68	10,84	SD	1,00	8,70
10 MMC			10 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	36	68	K1-71	2	14
P2-65	48	74	K2-30	0	28
P3-66	44	66	K3-03	4	24
P4-17	16	68	K4-99	0	36
P5-64	34	44			
P6-98	28	54			
Median	35	67	Median	1	26
Mittel	34,33	62,33	Mittel	1,50	25,50
SD	11,48	11,13	SD	1,91	9,15
50 MMC			50 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	46	58	K1-71	8	36
P2-65	64	74	K2-30	10	32
P3-66	60	80	K3-03	18	16
P4-17	34	68	K4-99	6	62
P5-64	52	52			
P6-98	24	78			
Median	49	71	Median	9	34
Mittel	46,67	68,33	Mittel	10,50	36,50
SD	15,37	11,27	SD	5,26	19,07
100 MMC			100 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	46	74	K1-71	8	30
P2-65	52	86	K2-30	28	56
P3-66	62	76	K3-03	24	28
P4-17	58	82	K4-99	6	40
P5-64	64	64			
P6-98	38	80			
Median	55	78	Median	16	35
Mittel	53,33	77,00	Mittel	16,50	38,50
SD	10,01	7,67	SD	11,12	12,79

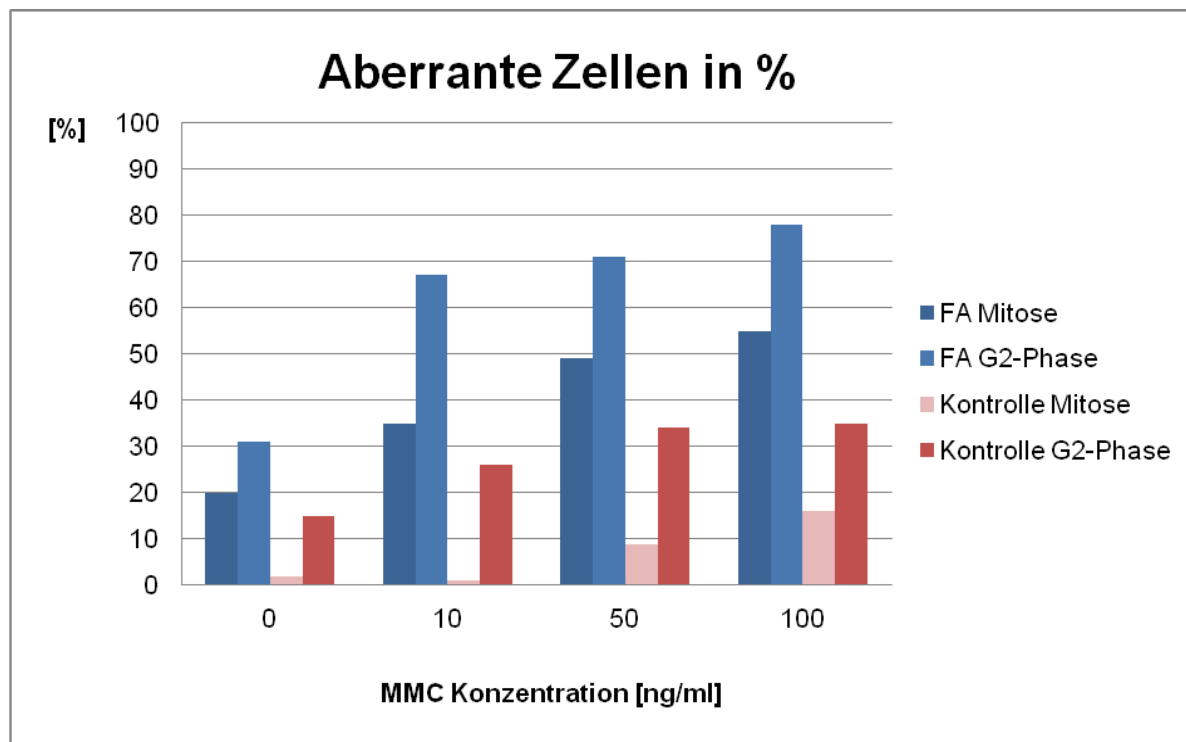


Abb. 13: Aberrante Zellen der Lymphozytenkulturen in % (Konventionell)

Tab. 11: Aberrante Zellen der Fibroblastenkulturen in % (Konventionell)

Konventionell			
0 MMC			
Patient	Colcemid	Cal A	KG
P7-17F	26	70	D1
P8-59F	16	64	D2
Kontrolle	Colcemid	Cal A	
K5-00F	0	20	
K6-09F	2	6	
K7-52F	2	14	
Median	2	14	

Laut den Diagnosekriterien nach Wegner für die Fanconi-Anämie befinden sich alle analysierten FA-Kulturen im Referenzbereich. Auch die Kontrollkulturen überschreiten die 2%-Grenze an aberranten Zellen in der spontanen Bruchanalyse nicht. Die FA-Kulturen, bezogen auf die konventionelle Bruchdiagnostik unter Colcemid Verwendung, weisen im Median eine Aberranz von 20% (range 10 – 22%) auf.

Unter Mitomycin C Einfluss steigt die Anzahl aberranter Metaphasen in den FA-Kulturen deutlich an. Die mit Colcemid behandelten Zellen korrelieren positiv ($r > 0,9$) bezüglich steigender MMC Konzentration und Zunahme der Aberrationsrate. Bei den G_2 -PCCs fällt auf, dass es eine enorme Steigerung in der Anzahl der aberranten Zellen nach Zugabe des Mitomycin C gibt. Ohne Quervernetzter liegt die Rate bei 31% und steigt bei 10 ng/ml MMC auf 67%, das heißt auf mehr als die doppelte Anzahl aberranter Zellen. Die Aberrationsrate erhöht sich bei 50 und 100 ng/ml nicht mehr um das doppelte, sondern nur um 3 - 6 %. Der Korrelationskoeffizient in der Calyculin A - Gruppe liegt bei $r > 0,7$.

Wie bei der Variablen *Brüche pro Zelle* lässt sich bei *Prozent aberranter Zellen* ein signifikanter Unterschied in der Aberrationsrate feststellen, vergleicht man die Brüchigkeit in den G_2 -PCCs und in der Mitose ($p < 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test). Nicht nur die FA-Kulturen, sondern auch die Kontrollkulturen weisen eine deutlich höhere Anzahl aberranter Zellen auf, wenn sie sich in der G_2 -Phase befinden. Wenn man FA- und Kontrollkultur in der G_2 -Phase miteinander vergleicht, wird ersichtlich, dass signifikante Unterschiede nur bei Zugabe von 10 und 50 ng/ml MMC auftreten. Anders verhalten sich die Colcemid behandelten Zellen. Unabhängig von Mitomycin C Konzentration zeigen die FA-Kulturen eine signifikant erhöhte Aberrationsrate ($p < 0,05$).

Auffällig sind die extrem erhöhten Werte der FA-Fibroblasten in der G_2 -Phase. Mit 70 und 64% liegen sie weit über dem Median der FA-Lymphozyten. Analog zur Darlegung der *Brüche pro Zelle*, weist die FA-Fibroblastenkultur P7-17F, verglichen mit der Fibroblastenkultur P8-59F, eine höhere Aberranz in der Mitose auf.

Insgesamt ist ersichtlich, dass je mehr aberrante Zellen vorhanden sind, desto höher die Bruchrate unter Calyculin A ausfällt. So weist die FA-Lymphozytenkultur P1-09 mit 0,76 die höchste Anzahl spontaner Brüche pro Zelle unter Calyculin A auf. Mit einem 46%igen Anteil aberranter Zellen ist diese Kultur darüber hinaus am stärksten betroffen.

4.3.3 Verteilung der Aberrationstypen

Durch die Analyse der einzelnen Aberrationsereignisse ist es möglich, einen genauen Vergleich zwischen Colcemid arretierten Zellen und Calyculin A behandelten Zellen bezüglich der Aberrationstypen durchzuführen (Abb.14). Die FA-Zellen weisen in der G₂-Phase des Zellzyklus etwa doppelt so viele Chromatidbrüche (ctb) und azentrische Fragmente (ace) auf, als in der Mitose durch Colcemid arretiert. Weiterhin bestehen dreimal mehr Chromosomenbrüche (csb) unter Calyculin A. Auffällig ist die in etwa gleiche Anzahl an Reunionsfiguren (rb). Sowohl inkomplette (rb ik) als auch komplette Reunionsfiguren (rb k) kommen in beiden Zellphasen ähnlich häufig vor. Allerdings stellen die Reunionsfiguren einen größeren Anteil an den Gesamtbrüchen unter Colcemid dar. Die Chromatidbrüche machen in der G₂-Phase 87% des Anteils an der Gesamtbruchzahl aus. Unter Colcemid sind es 85%. Mit 3% weisen die G₂-PCCs nur 1% mehr Chromosomenbrüche auf. Azentrische Fragmente kommen in beiden Phasen in etwa zu 5% vor.

Die zwei FA-Fibroblastenkulturen weisen mit 117 fünfmal mehr Chromatidbrüche auf, wenn diese sich in der G₂-Phase befinden. In der Mitose sind es nur 23. Allerdings machen die Chromatidbrüche 100% unter Colcemid und 96% unter Calyculin A aus. Auffällig ist, dass nur eine Reunionsfigur in der G₂-Phase und keine einzige in der Mitose gebildet wurde.

Bezüglich der Kontrollzellen lassen sich durch Calyculin A fünfmal mehr Chromatidbrüche feststellen als unter Colcemid. Die Kontrollzellen weisen in der Mitose keine Chromosomenbrüche auf und zeigten in der G₂-Phase einen 4%igen Anteil. Azentrische Fragment und Reunionsfiguren unterscheiden sich nicht wesentlich. Die G₂-PCC-Kontrollzellen A zeigen nur 6 Reunionsfiguren mehr. Ähnlich verhalten sich die Kontroll-Fibroblasten.

Um Differenzen zwischen FA-Zellen und Kontrollzellen festzustellen, kann man aufgrund der unterschiedlichen Probenzahl nicht die Summe der Aberrationsereignisse vergleichen, sondern muss die einzelne FA-Kultur mit dazugehöriger Kontroll-Kultur verwenden. Es fällt auf, dass die mit Colcemid behandelten FA-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine im Durchschnitt sechsfach erhöhte Chromatidbrüchigkeit (ctb) aufweisen. Dagegen zeigt der Unterschied zwischen FA-Zellen und Kontrollen bei Verwendung von Calyculin A eine nur 2,6 fach erhöhte Chromatidbrüchigkeit der FA-

Zellen. Unterschiede in der Chromosomenbrüchigkeit (csb) zwischen FA-Zellen und Kontrollen ähneln sich hinsichtlich beider Methoden. Reunionsfiguren werden vorwiegend von FA-Lymphozyten gebildet, wohingegen die Kontrollzellen nur wenige aufweisen (Abb. 14).

In der konventionellen Bruchanalyse konnten keine Deletionen, Duplikationen und Translokationen festgestellt werden. Für deren Detektion ist die Molekularzytogenetik mittels *whole chromosome painting* hilfreich.

Folgend (Abb. 14) sind die Aberrationsmuster der FA- und Kontroll-Lymphozytenkulturen in absoluten Zahlen dargestellt (ctb-Chromatidbruch, csb-Chromosomenbruch, ace-azentrisches Fragment, del-Deletion, dup-Duplikation, bt-balancierte Translokation, ut-unbalancierte Translokation, rb k-komplette Reunionsfigur, rb ik-inkomplette Reunionsfigur, dic-dizentrisches Chromosom).

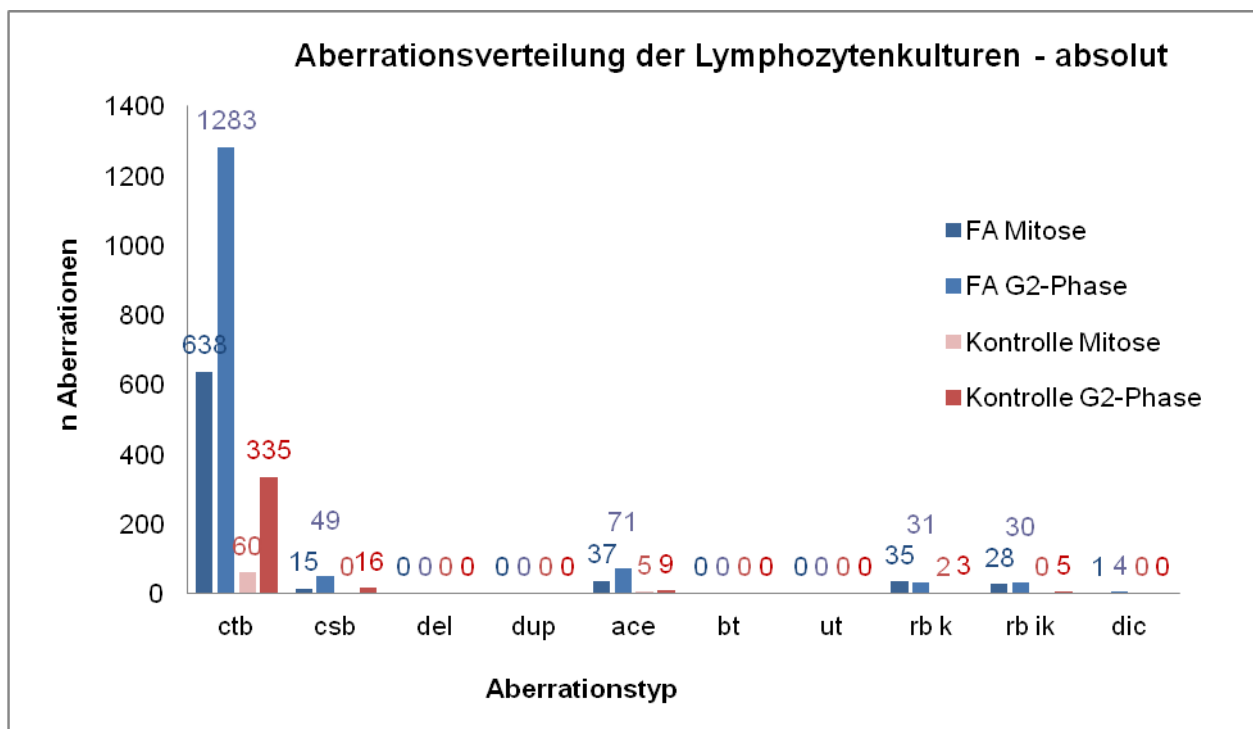


Abb. 14: Aberrationsverteilung der Lymphozytenkulturen in absoluten Zahlen

4.4 Molekularzytogenetik

4.4.1 Brüche pro Zelle

Ähnlich der konventionellen Zytogenetik fallen die Ergebnisse in der molekularzytogenetischen Analyse aus. Im Vordergrund steht wiederum der Vergleich der Chromosomenbruchraten in G₂-Phase und Mitose. Die Fanconi-Anämie-Zellen, welche mit Calyculin A behandelt wurden (G₂-PCCs), wiesen eine signifikant höhere Brüchigkeit auf als jene nach dem G₂/M Checkpoint. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnten hinsichtlich jeder Mitomycin C Konzentration Bedeutungswerte unter 0,05 ermittelt werden. Diese Beobachtung trifft nicht nur auf die FA-Lymphyten, sondern auch auf die FA-Fibroblasten zu. Ähnlich wie bei der konventionellen Bruchanalyse sind die Standardabweichungen bei den mit Calyculin A behandelten Zellen größer als bei den mit Colcemid behandelten. Die Standardabweichungen werden umso größer, je höher die Mitomycin C Konzentration ist.

Vergleicht man die Bruchraten der Kontrollzellen zwischen G₂-PCC und Mitose, zeigt sich, dass lediglich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bei Verwendung der Mitomycin C Konzentrationen von 10 ng/ml und 100 ng/ml bestehen. Hier ist die Chromosomenbruchrate in den mit Calyculin A behandelten Zellen höher.

Analog der konventionellen Bruchanalyse bestehen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) vergleicht man Fanconi-Anämie-Zellen und Kontrollzellen miteinander. Unabhängig von der Zellzyklusphase, G₂-Phase und Mitose, weisen die FA-Zellen eine deutlich höhere Chromosomenbrüchigkeit auf als die Kontrollzellen. Diese Unterschiede sind in der unten abgebildeten Abbildung 15 nochmals dargestellt. Eine positive Korrelation zwischen steigender MMC Konzentration und steigender Brüchigkeit konnte in allen Gruppen, den Kontrollen eingeschlossen, mit $r > 0,9$ bestätigt werden.

Analog der konventionellen Bruchanalyse werden zuerst die Ergebnisse in Tabellenform vorgestellt, wobei der Umrechnungsfaktor 4,94 verwendet wurde, um die konventionell ermittelten Ergebnisse mit den Werten der molekularzytogenetischen Untersuchung vergleichen zu können (MMC in ng/ml). Dieser Faktor ergibt sich aus den physikalischen Chromosomengrößen nach Matise et al. und dem Anteil der Chromosomen 1, 3 und 7 am Gesamtgenom.

Tab. 12: Brüche pro Zelle der Lymphozytenkulturen (WCP) (n.d. - nicht durchgeführt)

WCP			WCP		
0 MMC			0 MMC		
FA	Mitose	G2-Phase	Kontrolle	Mitose	G2-Phase
P1-09	0,40	0,79	K1-71	0,05	0,05
P2-65	0,15	0,35	K2-30	0,00	0,30
P3-66	0,30	0,84	K3-03	0,05	0,05
P4-17	0,25	0,84	K4-99	0,05	0,49
P5-64	0,35	0,54			
P6-98	0,44	0,49			
Median	0,33	0,67	Median	0,05	0,18
Mittel	0,32	0,64	Mittel	0,04	0,22
SD	0,11	0,21	SD	0,03	0,21
10 MMC			10 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	0,44	0,74	K1-71	0,00	0,10
P2-65	0,50	1,28	K2-30	0,10	0,15
P3-66	0,59	1,19	K3-03	0,05	0,15
P4-17	0,54	1,09	K4-99	0,10	0,40
P5-64	0,74	0,79			
P6-98	0,30	0,74			
Median	0,52	0,94	Median	0,08	0,15
Mittel	0,52	0,97	Mittel	0,06	0,20
SD	0,15	0,24	SD	0,05	0,14
50 MMC			50 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	0,69	1,04	K1-71	0,10	0,25
P2-65	1,33	1,73	K2-30	0,05	0,36
P3-66	1,19	2,42	K3-03	0,05	0,30
P4-17	0,74	2,17	K4-99	0,15	0,54
P5-64	0,99	1,14			
P6-98	0,44	1,58			
Median	0,87	1,66	Median	0,08	0,33
Mittel	0,90	1,68	Mittel	0,09	0,36
SD	0,33	0,55	SD	0,05	0,13
100 MMC			100 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	0,74	1,68	K1-71	0,05	n.d.
P2-65	1,43	2,82	K2-30	0,25	0,54
P3-66	2,12	3,60	K3-03	0,15	0,54
P4-17	0,74	3,31	K4-99	n.d.	0,94
P5-64	1,19	2,77			
P6-98	0,54	2,72			
Median	0,97	2,80	Median	0,15	0,54
Mittel	1,13	2,82	Mittel	0,15	0,67
SD	0,60	0,66	SD	0,10	0,23

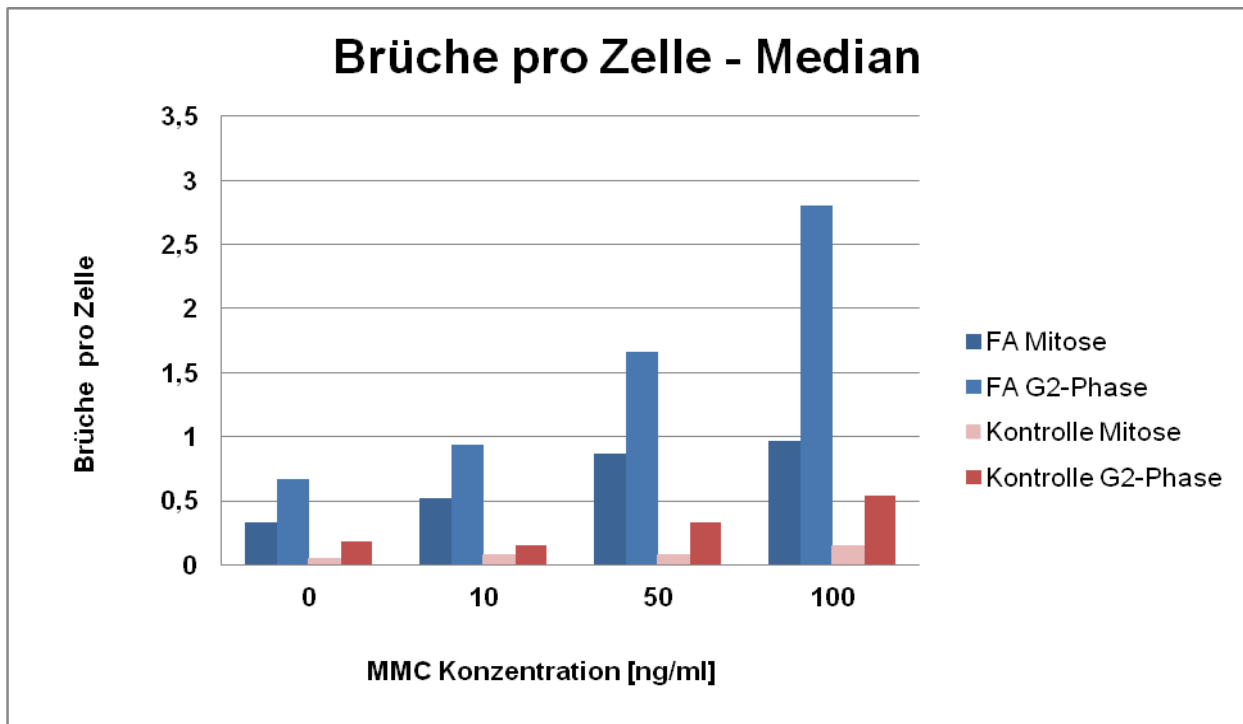


Abb. 15: Brüche pro Zelle der Lymphozytenkulturen - im Median (Molekularzytogenetik, mit Umrechnungsfaktor 4,94 zum Vergleich mit der konventionellen Bruchanalyse)

Des Weiteren wird im Vergleich der FA-Fibroblastenkulturen ersichtlich, dass die Kultur mit der Komplementationsgruppe D1/BRCA2, ähnlich der konventionellen Bruchanalyse, eine deutlich höhere Chromosomenbruchrate in Mitose und G₂-Phase aufweist (Tab. 13, Abb. 16).

Tab. 13: Brüche pro Zelle der Fibroblastenkulturen (Molekularzytogenetik)

WCP			
0 MMC			
FA	Colcemid	Cal A	KG
P7-17F	0,30	1,24	D1
P8-59F	0,10	0,94	D2
Kontrolle	Colcemid	Cal A	
K5-00F	0,03	0,03	
K6-09F	0,00	0,00	
K7-52F	0,00	0,05	
Median	0,00	0,03	

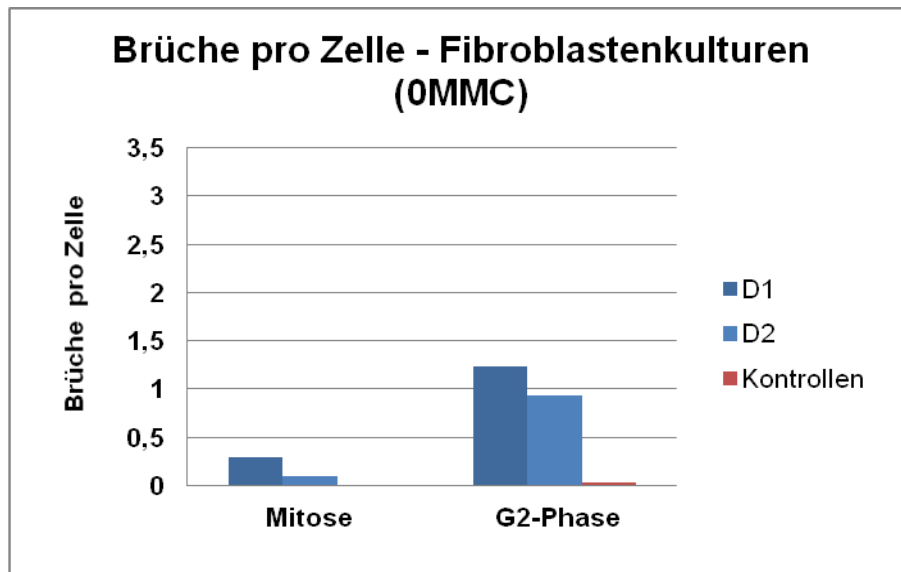


Abb. 16: Brüche pro Zelle der Fibroblastenkulturen (Molekularzytogenetik, Kontrollen im Median)

4.4.2 Aberrante Zellen in %

Die folgend dargestellten aberranten Zellen in Prozent betreffen lediglich die Chromosomen 1, 3 und 7, bezogen auf 150 im WCP- Assay analysierte Metaphasen bzw. G₂-PCC-Zellen (Tab. 14, MMC in ng/ml). Eine Zelle wurde als aberrant definiert, wenn eines dieser drei Chromosomen eine Aberration aufwies. Dadurch erklärt sich die deutlich erniedrigte Anzahl an aberranten Zellen verglichen mit der konventionell zytogenetischen Analyse.

Die FA-Zellen, welche sich in der G₂-Phase befinden sind signifikant häufiger aberrant ($p < 0,05$), als solche, die sich in der Mitose befinden. Dies trifft sowohl für die FA-Lymphozyten als auch für die FA-Fibroblasten zu. Anders verhalten sich die Kontrollzellen. Ein deutlicher Unterschied in der Aberrationsrate besteht lediglich unter 50 und 100 ng/ml Mitomycin C. Der Referenzwert für Kontrollzellen nach Wegner kann trotz der häufig aberranten Chromosomen 1, 3 und 7 hier nicht angewandt werden. Im Mann-Whitney-U-Test besteht allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen FA- und Kontrollzellen bezüglich der Anzahl aberranter Zellen ($p < 0,05$). Dieser Unterschied ist unabhängig von Calyculin A oder Colcemid Zugabe.

Eine Korrelation zwischen steigender Aberrationsrate und Mitomycin C Konzentration konnte in allen Gruppen mit $r > 0,9$ nachgewiesen werden.

Tab. 14: Aberrante Metaphasen in % - Lymphozytenkulturen (Molekularzytogenetik)

WCP			WCP		
0 MMC			0 MMC		
FA	Mitose	G2-Phase	Kontrolle	Mitose	G2-Phase
P1-09	6,67	16,00	K1-71	1,33	1,33
P2-65	3,33	8,67	K2-30	0	6,67
P3-66	4,67	17,33	K3-03	1,33	0,66
P4-17	4,67	14,67	K4-99	4	10
P5-64	5,33	10,67			
P6-98	8,00	10,67			
Median	5	13	Median	1	4
Mittel	5,45	13	Mittel	1,67	4,67
SD	1,66	3,47	SD	1,68	4,46
10 MMC			10 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	6	14,67	K1-71	2,67	2,00
P2-65	8	23,33	K2-30	1,33	3,33
P3-66	9,33	22,67	K3-03	2	2,67
P4-17	10	21,33	K4-99	2	9,33
P5-64	11,33	13,33			
P6-98	7,33	14,00			
Median	9	18	Median	1	3
Mittel	8,67	18,22	Mittel	2,00	5,33
SD	1,93	4,69	SD	0,55	3,38
50 MMC			50 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	11,33	15,33	K1-71	4,67	5,33
P2-65	16	24	K2-30	2	6,67
P3-66	18,67	34,67	K3-03	0,66	4,67
P4-17	11,33	28,00	K4-99	4,67	13,33
P5-64	17,33	16,67			
P6-98	8,67	30,67			
Median	14	26	Median	3	6
Mittel	13,89	24,89	Mittel	3,00	7,50
SD	3,99	7,24	SD	2,00	3,97
100 MMC			100 MMC		
	Mitose	G2-Phase		Mitose	G2-Phase
P1-09	10,67	24,67	K1-71	4,67	n.d.
P2-65	20,67	41,33	K2-30	4,67	12,00
P3-66	29,33	45,33	K3-03	2,67	6,67
P4-17	13,33	37,33	K4-99	n.d.	16,00
P5-64	18,00	32,00			
P6-98	12,00	35,33			
Median	16	36	Median	5	12
Mittel	17,33	36,00	Mittel	4,00	11,56
SD	6,99	7,24	SD	1,15	4,68

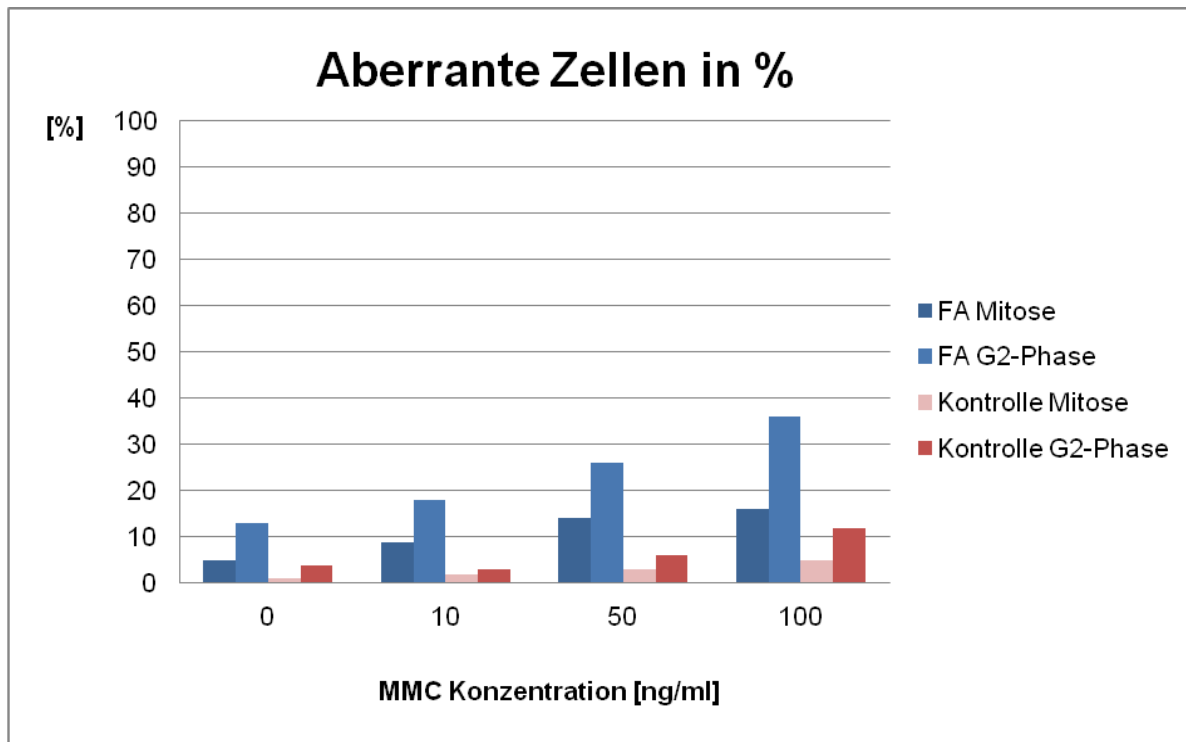


Abb. 17: Aberrante Zellen der Lymphozytenkulturen in % (Molekularzytogenetik)

Die FA-Fibroblasten weisen auch im WCP-Assay unter Calyculin A eine höhere Aberrationsrate als die FA-Lymphozyten auf. Diese zeigen einen im Median 13%igen Anteil aberranter Zellen (range 8,67 – 17,33), wogegen die FA-Fibroblasten unter Calyculin A mit 18 und 16,67% hohe Werte aufweisen (Tab. 15).

Tab. 15: Aberrante Metaphasen der Fibroblastenkulturen in % (Molekularzytogenetik)

WCP			
0 MMC			
Patient	Colcemid	Cal A	KG
P7-17F	4,00	18,00	D1
P8-59F	1,34	16,67	D2
Kontrolle	Colcemid	Cal A	
K5-00F	1,34	1,34	
K6-09F	0,00	0,00	
K7-52F	0,00	1,34	
Median	0,00	1,34	

4.4.3 Verteilung der Aberrationstypen

Die Fanconi-Anämie-Lymphozyten zeigen in der G₂-Phase des Zellzyklus mit 1045 Chromatidbrüchen (ctb) etwa dreimal soviel, wie in der Mitose. Das entspricht 83% der Gesamtbrüche. Die Colcemid arretierten FA-Zellen dagegen zeigen nur 75% Chromatidbrüche. Wie schon in der konventionellen Bruchanalyse sind ebenso mehr Chromosomenbrüche (csb) in der G₂-Phase vorhanden. Mit einem 12%igen Anteil liegt dieser Aberrationstyp 4% über dessen Anteil in der Mitose. Auffällig ist, dass schon in absoluten Zahlen betrachtet, die Reunionsfiguren (rb) viel häufiger in der Mitose vorkommen. Dort beträgt der Anteil 12%. Vor dem G₂/M Checkpoint weisen die FA-Zellen nur 2% Reunionsfiguren auf. Ähnlich sind die absoluten Zahlen hinsichtlich der Translokationen (bt und ut). Unter Colcemid kommen diese aber mit einem 5% Anteil häufiger vor, als unter Calyculin A mit 2%. Dabei bestehen keine Unterschiede zwischen unbalancierten (ut) und balancierten (bt) Translokationen.

Die zwei FA-Fibroblasten weisen in der G₂-Phase 54 Chromatidbrüche auf. Im Gegensatz dazu, konnten nur 8 in der Mitose detektiert werden. Sowohl konventionell, als auch im WCP-Assay fiel auf, dass Fibroblastenkulturen eine geringe Zahl an Reunionsfiguren aufweisen. So zeigten P7-17F und P8-59F in beiden Methoden jeweils nur eine Reunionsfigur in der G₂-Phase und keine in der Mitose. Allerdings wird hier nur die spontane Brüchigkeit betrachtet. So bestehen ohne Zusatz eines Quervernetzlers keine Unterschiede zwischen FA-Fibroblasten und FA-Lymphozyten hinsichtlich der Anzahl an Reunionsfiguren.

Vergleicht man FA-Zellen und Kontrollzellen miteinander, so besteht wie in der konventionellen Analyse ein größerer Unterschied der Chromatidbrüchigkeit in der Colcemid-Gruppe. So haben die FA-Zellen gegenüber den Kontrollzellen eine im Durchschnitt 8,7fach erhöhte Brüchigkeit bei Verwendung von Colcemid. Dagegen ist diese bei den G₂-PCC-Zellen im Durchschnitt nur 4,9 fach erhöht.

In verschiedenen Fanconi-Anämie-Lymphozytenkulturen konnten 3q Duplikationen (dup) detektiert werden. In der G₂-Phase sind diese ein wenig häufiger anzutreffen. Es handelt sich allerdings nicht um klonale Aberrationen, da unter Colcemid Arretierung der Zellen nur vereinzelt Duplikationen bei verschiedenen Patienten auftreten. Auffällig ist, dass P4-17, welcher eine MDS entwickelt hat, in der G₂-Phase neben einer 1q Duplikation, die auch in der Mitose vorkommt, zwei 3q Duplikationen aufweist.

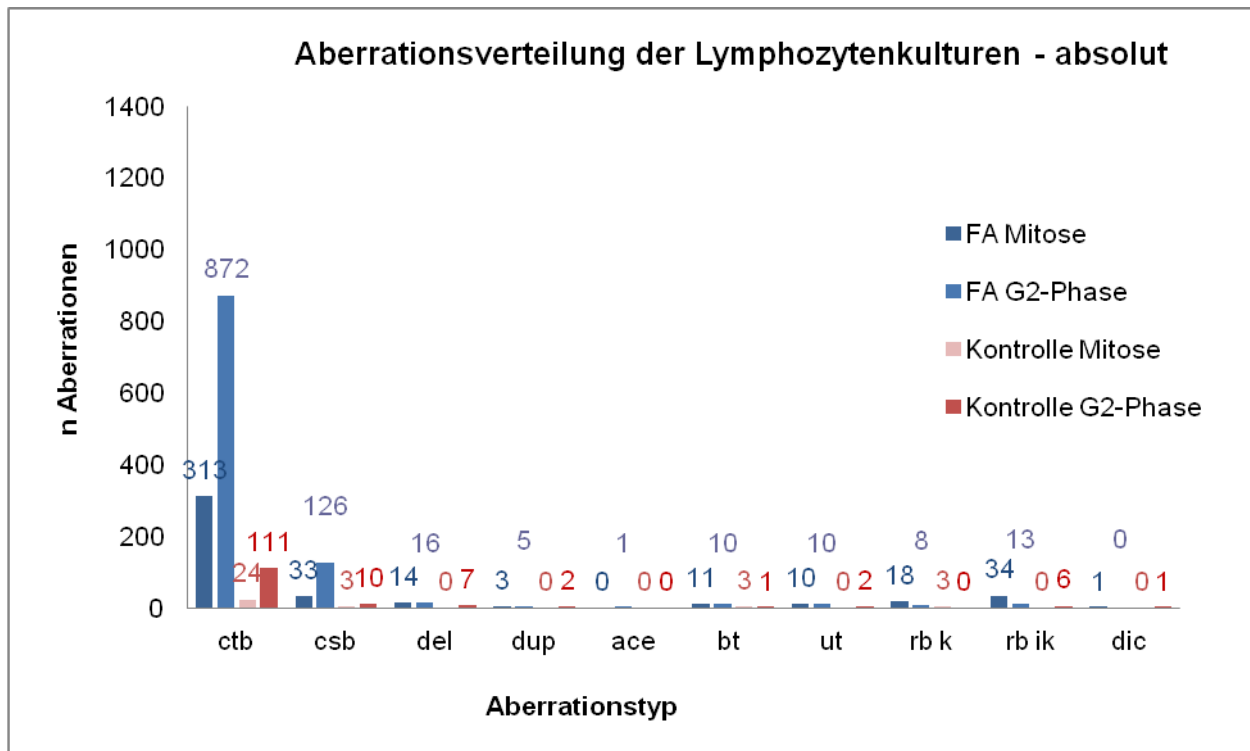


Abb. 18: Aberrationsverteilung der Lymphozytenkulturen (Molekularzytogenetik)

4.4.4 Relative Bruchhäufigkeiten

Durch Verwendung des WCP-Assays ist es möglich einzelne Chromosomen durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe darzustellen. Pro Patient und MMC Konzentration wird das Verhältnis der Chromosomenbrüchigkeit zueinander ermittelt. In diesem Versuch wurden die Chromosomen 1, 3 und 7 untersucht und je Chromosom ein Mittelwert der relativen Bruchhäufigkeit in Prozent ermittelt. Die Errechnung der relativen Bruchhäufigkeiten soll der Evaluierung der WCP-Methode dienen. So korreliert die physikalische Größe mit den Bruchhäufigkeiten. Je größer das Chromosom, desto häufiger bricht es. Chromosom 1 ist 245,3 Mb groß, was 8,4% des Genoms repräsentiert. Chromosom 3 ist dementsprechend 199,1 Mb groß und macht 6,8% des Genoms aus. Das hier kleinste verwendete ist Chromosom 7 mit 158,5 Mb mit einem Anteil von 5,4% am Gesamtgenom (Matise 2007).

Durch Ermittlung des Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizienten r wird ersichtlich, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen physikalischer Chromosomengröße und Bruchhäufigkeit gibt. Dieser Zusammenhang stellt sich unter Verwendung von Calyculin A als besonders deutlich dar. So weisen fast alle Kulturen einen Koeffizienten $r > 0,90$

auf. P7-17F zeigt mit $r = 0,85$ dennoch eine positive Korrelation. Bis auf P2-65 zeigen alle Kulturen, die mit Colcemid behandelt wurden einen Korrelationskoeffizienten $r > 0,80$. Mit 0,53 besteht bei P2-65 bezogen auf den Stichprobenumfang keine Korrelation.

In folgender Abbildung wird ersichtlich, wie deutlich die Chromosomen entsprechend ihrer physikalischen Größe brechen. So ist der Anteil der Brüche bezogen auf Chromosom 1 am größten.

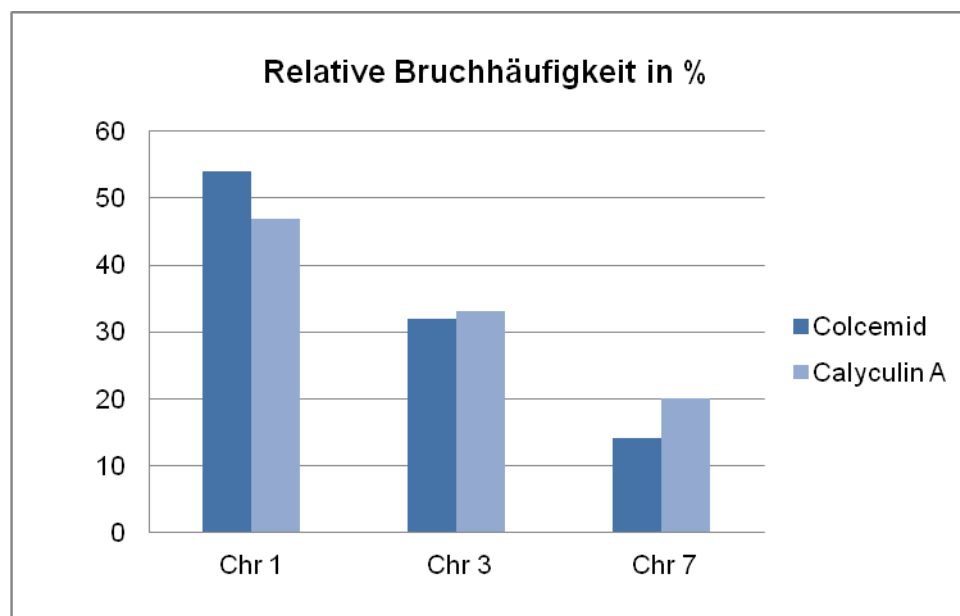


Abb. 19: Relative Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 in % ($n_{FA}=8$)

In Abbildung 19 sind die relativen Bruchraten für die einzelnen Chromosomen 1, 3 und 7 dargestellt. Im Mittel bricht Chromosom 1 zu 54% unter Colcemid und zu 47% unter Verwendung von Calyculin A. Mit 32% (Col) und 33% (Cal A) unterscheiden sich die relativen Bruchhäufigkeiten bezogen auf die verschiedenen Methoden kaum. Anders als Chromosom 1 bricht Chromosom 7 unter Calyculin mit 20% stärker als unter der Verwendung von Colcemid mit einem 16%igen Anteil an der Bruchhäufigkeit. Es zeigen sich keine Unterschiede der relativen Bruchhäufigkeiten vergleicht man Lymphozyten- mit Fibroblastenkulturen.

Aufgrund der geringen Chromosomenbrüchigkeit der Kontrollkulturen ist eine Korrelationsberechnung der relativen Bruchhäufigkeiten wenig aussagekräftig. Trotzdem zeigt sich hier, dass Chromosom 1 im Mittel häufiger bricht, als Chromosom 3 und 7. So bricht Chromosom 1 zu 68% unter Colcemid und zu 50% unter Verwendung von Calyculin A, wobei hier lediglich die Lymphozytenkulturen miteinbezogen wurden.

Chromosom 3 bricht zu 24% und Chromosom 7 zu 8% unter Colcemid. In der Calyculin A Gruppe bricht Chromosom 3 zu 38% und Chromosom 7 zu 12%. Die Kontroll-Fibroblastenkulturen weisen entweder keine Brüche auf oder eine 100%ige Brüchigkeit von Chromosom 1 oder 3, da nur die Spontanbrüchigkeit, das heißt ohne Zugabe von Mitomycin C, untersucht wurde. Demnach zeigt sich eine geringe Chromosomenbrüchigkeit der Kontroll-Fibroblastenkulturen.

4.5 Korrelation von konventioneller Zytogenetik und WCP-Assay

Um Aussagen darüber zu machen, wie valide die molekularzytogenetische Methode gegenüber der konventionellen Zytogenetik im Hinblick auf diesen Versuchsaufbau funktioniert, ist es nötig, diese miteinander zu korrelieren. Hierfür wird der Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizient r ermittelt. Korreliert werden die Anzahl der *Brüche pro Zelle*; konventionell pro 50 Metaphasen bzw. G₂-PCC-Zellen und molekularzytogenetisch pro 150 Metaphasen bzw. G₂-PCC-Zellen.

Tab. 16: Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizienten von Konventioneller Methode und WCP- Assay der Lymphozytenkulturen

FA	Colcemid	Calyculin A
P1 - 09	0,95	0,82
P2 - 65	0,96	0,97
P3 - 66	0,90	0,90
P4 - 17	0,58	0,95
P5 - 64	0,97	0,87
P6 - 98	0,64	0,98
Kontrolle	Colcemid	Calyculin A
K1 - 71	0,88	0,99
K2 - 30	0,35	0,82
K3 - 03	0,90	0,70
K4 - 99	0,80	0,07

Tab. 17: Beispiel P2-65 Colcemid - Brüche pro Zelle (KON - Konventionell zytogenetisch; WCP- molekularzytogenetisch; r - Korrelationskoeffizient)

MMC [ng/ml]	KON	WCP
0	0,38	0,03
10	0,64	0,10
50	1,74	0,27
100	1,42	0,29
	r =	0,96

Es zeigt sich deutlich, dass eine positive Korrelation zwischen den Methoden besteht: Je höher die Mitomycin C Konzentration, desto höher ist demnach die Brüchigkeit der Fanconi-Anämie-Zellen, sowohl konventionell, als auch molekularzytogenetisch. Überwiegend wird ein Korrelationskoeffizient $r > 0,9$ ermittelt. Betrachtet man die Kontrollzellen zeigt sich tendenziell ebenso eine positive Korrelation.

Korreliert man die FA-Fibroblastenkulturen ($n = 2$) hinsichtlich konventioneller Methode und WCP-Assay miteinander, so erhält man einen Korrelationskoeffizienten von $r = 1$, unabhängig der Zugabe von Colcemid oder Calyculin A. Dies ist hinsichtlich der kleinen Stichprobe nicht sehr aussagekräftig, kann aber die Korrelationsergebnisse der Lymphozytenkulturen bekräftigen.

Molekularzytogenetisch wurden lediglich die Chromosomen 1, 3 und 7 untersucht. Daraus ergeben sich geringere Werte hinsichtlich der Variable *Brüche pro Zelle*. Zur Veranschaulichung und Vergleichbarkeit gegenüber der konventionellen zytogenetischen Methode wurden die Werte mit dem Faktor 4,94 multipliziert. Folgende Abbildung stellt eine Zusammenfassung der Ergebnisse dar (Abb. 20). Aufgrund der kleinen Stichprobe von $n = 6$ FA-Lymphozytenkulturen wird die Mediandarstellung dem Mittelwert bevorzugt. Man erkennt deutlich, dass die Variable *Brüche pro Zelle* in jeder der vier Methoden in einem linearen Zusammenhang zur ansteigenden Mitomycin C Konzentration steht. Vergleicht man die konventionelle und molekularzytogenetische Methode miteinander, so wird ersichtlich, dass die Bruchzahl in der konventionellen Analyse, besonders unter Verwendung von Calyculin A höher ist. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test lässt sich lediglich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der

konventionellen und molekularzytogenetischen Calyculin A Gruppe bei 10 ng/ml Mitomycin C feststellen.

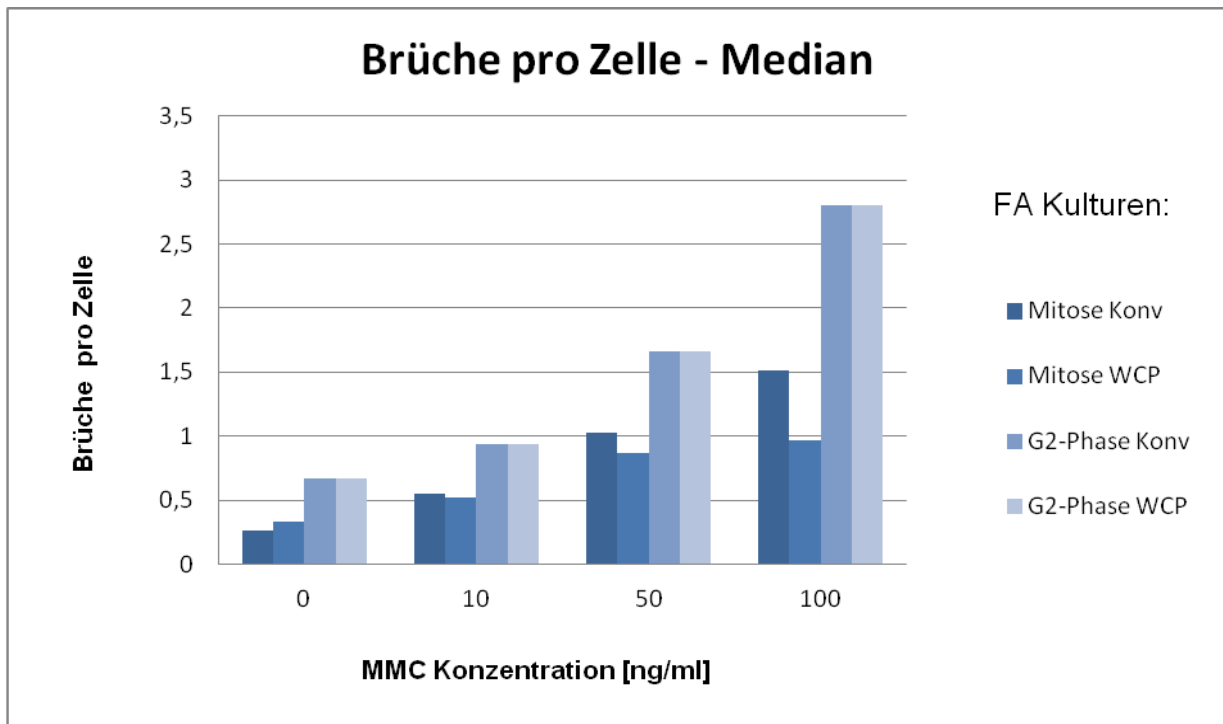


Abb. 20: FA-Lymphozytenkulturen im Vergleich (Konv - Konventionell; WCP- whole chromosome painting 1, 3 und 7)

5 Diskussion

5.1 Evaluierung des Calyculin A induzierten PCC in Fanconi-Anämie-Zellen

Um eine vergleichende Bruchanalyse von G₂-PCCs und Metaphasen durchzuführen, sollte diese hinsichtlich der Chromosomenqualität ähnliche Bedingungen aufweisen. Die Struktur der vorzeitig kondensierten Chromosomen ist dabei abhängig von der Zellzyklusphase. So kann *premature chromosome condensation* (PCC) nicht in der S-Phase angewandt werden, da hier die Chromosomen stark fragmentiert sind und nicht zusammenhängend dargestellt werden können (Rao 1977, Bezrookove 2003, Kramer 2008). Zur zytogenetischen Analyse eignen sich allerdings die Chromosomen in G₁- und G₂-Phase des Zellzyklus. Vorwiegend werden diese in der G₂-Phase, das heißt vor Passieren des G₂/M Checkpoints untersucht. Dadurch dass der PCC-Index der analysierbaren Zellen im Vergleich zur Colcemid-Arretierung deutlich höher ist, können die Chromosomen effizienter und schneller untersucht werden (Kramer 2008). Ein Vorteil ist, dass auch diejenigen Chromosomen erfasst werden können, welche sonst durch den G₂/M Checkpoint aufgehalten werden, in die Mitose einzutreten (Bezrookove 2003). Srebniak et al. zeigten, dass Calyculin A in der Pränataldiagnostik von Nutzen sein kann, weil so die Zahl der analysierbaren Zellen erhöht werden kann. Unter Verwendung der GTG-Bänderungstechnik zeigten die Chromosomen allerdings keine hohe Auflösung. Auch ein Auseinanderweichen der Zentromere konnte vermehrt beobachtet werden (Srebniak 2005). Dieses oft beschriebene Problem (Durante 1999, Terzoudi 2005) konnte mit Hilfe eines kombinierten Colcemid und Calyculin A Assays reduziert werden (Shovman 2008).

In der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Fanconi-Anämie-Zellen sollte allerdings deutlich zwischen G₂-Phase und Mitose unterschieden werden und trotzdem eine effiziente Bruchanalyse stattfinden. Vergleicht man die Publikationen zum Einsatz von Calyculin A, stellt sich heraus, dass beispielsweise Srebniak et al. mit 100 nM eine 10-fach höhere Konzentration des Agens verwendet hatten und dieses darüber hinaus um 15-30 Minuten länger auf die Zellen wirkte, als in der vorliegenden Arbeit (Srebniak 2005). So konnte hier, aufgrund des geringen Anteils an Chromosomen, die noch kein Auseinanderweichen der Zentromere zeigten, die Bruchanalyse problemlos durchgeführt werden. In vielen Arbeiten beeinflusste die Wirkdauer und Konzentration des Calyculin A die Qualität der Chromosomen. So zeigten Kramer et al., je länger

Calyculin A einwirkte, desto schwieriger gestaltete sich die Bruchanalyse. Bei einer Wirkdauer von über 2 Stunden konnte die Bruchanalyse nicht mehr durchgeführt werden. In dieser Arbeit stellte sich heraus, dass das Splitting häufiger auftrat, je stärker die Chromosomen kondensierten. Darüber hinaus berichteten Kramer et al. von Negativeffekten, wenn eine Calyculin A Konzentration von 100 nM überschritten wurde und ein sogenanntes Über-Kondensieren verursachte (Kramer 2008). Bei einer Konzentration von 10 nM Calyculin A, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, wird eine hohe Zahl an G₂-PCCs induziert und es bestehen weniger zytotoxische Effekte als bei 100 nM (Gotoh 1995).

Aufgrund der hohen PCC-Indices konnten genügend auswertbare Zellen untersucht werden, bei denen kein Centromer-Splitting vorlag. In der vorliegenden Arbeit wurden bis zu 5fach erhöhte G₂-PCC-Indices gegenüber den Mitose-Indices beobachtet. In der Arbeit von Bezrookove et al. waren diese im Vergleich zu der konventionellen Colcemid-Arretierung sogar bis zu 10fach erhöht und erleichterten die Bruchanalyse ebenso (Bezrookove 2003). Auch zeigt die Abbildung 8 der Chromosomen, dass obwohl die Calyculin A behandelten Zellen länger erscheinen, Brüche gut erkennbar waren. Ähnlich charakterisiert wurden die Chromosomen der Ataxia Telangiektasia-Zellen, welche Terzoudi et al. durch PCC in der G₂-Phase des Zellzyklus untersuchten. Anstelle eines Quervernetzlers wie Mitomycin C wurde in dieser Arbeit ionisierende Strahlung eingesetzt, um Brüche zu induzieren, da die Ataxia Telangiektasia-Zellen eine hohe Radiosensitivität besitzen (Terzoudi 2005).

Verglichen mit der konventionellen Colcemid-Arretierung der Zellen in der Mitose benötigte die Bruchanalyse der G₂-Zellen einen höheren Zeitaufwand. Dies erklärt sich durch die signifikant höhere Brüchigkeit der FA-Zellen in der G₂-Phase.

Zusammenfassend konnte bei einer Calyculin A Konzentration von 10 nM und einer Wirkdauer von 30 Minuten eine effektive Bruchanalyse der Fanconi-Anämie-Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus konventionell zytogenetisch als auch molekularzytogenetisch erfolgen. Auswertbare Zellen, mit geringem oder keinem Centromer-splitting der Chromosomen waren aufgrund der hohen PCC-Indices bei allen MMC-Konzentrationen in ausreichendem Maße vorhanden.

5.2 Der G₂/M Checkpoint in Fanconi-Anämie-Zellen

5.2.1 Die Mitose- und G₂-PCC-Indices der Lymphozytenkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurde der G₂/M Checkpoint vorwiegend durch Ermittlung der Variablen *Chromosomenbrüchigkeit* und *Mitose- bzw. G₂-PCC-Indices* untersucht. Zu Beginn jeder konventionell zytogenetischen Bruchanalyse wurden die Mitose- bzw. G₂-PCC-Indices der Chromosomenpräparate bestimmt. Aufgrund der Hypersensitivität der Fanconi-Anämie-Zellen gegenüber strangvernetzenden Substanzen wie Mitomycin C (German 1987, Auerbach 1993, Garcia-Higuera 2001) sind die Indices nach MMC-Behandlung in der Mitose des Zellzyklus gering. So verhalten sich die steigende Mitomycin C (MMC) Konzentration und der Mitose-Index umgekehrt proportional zueinander. Je höher die MMC-Konzentration ist, desto geringer ist der Mitose-Index. Dieses Phänomen beruht darauf, dass die Zellen, die einen hohen Schädigungsgrad aufweisen, den G₂/M-Checkpoint nicht mehr passieren können und in der G₂-Phase des Zellzyklus arretiert werden. Diese charakteristische Zellkinetik ist schon seit Jahren bekannt und wird zur Diagnostik der Fanconi-Anämie mithilfe der Durchflusszytometrie angewandt (Seyschab 1994, Seyschab 1995). Dabei wird der DNA-Gehalt der Zellpopulation nach Behandlung der Zellen mit DNA-Crosslinkern gemessen. Sind die Zellen in der G₂-Phase blockiert, so ist der Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2n, 4c relativ zu denen in anderen Zellzyklusphasen erhöht.

Durch Calyculin A kann nun auch die G₂-Phase des Zellzyklus hinsichtlich der PCC-Indices untersucht werden. Hier wird deutlich, dass die G₂-PCC-Indices mit steigender MMC Konzentration positiv korrelieren. Da Fanconi-Anämie-Zellen eine herabgesetzte Fähigkeit haben, *interstrand crosslinks* (ICLs) zu reparieren und da die durch Mitomycin C induzierten ICLs wahrscheinlich zu Doppelstrangbrüchen, als Versuch einer Reparatur, überführt werden (De Silva 2000, Rothfuss 2004), arretieren die Zellen in der G₂-Phase (Tischkowitz 2004). Das heißt, dass weniger Zellen den G₂/M Checkpoint passieren können, da die Schäden nicht oder nur verzögert repariert werden. Calyculin A induziert PCC primär in der G₂-Phase des Zellzyklus. Dies erklärt, warum der PCC-Index in der G₂-Phase steigt, je höher die Konzentration der quervernetzenden Substanz ist: Je mehr ICLs beziehungsweise Doppelstrangbrüche induziert werden, desto mehr Zellen bleiben in der G₂-Phase arretiert und können durch Behandlung mit Calyculin A vorzeitig kondensieren. Wie oben erwähnt, nutzt die Durchflusszytometrie

nach Schindler et al. diese prologierte G₂-Phase der FA-Zellen zur Differenzierung zwischen FA- und Nicht-FA-Patienten (Schindler 1985).

Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse an Kontrollzellen, dass keine Abhängigkeit der Mitose- und PCC-Indices von der MMC Konzentration besteht. Darüber hinaus gibt es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Indices der Kontrollzellen in Bezug auf die untersuchten Zellzyklusphasen ($p > 0,05$). Das bedeutet, dass die Kontrollzellen nicht sensitiv auf Mitomycin C reagieren und demnach den G₂/M Checkpoint problemlos passieren können. Da man davon ausgehen muss, dass in FA- und Kontrollzellen dieselbe Zahl von ILCs durch die MMC-Behandlung entstehen, ist anzunehmen, dass die normalen Kontrollzellen, diese Läsionen schnell und effizient reparieren und danach den Zellzyklus fortsetzen.

Auffällig verhielt sich die FA-Lymphozytenkultur P1-09. Unabhängig davon, welche Mitomycin C Konzentration auf die Zellen einwirkte, waren die PCC-Indices in der G₂-Phase deutlich niedriger als die Mitose-Indices nach Passieren des Checkpoints. Wie der Großteil der verwendeten Lymphozytenkulturen gehörte P1-09 der Komplementationsgruppe FANCA an. Eventuell ist aber das bereits schwere klinische Bild einer Aplastischen Anämie mit dem Ergebnis in Zusammenhang zu bringen. Es kann demnach darüber spekuliert werden, ob eine relative Vermehrung von Lymphozyten, welche bei der AA auftritt (Niemeyer 2006), dazu führt, dass die erhöhte Proliferationsrate keine G₂-Verlängerung mehr nach sich zieht. Ähnlich verhalten sich die Zellen von präleukämischen und leukämischen Patienten (Wuttke 2004).

Des Weiteren soll das von FANCC kodierte Protein an der korrekten Funktion des G₂/M Checkpoints beteiligt sein. So weisen FANCC defiziente Fibroblasten in der Durchflusszytometrie nach Bestrahlung einen defekten Checkpoint auf (Freie 2004). In der vorliegenden Arbeit weist P4-17, welcher der Komplementationsgruppe C angehört, ein ähnliches Ergebnis ohne Verwendung von Mitomycin C auf. Der Mitoseindex steigt deutlich im Vergleich zum G₂-PCC-Index, was auf einen Defekt des Checkpoints deuten würde. Nach Induktion von ICLs durch MMC zeigt sich wiederum, dass die Mitoseindices verringert werden, das heißt es kommt zu einer Arretierung in der G₂-Phase, wenn vermehrt Schäden gesetzt werden.

Im Mann-Whitney-U-Test zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) der FA-Indices zwischen G₂-Phase und Mitose. Dieses Ergebnis kann durch den statistischen

Bereich (range) der Indices erklärt werden. Wie auch bei Gotoh et al. war dieser weitaus größer unter Verwendung von Calyculin A (Gotoh 1995) im Vergleich zur Colcemid-Arretierung der Zellen in der Mitose. Auch Bezrookove et al. ermittelten PCC Frequenzen von 10-60%. Die Standardabweichung zeigt außerdem, dass je höher die eingesetzte MMC Konzentration war, desto deutlicher unterscheiden sich die Indices interindividuell. Wie obig beschrieben können die Indices darüber hinaus von klinischem Bild und Komplementationsgruppe abhängen. In der Abbildung 10 lässt das gewichtete Mittel jedoch erkennen, dass insgesamt deutliche Unterschiede zwischen G₂-Phase und Mitose existieren.

5.2.2 Die Chromosomenbrüchigkeit der Lymphozytenkulturen

Die Analyse der Brüchigkeit pro Zelle erfolgte nicht nur konventionell zytogenetisch, sondern auch molekularzytogenetisch durch ein *whole chromosome painting* der Chromosomen 1, 3 und 7, sowie einer BAC-Sonde auf Chromosom 3q. Dadurch, dass beide Methoden positiv miteinander korrelieren, kann man hinsichtlich der Variable *Brüche pro Zelle* valide Aussagen treffen. Die Untersuchung zu den relativen Bruchhäufigkeiten ergab weiterhin, dass die Chromosomenlänge mit der Chromosomenbrüchigkeit positiv korreliert ist.

Es konnte festgestellt werden, dass die Brüchigkeit der Fanconi-Anämie-Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus signifikant höher ist ($p < 0,05$) als in der Mitose nach Passieren des G₂/M Checkpoints. Bei Betrachtung der Kontrollzellen hingegen fällt auf, dass es überwiegend keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zellzyklusphasen gibt ($p > 0,05$). Vor allem ohne Verwendung von Mitomycin C zeigen sich keine Differenzen in der Brüchigkeit der Kontrollzellen vergleicht man G₂-Phase und Mitose miteinander. Darüber hinaus ist es wichtig zu beurteilen, inwiefern sich jeweils FA-Zellen und Kontrollzellen hinsichtlich der Chromosomenbrüchigkeit unterscheiden. Sowohl in der G₂-Phase, als auch in der Mitose weisen die FA-Zellen eine signifikant höhere Brüchigkeit auf ($p > 0,05$). Dies deutet darauf hin, dass der Checkpoint, trotz einer in der Mitose erhöhten Brüchigkeit der Zellen gegenüber Kontrollen, zumindest partiell funktionieren muss. Des Weiteren fällt in der zytogenetischen Bruchanalyse der FA-Zellen auf, dass fast 5x mehr multiaberrante Zellen in der G₂-Phase zu finden waren. Als multiaberrant wurden alle Zellen gewertet,

die 8 oder mehr Brüche pro Zelle aufwiesen. Demnach ist die Gesamtbrüchigkeit in dieser Phase also deutlich höher, als in der Mitose und unterstreicht so das signifikante Ergebnis.

Diagnostisch wird die erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit der Fanconi-Anämie-Zellen schon seit 1964 verwendet (Schröder 1964). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich diese im Mittel 4,5fach, beziehungsweise molekularzytogenetisch über 6fach erhöht gegenüber den Kontrollzellen. Ähnliche Ergebnisse erhielt Callén et al. Die FA-Zellen zeigten konventionell zytogenetisch eine Brüchigkeit von im Mittel 0,163 gegenüber den Kontrollen mit 0,013 (Callén 2002).

Sasaki et al. zeigten 1973 erstmals, dass die Chromosomen der Fanconi-Anämie-Patienten empfindlich auf Mitomycin C (MMC), das heißt mit einer Erhöhung der Chromosomenbruchrate reagieren (Sasaki 1973). In der vorliegenden Arbeit korrelieren die zunehmende MMC Konzentration und die Chromosomenbruchrate positiv miteinander. Nicht nur in der Mitose steigt die Brüchigkeit, sondern auch in der G₂-Phase. Neben den FA-Zellen reagieren auch die Kontrollzellen auf eine zunehmende MMC Konzentration. Allerdings ist die Chromosomenbruchrate insgesamt deutlich geringer, als die der FA-Zellen. Darüber hinaus weisen die Kontrollzellen keine positive Korrelation zwischen MMC Konzentration und Mitoseindices auf. Das Passieren des G₂/M Checkpoint äußert sich demnach auch nicht mit einer Reduktion der Mitose-Indices, wie bereits in Punkt 5.2.1 dargestellt wurde. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass unabhängig, wie hoch die Konzentration des Quervernetzers Mitomycin C angesetzt wurde, eine deutliche Reduktion der Chromosomenbrüchigkeit der FA-Zellen in der Mitose im Vergleich zur G₂-Phase auftritt. Dies spricht für einen zumindest partiell funktionierenden G₂/M-Checkpoint in FA-Zellen.

Betrachtet man wiederum die FA-Kultur P4-17, welche der Komplementationsgruppe C zugehörig ist, so zeigt sich ohne Verwendung des Quervernetzers in der konventionell zytogenetischen Analyse nur eine geringe Reduktion der Bruchrate in der Mitose. Analog zu den obig beschriebenen Mitoseindices dieser Kultur, scheint der Checkpoint nach Zugabe von Mitomycin C doch zu funktionieren, da die Brüchigkeit in der G₂-Phase durch MMC deutlich höher ist als nach Passieren des Checkpoints. Auch zeigt die molekularzytogenetische Untersuchung, dass sich die Komplementationsgruppen A und C hinsichtlich der Chromosomenbruchrate nicht unterscheiden lassen. Demnach ist die Auffälligkeit der spontanen Brüchigkeit von P4-17 in G₂-Phase und Mitose schwer

zu deuten. Möglicherweise ist der Einfluss von Strahlung auf Fanconi-Anämie-Zellen, wie Freie sie verwendet hat (Freie 2004) mit anderen Folgen auf die Zellzyklusprogression verbunden, vergleicht man diese mit der Wirkung von Mitomycin C. So zeigte die Arbeit von Heinrich et al., dass FANCC defiziente Zellen, nach Behandlung mit MMC einen normal funktionierenden G₂/M Checkpoint aufweisen und die Arretierung der Zellen vor dem Checkpoint die Folge von DNA-Schäden ist (Heinrich 1998).

Neben der Anzahl der *Brüche pro Zelle* kann die Chromosomenbrüchigkeit weiterhin mit Hilfe der Anzahl der *aberranten Zellen in %* dargestellt werden. Analog zur Zählung der Brüche fällt auf, dass es signifikant mehr aberrante PCC in der G₂-Phase, verglichen mit den aberranten Metaphasen in der Mitose des Zellzyklus gibt. Nicht nur die FA-Zellen, sondern auch die Kontrollzellen weisen mehr aberrante G₂-PCCs auf. Es besteht wiederum ein signifikanter Unterschied zwischen FA- und Kontrollzellen unabhängig von der Zellzyklusphase ($p < 0,05$). Bei den konventionell zytogenetischen Ergebnissen zeigt sich, dass die Anzahl an aberranten Metaphasen bzw. G₂-PCCs, vor allem in der G₂-Phase enorm steigt, sobald der Quervernetzer Mitomycin C hinzugegeben wurde. Dies unterstreicht nochmals die Hypersensitivität der FA-Zellen gegenüber quervernetzenden Substanzen. Die Reduktion der Anzahl aberranter Metaphasen nach Passieren des G₂/M Checkpoints fällt nicht so stark aus, wie die Reduktion der Brüche pro Zelle. Das heißt, dass die FA-Zellen in der Mitose zwar deutlich weniger Brüche aufweisen, aber dennoch als aberrant detektiert werden. Betrachtet man wiederum die Anzahl aberranter Metaphasen der FA-Kultur P4-17, so fällt auf, dass diese sich nicht wesentlich unterscheiden, wenn konventionell zytogenetisch keine Mitomycin C Behandlung erfolgte. Sobald MMC dazugegeben wurde, steigen die aberranten PCC enorm an und erniedrigen sich nach Passieren des G₂/M Checkpoints.

5.2.3 Der G₂/M Checkpoint in Ataxia-Telangiektasia-Zellen (AT)

Nicht nur Fanconi-Anämie-Zellen reagieren durch Einwirken des G₂/M Checkpoints mit einer deutlichen Reduktion der Metaphasen-Indices, sondern auch Tumorzellen, wie zum Beispiel jene von FAP Gewebe (Bezrookove 2003). Dagegen zeigt sich nach Bestrahlung von Ataxia-Telangiektasia-Zellen keine Reduktion der Metaphase-Indices in der Mitose. Verantwortlich dafür ist ein defekter G₂/M Checkpoint in diesen Zellen

(Terzoudi 2005). Wie die Fanconi-Anämie gehört auch Ataxia Telangiektasia zu den Chromosomeninstabilitätssyndromen mit erhöhter Prädisposition für hämatologische und solide Tumoren (Garcia-Higuera 2001, Niemeyer 2006). Die beteiligten Gene, die bei den betreffenden Chromosomeninstabilitätssyndromen defekt sind, sind sogenannte *Care-Taker-Gene*, die für die Aufrechterhaltung der Checkpoint-Kontrolle verantwortlich sind sowie für einen gemeinsamen Signalweg zur Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Wang, D'Andrea 2004, Kennedy 2007). Bestrahlte ATM defiziente Zellen weisen vor sowie nach Passieren des G₂/M Checkpoints gleiche Level an Chromosomenbrüchen auf. Mit Hilfe von Calyculin A konnte die G₂-Phase der AT-Zellen hinsichtlich der Chromosomenbrüchigkeit, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, untersucht werden (Terzoudi 2005). Ataxia-Telangiektasia-Zellen besitzen ebenso wie Fanconi-Anämie-Zellen eine herabgesetzte Fähigkeit Doppelstrangbrüche zu reparieren. Das Genprodukt ATM, welches bei der Ataxia Telangiektasia defekt ist, spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur Antwort und phosphoryliert beispielsweise p53 und die Checkpoint Kinase Chk2, welche wichtige Mediatoren des G₂/M Checkpoints darstellen (Lavin 2006). So fanden Yamamoto et al. heraus, dass die ATM Expression in Fanconi-Anämie-Zellen (FANCA) bei Induktion von Crosslinks sogar gesteigert wird und demnach den G₂/M Block stärkt (Yamamoto 2008). Fünf der in der vorliegenden Arbeit verwendeten FA-Lymphozytenkulturen sind der Komplementationsgruppe A zuzuordnen. Es zeigte sich, dass die Brüchigkeit durch den G₂/M Checkpoint im Durchschnitt um 2-3fach, unabhängig davon, wie hoch die Mitomycin C Konzentration angesetzt wurde, gesenkt werden konnte. So könnte die gesteigerte Expression von ATM in den FANCA defizienten Zellen durchaus dafür verantwortlich sein. Darüber hinaus reagieren FA-Zellen bei Hemmung von ATM sogar hypersensitiv (Kennedy 2007). Demnach ist vorstellbar, dass ATM und FA-Gene parallel und kompensatorisch funktionieren.

5.2.4 Der G₂/M Checkpoint der Fibroblastenkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei FA-Fibroblastenkulturen untersucht, die den Komplementationsgruppen (KG) FANCD1/BRCA2 und FANCD2 angehören. Auffällig sind die besonders niedrigen Mitose-Indices der Fibroblastenkulturen. Mit einem Index von 0,89 und 0,37 liegen die Fibroblasten weit unter den Mitose-Indices der Lymphozyten. Eine Reduktion der Indices von G₂-Phase zu Mitose ist allerdings

deutlich ersichtlich. Die Zellen beider Kulturen werden demnach durch den G₂/M Checkpoint zumindest partiell aufgehalten, in die Mitose einzutreten. Bezieht man die Komplementationsgruppen der verwendeten Fibroblastenkulturen in die Analyse mit ein, so fällt auf, dass der Mitose-Index der Kultur P7-17F mit der Komplementationsgruppe FANCD1/BRCA2 deutlich höher ist, als der Mitose-Index der Kultur P8-59F, welche der Komplementationsgruppe FANCD2 angehört. Des Weiteren zeigte die Kultur P7-17F, im Vergleich zur anderen FA-Fibroblastenkultur, eine deutlich höhere Chromosomenbrüchigkeit in der Mitose des Zellzyklus. Im Fanconi-Anämie-Pathway ist das Protein BRCA2 dem Downstream zuzuordnen. So können Mutationen in den FA-Genen, die unmittelbar an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, wie BRCA2 und FANCN/PALB2, zu ausgeprägter Chromosomenbrüchigkeit führen (Reid 2007). Bei Betrachtung der Fibroblastenkulturen fällt auf, dass die spontane Brüchigkeit vor allem in der G₂-Phase sehr hoch ist. Die konventionell zytogenetische Analyse zeigte, dass die Chromosomenbrüchigkeit der Fibroblasten bis zu doppelt so hoch ist, wie die der FA-Lymphozyten. Grundsätzlich könnte dieser Befund auf Zelltyp-abhängige Unterschiede in der Brüchigkeit zurückgehen. Das heißt, dass bei allen Komplementationsgruppen die Fibroblasten eine erhöhte Brüchigkeit aufweisen oder aber die Brüchigkeit bei diesen beiden untersuchten Komplementationsgruppen besonders hoch ist. In anderen Arbeiten wurde eine hohe Empfindlichkeit der FA-Fibroblasten gegenüber Alkylantien erwähnt (Endres 2003, Müller 2006). Da in der vorliegenden Arbeit nur die spontane Brüchigkeit, das heißt ohne Verwendung von Mitomycin C untersucht wurde, kann angenommen werden, dass diese umso höher ist, je mehr Quervernetzer Substanz auf die Zellen wirkt.

Insgesamt zeigt die deutliche Reduktion der Chromosomenbrüchigkeit der FA-Fibroblasten in der Mitose, verglichen mit der G₂-Phase, dass auch bei diesem Zelltyp der G₂/M Checkpoint partiell funktioniert.

5.3 Reparaturvorgänge in der G₂-Phase des Zellzyklus

Die Fanconi-Anämie repräsentiert ein wichtiges Modell zum Verständnis von DNA-Reparaturmechanismen im Zellzyklus. Vor allem steht die Beseitigung von kovalenten Interstrangverbindungen, sogenannten *interstrand crosslinks (ICL)* im Vordergrund der Aufgaben des FA-Pathways. Wie bereits erwähnt resultieren die beispielsweise durch

Mitomycin C induzierten Crosslinks in Doppelstrangbrüche (DSB) (Rothfuss 2004). Die endogenen Quellen der Crosslinks induzierenden Metaboliten oder anderen Substanzen bleibt dabei ungeklärt (Moldovan und D'Andrea 2009). In der durch ICLs aufgehaltenen Replikation werden die Doppelstrangbrüche durch Endonukleasen gebildet (De Silva 2000). Nach der Chromosomenkondensation werden diese Doppelstrangbrüche letztendlich als Chromatidbrüche in der zytogenetischen Analyse sichtbar (Terzoudi 2005).

Ein Hinweis auf die spezifischen Reparaturvorgänge in der G₂-Phase des Zellzyklus liefert die Analyse der Aberrationstypen. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die FA-Zellen vor allem Chromatidbrüche aufweisen. In der konventionell zytogenetischen Analyse wurden in etwa doppelt so viele und in der molekularzytogenetischen sogar 3mal mehr Chromatidbrüche in der G₂-Phase nachgewiesen, vergleicht man diese mit der Mitose. Auch der Gesamtanteil der Chromatidbrüche an den Bruchtypen ist vor Passieren des Checkpoints größer. Das kann bedeuten, dass die geschädigten Zellen entweder durch den G₂/M Checkpoint aufgehalten und in die Apoptose geschickt werden, was mit dem reduzierten Mitoseindices konform läuft, oder dass ein Teil der Chromatidbrüche in der G₂-Phase repariert werden. Dafür spricht der höhere Anteil an Reunionsfiguren in der Mitose. Betrachtet man die absoluten Zahlen, so zeigt zumindest die molekularzytogenetische Analyse, dass deutlich mehr Reunionsfiguren in der Mitose vorkommen. Interpretierend müssten die Chromatidbrüche als Versuch einer Reparatur eventuell über nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (*non-homologous end-joining* NHEJ) in Reunionsfiguren überführt werden. Das NHEJ stellt einen Alternativweg zur Beseitigung von Doppelstrangbrüchen dar. Anders als die homologe Rekombination neigt dieser Reparaturmechanismus zu Fehlern (Moldovan 2009).

Die Analyse der Aberrationstypen hinsichtlich der verschiedenen Komplementationsgruppen ergab, dass die FANCD1 und FANCD2 defizienten Fibroblastenkulturen P7-17 und P8-59 scheinbar eine geringe Anzahl an Reunionsfiguren aufwiesen. Lediglich in der G₂-Phase des Zellzyklus konnte pro Komplementationsgruppe eine Figur detektiert werden. Vergleicht man allerdings die Aberrationsmuster ohne Zusatz von Mitomycin C, so wird klar, dass auch die FA-Lymphozytenkulturen keine, beziehungsweise wenige Reunionsfiguren bilden. Im Gegensatz dazu weisen die FA-Fibroblastenkulturen in der G₂-Phase des Zellzyklus weitaus mehr Chromatidbrüche auf

als die FA-Lymphozyten. Da die Mitoseindices und die Chromosomenbrüchigkeit der Fibroblasten durch den G₂/M Checkpoint deutlich erniedrigt vorliegen und somit eine Funktionalität des Checkpoints belegen, muss die hohe Brüchigkeit in der G₂-Phase auf defekte Reparaturmechanismen in der S-Phase des Zellzyklus zurückzuführen sein. So fanden Knipscheer et al. heraus, dass der FANCI - FANCD2 Komplex zur Replikations-abhängigen Reparatur von ICLs nötig ist (Knipscheer 2009). Je näher die beteiligten Proteine in der Signalkette am DNA-Reparaturfokus lokalisiert sind, desto größer scheint der negative Effekt von Mutationen dieser Downstream-Gene. FANCD2 und FANCI werden durch den FA-Kernkomplex ubiquitiniert, um zu den DNA-Reparaturstrukturen zu gelangen (Smogorzewska 2007). Diese enthalten neben Faktoren, wie RAD51, BRCA1 und anderen, auch FANCD1/BRCA2 (Moldovan und D'Andrea 2009). Letzteres ist essentiell für die Homologe Rekombination (Nakanishi 2005), einer Methode zur Behebung von DNA-Doppelstrangbrüchen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Die Beseitigung von Crosslinks geschieht weitestgehend in der S-Phase des Zellzyklus (Moldovan und D'Andrea 2009). Zu den Reparaturmechanismen gehören vor allem die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), die Transläsionen-Synthese (*translesion synthesis* TLS) und die Homologe Rekombination (HR) (Moldovan und D'Andrea 2009). Dabei ist die HR, der einzige Mechanismus, welcher auch in der G₂-Phase des Zellzyklus die fehlerfreie Reparatur von DSB sicherstellen kann. Die HR benötigt, wie der Name schon beinhaltet, das homologe Schwesterchromatid, um dieses als intakte Vorlage zu nutzen. Somit ist die Verfügbarkeit der HR durch Vorhandensein einer homologen Sequenz auf die späte S- und G₂-Phase beschränkt. Die Verbindung zwischen HR und Fanconi-Anämie-Pathway ist verdeutlicht worden durch die Interaktion des FANCD1/BRCA 2 Proteins mit dem ssDNA bindenden Protein RAD51 (Green und Kupfer 2009). Der Komplex bindet auf die beschädigte DNA und leitet die frühe Phase der HR ein (Yang 2002). Darüber hinaus fand man heraus, dass RAD51C, Mitglied der RAD51 *like gene family* auch an der Homologen Rekombination beteiligt ist (Vaz 2010). So führen Mutationen im RAD51C Gen zu einer der Fanconi-Anämie ähnlichen erhöhten zellulären Empfindlichkeit gegenüber quervernetzenden Substanzen, wie Mitomycin C. Weiterhin soll RAD51C, als Antwort auf DNA-Schäden die Aktivierung der Checkpoint Kinase 2 erleichtern und an einer Zellzyklusarretierung beteiligt sein (Badie 2009). Dabei ist die Chk2 an der Kontrolle des Zellzyklus am Ende der G₂-Phase involviert und verhindert, dass Zellen, die DNA-Schäden aufweisen, in die

Mitose eintreten. Die Checkpoint Kinase 2 phosphoryliert unter anderem p53 und BRCA1, um die Zelle in die Apoptose zu schicken oder Reparaturmechanismen einzuleiten (Hirao 2000, Zhang 2004). Auch Rani et al. zeigten, dass die FA-Proteine Modulatoren in der p53 Aktivierung darstellen (Rani 2008). Heterozygotie für p53(+/-) soll in FANCD2 defizienten Knockoutmäusen die Tumorentstehung beschleunigen und bekräftigt die Annahme, dass der FA-Pathway in komplexer Weise den G₂/M Checkpoint beeinflusst (Houghtaling 2008). Dieser Argumentation nach werden auch in der G₂-Phase des Zellzyklus DNA-Doppelstrangbrüche beseitigt, beziehungsweise beschädigte Zellen in den Zelltod geschickt. Durch eine G₂/M Checkpoint induzierte Arretierung des Zellzyklus und die Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen können Doppelstrangbrüche in der G₂-Phase verringert werden. So ist die Chromosomenbruchrate, vor allem die Chromatidbrüchigkeit der Fanconi-Anämie-Zellen in der G₂-Phase gegenüber der Mitose deutlich höher. Die hohe Anzahl multiaberranter Zellen in der G₂-Phase zeigt deutlich den Effekt von quervernetzenden Substanzen auf FA-Zellen. Trotzdem kommt es in den FA-Zellen zu einer Verringerung der Chromosomenbruchrate in der G₂-Phase vor Eintritt in die Mitose. Die Zellzyklusarretierung ist nötig, um Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden zu gewinnen und die Zellintegrität zu wahren. Wie genau der FA-Pathway in Bezug auf die Homologe Rekombination wirkt, bleibt dabei bisher ungeklärt (Moldovan und D'Andrea 2009/12).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Fanconi-Anämie-Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus nicht nur arretieren, sondern auch eine signifikant höhere Chromosomenbrüchigkeit gegenüber FA-Zellen in der Mitose aufweisen. Damit wird deutlich, dass der G₂/M Checkpoint in diesen Zellen zumindest partiell funktionieren muss. Es kommt darüber hinaus zu einer signifikanten Erniedrigung der Mitose-Indices, was auch Ausdruck für einen funktionierenden Checkpoint ist. Die FA-Proteine scheinen eine große Rolle in der Beseitigung von Doppelstrangbrüchen mittels Homologer Rekombination zu spielen. Da diese neben dem nicht fehlerfrei arbeitenden NHEJ in der G₂-Phase des Zellzyklus stattfindet, kann man die hohen Bruchraten bei FA als Ausdruck einer herabgesetzten Fähigkeit zur HR deuten.

5.4 Ausblick

Die Methode des *premature chromosome condensation* kann ein zusätzliches Mittel zur Diagnostik der Fanconi-Anämie darstellen. Die signifikant höhere Chromosomenbrüchigkeit der FA-Zellen gegenüber den Kontrollzellen in der G₂-Phase des Zellzyklus kann alternativ zur Durchflusszytometrie angewandt werden, da in beiden Methoden eine positive Diagnose aufgrund der Zellzyklusarretierung der FA-Zellen gestellt werden kann. Die Durchflusszytometrie misst dabei nicht die Chromosomenbrüchigkeit, sondern den DNA-Gehalt in der G₂-Phase (Schindler 1985). Interessant wäre eine Untersuchung von Fanconi-Anämie-Zellen mit Reversionsmutationen und deren Bruchraten in der G₂-Phase, nicht nur hinsichtlich diagnostischer Zwecke, sondern vor allem dahingehend, Reparaturmechanismen besser zu verstehen oder den Einfluss des G₂/M Checkpoints auszumachen. Bei einer hohen Chromosomenbrüchigkeit dieser Zellen in der G₂-Phase könnte man davon ausgehen, dass der Checkpoint eine größere Bedeutung hat, als bisher angenommen.

Unklar bleibt, warum der G₂/M Checkpoint nicht mehr geschädigte FA-Zellen aufhält, in die Mitose einzutreten und welcher Zusammenhang zwischen FA-Proteinen und dem G₂/M-Checkpoint besteht. Die Komplexität der beteiligten Proteine beschreibt, wie eng der Fanconi-Anämie-Pathway mit anderen Signalwegen zusammenhängt, was eventuell in Zukunft ein Gesamtbild der Zellzyklusfunktion ergibt. Vor allem die BRCA Gene stehen im engen Zusammenhang mit den FA-Genen. So ergaben sich Überschneidungen durch Identifikation der FA-Gene FANCD1, FANCN und FANCI als BRCA2, PALB2 und BRIP1. Nicht nur das Beispiel der Ataxia Telangiektasia verdeutlicht den Zusammenhang. Das Reparaturnetzwerk enthält des Weiteren das *Rad3 related Protein* (ATR), das *Bloom Syndrom Protein* (BLM) und BRCA1 (Wang 2007). RAD51C Mutationen ergeben nicht nur einen Fanconi-Anämie-ähnlichen Phänotyp, sondern sind darüber hinaus für eine erhöhte Prädisposition für Brust und Eierstockkrebs verantwortlich (Meindl 2010). So werden in Zukunft die weitergehende Analyse des Fanconi-Anämie-Pathway und anderer Signalwege die Tumorgenese verständlicher machen.

6 Zusammenfassung

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine genetisch heterogene Krankheit, welche sich bei einem Funktionsverlust eines Gens der bisher 15 identifizierten Gene des FA-Pathways, auch phänotypisch sehr variabel, durch angeborene Fehlbildungen, Knochenmarksversagen und einer erhöhten Prädisposition dahingehend Neoplasien zu entwickeln, darstellen kann. Die FA ist ein Chromosomeninstabilitätssyndrom, welches durch eine herabgesetzte Fähigkeit DNA-Schäden zu reparieren gekennzeichnet ist. Diagnostisch fallen die Chromosomen der FA-Patienten durch eine hohe spontane und durch DNA-Strangvernetzer induzierte erhöhte Brüchigkeit auf. In der vorliegenden Arbeit wurden die FA-Zellen hinsichtlich der Chromosomenbrüchigkeit in der G₂-Phase des Zellzyklus konventionell- und molekularzytogenetisch untersucht. Ein durch den Phosphataseinhibitor Calyculin A (Cal A) vorzeitig induziertes Kondensieren der Chromosomen machte diese Untersuchung möglich. Durch den Vergleich der Bruchraten zwischen G₂-Phase und Mitose konnte darüber hinaus die Funktion des G₂/M Checkpoints analysiert werden.

Zusammenfassend konnte sowohl konventionell- als auch molekularzytogenetisch eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit der FA-Zellen in der G₂-Phase, verglichen mit der Mitose festgestellt werden ($p < 0,05$). Vergleicht man darüber hinaus die Mitose- bzw. G₂-PCC-Indices miteinander, so fällt auf, dass in der G₂-Phase signifikant höhere Indices ermittelt werden konnten ($p < 0,05$). Die Ergebnisse unterstützen demnach die Annahme, dass FA-Zellen bei nicht reparierten DNA-Schäden in der G₂-Phase des Zellzyklus arretieren. Die Sensitivität der FA-Zellen gegenüber quervernetzenden Substanzen konnte durch Mitomycin C (MMC) gezeigt werden. In der G₂-Phase korrelieren die steigende MMC Konzentration und die Bruchrate positiv miteinander. Weiterhin steigt die Anzahl multiaberranter Zellen, je mehr Quervernetzer auf die Zellen einwirkt. Auch die G₂-PCC-Indices steigen an, je mehr Crosslinks induziert werden. Demnach arretieren mehr Zellen in der G₂-Phase, je schwerer der DNA-Schaden ist. Im Gegensatz dazu fällt auf, dass nach Passieren des G₂/M Checkpoints die Mitose-Indices fallen, je höher MMC angesetzt ist. Zwar korrelieren die Konzentration des Quervernetzers und die Brüchigkeit der Metaphasechromosomen positiv miteinander, aber die verringerten Indices beweisen, dass die geschädigten Zellen durch den G₂/M Checkpoint aufgehalten werden in die Mitose zu treten. Die Arretierung der FA-Zellen in

der G₂-Phase kann als Versuch gedeutet werden, die in Doppelstrangbrüche überführten Crosslinks zu reparieren. Die geringere Zahl multiaberranter Zellen in der Mitose des Zellzyklus zeigt darüber hinaus, dass der G₂/M Checkpoint besonders stark geschädigte FA-Zellen nicht passieren lässt.

Hinsichtlich der verschiedenen Komplementationsgruppen konnte festgestellt werden, dass auch die Zellen mit Defekt im Downstream des FA-Pathways, zumindest ohne MMC Einfluss einen funktionierenden G₂/M Checkpoint aufweisen. Die FANCD1 und FANCD2 Fibroblastenkulturen zeigen signifikant verringerte Mitoseindices und Bruchraten nach Passieren des Checkpoints ($p < 0,05$).

Auffällig mehr Reunionsfiguren wurden in der Mitose detektiert. Als reparierte Doppelstrangbrüche werden sie nicht vom Checkpoint als beschädigt erkannt und können diesen demnach passieren. Der FA-Pathway soll Einfluss auf die Homologe Rekombination haben (Moldovan 2009). Es kann nun darüber spekuliert werden, inwiefern das NHEJ die Homologe Rekombination in der G₂-Phase defekter Fanconi-Anämie-Zellen ersetzt und sich diese Annahme durch häufige Reunionsfiguren in den Metaphasechromosomen zeigt.

Zusammenfassend konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass sich durch Calyculin A induziertes vorzeitiges Kondensieren der Chromosomen eine erhöhte Brüchigkeit dieser, in der G₂-Phase des Zellzyklus nachweisen lässt. Der G₂/M Checkpoint führt zur Arretierung der geschädigten Zellen, was sich durch verringerte Mitose-Indices und niedriger Chromosomenbruchraten ausdrückt. Demnach funktioniert der G₂/M Checkpoint in Fanconi-Anämie-Zellen, verhindert zumindest teilweise einen Übertritt stark geschädigter Zellen in die Mitose und somit auch die Verbreitung von klonalen Aberrationen.

Literaturverzeichnis

- Alter BP, Caruso JP, Drachtman RA et al. Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;117:125-131.
- Alter BP. Modern review of congenital hypoplastic anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23(6):383-4.
- Amasino RM. Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal Biochem* 1986;152(2):304-7.
- Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp Hematol* 1993;21(6):731-3.
- Auerbach AD, Allen RG. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet. Cytogenet* 1991;51:1-12.
- Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research* 2009;668:4-10.
- Badie S, Liao C, Thanasoula M et al. RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation. *J Cell Biol* 2009;185(4):587-600.
- Bezrookove V, Smith R, Moeslein G et al. Premature Chromosome Condensation Revisited: A novel chemical approach permits efficient cytogenetic analysis of cancers. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2003;38:177-186.
- Butturini A, Gale RP, Verlander PC et al. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi anemia registry study. *Blood* 1994;84(5):1650-1655.
- Callén E, Ramírez MJ, Creus A et al. Relationship between chromosome fragility, aneuploidy and severity of the hematological disease in Fanconi anaemia. *Mutation Research* 2002;504:75-83.
- De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH et al. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2000; 20:7980-7990.
- De Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA et al. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet* 1998;20(3):281-283.
- De Winter JP, Rooimans MA, van der Weel L et al. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet* 2000;24(1):15-16.
- Durante M, Furusawa Y, Majima H et al. Association between G2-phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes. *Radiat Res* 1999;151:670-676.

-
- Endres K. Zellzykluseffekte von Mitomycin C. Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg 2003;Seite 88. (Accessed August 17, 2010, at http://www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2005/1264/pdf/Zellzykluseffekte_von_Mitomycin_C.pdf)
- Ensemble Genome Browser. (Accessed July 2009, at <http://ensembl.org>)
- Fabian L, Troscianczuk J, Forer A. Calyculin A, an enhancer of myosin, speeds up anaphase chromosome movement. *Cell Chromosome* 2007;6:1.
- Freie BW, Ciccone SL, Li X, Plett PA et al. A role for the Fanconi anemia C protein in maintaining the DNA damage-induced G2 checkpoint. *J Biol Chem* 2004;279(49):50986-50993.
- Frohnmayr D, Frohnmayr L. Behandlung und Therapie der Fanconi-Anämie. In: *Fanconi-Anämie. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte. Deutsche Fanconi-Anämie Hilfe e.V.* 2005:68.
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S et al. Interaction of the Fanconi Anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 2001;7:249-262.
- German J, Schonberg S, Casky S, Warburton D, Falk C, Ray JH. A test for Fanconi's Anemia. *Blood* 1987;69:1637-1641.
- Giampietro PF, Verlander PC, Davis JG et al. Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an international Fanconi anemia registry study. *Am J Med Genetics* 1997;68(1):58-61.
- Giampietro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC et al. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics* 1993;91(6):1116-20.
- Gluckman E, Auerbach AD, Horowitz MM et al. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Blood* 1995;86:2856-62.
- Green AM, Kupfer GM. Fanconi Anemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(2):193-214.
- Gotoh E, Asakawa Y. Detection and evaluation of chromosomal aberrations induced by high doses of gamma-irradiation using immunogold-silver painting of prematurely condensed chromosomes. *Int J Radiat Biol* 1996;70(5):517-20.
- Gotoh E, Asakawa Y, Kosaka H. Inhibition of protein serine threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells. *Biomed Res* 1995;16:63-68.
- Guinan EC, Lopez KD, Huhn RD et al. Evaluation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of pancytopenia in children with Fanconi anemia. *J Pediatr* 1994;124(1):144-150.

- Guardiola P, Pasquini R, Dokal I et al. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2000;95:422-429.
- Hajdu SI. A note from history: Rudolph Virchow, pathologist, armed revolutionist, politician, and anthropologist. *Ann Clin Lab Sci* 2005;35(2):203-5.
- Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ et al. DNA Cross-Linker-Induced G2/M Arrest in Group C Fanconi Anemia Lymphoblasts Reflects Normal Checkpoint Function. *Blood* 1998;1:275-287.
- Higuera IG, Taniguchi T, Ganesan S et al. Interaction of Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. *Molecular Cell* 2001;7:249-262.
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S et al. DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science* 2000;287:1824-1827.
- Houghtaling S, Granville L, Akkari Y et al. Heterozygosity for p53 (Trp53+/-) Accelerates Epithelial Tumor Formation in Fanconi Anemia Complementation Group D2 (Fancd2) Knockout Mice. *Cancer Res* 2005;65:85-91.
- Howlett NG, Taniguchi T, Olson S et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 2002;297(5581):606-609.
- Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL et al. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159(3):871-877.
- Johnson RT, Gotoh E, Mullinger AM et al. Targeting double-strand breaks to replicating DNA identifies a subpathway of DSB repair that is defective in ataxia-telangiectasia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261(2):317-325.
- Johnson RT, Rao PN. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 1970;226(5247):717-22.
- Kanda R, Hayata I, Lloyd DC. Easy biodosimetry for high-dose radiation exposures using drug-induced, prematurely condensed chromosomes. *Int J Radiat Biol* 1999;75(4):441-446.
- Kennedy RD, D'Andrea AD. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes and Development* 2005;19:2925-2940.
- Kennedy RD, Chen CC, Stuckert P et al. Fanconi anemia pathway-deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated. *J Clin Invest* 2007;117:1440-1449.
- Kowalska A, Srebniak M, Wawrzekiewicz A et al. The influence of calyculin A on lymphocytes in vitro. *J Appl Genet*. 2003;44(3):413-418.

-
- Kramer JM, Evans A, Drury K, Moore K. Calyculin-A improves chromosome condensation for cytogenetic analysis of blastomeres from bovine and murine eight-cell stage embryos. *Theriogenology* 2008;70(4):692-703.
- Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J et al. High Incidence of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Patients With Fanconi Anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:106-112.
- Lavin MF, Delia D, Chessa L. ATM and the DNA damage response. Workshop on ataxia-telangiectasia and related syndromes. *EMBO reports* 2006;7(2):154-160.
- Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence of two new genetic subtypes. *Blood* 2004;103(7):2498-2503.
- Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature Genetics* 2005;37(9):921-922.
- Levitus M, Joenje H, de Winter JP. The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance. *Cell. Onc* 2006;28:3-29.
- Lichter P, Cremer T, Borden J et al. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 1988;80(3):224-234.
- Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F et al. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell* 2005; 8(3):255-265.
- Löffler GL, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007;220-225.
- London TB, Barber LJ, Mosedale G et al. FANCI is a structure-specific DNA helicase associated with the maintenance of genomic G/C tracts. *J Biol Chem* 2008; 283(52):36132-9.
- Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Joenje H et al. Novel frameshift mutation (1806insA) in exon 14 of the Fanconi anemia C gene, FAC. *Hum Mutat* 1996;7(3):264-265.
- Lo Ten Foe JR, Kwee MR, Rooimans MA. Somatic mosaicism in Fanconi Anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet* 1997;5:137-158.
- Mammone T, Gan D, Foyouzi-Youssefi R. Apoptotic cell death increases with senescence in normal human dermal fibroblast cultures. *Cell Biol Int* 2006;30(11):903-9.
- Matise TC, Chen F, Chen W, et al. A second-generation combined linkage-physical map of the human genome. *Genome Res* 2007;17:1783-1786.
- Medeiros C, Zanis-Neto J, Pasquini R. Bone marrow transplantation for patients with Fanconi anemia: reduced doses of cyclophosphamide without irradiation as conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2000;24:849-852.

-
- Medhurst AL, Laghmani el H, Steltenpool J et al. Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway. *Blood* 2006;108(6):2072-2080.
- Meetei AR, Sechi S, Wallisch M et al. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol* 2003;5;23(10):3417-26.
- Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 2003/10;35(2):165-170.
- Meetei AR, Yan Z, Wang W. FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *Cell Cycle* 2004;3(2):179-81.
- Meetei AR, Medhurst AL, Ling C et al. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* 2005 Sep;37(9):921-922.
- Mehta P, Locatelli F, Stary J et al. Bone marrow transplantation for inherited bone marrow failure syndromes. *Pediatr Clin North Am* 2010 Feb;57(1):147-70.
- Meindl A, Hellebrand H, Wiek C et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature Genetics* 2010;42(5):410-416.
- Moldovan GL, D'Andrea AD. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annu Rev Genet* 2009/10;43:223-249.
- Moldovan GL, D'Andera AD. FANCD2-FANCI Hurdles the DNA Interstrand Crosslink. *Cell* 2009/12;139(7):1222-1224.
- Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374(6518):131-134.
- Niemeyer C, Baumann I, Führer M. Aplastische Anämien. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J, eds. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006;40-65.
- Nijman SM, Huang TT, Dirac AM et al. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell* 2005;17(3):331-339.
- Ozenne V, Paradis V, Vullierme MP, Liver tumours in patients with Fanconi anaemia: a report of three cases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20(10):1036-1039.
- Pantelias GE, Maillie HD. A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. *Somatic Cell Genet*. 1983;9(5):533-547.
- Patel KJ, Joenje H. Fanconi anemia and replication repair. *DNA Repair* 2007;6:885-890.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C et al. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(23):9138-9142.

-
- Pinto FO, Leblanc T, Chamousset D et al. Diagnosis of Fanconi anemia patients with bone marrow failure. *Haematologica* 2009;94(4):487-495.
- Povirk LF. Biochemical mechanisms of chromosomal translocations resulting from DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 2006;5(9-10):1199-1212.
- Rani R, Li J, Pang Q. Differential p53 Engagement in Response to Oxidative and Oncogenic Stresses in Fanconi Anemia Mice. *Cancer Res* 2008;68:9683-9702.
- Rao PN, Wilson B, Puck TT. Premature chromosome condensation and cell cycle analysis. *J Physiol* 1977;91:131-142.
- Rackoff WR, Ge J, Sather HN, Cooper HA et al. Central venous catheter use and the risk of infection in children with acute lymphoblastic leukemia: a report of the Children's Cancer Group. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999;21:260-267.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R et al. *Duale Reihe - Biochemie*. 1. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart 2006;515.
- Reid S, Schindler D, Hanenberg H et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nature Genetics* 2007;39(2):162-164.
- Resjö S, Oknianska A, Zolnierowics S et al. Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A. *Biochem J* 1999;341(3):839-845.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C et al. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977;113(1):237-251.
- Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi's anemia. *Blood* 2003;101:822-826.
- Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica* 2008;93(4):511-517.
- Rosenberg PS, Tamary H, Alter BP. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *Am J Med Genet A* 2011 Aug;155A(8):1877-83
- Rothfuss A, Grompe M. 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;24:123-134.
- Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res* 1973;33(8):1829-1836.
- Schindler D, Kubbies M, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS. Presymptomatic diagnosis of Fanconi's anemia. *Lancet* 1985;1:937.

-
- Schindler D, Hoehn H (Editors). Fanconi Anemia - A paradigmatic disease for the understanding of Cancer and Aging. Karger 2007;15:1-229.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T et al. Multicolour spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273(5274):494-497.
- Schröder TM, Anschutz F, Knopp A. Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy. *Humangenetik* 1964;1(2):194-196.
- Schroeder TM, Tilgen D, Kruger J et al. Formal genetics of Fanconi's anemia. *Hum Genet* 1976;32:257-288.
- Seyschab H, Bretzel G, Friedl R et al. Modulation of the spontaneous G2 phase blockage in Fanconi anemia cells by caffeine: differences to cells arrested by x-irradiation. *Mutat Res* 1994;308:149-157.
- Seyschab H, Friedl R, Sun Y et al. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 1995;85:2233-2237.
- Shaffer LG, Tommerup N. ISCN 2005 An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger Basel 2005;88.
- Shahidi N, Diamond L. Testosterone-induced remission in aplastic anemia of both acquired and congenital types. Further observation of 24 cases. *N Engl J Med* 1961;264:953-967.
- Shimamura A. Inherited bone marrow failure syndromes: molecular features. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:63-71.
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(18):8794-8797.
- Shovman O, Riches AC, Adamson D et al. An improved assay for radiation-induced chromatid breaks using a colcemid block and calyculin-induced PCC combination. *Mutagenesis*. 2008 Jul;23(4):267-270.
- Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 1999;18(45):6145-6157.
- Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P et al. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* 2007;129(2):289-301.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12(4):368-375.
- Srebniak MI, Trapp GG, Wawrzkiwicz AK et al. The Usefulness of Calyculin A for Cytogenetic Prenatal Diagnosis. *J Histochem Cytochem* 2005;53(3):391-394.

-
- Stoepker C, Hain K, Schuster B et al. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nat Genet* 2011;43(2):138-41.
- Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet*. 1992;1(3):196-198.
- Su X, Huang J. The Fanconi anemia pathway and DNA interstrand cross-link repair. *Protein Cell* 2011;2(9):704-11.
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Andreassen PR et al. S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 2002; 100(7):2414-2420.
- Terzoudi GI, Manola KN, Pantelias GE et al. Checkpoint Abrogation in G2 Compromises Repair of Chromosomal Breaks in Ataxia Telangiectasia Cells. *Cancer Res* 2005;65:11292-11295.
- Timmers C, Taniguchi T, Hejna J et al. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Molecular Cell* 2001;7(2):241-248.
- Tischkowitz MD, Dokal I. Fanconi anaemia and leukaemia – clinical and molecular aspects. *British Journal of Haematology* 2004;126:176-191.
- Tischkowitz MD, Hodgson SV. Fanconi Anemia. *J Med Genet* 2003;40:1-10.
- Tönnies H, Huber S, Kühl JS, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H. Clonal chromosomal aberration in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood* 2003;15:3872-3874.
- Vaz F, Hanenberg H, Schuster B et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi-anemia-like disorder. *Nature Genetics* 2010;42(5):406-411.
- Velleuer E. Guido Fanconi - eine Kurzbiographie. In: *Fanconi-Anämie. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte*. Deutsche Fanconi-Anämie Hilfe e.V. 2005:352.
- Wagner JE, Tolar J, Levrán O et al. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood* 2004;103(8):3226-3229.
- Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD. Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol* 2004;24:5850-5862.
- Wang X, D'Andrea AD. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair* 2004;3:1063-1069.
- Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nature Genetics* 2007;8:735-748.

-
- Wegner RD, Stumm M. Diagnosis of Chromosomal Instability Syndroms. Wegner RD. Diagnostic Cytogenetics. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1999:251-268.
- Wu Y, Brosh RM Jr. FANCD1 helicase operates in the Fanconi Anemia DNA repair pathway and the response to replicational stress. *Curr Mol Med* 2009;9(4):470-482.
- Wuttke B. Einfluß von Alter und Genotyp auf die Zellzyklusverteilung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes nach Kurzzeitkultur und bivariater Durchflusszytometrie. Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg 2004;3. (Accessed July 20, 2010, at http://www.opus-bayern.de/uni_wuerzburg/volltexte/2004/917/pdf/Dissertation_Bettina_Wuttke.pdf)
- Yamamoto K, Nihrane A, Aglipay J et al. Upregulated ATM Gene Expression and Activated DNA Crosslink-Induced Damage Response Checkpoint in Fanconi Anemia: Implications for Carcinogenesis. *Mol Med* 2008;14:167-174.
- Yang H, Jeffrey PD, Miller J et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 2002;297:1837-1848.
- Zhang J, Willers H, Feng Z et al. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2004;24:708-718.
- Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408(6811):433-439.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidemarie Neitzel für die Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Themas, die umfassende Betreuung, die vielen Ideen sowie die Unterstützung und Förderung, die sie mir hat zuteil werden lassen.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgemeinschaft Zytogenetische Diagnostik und molekulare Zytogenetik. Ich danke Euch für die Einarbeitung in die praktische Arbeit im Labor und die vielen hilfreichen Tipps und Hilfestellungen während der gesamten Zeit. Ich habe mich sehr wohl gefühlt bei Euch. Insbesondere danke ich Kateryna Konrat, die mich wissenschaftlich betreut hat und mir zu jeder Zeit mit Ratschlägen und Ideen zur Seite stand.

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung und Ermutigung während all der Jahre meines Studiums. Diese Promotionsarbeit ist Euch gewidmet.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eigenständigkeitserklärung

„Ich, Rica Sauer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung des G₂/M Checkpoints in Fanconi-Anämie-Zellen durch Analyse der Chromosomeninstabilität in G₂-Phase und Mitose“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift