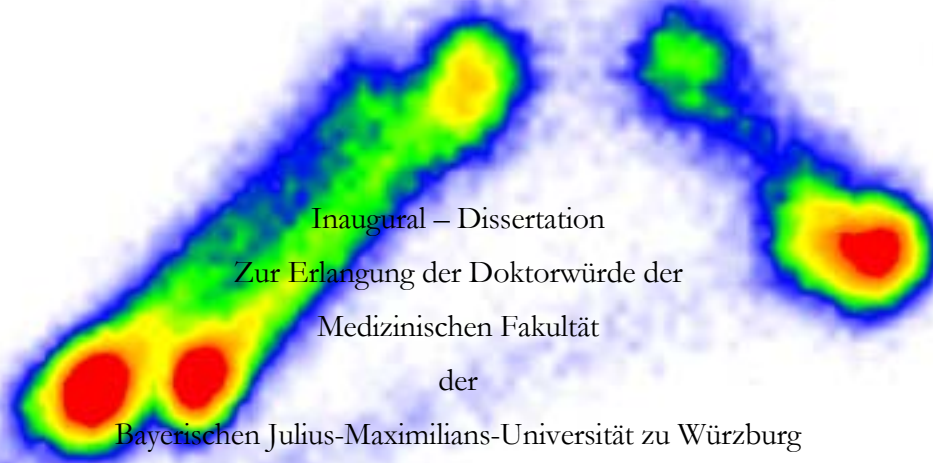


Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Höhn

ZELLZYKLUSEFFEKTE VON MITOMYCIN C



vorgelegt von
Karlheinz Endres
aus Neusitz bei Rothenburg o.d.T.

Würzburg, Februar 2003

Referent: Priv.–Doz. Dr. med. D. Schindler

Koreferent: Professor Dr. med. H. Höhn

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Zellzyklus eukaryonter Zellen | 1 |
| 1.2 | Störungen des Zellzyklus | 2 |
| 1.3 | Mitomycin C | 3 |
| 1.4 | Erkrankungen mit erhöhter chromosomaler Instabilität | 4 |
| 1.5 | Fanconi Anämie | 6 |
| 1.5.1 | Phänotypische und genotypische Charakterisierung der Fanconi-Anämie | 6 |
| 1.5.2 | Diagnose..... | 9 |
| 1.5.3 | Therapie..... | 9 |
| 1.6 | Fragestellung | 10 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 11 |
| 2.1 | Zellkulturen | 11 |
| 2.1.1 | Periphere Blutlymphozyten | 11 |
| 2.1.1.1 | Probanden | 11 |
| 2.1.1.2 | Zellisolation..... | 11 |
| 2.1.1.3 | Kultivierung..... | 12 |
| 2.1.1.4 | Zellernte..... | 13 |
| 2.1.2 | Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)..... | 13 |
| 2.1.2.1 | Probanden | 13 |
| 2.1.2.2 | Vorbereitung der lymphoblastoiden Zellen für die Zellkultur | 13 |
| 2.1.2.3 | Kultivierung..... | 14 |
| 2.1.2.4 | Zellernte..... | 14 |
| 2.1.3 | Zellkulturen mit humanen Fibroblasten | 14 |
| 2.1.3.1 | Probanden | 14 |
| 2.1.3.2 | Vorbereitung der Fibroblasten für die Zellkultur | 14 |
| 2.1.3.3 | Kultivierung..... | 15 |
| 2.1.3.4 | Zellernte..... | 16 |
| 2.2 | Applikation von Mitomycin C | 16 |
| 2.3 | Durchflusszytometrische Messverfahren | 16 |
| 2.3.1 | Einführung in Messtechniken und Messprinzip..... | 16 |
| 2.3.2 | Zweidimensionale Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidumbromidverfahren..... | 18 |
| 2.3.3 | Versuchsansatz..... | 19 |
| 2.3.4 | Messdurchführung und Messgerät | 20 |
| 2.3.4.1 | Particle Analysing System (PAS,1999) | 20 |
| 2.3.4.2 | Durchflusszytometrische Probenanalyse..... | 21 |
| 2.3.4.3 | Zellzyklusdarstellung anhand zweidimensionaler BrdU/Hoechst 33258-Ethidumbromid Zytogramme | 21 |
| 2.3.5 | Analyse der Zellzyklen mit der Software MULTI2D, MCYCLE und 2DAGE..... | 23 |
| 2.3.6 | Graphische Aufarbeitung..... | 24 |
| 2.4 | Statistisches Auswertungsprogramm (SPSS, Statistical Package for the Social Science) | 28 |
| 2.4.1 | Einführung..... | 28 |
| 2.4.2 | Datenbankerstellung anhand der Messwerte aus den Zellzyklusanalysen | 28 |
| 2.5 | Gruppeneinteilung und statistische Datenanalyse | 29 |
| 3 | ERGEBNISSE | 31 |
| 3.1 | Häufigkeiten und Verteilungen der Diagnosegruppen | 31 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 3.1.1 | Übersicht | 31 |
| 3.1.2 | Geschlecht und Altersverteilung aller Probanden | 31 |
| 3.2 | Ergebnisse der Zellzyklusanalysen | 32 |
| 3.2.1 | Menschliche periphere Blutlymphozyten..... | 33 |
| 3.2.1.1 | Zweidimensionale BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid Zytogramme..... | 33 |
| | von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten | 33 |
| 3.2.1.1.1 | Kontrollperson nach Mitomycin C Behandlung | 34 |
| 3.2.1.1.2 | Proband mit Fanconi Anämie nach Mitomycin C Behandlung | 36 |
| 3.2.1.2 | Zellzyklusparameter der Zellkulturen | 37 |
| | mit menschlichen peripheren Blutlymphozyten | 37 |
| 3.2.2 | Ergebnisse der Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)..... | 42 |
| 3.2.2.1 | Zweidimensionale Zytogramme | 42 |
| | von 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)..... | 42 |
| 3.2.2.1.1 | Kontrollperson nach Mitomycin C Behandlung..... | 43 |
| 3.2.2.1.2 | Proband mit Fanconi Anämie nach Mitomycin C Behandlung | 44 |
| 3.2.2.2 | Zellzyklusparameter der lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) | 46 |
| 3.2.3 | 72 Stunden Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten..... | 50 |
| 3.2.3.1 | Zellzyklusparameter von Zellkulturen mit humanen Fibroblasten | 50 |
| 3.3 | Zellzyklusparametervergleich aller Gruppen | 54 |
| 3.4 | Statistische Datenanalyse der zufälligen Variable $\Sigma G2/GF$ | 57 |
| 3.4.1 | Mittelwerte, Varianzen und Standardabweichung | 58 |
| | Summe der G2 Phasen/Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) aller Gruppen..... | 58 |
| 3.4.2 | Test auf Normalverteilung..... | 59 |
| 3.4.2.1 | Summe der G2-Phasen/Wachstumsfraktion der Kontrollgruppe | 59 |
| | bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten..... | 59 |
| 3.4.2.2 | Darstellung der $\Sigma G2/GF$ bei Standardzellkulturen | 60 |
| | mit peripheren Blutlymphozyten | 60 |
| | von Fanconi Anämie Patienten (Gruppe 3)..... | 60 |
| 3.5 | Statistische Datenanalyse der Zunahme der G2 Phasen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration | 61 |
| 3.5.1 | Anstieg der G2-Phasen innerhalb des 1 und 2 Zellzyklus | 62 |
| 3.5.2 | Zunahme der G2-Phasen in allen Zellzyklen..... | 64 |
| 3.6 | Entwicklung von Mittelwert und Streuung der Mittelwerte der G2-Phasen | 66 |
| 3.6.1 | Verlauf der Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$)..... | 66 |
| 3.6.2 | Verlauf der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) | 69 |
| 3.6.3 | Verlauf der Zunahme der G2-Phasen Arretierung innerhalb | 73 |
| | des ersten und zweiten Zellzyklus (Increased $\Sigma G2+G2' /GF$) | 73 |
| 3.6.4 | Verlauf der Zunahme der G2-Phasen Arretierung | 75 |
| | in allen Zellzyklen (Increased $\Sigma G2/GF$) | 75 |
| 4 | DISKUSSION | 78 |
| 4.1 | Anmerkungen zur Methodik | 78 |
| 4.1.1 | Sensivität der einzelnen Parameter..... | 79 |
| 4.2 | Induktion von Zellzyklusstörungen durch Mitomycin C | 80 |
| 4.3 | Zellzyklusstörungen bei Fanconi-Anämie | 83 |
| 4.4 | Diagnostische Implikationen bei heterozygoten Genträgern für Fanconi-Anämie | 86 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 88 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 90 |
| 7 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 103 |
| 8 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 104 |
| 9 | TABELLENVERZEICHNIS | 106 |
| 10 | ANHANG | 109 |

1 EINLEITUNG

1.1 Zellzyklus eukaryonter Zellen

Der Zellzyklus von Eukaryonten umfasst die Lebenszeit einer Zelle vom Ende einer Zellteilung bis zum Abschluss der nächsten Mitose. Der Zellzyklus besteht aus einer kurzen Zellteilungsphase, der Mitosephase (M-Phase), sowie einer langen Interphase, welche die S-Phase (S = Synthese), die Phase der DNA-Synthese, die Phase zwischen M-Phase und S-Phase (G1-Phase, G = gap) und die Phase zwischen M- und S-Phase (G2-Phase) umfasst. Normalerweise durchlaufen die Zellen die S-Phase nur im Rahmen der Mitose. Demgegenüber verbleiben Zellen die sich nicht teilen in einer modifizierten G1-Phase, die auch als G0-Phase bezeichnet wird. Wichtig für den Zellzyklus ist die fehlerfreie Replikation der DNA der Zellen in der S-Phase und die Verteilung der identischen Chromosomenkopien auf die Tochterzellen während der Mitosephase.

Die Regulation des Zellzyklusses erfolgt dabei durch Kontrollpunkte (checkpoints) an wenigstens zwei Stellen, am Übergang der G1-Phase in die S-Phase und am Übergang der G2-Phase in die Mitose (Hartwell und Weinert 1989; Matsushime, Roussel et al. 1991; Alberts, Bray et al. 1995). Die Steuerung des Zellzyklus unterliegt weiterhin verschiedenen Proteinkinasen in Verbindung mit ihren regulatorischen Partnerproteinen, den Cyclinen. Eine besondere Bedeutung hat hierbei eine Proteinkinase mit 34 kd (p34 Kinase, oder auch cdc2-Protein, cell-division cycle, mit Kodierung über ein Zellzyklusteilungsgen). Den meisten Erkenntnissen über die Steuerung des Zellzyklus durch das cdc2-Protein (p34 Kinase) liegen dabei Forschungen an eukaryonten Organismen (*S. cerevisiae* und *S.pombe*) zugrunde (Nurse 1990). Beim Menschen übernimmt ein dem cdc2-Protein eng verwandtes Protein die Regulation des Zellzyklusses, es wird als cyclinabhängige Proteinkinase 2 (cyclin-depent protein kinase 2; CDK 2) bezeichnet. Daneben sind noch eine ganze Reihe weiterer Kinasen (CDK 1-8) und Cyclinen (Cyclin A-H) bekannt (Norbury und Nurse 1992). Während der Evolution sind die Aminosäuresequenzen der cdc2-Proteine von Hefe und Menschen aber weitgehend identisch geblieben (65 %).

Die Kinaseaktivitäten werden über verschiedene Regulationsmechanismen gesteuert und koordinieren somit den Fortgang einer Zelle durch den Zellzyklus und die Aktivität der Kontrollpunkte (checkpoints) (Murray 1992; Funk und Kind 1997). Der Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase wird dabei von einem Komplex aus cdc2-Kinase (p34 Kinase) und G1 spezifischen Cyclinen reguliert (Wittenberg, Sugimoto et al. 1990). Nach Eintritt der Zelle in die S-Phase kann mit der DNA-Synthese begonnen werden. An der Regulation des Übergangs der Zelle von der G2 in die Mitosephase ist die cdc2-Kinase (p34-Kinase) ebenfalls beteiligt. Um aktiv zu sein benötigt die cdc2-Kinase (p34 Kinase) Cyclin B, mit dem sie gemeinsam einen

reifungsfördernden Komplex (MPF, maturation promoting factor) bildet, der dann über die Phosphorylierung zahlreicher Proteine die Mitose auslöst. Die Inaktivierung der cdc2-Kinase erfolgt über die Anschaltung eines Proteins, das Cyclin B abbaut (Alberts, Bray et al. 1995).

Während der G1-S-Phase Kontrollpunkt in Säugetierzellsystemen relativ gut untersucht ist, basieren die Kenntnisse über den G2-M-Phase Kontrollpunkt hauptsächlich auf Forschungen mit Hefezellen (Nurse 1990). Weiterführende Experimente, bei denen es gelingt genaue Kenntnisse über die Zellzyklusregulation, vor allem in Säugetierzellsystemen zu gewinnen, sind deshalb von großer Bedeutung.

1.2 Störungen des Zellzyklus

Der Zellzyklus kann durch Regenerations- und Alterungsprozesse sowie bei der Tumorenstehung vor allem in seiner Dauer verändert werden.

Störungen des Zellzyklus durch Noxen, wie therapeutisch gegebene Tumorstoffe wirken innerhalb verschiedener Phasen des Zellzyklus. Die Zytostatika können dabei den Übergang der Tumorzellen von der G1 in die S-Phase verhindern (z.B. Fluoruracil), die Zellen in der S-Phase (z.B. Antimetabolite) oder G2-Phase (z.B. Bleomycin, Mitomycin) vernichten, die Zellteilung unterbinden (z.B. Colchicin, Vinblastin) oder eine Chromosomenschädigung (z.B. Röntgenstrahlen, Radiomimetika) verursachen. Die Beeinträchtigungen des Zellzyklus führen dabei meist zu Chromosomenverklumpungen, Arretierungen, höherploiden Zellkernen oder mehrkernigen Riesenzellen.

Mit den Kontrollpunkten am Übergang von der G1-Phase in die S-Phase und dem Übergang von der G2-Phase in die M-Phase ist es der Zelle möglich z. B. Schädigungen der DNA aufzudecken und Zellzyklusblockaden mit DNA-Reparatur oder Apoptose einzuleiten. Besonders bei proliferierenden Zellen ist eine adäquate und schnelle Antwort auf DNA-Schädigungen besonders wichtig, denn die Replikation würde Mutationen irreparabel machen und die Mitose von unreparierten DNA-Schädigungen würde zu chromosomalen Aberrationen in den Tochterzellen führen. Somit kommt den DNA-Reparaturmechanismen neben den Kontrollpunkten der Zellzyklusregulation eine wichtige Bedeutung für die fehlerfreie Funktion und der Weitergabe der genetischen Informationen während der Zellteilung zu. Einige wichtige DNA-Reparaturmechanismen sind Exszisionsreparatur, Einzelstrang- und Doppelstrangreparatur und Mechanismen, die die Schädigungen der DNA durch freie Radikale, UV-Strahlung oder Oxidantien beheben. Diese Mechanismen können dabei Schädigungen der DNA hauptsächlich vor und während der DNA-Synthese reparieren. Nach der Übertragung des genetischen Materials steht der Zelle mit der homologen Rekombination ein weiterer Reparaturmechanismus zur Verfügung. Mit diesem Postreplikation-Reparatursystem können fehlerhafte DNA-Sequenzen durch den

repliziertem homologen DNA-Strang ersetzt werden (Hickson und Harris 1988; Lehmann, Bridges et al. 1996). Viele Kenntnisse über die Bedeutung der Reparaturwege liegen dabei Forschungen an Mutanten von *E.coli*, Hefezellen und chinesischen Hamsterzellen mit Defekten in der DNA-Reparatur zugrunde (Lindahl 1982; Timms, Steingrimsdottir et al. 1992; Dronkert, de Wit et al. 2000; Dronkert und Kanaar 2001). Aufgrund ihrer spezifischen Sensivität gegenüber Substanzen, die bestimmte DNA-Schädigungen verursachen ist es möglich Hinweise auf die entsprechenden Reparaturmechanismen, die auf Mutationen in den entsprechenden Reparaturgenen folgen, zu erhalten. Im Rahmen von weiterführenden Studien mit Mutanten von Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* und *S. pombe*) konnte dabei die besondere Bedeutung der G₂-Phase des Zellzyklus für die DNA-Reparatur mit intakter Weitergabe der genetischen Informationen erkannt werden (Weinert und Hartwell 1988; Lehmann 1996; Al-Moghrabi, Al-Sharif et al. 2001). Die Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien führte dabei zu einer Verlängerung der G₂-Phase oder Arretierung von Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus (Weinert und Hartwell 1989; Feilotter, Lingner et al. 1992).

1.3 Mitomycin C

Mitomycin C (MMC) ist ein bifunktionelles Alkylanz aus der Gruppe der zytotoxischen Antibiotika, welches direkt mit DNA *in vivo* und *in vitro* reagieren kann. Es wird hauptsächlich in der Tumorthherapie als Mono- oder Kombinationstherapeutikum für die Behandlung von gastrointestinalen Adenokarzinomen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (non-small cell lung cancer, NSCLC) eingesetzt (Forth, Henschler et al. 1987; Dorr und von Hoff 1994; Paz, Arunangshu et al. 1999). Daneben wird Mitomycin C (MMC) im Rahmen der zytogenetischen Diagnostik von Fanconi Anämie verwendet.

Die Interaktionen mit der DNA können erst nach metabolischer Aktivierung von Mitomycin C erfolgen. Der wesentliche Mechanismus ist dabei die Reduktion durch Reduktasen (Reduktion des Chinons zu einem Semichinonradikal mit Abspaltung der Methoxy-Gruppe) von Bakterien oder Säugetierzellen (Tomasz, Lipman et al. 1987; Tomasz 1995). Es entsteht ein mono- und bifunktionelles Alkylanz, das irreversibel DNA-Seitenstränge verknüpft und Strangbrüche induziert (siehe Abbildung 22 im Anhangsteil dieser Arbeit). Daneben werden weitere Effekte wie DNA-Proteinverknüpfungen und Schädigungen über Freisetzung von Radikalen diskutiert. Als zytotoxisches Antibiotikum kann Mitomycin C Zelltod durch Apoptosis herbeiführen (Papouli, Lafon et al. 2000).

Im Organismus erfolgt eine rasche metabolische Inaktivierung von Mitomycin C (MMC) vor allem durch das NADPH Cytochrom P₄₅₀ Reduktasesystem (Pan, Andrews et al. 1984). Ebenso kann die Toxizität von Mitomycin C und anderen alkylierenden Substanzen durch intrazelluläres Glutathion

aufgehoben werden. Die durch Mitomycin C induzierten DNA-Strangvernetzungen (DNA-crosslinks) gehören zu den DNA-Schädigungen die hoch toxisch für Organismen sind. So kann in reparaturdefizienten Bakterien oder Hefezellen durch eine einzige, in reparaturdefizienten Säugetierzellen diese durch etwa 40 DNA-Strangvernetzungen abgetötet werden (Magana-Schwencke, Henriques et al. 1982; Lawley und Phillips 1996). Des Weiteren können DNA-Strangvernetzungen Mutationen und DNA-Strukturveränderungen verursachen, die unreguliertes Zellwachstum und Tumorbildung induzieren. In der Literatur ist vor allem die Wirkung von Mitomycin C, Cisplatin, Nitrogen Mustard, sowie weiteren Substanzen und deren Derivate gut dokumentiert worden. Aber auch für natürliche Stoffe wie die Furocumarine die in vielen Pflanzen und kosmetischen Produkten vorkommen sind Induktion von DNA-Strangvernetzungen beschrieben worden (Scott, Pathak et al. 1976). Eine Besonderheit in der Reparatur von DNA-Strangvernetzungen (DNA-crosslinks) ist dabei, dass mehrere oder verschiedene Mechanismen an der Reparatur beteiligt sein können. Diese DNA-Reparaturmechanismen sind in Säugetierzellsystemen vor allem durch Untersuchungen mit reparaturdefizienten chinesischen Hamsterzellen genetisch und biochemisch näher charakterisiert worden (Hickson und Harris 1988; Jones 1994). Als Effekt auf der Ebene des Zellzyklus ist für Mitomycin C die Arretierung von Zellen in den G2-Phasen des Zellzyklus als Folge der DNA-Strangvernetzungen (DNA-crosslinks) beschrieben worden (Dronkert und Kanaar 2001). Abbildung 1 zeigt die Strukturformel von Mitomycin C.

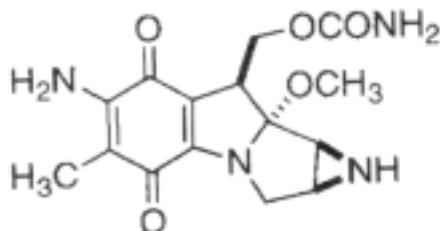


Abbildung 1: Strukturformel von Mitomycin.

1.4 Erkrankungen mit erhöhter chromosomaler Instabilität

Es gibt seltene Erkrankungen mit autosomal-rezessivem Erbgang die durch erhöhte chromosomale Instabilität, Sensivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien und Prädisposition zur Entwicklung maligner Tumoren charakterisiert sind. Diese Gemeinsamkeiten haben trotz der recht unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen zu einer gemeinsamen Klassifikation (Caretaker Gene diseases) geführt (Murken und Cleve 1996). Als Ursache der Chromosomenbruchsindrome wird eine verminderte Fähigkeit spontane DNA-Läsionen zu reparieren diskutiert. Die Prädisposition zur Entstehung von Karzinomen wird dabei als indirekte

Manifestation des primären genetischen Defektes verstanden (Joenje und Patel 2001). Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige Krankheitsbilder mit gesteigerter Chromosomenbrüchigkeit, chromosomenschädigende Faktoren und die betroffenen Organsysteme.

| Krankheitsbild | chromosomenschädigende Faktoren | betroffene Organsysteme (Auswahl) |
|---|---------------------------------|--|
| Fanconi Anämie | Mitomycin C/Diepoxybutan | blutbildendes System / Skelett / Haut /innere Organe |
| Ataxia teleangiectasia (AT; Louis Bar Syndrom) | Röntgenstrahlen | blutbildendes und lymphatisches System / Haut |
| Bloom Syndrom (BS) | UV-Licht | blutbildendes und lymphatisches System / Haut |
| Nijmegen Breakage Syndrom | Röntgenstrahlen | lymphatisches System / Skelett |
| Werner Syndrom (WRN) | Melphalan/Chlorambucil/MMC | Haut / Skelett |
| Xeroderma pigmentosum (XP) | UV-Licht, Karzinogene | Haut (Plattenepithelkarzinome) |

Tabelle 1: Übersicht über Krankheitsbilder mit erhöhter chromosomaler Instabilität.

Bei Xeroderma pigmentosum (XP) und Fanconi-Anämie sind dabei verschiedene Gene für das Zustandekommen eines gemeinsamen Phänotyps verantwortlich. Im Gegensatz zur Fanconi-Anämie konnte für Xeroderma pigmentosum (XP) ein spezifischer Defekt in der DNA-Reparatur (Exzisionsreparatur) nachgewiesen werden (Bootsma 1978; Tuteja und Tuteja 2001). Für Fanconi-Anämie wird aufgrund der Hypersensivität gegenüber alkylierenden Substanzen aber ein DNA-Reparaturdefekt, speziell von DNA-Strangvernetzungen (DNA-crosslinks) vermutet. Eine genaue Zuordnung konnte aber einerseits wegen den gleichzeitig vorliegenden zellulären Veränderungen und den fehlenden Homologien der Fa-Proteine zu Proteinen in Prokaryonten (*E.coli*) und Eukaryonten (*S.cerevisiae*) noch nicht erfolgen (siehe hierzu auch 1.5.1). Neben den bei den genannten Erkrankungen bestehenden Defekten in der DNA-Reparatur, weisen diese auch Besonderheiten im Zellzyklus auf, die mit der Krankheitsgenese der Chromosomenbruchsindrome ursächlich verbunden sind. Deshalb sind die menschlichen Chromosomenbruchsindrome für Zellzyklusstudien besonders wichtig. Da die Zellzyklusanalysen im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich mit Zellen von Fanconi-Anämie Patienten durchgeführt wurden, ist das Krankheitsbild der Fanconi-Anämie in den folgenden Abschnitten genauer dargestellt.

1.5 Fanconi Anämie

Fanconi Anämie wurde 1927 erstmals durch Guido Fanconi anhand seiner Beobachtungen zweier Brüder beschrieben (Fanconi 1927). Die Fanconi Anämie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung mit erhöhter spontaner Chromosomeninstabilität und erhöhter Sensivität gegenüber alkylierenden Substanzen (Cervenka und Hirsch 1982). Klinisch kann die Fanconi-Anämie zum Formenkreis der angeborenen aplastischen Anämien gerechnet werden (Herold 1999). Die weltweite Prävalenz der Fanconi Anämie beträgt etwa 1-5 / Mill., bei einer geschätzten heterozygoten Frequenz zwischen 0,3 und 1 % (Verlander, Kaporis et al. 1995; Auerbach, Buchwald et al. 2001). Das durchschnittliche Erstmanifestationsalter mit dem Auftreten von hämatologischen Problemen beträgt etwa 5-10 Lebensjahre (Giampietro, Adlerbrecher et al. 1993). Oftmals wird jedoch die Erstdiagnose erst während des zweiten Lebensjahrzehnts gestellt. Die mittlere Lebenserwartung liegt zwischen 10-23 Lebensjahren (Swift 1971; Macdougall, Greeff et al. 1990; Auerbach und Allen 1991; Dandrea und Grompe 1997). Der Tod tritt meist als Folge eines Knochenmarksversagens ein.

1.5.1 Phänotypische und genotypische Charakterisierung der Fanconi-Anämie

Der **klinische Phänotyp** bei Fanconi-Anämie ist gekennzeichnet durch Knochenmarksversagen, maligne Tumoren und Fehlbildungen. Lebensbedrohliche Komplikationen der Erkrankung sind unstillbare Blutungen, Infektionen, Leukämien vom meist myeloischen Typ (AML), sowie der Prädisposition für die Entstehung von hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinomen (squamöse Zellkarzinome) (Auerbach und Allen 1991; Alter 1996). Charakteristische phänotypische Veränderungen der Fanconi Anämie sind vor allem Hauthyperpigmentierungen (Cafe-au-lait Flecken), Radiushypoplasie bei gleichzeitig fehlenden, hypoplastischen oder überzähligen Daumen und Minderwuchs (Hagerman und Williams 1993). Weitere Aberrationen, wie spinale Fehlbildungen, Skoliose, Hüftmissbildungen, knöcherne Rippendeformitäten, Mikrocephalus, Mikrophthalmie, vermindertes Geburtsgewicht, einseitige Nierenaplasien, Nierenfunktionsstörungen, Herzvitien, gastrointestinale Erkrankungen, körperliche Entwicklungsstörungen und geistige Retardierung können auftreten. Zu etwa 30 % bestehen bei Fanconi-Anämie Patienten aber keine sichtbaren Fehlbildungen bei der Geburt, sodass die klinischen Erstmanifestationen meist Knochenmarksversagen oder maligne Tumoren sind. Bei weiblichen Patienten ist eine Schwangerschaft möglich (Alter, Frissora et al. 1991), männliche Erkrankte sind dagegen aufgrund verminderter Entwicklung der Geschlechtsorgane (hypergonadotroper Hypogonadismus) infertil (Berkovitz, Zinkham et al. 1984). Gehäuftes

Auftreten von Stoffwechselerkrankungen bei Fanconi Anämie wie Diabetes mellitus (Morrell, Chase et al. 1986) sind beschrieben worden.

Der **zelluläre Phänotyp** bei Fanconi-Anämie ist charakterisiert durch eine spontan erhöhte Chromosomenbruchrate und Hypersensivität gegenüber alkylierenden Substanzen (Schroeder, Anschutz et al. 1964; Cervenka und Hirsch 1982). Daneben sind für den zellulären Phänotyp bei Fanconi Anämie weitere Veränderungen beschrieben worden:

- Arretierung oder Verlängerung der G2-Phasen (Kubbies, Schindler et al. 1985)
- Sensivität gegenüber O₂ (Schindler und Hoehn 1988)
- G2-phasenspezifische Sensivität gegenüber ionisierender Strahlung (Bigelow, Rary et al. 1979)
- Überproduktion von TNF α (Rosselli, Sanceau et al. 1992)
- DNA-Reparaturdefekte (Fujiwara, Tatsumi et al. 1977)
- Chromosomeninstabilität (Auerbach, Rogatko et al. 1989)
- gesteigerte Apoptosis und fehlerhafte p53 Induktion (Kupfer und D'Andrea 1996).

Der **Genotyp** bei Fanconi-Anämie ist gekennzeichnet durch ausgedehnte Heterogenität. Bisher sind Defekte in acht verschiedenen Genen (FANCA, B, C, D1, D2, E, F und G) bekannt (Buchwald, Strathdee et al. 1993; Joenje, Oostra et al. 1997; de Winter, Waisfisz et al. 1998; de Winter, Rooimans et al. 2000; Hejna, Timmers et al. 2000; Timmers, Taniguchi et al. 2001). Die auffallende Hypersensivität gegenüber alkylierenden Substanzen wie Mitomycin C wird dabei im Rahmen von Komplementationstudien für die Identifikation der FA-Gene genutzt. Die Methode basiert auf der Wiederherstellung einer genetischen Funktion durch Einbringen eines Gens in eine Zelle, in welcher dieses Gen durch eine Mutation verändert wurde. Die Studien bei Fanconi-Anämie werden mit immortalisierten lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) durchgeführt, die normalerweise eine stark erhöhte Sensivität gegenüber Mitomycin C oder anderen Alkylanzien zeigen. Durch die Fusion von lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) zweier nicht miteinander verwandter Fanconi-Anämie Patienten bleibt dabei die Sensitivität gegenüber Mitomycin C bestehen oder wird korrigiert (Komplementation). Im Falle der unkorrigierten Sensitivität gehören die untersuchten Zellen der Fa-Individuen zur gleichen Komplementationsgruppe, welche jeweils mit einem spezifischen Gendefekt korrespondiert. In den so vordefinierten Genabschnitten kann nun mit verschiedenen Methoden (z.B. Kopplungsanalysen, linkage analysis oder complementation cloning) die weitere Identifikation der Krankheitsgene erfolgen, welche aufgrund ihrer biochemischer und physiologischen Funktionen mit der Erkrankung im Zusammenhang stehen und somit für den Krankheitsverlauf von entscheidender Bedeutung sein können (Strathdee, Gavish et al. 1992; Gibson, Pronk et al. 1996).

Mit statistischen Methoden konnten für die Patienten der einzelnen Komplementationsgruppen phänotypische Unterschiede nachgewiesen werden (Faivre, Guardiola et al. 2000). So erleben FANCA Patienten ein früheres Auftreten von Anämie und haben eine erhöhte Inzidenz für Leukämie, Erkrankte mit FANCC ein höheres Alter bei Ausbruch von aplastischen Anämien und ein geringeres Auftreten somatischer Aberrationen, welche dagegen bei den selteneren Komplementationsgruppen FANCD, FANCE und FANCF vermehrt zu finden sind. Die FANCG Patienten entwickeln eine schwerere Zytopenie und haben eine erhöhte Inzidenz für Leukämie. Die Komplementationsgruppenzugehörigkeit kann deshalb für die therapeutische Intervention und die Erkennung von Hochrisikopatienten bei Fanconi Anämie von Bedeutung sein (Faivre, Guardiola et al. 2000). Eine Übersicht über bekannte Komplementationsgruppen, deren Genlokalisierungen und Häufigkeiten (Buchwald 1995; Joenje 1996; Jakobs, FiddlerOdell et al. 1997; Timmers, Taniguchi et al. 2001; Howlett, Taniguchi et al. 2002; Taniguchi, Garcia-Higuera et al. 2002) bietet Tabelle 2.

| Komplementationsgruppe | Genlokalisierung | Häufigkeiten |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------|
| FANCA | 16q24.3 | 66-69 % |
| FANCB | 13q12.3 | 4,3-9 % |
| FANCC | 9q22.3 | 12,7-18 % |
| FANCD1 | 13q12.3 | [o.A.] |
| FANCD2 | 3p25.3 | 4-4,3 % |
| FANCE | 6p21.3 | 9-12,7 % |
| FANCF | 11p15 | [o.A.] |
| FANCG | 9p13 | [o.A.] |

Tabelle 2: Komplementationsgruppen, Genlokalisierung und Häufigkeiten bei Fanconi Anämie (Joenje 1996; Savoia, Zatterale et al. 1996).

Bei Fanconi-Anämie ist das Zustandekommen eines gemeinsamen Phänotyps durch Mutationen in den acht betroffenen Genen noch unklar (Joenje und Patel 2001). So sind z.B. für das FANCA Gen über 76 unterschiedliche Mutationen bekannt (Wijker, Morgan et al. 1999).

Ein weiteres genotypisches Merkmal der Fanconi-Anämie ist das Auftreten von Mosaikbildung. Davon sind etwa 25 % der Fa-Individuen betroffen. Die Patienten besitzen dabei zwei Subpopulationen von Lymphozyten, von der ein Teil der Zellen die erhöhte Sensivität gegenüber alkylierenden Substanzen aufweist, während die andere Population dagegen resistent ist (LoTenFoe, Kwee et al. 1997).

1.5.2 Diagnose

Die Basisdiagnostik bei Fanconi Anämie beginnt mit einem Blutbild mit Zellzählung, Differentialblutbild, daneben Knochenmarkszytologie und Histologie, sowie AFP-Spiegelbestimmung (Cassinat, Guardiola et al. 2000; Cassinat, Darsin et al. 2001). Im Rahmen der zytogenetischen Diagnostik bei Verdacht auf Fanconi-Anämie wird außer der spontan erhöhten chromosomalen Instabilität, die erhöhte Sensivität gegenüber alkylierenden Substanzen, wie Diepoxybutan (DEB) und Mitomycin C (MMC) getestet (Cervenka und Hirsch 1982; Auerbach, Rogatko et al. 1989). Daneben kann die Diagnose der Fanconi-Anämie auch mit durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen gestellt werden. Der Test auf erhöhte Mitomycin C oder Diepoxybutan Sensivität wird dabei in der Regel mit 72 Stunden Zellkulturen von Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten peripheren Blutlymphozyten durchgeführt. Aufgrund der erhöhten Sensivität gegenüber Mitomycin C bei Fanconi Anämie erfolgt auch eine Einteilung in Komplementationsgruppen (siehe 1.5.1). Mit den Testverfahren ist auch eine Abgrenzung der Fanconi-Anämie zu anderen Formen von aplastischen Anämien (German, Schonberg et al. 1987) möglich und kann auch im Rahmen differentialdiagnostischer Überlegungen und für die Therapieplanung bei Panzytopenie angewendet werden (Cervenka, Arthur et al. 1981). Erschwerend für die Diagnosestellung und Therapie der Fanconi Anämie sind neben den zahlreichen unterschiedlichen phänotypischen Veränderungen auch der unterschiedliche Ausprägungsgrad der einzelnen Symptome dieser Erkrankung. Die Differentialdiagnose der Fanconi Anämie umfasst erworbene aplastische Anämien durch Medikamente, Noxen, ionisierende Strahlen und Virusinfektionen. Weiterhin kommen Knochenmarksinfiltrationen durch Leukämien, maligne Lymphome, Karzinome und Osteomyelosklerose, chronische Anämien durch Nephritiden, Kollagenosen und Endokrinopathien, sowie kongenitale isolierte aplastische Anämien (z.B. Blackfan-Diamond-Syndrom mit isolierter Störung der Erythropoese) und myelodysplastische Syndrome (MDS) in Betracht.

1.5.3 Therapie

Kurative Behandlungsmethoden bei Fanconi Anämie sind die Knochenmarkstransplantation (KMT) oder die Stammzelltransplantation (SZT) (Broxmeyer, Kurtzberg et al. 1991; Gluckman, Auerbach et al. 1995). Bei Knochenmarkstransplantationen wird bei vorhandenen Spendern bzw. Geschwisterspende eine mittlere Überlebenszeit von 2 Jahren in 73 % der Fälle beobachtet. Die supportive Therapie betroffener Patienten ähnelt der Behandlung der aplastischen Anämien mit Blutzellsubstitution, Infektionsprophylaxe, Immunsuppression mit Antilymphozytenglobulinen (ALG), Antithymozytenglobulinen (ATG), Prednisolon und Ciclosporin A, sowie weiteren

Maßnahmen, mit Androgenen und hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Liu, Buchwald et al. 1994). Daneben wird der Einsatz gentechnischer Behandlungsmöglichkeiten untersucht (Walsh, Nienhuis et al. 1994; Fu, tenFoe et al. 1997).

1.6 Fragestellung

Fanconi-Anämie ist durch erhöhte chromosomale Instabilität, Sensivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien und Prädisposition zur Entwicklung maligner Tumoren charakterisiert. Aufgrund der Veränderungen im Zellzyklus ist die Erkrankung von besonderer Bedeutung für Zellzyklusstudien. Die Störungen des Zellzyklus bei Fanconi-Anämie sind dabei vermutlich durch Gendefekte, die an der DNA-Reparatur oder an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, bedingt. Zellkinetisch kann man dabei eine Akkumulation von Zellen in den G₂-Phasen des Zellzyklus beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die bei Fanconi-Anämie vorliegenden endogenen Zellzyklusstörungen sowie exogen induzierte Zellzyklusveränderungen in verschiedenen Zellsystemen (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) untersucht werden. Die Induktion der exogenen Störungen des Zellzyklus erfolgte mit Mitomycin C (MMC). Ein hervorragend geeignetes Verfahren Veränderungen des Zellzyklus festzuhalten ist die zweidimensionale BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Durchflusszytometrie. Mit dem hochauflösenden Verfahren kann zwischen proliferierenden und nichtproliferierenden Zellen unterschieden werden. Daneben ist es möglich Verteilungen der Zellen in bis zu vier Zellzyklusphasen mit quantitativer Analyse der Populationen während der G₀-G₁-, G₁-, S- und G₂-Phasen zu erfassen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellkulturen

2.1.1 Periphere Blutlymphozyten

2.1.1.1 Probanden

Für die Erstellung der Kontrollgruppe gesunder Probanden stellten sich freundlicherweise Mitarbeiter des Kreiskrankenhauses Bad Neustadt/Saale, Bewohner eines Studentenwohnheimes der Universität Würzburg, sowie Angehörige meiner Familie zur Verfügung. Insgesamt wurden von 24 Probanden Zellkulturen angefertigt. Die Personen mussten sich dabei selbst als gesund einschätzen, auf klinische Untersuchungen wurde verzichtet. Nach bekannten Bluterkrankungen ist gezielt gefragt worden, Betroffene konnten dann nicht teilnehmen.

Den Studienteilnehmern wurde über ein steriles Entnahmesystem mindestens 5 ml venöses Blut entnommen. Transportmedium waren Heparin Novo Röhrchen mit 50 bis 150 i.E./ml Heparin zur Verhinderung der Koagulation. Die Proben wurden nach Entnahme innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet. Die Aufbewahrung erfolgte solange bei Raumtemperatur. Für jeden Probanden wurde ein Zellkulturlaufzettel angelegt und die darauf verwendeten Seren und Zusatzstoffe, jeweils mit Haltbarkeitsdatum, das Ergebnis der Zellauszählung, die Blutgesamtmenge mit autologen Serumanteil, Kultur und Erntedatum, und der weitere Verlauf dokumentiert.

2.1.1.2 Zellisolation

Die Isolation der Blutlymphozyten wurde nach der Ficoll-Paque Dichtegradientenzentrifugationsmethode durchgeführt. Anhand der unterschiedlichen Dichte der mononukleären Zellen kann eine Abtrennung von den anderen Blutbestandteilen erfolgen. Alle Arbeitsschritte der Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen, dies wurde erreicht durch die Verwendung einer Zellbank mit Absaugvorrichtung und entsprechender sterilen Arbeitsmaterialien.

Zunächst wurde das gewonnene Vollblut in ein steriles Falconröhrchen gefüllt und das autologe Serum durch Zentrifugation bei 1200 U/min, 220 g, für 10 Minuten bei Raumtemperatur abgetrennt. Anschließend wurde das Serum mit einer Pipette abgenommen, die Menge notiert und als späterer Kulturzusatz in ein neues Falconröhrchen übertragen. Äquivalent dazu wurde der entnommene Serumanteil durch HBSS ersetzt und dann die Gesamtmenge im Verhältnis 1:1 mit HBSS verdünnt. In ein mit jeweils 3 ml Ficoll-Paque gefülltes Röhrchen konnte das Gemisch vorsichtig aufgetragen werden. Für die saubere Auftrennung nach der

Dichtegradientenzentrifugationsmethode mussten die Proben mit 2100 U/min, 700 g, für 30 Minuten bei einer Temperatur von 4° Celsius zentrifugiert werden. Nach der Abnahme des Überstandes wurden die mononukleären Zellen mit einer Pasteurpipette aufgenommen und für die Waschung in ein neues Falconröhrchen mit HBSS gegeben und für 15 Minuten bei 900 U/min, 120 g und RT zentrifugiert. Sie konnten dann für die Zellzählung und Kultur verwendet werden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 3 ml RPMI 1640 Komplettmedium resuspendiert.

Da die Zellkulturen nicht zu dicht eingesät werden sollten, ist die Zellgesamtanzahl durch Auszählung in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt worden. Für die Bestimmung mussten 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit 1 % Essigsäure vermischt werden. Eine Vitalitätskontrolle der Zellen wurde mit Hilfe von 10 µl Trypanblau durchgeführt.

Anschließend konnte das Zell-RPMI-Gemisch unter Berücksichtigung eines Zellanteils von 1 Mill./ml mit Medium aufgefüllt werden.

2.1.1.3 Kultivierung

Für die durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren musste eine Zellkultur mit einer Zelldichte von 1×10^5 / ml angesetzt werden.

Im ersten Schritt erfolgte die Zugabe von 3,560 ml RPMI 1640 Komplettmedium, von 0,5 ml Zellsuspension, 1 %, bzw. 0,05 ml autologem Serum, und 0,75 ml 15 % -igem hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, Firma Gibco). Unter Schutz vor direktem Lichteinfall, wurden dann 10^{-4} M (0,05 ml) 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) als Thymidinbasenanalogon, 10^{-4} M (0,05 ml) 2'-Deoxycytidin (DC), 10^{-5} M (0,01 ml) alpha-Thioglycerol (α -TG) und 1,2 µg/ml (0,0225 ml) Phytohämagglutinin mit mitogener Wirkung zugegeben (Schindler, Kubbies et al. 1988).

Insgesamt sollte ein Mediumgesamtvolumen von 5 ml erreicht werden.

Um die Dosisabhängigkeit der Zellzykluseffekte von Mitomycin C beurteilen zu können, wurden jeder Versuchsreihe eines Probanden unterschiedliche Konzentrationen MMC¹ zugegeben. Die Zellkulturflaschen wurden mit Namen und MMC Konzentrationen beschriftet, und in Aluminiumfolie eingewickelt um Chromosomenbrüche des DNA gebundenen BrdU's durch Lichteinfall zu verhindern (Stetten, Latt et al. 1976). Die Proben wurden anschließend mit etwas geöffnetem Schraubverschluss, im Brutschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ Anteil, bei 37,5° Celsius für 72 Stunden inkubiert.

¹ Angabe der MMC Konzentrationen in Abschnitt 2.2

2.1.1.4 Zellernte

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zellernte. Wiederum galt es Effekte durch direkte Lichteinstrahlung auf die Proben über Raumabdunkelung oder Rotlichtbeleuchtung zu vermeiden. Mit der Pipetierhilfe wurde die Zellsuspension in ein Falconröhrchen gegeben und für 15 Minuten bei 900 U/min, 460 g, RT zentrifugiert. Dann konnte der Überstand abgenommen werden und das Zellpellet nach gründlicher Durchmischung mit 1,5 ml selbsthergestelltem Einfriermedium (40 ml RPMI 1640, 5 ml FCS 10 %, 5 ml Dimethylsulfoxid, DMSO) stabilisiert werden. Die Proben wurden bei -20° Celsius eingefroren, die weitere Verwendung für die durchflußzytometrischen Messungen sollte innerhalb eines Zeitraumes von drei Monaten erfolgen.

2.1.2 Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)

2.1.2.1 Probanden

Für die Untersuchungsreihe dieser Arbeit mit lymphoblastoiden Zellen wurden tiefgefrorene Proben aus der Zellbank des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg genutzt. Anhand den Einträgen des dazugehörigen Verwaltungsprogramms konnte die Lokalisation der Proben in der Zellbank leicht ermittelt werden und die entsprechenden Zellproben aufgetaut werden. Nicht benötigtes Zellmaterial für die Zellkulturen ist zurückgeführt worden.

2.1.2.2 Vorbereitung der lymphoblastoiden Zellen für die Zellkultur

Die erforderlichen Zellen in Einfriercaps mit 2 ml Gesamtvolumen wurden den Behältern mit flüssigem Stickstoff entnommen und rasch in einem Wasserbad mit 37° Celsius aufgetaut. Die Übernahme erfolgte in sterile, mit angewärmten 8 ml RPMI 1640 Komplettmedium gefüllte Zellkulturflaschen. Um die Vitalität der Zellen durch noch vorhandene Einfrierflüssigkeit nicht zu gefährden, musste innerhalb von 24 Stunden 9 ml Kulturmedium mit gleicher Menge frischen Mediums ausgetauscht werden. Bis zum Erreichen der erforderlichen Zellanzahl von 1 Mill./pro Kultur, schlossen sich regelmäßige lichtmikroskopische Vitalitätskontrollen und Medienwechsel der Kulturflüssigkeit an. Die Zellgesamtanzahl wurde durch Auszählung in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt.

Bei den Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen ließ sich ein Absterben der Zellen aufgrund der raschen Proliferation häufig nur durch Verwerfen von Zellsuspension oder eine teilweise Übernahme in neue Kulturflaschen verhindern.

2.1.2.3 Kultivierung

Für die Kulturen sind die Zellen mit einer Dichte von 1 Mill./Zellen eingesät worden. Dazu ist ein Teil der Suspension nach vorheriger Durchmischung den Kulturflaschen entnommen worden und unter Verwendung der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Gesamtanzahl der Zellen berechnet worden.

Unter Lichtschutz erfolgte die Zugabe von 10^{-4} M (0,1 ml) 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), 10^{-4} M (0,1 ml) 2'-Deoxycytidin (DC) und 10^{-5} M (0,02 ml) alpha-Thioglycerol (α -TG). Die Ansätze wurden dann bis zu einer Gesamtmenge von 10 ml pro Kulturflasche mit RPMI 1640 Komplettmedium substituiert. Die lichtgeschützt verpackten Kulturen sind dann für 48 Stunden bei 37,5° Celsius, 5 % CO₂-Anteil der Umgebung inkubiert worden. Es wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen für Mitomycin C² zugegeben.

2.1.2.4 Zellernte

Nach der Entnahme der Kulturflaschen aus dem Brutschrank wurde die enthaltene Zellsuspension unter Vermeidung direkten Lichteinfalls in ein neues Falconröhrchen pipettiert. Diese wurde anschließend für 15 Minuten bei 900 U/min, 460 g, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und das gewonnene Zellpellet mit 1,5 ml Einfriermedium (40 ml RPMI 1640, 5 ml FCS 10%, 5 ml Dimethylsulfoxid, DMSO) resuspendiert und anschließend bei -20° Celsius eingefroren. Die weitere Verwendung der Proben erfolgte innerhalb eines Zeitraumes von drei Monaten.

2.1.3 Zellkulturen mit humanen Fibroblasten

2.1.3.1 Probanden

Für die Darstellung von Zellzykluseffekten von Mitomycin C anhand von Fibroblastenkulturen wurden tiefgefrorene Zellproben aus der Zellbank des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg genutzt.

2.1.3.2 Vorbereitung der Fibroblasten für die Zellkultur

Nach der Entnahme der Zellproben aus den Behältern mit flüssigem Stickstoff wurden die Einfriercaps sofort in ein vorbereitetes Wasserbad mit 37° Grad gegeben, um ein rasches Auftauen zu ermöglichen. Die Zellsuspension ist dann aufgeteilt in je zwei kleine Zellkulturflaschen (T 25), mit 8 ml angewärmtem MEM Medium (16 % FKS ; hitzeinaktiviert)

² Angabe der MMC Konzentrationen in Abschnitt 2.2

gegeben worden. Die Proben wurden unter 5 % CO₂ Anteil der Atmosphäre und bei einer Temperatur von 37,5° Celsius im Brutschrank aufbewahrt.

Nach 18 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel unter Austausch von 8 ml MEM Medium, um den Anteil des vorhandenen Einfriermediums weiter zu reduzieren und die Vitalität der Zellen zu erhalten. Weitere Wechsel des Mediums wurden dann alle drei bis vier Tage durchgeführt.

Es folgten lichtmikroskopische Kontrollen der Zellvitalität.

2.1.3.3 Kultivierung

Für die Zellkulturen mussten die am Boden der Flaschen anhaftenden Zellen abgelöst werden.

Bei Konfluenz der Zellen ist dazu das gesamte Medium abgenommen worden und zunächst eine kurze Spülung mit 2 ml PBS-Trypsin-Gemisch (selbsthergestellte Gebrauchslösung; 90 ml PBS; 10 ml Trypsin EDTA) erfolgt, die endgültige Ablösung der Zellen wurde dann mit 4ml des Gemisches bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten im Brutschrank durchgeführt.

Anschließend ist die lytische Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 0,5 ml Medium-Serumgemisch gestoppt worden.

Um Einzelzellen zu erhalten wurden die Behältnisse mehrfach gut durchgespült und die Zellsuspension gleichmäßig verteilt in neue Zellkulturflaschen (T 80) eingesät. Die Kulturlösung wurde nach erfolgter erneuter Anheftung der Zellen am Flaschenboden innerhalb von 24 Stunden ausgetauscht.

Für die Synchronisation der Zellen wurde bei Wiedererreichen der Konfluenz das Medium entfernt und die Zellen unter Zugabe von MEM ohne Serumanteil, für 48 Stunden bei 37,5° Celsius, 5 % CO₂-Anteil der Umgebung inkubiert.

Danach konnten die synchronisierten Zellen mit PBS-Trypsin-Gemisch abgelöst werden. Sie wurden dann unter Berücksichtigung einer Zelldichte von 0,4 Millionen Zellen pro Flasche, 4×10^3 Zellen/cm² auf fünf Zellkulturflaschen (T 80) verteilt.

Nach weiteren 18 Stunden erfolgte unter lichtgeschützten Bedingungen die Ansätze der Zellkulturen jeweils mit Zugabe von 10⁻⁴ M (0,08 ml) 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), 10⁻⁴ M (0,08 ml) 2'-Deoxyuridin (DC) und 10⁻² M (0,016 ml) alpha-Thioglycerol (α-TG). Aufgefüllt wurde bis zu einer Gesamtmenge von 10 ml mit MEM Medium (16 % FKS; hitzeinaktiviert). Die einzelnen Kulturflaschen wurden mit Aluminiumfolie umwickelt und für 72 Stunden bei 37,5° Celsius, 5 % CO₂ inkubiert. Die Kulturen wurden für Mitomycin C in unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt.

2.1.3.4 Zellernte

Die Ernte der Zellen erfolgte unter Lichtschutz und bei sterilen Bedingungen.

Wiederum mussten die anhaftenden Zellen abgelöst werden. Dazu wurde das gesamte Medium vorsichtig abgenommen und die Flaschen mit 4 ml PBS kurz gespült und dann unter Zugabe von 4 ml PBS-Trypsin-Gemisch für 5 Minuten bei 37,5°Celsius inkubiert.

Danach konnten die losgelösten Fibroblasten mit 1ml Medium-Serumgemisch in Falconröhrchen gegeben werden.

Die Übernahme des Pellets in 1 ml Einfriermedium (40 ml MEM, 5 ml FCS 10 %, 5 ml Dimethylsulfoxid, DMSO) erfolgte nach Zentrifugation bei 800 U/min, 15 min, RT. Bis zu den durchflußzytometrischen Messungen wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.2 Applikation von Mitomycin C

Um die konzentrationsabhängigen Zellzykluseffekte von Mitomycin C (MMC) beurteilen zu können, erhielt jede Versuchsreihe von peripheren menschlichen Blutlymphozyten eines Probanden eine Standardzellkultur, sowie in aufsteigender Konzentration Kulturen mit 5 ng/ml, 10 ng/ml und 50 ng/ml Mitomycin C (MMC). Ansätze mit lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten wurden zusätzlich mit 100 ng/ml Mitomycin C inkubiert. Die Zugabe von Mitomycin C (MMC) erfolgte dabei jeweils zu Beginn der Zellkulturen (Zeitpunkt 0 Stunden).

2.3 Durchflußzytometrische Messverfahren

2.3.1 Einführung in Messtechniken und Messprinzip

Die Durchflußzytometrie ist ein Verfahren zur Beurteilung von Partikeln in einer wässrigen Suspension (Raffael A. 1994). Es ermöglicht die Messung von Einzelzellen, Zellkernen, Bakterien, daneben sind multiple Merkmale von Zellpopulationen darstellbar. Die Partikel werden nach dem Verfahren der hydrodynamischen Fokussierung perlschnurartig hintereinander aufgereiht und durch einen Lichtstrahl geführt. Als Lichtquellen werden dabei häufig Argon (primäre Wellenlängen bei 488 nm/blau und 514,5 nm/grün) und Kryptonlaser (primäre Wellenlänge bei 647,1 nm/rot) verwendet. Innerhalb des Kreuzungspunktes zwischen Licht und Zellen entsteht Streulicht, welches aus verschiedenen Positionen ausgewertet wird und somit in Abhängigkeit der Wellenlänge des Lichtes, der emittierten Fluoreszenz und Beschaffenheit der Teilchen unterschiedliche Eigenschaften wiedergeben kann. Über Bandpassfilter wird die einfallende Strahlung innerhalb eines bestimmten Spektralbereiches bestimmt und die übrige Strahlung gesperrt. Bei den Fluoreszenzmessungen mit direkter Färbung oder mit fluoreszierenden Antikörpern ist es notwendig, dass die verwendeten Fluorochrome innerhalb des

Absorptionsmaximums der Lichtquelle liegen. Über den Photomultiplier werden die Photonen in Elektronen umgewandelt und die Signale verstärkt. Mit den gewonnenen Informationen ist es dem System dann möglich, Partikelgröße, Dichte, Granularität und in Abhängigkeit der verwendeten Fluoreszenzfärbung Zellzyklusanalysen über DNA-Gehalt und fluoreszenzbasierende Proteinanalysen durchzuführen (Robinson 1993). Meistens werden bei Messungen mehrere Parameter gleichzeitig bestimmt. Eine Übersicht über einige bei der Durchflusszytometrie verwendete Messparameter kann aus Tabelle 3 entnommen werden.

| Messparameter | Abk. | Wellenlänge | Eigenschaften |
|-----------------------------|-------------|----------------------|---|
| Volumen | VOL | Widerstandsänderung | Zellvolumen |
| Axialer Lichtverlust | AXL | Anregungswellenlänge | Zellgröße |
| Vorwärtsstreulicht | FSC | Anregungswellenlänge | Zellgröße |
| Seitwärtsstreulicht | SSC | Anregungswellenlänge | Granularität |
| Blaufluoreszenz | | 350/480 nm | DAPI, INDO, mit Anregung durch UV-Laser oder Quecksilberlampe |
| Grünfluoreszenz | FL 1 | 488/530 nm | Fluoreszein, Thiazolorange, R123 |
| Orangefluoreszenz | FL 2 | 488/575 nm | Phycoerythrin, Propidiumjodid |
| Rotfluoreszenz | FL 3 | 488/630 nm | Phycoerythrin-Cyanin5, PerCP, Propidiumjodid, LDS 751, 7-AAD |
| Tiefrotfluoreszenz | FL 4 | 488/670 nm | Allophycocyanin |

Tabelle 3: Messparameter in der Durchflusszytometrie

Für die Auswertung bei Zellzyklusanalysen über den DNA-Gehalt und Ploidiebestimmungen ist durch den unterschiedlichen Chromosomensatz eine lineare Verstärkung notwendig. Die graphische Darstellung der Messwerte erfolgt anhand von Histogrammen, Zytogrammen, Dot Plots und Punktwolken. Über eine elektronische Eingrenzung (Gate) einzelner Regionen können innerhalb heterogener Gemische einzelne Zellpopulationen unterschieden werden. Die Datenanalyse erfolgt dabei anhand von einfachen parametrischen Methoden oder durch komplexere nichtparametrische Verfahren (Dean 1985). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die wesentlichen Bauteile eines Durchflusszytometers.

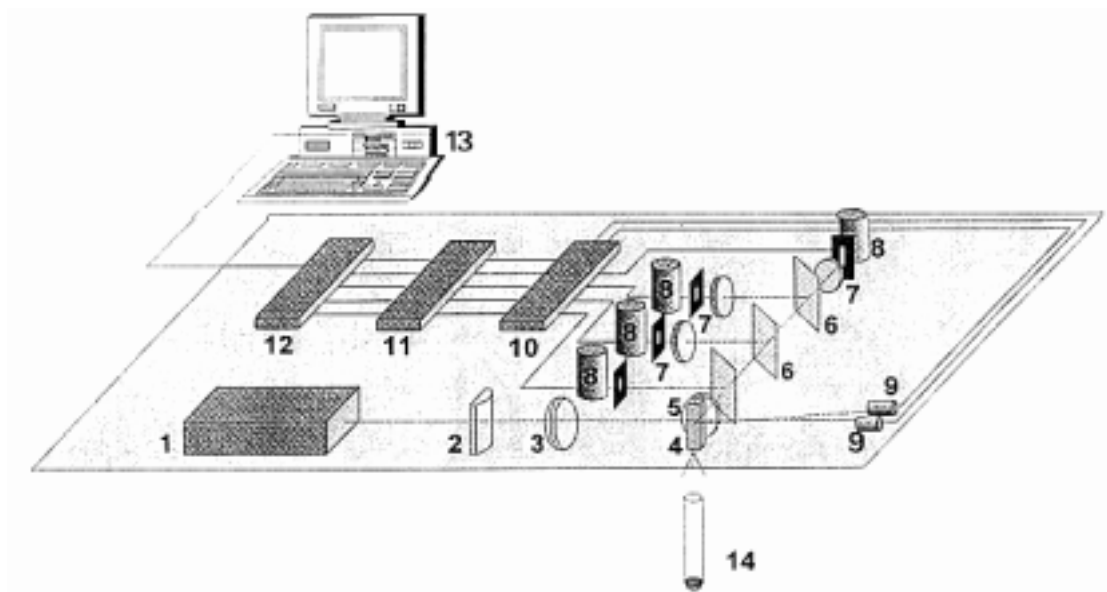


Abbildung 2 (Raffael A. 1994): Aufbau eines Flowzytometers. Die zu analysierende Probe (14) wird über eine Saugvorrichtung dem Messpunkt (4) zugeführt. Lichtquelle ist meist ein Laser (1), wegen der guten Kohärenz, der Enge und Gleichförmigkeit des Farbspektrums. Das über einem Mikroskopobjektiv (5) eingesammelte Fluoreszenzlicht wird über verschiedene Teilerspiegel (6) und FarbfILTER / Bandpassfilter (7) in seine spektralen Bestandteile zerlegt. Die Größe des Beobachtungsfeldes wird über eine Lochblende vor dem Messwandler (8) bestimmt. Mit dem Photomultiplier (8) und Photodioden (9) erfolgt die Umwandlung des Lichtes (Photonen) in elektrischen Strom (Elektronen). Anschließend erfolgt eine Umwandlung in Spannungen (10), eine Verstärkung (11) sowie eine Digitalisierung (12) mit dem Analog-Digital-Wandler, mit meist 256 oder 1024 Kanälen (Auflösungen).

2.3.2 Zweidimensionale Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidumbromidverfahren

Zur Bestimmung des Anteils proliferierender Zellen innerhalb von Zellzyklusphasen wurde für diese Arbeit das BrdU/Hoechst 33258-Ethidumbromidverfahren genutzt. Die Methode erlaubt eine Darstellung des replikativen Verhaltens von Zellen innerhalb einzelner Zellzyklen (Rabinovitch, Kubbies et al. 1988). Grundlage ist der Einbau des Thymidin Basenanalogons Bromdesoxyuridin in die DNA während der DNA-Replikation. Der Nachweis erfolgt über eine Doppelfärbung der DNA mit den Fluorochromen Ethidumbromid (Anregungsmaximum bei 500 nm, Emissionsmaximum bei 610 nm) und Hoechst 33258 (Anregungsmaximum bei 350 nm, Emissionsmaximum bei 460 nm). Dabei wird die Fluoreszenz von Hoechst 33258 durch die Anwesenheit des Bromatoms reduziert (Bohmer und Ellwart 1981) (Qench Effekt). Mit dem gering BrdU sensitiven Ethidumbromid wird bei den zweidimensionalen Messungen eine Verbesserung des Auflösungsvermögens erreicht, die Anregung des interkalierenden Farbstoffes erfolgt dabei über die Lichtemission von Hoechst 33258 durch indirekten Energietransfer. Mit der zweidimensionalen Durchflusszytometrie kann dabei zwischen proliferierenden und nichtproliferierenden Zellen (Ellwart, Stunkel et al. 1981) unterschieden werden und Verteilungen der Zellen in bis zu vier Zellzyklusphasen mit quantitativer Analyse der Populationen während der G0-G1-, G1-, S- und G2-Phasen erfasst werden (Kubbies 1989). Sie ist daneben ein geeignetes

Verfahren zur zellkinetischen Analyse von Hemmstoffen, Zellzykluszeiten und Arrestfraktionen einzelner Zellzykluskompartimente (Seyschab, Sun et al. 1993). Für den Erfolg der Methode ist die Höhe des Quencheffektes entscheidend, dieser kann durch verschiedene biologische, chemische und physikalische Faktoren beeinflusst werden (Kubbies und Rabinovitch 1983). Einen Überblick über Faktoren, welche den Quencheffekt beeinflussen können wird in Tabelle 4 gezeigt.

| Faktor | Optimierung | Effekt |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Zelldichte | 2×10^5 Zellen/ml | BrdU Mediumdepletion |
| BrdU Konzentration/Zellart | 1×10^{-4} M | Zytotoxizität |
| Hoechst 33258 | 1,2 µg/ml | Energietransfer |
| Inkubation/Temperatur | 4°C | Zellzerfall |
| NP 40 Konzentration | < 0,1 % | Kerndesintegration/Zellverklumpung |
| Puffer/ ph-Wert | < 8,5 | Fluoreszenzemission |

Tabelle 4: Beeinflussung des Quencheffektes

Neben der Bestimmung synchron wachsender Zellsysteme erlaubt die zweidimensionale Zellzyklusanalyse nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren auch eine Analyse asynchroner Zellpopulationen (Ormerod und Kubbies 1992).

2.3.3 Versuchsansatz

Für die durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen wurden die tiefgefrorenen Proben im Wasserbad bei RT langsam aufgetaut und für fünf Minuten bei 900 U/min (460 g) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1,2 µg/ml Hoechst 33258 in DNA Fluorochromosierungspuffer (0,1 M Tris, ph 7,4, 0,154 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,1 % Non-idet P40, 0,2 % BSA, Bovine Serum Albumin) für 15 Minuten bei 4°C resuspendiert. Nach der Inkubation mit 1,5 µg/ml Ethidiumbromid (Endkonzentration im Färbepuffer) für ebenfalls 15 Minuten, erfolgten die Messungen innerhalb von acht Stunden. Alle Arbeitsschritte wurden aufgrund der Lichtsensivität der BrdU-inkubierten Zellen unter Lichtschutz durchgeführt.

2.3.4 Messdurchführung und Messgerät

2.3.4.1 Particle Analysing System (PAS,1999)

Die durchflußzytometrischen Messungen mit Zellproben von peripheren menschlichen Blutlymphozyten, lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und den menschlichen Fibroblasten sind mit dem Durchflußzytometer Particle Analysing System PAS (Modell Galaxy, 1999), Firma Dako durchgeführt worden. In Abbildung 3 ist das Messgerät dargestellt.



Partec Particle Analysing System PAS

Fully equipped multiparameter benchtop analyser with argon ion laser (488 nm), red diode laser (635 nm) and mercury arc lamp (UV). 1 to 8 optical parameters and dual wavelength excitation. For all routine and research applications in flow cytometry.

Optional operation with the Partec Cell Sorter and the Partec Robby®. Partec FloMax® software on Windows™ operating system.

Abbildung 3 (Catalogue 2001-2002): Particle Analysing System PAS (Modell Galaxy, 1999).

Als Lichtquellen verfügt das Gerät neben einer Quecksilberhochdrucklampe HBO (Mercury lamp HBO long life, mit 100 W) auch über einen Argonlaser (Air-cooled argon ion laser, 488 nm, 20 mW).

Für die quantitative Erfassung der fluoreszierenden DNA wurde folgende Filterkombination verwendet:

| | | |
|------------------|---------------------|-----------------------------|
| Anregungsfilter: | Farbteiler FT 450 | 50% Transmission 450 nm |
| | UV-Glasfilter UG1 | 50% Transmission 350 nm |
| | Buntglasfilter BG38 | 50% Transmission 380 nm |
| Sperrfilter: | Farbteiler FT 510 | 50% Transmission 490 nm |
| | Bandpass K45 | 50% Transmission 438-485 nm |
| Spiegel: | Bandpass K65 | 50% Transmission 620-680 nm |

Mit dem Particle Analysing System PAS ist es möglich bis zu 8 Parameter optisch darzustellen (FSC, SSC, und FL1 - FL6). Das Durchflußzytometer verfügt über einen eingebauten Pentium III Mikrocomputer mit 128 MB RAM und der Software Flow Max® für die Erfassung, Aufnahme und Speicherung der Messdaten.

2.3.4.2 Durchflusszytometrische Probenanalyse

Bevor mit der durchflußzytometrischen Analyse der Proben begonnen werden konnte, mussten die Zellsuspensionen nach der Färbung mit einer Pipette gründlich durchmischt werden.

Als Ansaugvorrichtung für die Zellen der zu analysierenden Proben diente ein Hüllstrom mit schnellfließendem Aqua dest., welcher die Zellen perlschnurartig aneinander reihte (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung). Für jede Messung wurden etwa 1000 Ereignisse/Sekunde aufgezeichnet. Dabei konnten die Messungen auf einem eingebauten 15" TFT Monitor beobachtet werden. Auf dem Bildschirm stellten sich die Fluoreszenzen als zweidimensionale Punktwolke mit Abbildung der Hoechst 33258 Fluoreszenz auf der x-Achse und der Ethidiumbromidfluoreszenz auf der y-Achse dar. Die Datenfiles wurden mit der Software Flow Max® aufgenommen und auf der Festplatte des Personalcomputers abgespeichert.

2.3.4.3 Zellzyklusdarstellung anhand zweidimensionaler BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Zytogramme menschlicher peripherer Blutlymphozyten

Abbildung 4 zeigt die Sequenz von zweidimensionalen Zytogrammen menschlicher peripherer Blutlymphozyten, wie sie bei durchflußzytometrischen Messungen mit dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren gewonnen werden können. Im Unterschied zu den weiteren in dieser Arbeit dargestellten Zytogrammen wird hier der zeitliche Verlauf von Zellaktivierung und Zellzyklusprogression un behandelter humaner peripherer Blutlymphozyten dargestellt. Die Zellkulturen mussten dazu sequentiell geerntet werden. Die genauen Zeitpunkte wurden durch Vorversuche ermittelt.

Mit dem Mitogen Phytohämagglutinin stimulierte humane Blutlymphozyten befinden sich physiologischerweise für 24-30 Stunden im Ruhezustand (G₀-Phase), bevor die ersten Zellen zu proliferieren beginnen (Bild A). Innerhalb von 35 Stunden verlassen die ersten Zellen die G₀-G₁ Phase und treten in die S-Phase ein (Bild B). Die Zellen sind dabei als Signale zu erkennen, welche von Mitte des rechten Bildrandes nach links oben verlaufen. Dies entspricht der proportionalen Zunahme der Ethidiumbromidfluoreszenz auf der Ordinate und der Abnahme der Hoechst 33258-Fluoreszenz auf der Abszisse durch die Reduktion mit dem inkorporierten BrdU. Mit Erreichen der G₂-Phase, etwa in der Mitte des dritten Bildes, und nach Durchlaufen der Mitose endet der erste Zellzyklus (die Mitosephase, M-Phase ist hierbei in der G₂-Phase enthalten). Entsprechend dem DNA-Gehalt bei der Zellteilung halbieren sich auch die Fluoreszenzen der beiden Farbstoffe.

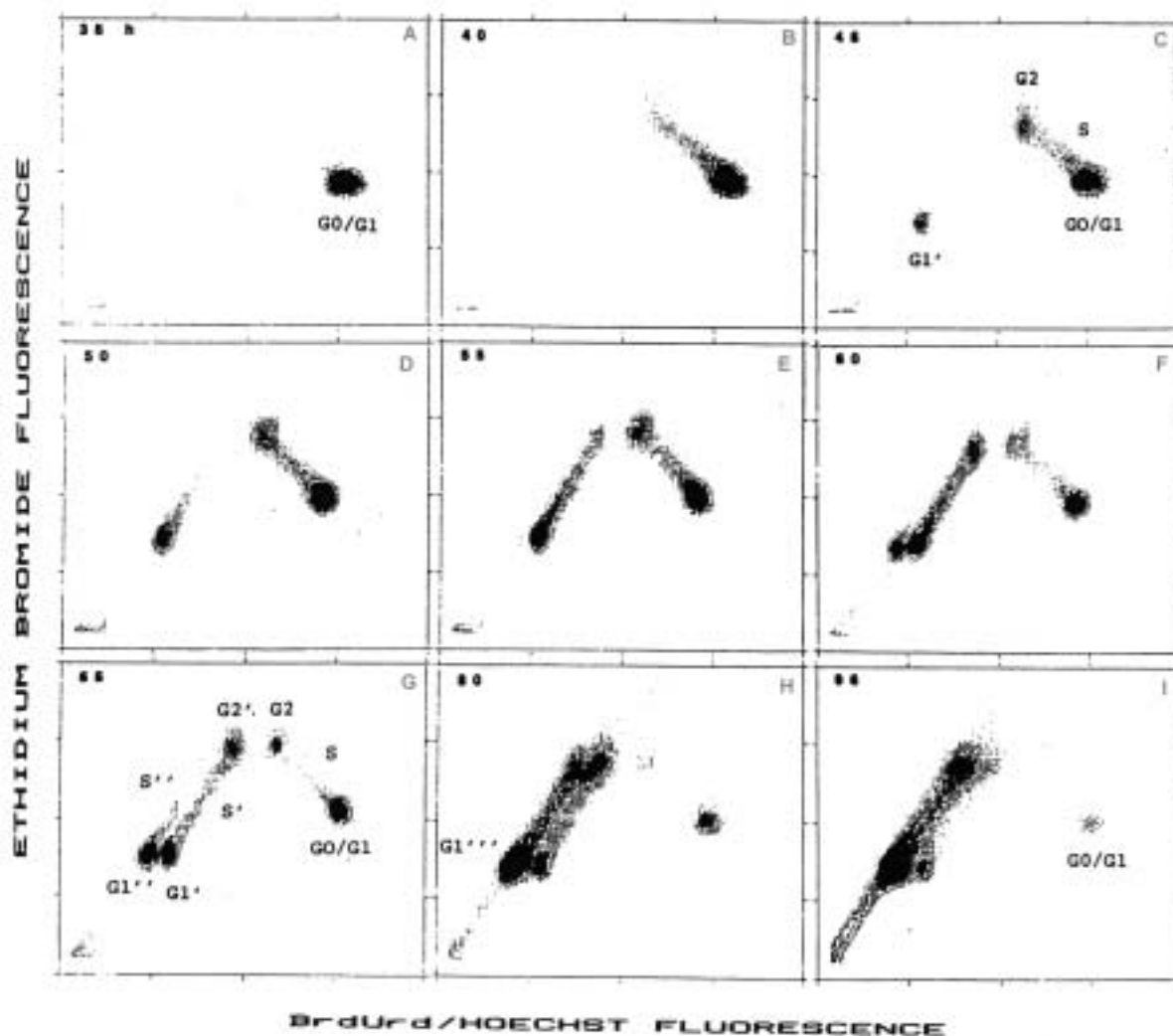


Abbildung 4 (Seyschab 1992): Zweidimensionale Zytogramme von PHA-stimulierten humanen peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Probanden. Die Abszisse zeigt die BrdU-Hoechst 33258 Fluoreszenz (gequench), die Ordinate gibt die Fluoreszenzintensität des Ethidiumbromids (ungequench) wider. Die einzelnen Kompartimente der Zellzyklen sind in ausgewählten Zytogrammen beschriftet. G0-G1, S und G2 stellt die Phasen des ersten Zellzyklus dar. G1', S' und G2' die des zweiten Zellzyklus, G1'', S'' und G2'' des dritten Zellzyklus. G1''' ist die G1-Phase des vierten Zellzyklus. Weitere Erläuterung erfolgen im Text.

Der zweite Zellzyklus beginnt mit der G1'-Phase im linken unteren Bildrand von Bild C. Es schließt sich die S-Phase an (Bild D). Die Zellen wandern dabei in Richtung der Bildmitte, auf die G2-Phase des ersten Zellzyklus zu (Bild E). Der aufeinanderzulaufende Verlauf erklärt sich durch die bifiliäre Substitution der DNA mit dem Thymidinanalogon BrdU während des zweiten Zellzyklus. Die Folge ist eine verminderte Reduktion im Vergleich zum ersten Zellzyklus, bei dem in nur einem DNA-Strang BrdU eingebaut wird.

Bild 6 zeigt den Beginn des dritten Zellzyklus nach erfolgter Zellteilung. Die G1''-Phase erscheint links neben G1'. Die anschließende S''- und G2''-Phasen verlaufen parallel des zweiten Zellzyklus (Bild F und G).

Bei Zellkulturen mit peripheren menschlichen Blutlymphozyten über eine Dauer von mehr als 72 Stunden erscheint der vierte Zellzyklus entsprechend links des dritten Zellzyklus (Bild H und I).

Mit der Software MULTI2D für die Auswertung der Zellzyklen ist dabei noch eine klare Abgrenzung gegenüber den anderen Zyklen möglich.

Zellkerndetritus mit unphysiologisch gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen stellt sich innerhalb der Zytogrammen als Spuren vom linken unteren Bildrand in Richtung der G1-Phasen dar (Kubbies 1990).

2.3.5 Analyse der Zellzyklen mit der Software MULTI2D, MCYCLE und 2DAGE

Für die Analyse der bei den Messungen gewonnenen zweidimensionalen BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid Zytogramme mussten deren Fluoreszenzen den jeweiligen Zyklen und Phasen zugeordnet werden.

Dazu wurde jeder Zyklus mit dem mausgesteuerten Softwareprogramm MULTI2D (Rabinovitch, Phoenix Flow Systems, San Diego, USA) eingegrenzt und auf eine der Hauptwachstumsrichtung parallele Achse projiziert. Die so entstandenen eindimensionalen Histogramme bilden Verteilungskurven der einzelnen Zellzyklusphasen.

Um die prozentuale Verteilung der Zellen innerhalb der G1, S und G2 Phasen berechnen zu können (Zellzyklusanalyse-Modell von Dean und Jett, 1974, modifiziert nach Rabinovitch P.S.; 1983 mit iterativer polynomer S-Phasenannäherung) mussten die Datenfiles mit dem Softwareprogramm MCYCLE (Rabinovitch, Phoenix Flow Systems, San Diego, USA) weiter ausgewertet werden. Mit Hilfe des Softwareprogramms 2DAGE (Friedl, R., Universität Würzburg) konnten, unter Berücksichtigung der Zellzahlen aus MULTI2D und der Zellzyklusanteile aus MCYCLE, die prozentualen Verteilungen der Zellzyklen auf die ursprünglich eingesäten Zellpopulationen (Original Data) zurückgerechnet werden.

Diese Daten erhielten dann die Informationen über den prozentualen Anteil (% Originalzellen) der Zellen innerhalb der G0-G1, G1, S und G2 Phasen des ersten bis vierten Zellzyklus. Sie bildeten die Grundlage für die statistische Analysen dieser Arbeit, da sie einen direkten Vergleich der Zellzyklen einzelner Probanden untereinander ermöglichten.

Neben den **G0-G1, G1-, S- und G2-Phasenanteilen** wurden für die Datenanalyse weitere Parameter genutzt:

- **Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF):**

prozentualer Anteil der Zellen (% Originalzellen), welche die G0-G1 Phase verlassen hat und in den Zellzyklus eingetreten sind (100 minus $G0-G1$ oder $\Sigma G1'+G1''+G1''' + S+S'+S''+S''' + G2+G2'+G2''+G2'''$).

- **Proliferationskapazität (Percent Increased Cells):**

$$\text{Percent Increased Cells} = \frac{\sum_{i=1}^4 N_i}{N_1 + \frac{N_2}{2} + \frac{N_3}{4} + \frac{N_4}{8}} \times 100,$$

mit N_i = Zellzahl pro Zellzyklus (Anzahl der Plot-Zellen des jeweiligen Zellzyklus)(Kubbies 1990).

- **Summe G2 Phasen durch Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$):**

Quotient aus der Summe der G2-Phasen und der Wachstumsfraktion / Growth Fraction, wobei GF dem prozentualen Anteil der proliferierenden Zellen innerhalb der Zellzyklusphasen nach Austreten aus der G0-G1 Phase des ersten Zellzyklus entspricht (100 minus G0-G1).

Die Zunahme der G2-Phasen für verschiedene Konzentrationen von Mitomycin C ist durch die beiden nachstehende Variablen ausgedrückt:

- **Zunahme der G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus durch Wachstumsfraktion ($G2+G2'/GF$):**

$$G2+G2'/GF(k) = \frac{\sum_{i=1}^2 G2_i(k)}{GF(k)} - \frac{\sum_{i=1}^2 G2_i(0)}{GF(0)}, \text{ mit } k \in \{5,10,50,100\}, i = \text{Zellzyklus } (i = 1,2)$$

(Differenz aus dem Quotient der Summe der G2 Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus und Wachstumsfraktion mit höherer Mitomycin C Konzentration und Quotient der Summe der G2 Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus und Wachstumsfraktion der niedrigeren Mitomycin C Konzentration).

- **Zunahme der G2-Phasen während aller Zellzyklen durch Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$):**

$$\Sigma G2/GF(k) = \frac{\sum_{i=1}^4 G2_i(k)}{GF(k)} - \frac{\sum_{i=1}^4 G2_i(0)}{GF(0)}, \text{ mit } k \in \{5,10,50,100\}, i = \text{Zellzyklus } (i = 1 - 4)$$

(Differenz aus dem Quotient der Summe der G2-Phasen aller Zellzyklen und Wachstumsfraktion höherer Mitomycin C Konzentration und Quotient der Summe G2-Phasen aller Zellzyklen und Wachstumsfraktion der niedrigeren Mitomycin C Konzentration).

2.3.6 Graphische Aufarbeitung

Da die bei den Zellzyklusanalysen gewonnenen Abbildungen nicht weiter aufgearbeitet werden konnten, wurde der bei den Messungen gewonnene binäre Datensatz in ein graphisches Datenformat (bmp) umgewandelt.

Dazu wurden die vorliegenden Daten zunächst mit einem modifizierten binären Filterprogramm (worksheet), das in die Zwischenablage der Software Origin (Microcal TM Origin®, Version 6,0, 1991-1999) kopiert wurde, ausgelesen und anschließend im ASCII Format abgespeichert. Im

nächsten Schritt wurden die Befehlszeilen des Kopfes der umgewandelten Dateien den Anforderungen des Graphikprogramms angepasst (DSAA) und einer entsprechenden Matrix zugeordnet, mit Kanalzahl (x, y-Achse) und Intensität der emittierten Fluoreszenzen (z-Level). Anschließend konnten die transformierten Daten mit der graphischen Software Surface Mapping System (Surfer, Golden Software Inc., Version 7.0, 1993-1999) weiterverarbeitet werden. Die erstellten Abbildungen wurden dann im Bitmap (bmp) Dateiformat abgespeichert.

In den zweidimensionalen und dreidimensionalen Abbildungen konnte dabei die Bildauflösung der Graphiken über die interpolierte Wiedergabe der einzelnen Messereignisse verbessert werden. Mit den linearen Farbskalen der zweidimensionalen Abbildungen wird die Intensität der emittierten Fluoreszenzen wiedergegeben, nicht die Wellenlänge der Lichtemission. Für jede Zellart wurde eine standardisierte Mustervorlage der Farbskalierung entworfen und entsprechend der Stärke der Emissionen der BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Fluoreszenzen angepasst. Die dreidimensionalen Histogramme sind um 9° auf der x-Achse und 44° auf der y-Achse rotiert. Die x- und y-Achsenkalierung wurde verkürzt und gibt nun den Kanalbereich von 10 bis 118 wider (ursprünglich 0 bis 128). Die Skalierung der z-Achse ist der maximalen Anzahl der Messereignisse angepasst worden (hier 0 bis 650). Der Messbereich konnte dabei aufgrund der Vorgabe des ursprünglichen binären Datensatzes innerhalb eines Bereiches von 0 bis 1000 liegen.

Abbildung 6 zeigt die farbliche zweidimensionale (Bild A) und dreidimensionale (Bild B) Darstellung von Zellzyklen einer Standardzellkultur mit peripheren Blutlymphozyten einer gesunden Kontrollperson. Auf der Ordinate ist die Ethidiumbromidfluoreszenz, auf der Abszisse die BrdU/Hoechst 33258-Fluoreszenz, jeweils in Abhängigkeit der Kanalzahl aufgetragen. Die Beschriftung des zweidimensionalen Zytogramms entspricht den Bezeichnungen in Abbildung 4. Die Zellzyklen des dreidimensionalen Histogramms sind für den ersten Zyklus mit G0-G1 und G2, den zweiten Zyklus mit G1` bis G2` und den dritten Zyklus mit G1`` bis G2`` gekennzeichnet. In Abbildung 7 sind zweidimensionale (Bild A) und dreidimensionale (Bild B) Zytogramme von Zellzyklen einer Standardzellkultur mit peripheren Blutlymphozyten eines Fanconi-Anämie Patienten dargestellt. Im Gegensatz zu den beiden Abbildungen der Kontrollperson treten bei Fanconi-Anämie die G2-Phasenanteile deutlicher hervor. Die hier dargestellten zweidimensionalen Zytogramme von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten sind in den Abschnitten 3.2.1.1.1 (Kontrollen) und 3.2.1.1.2 (Fanconi-Anämie) näher erläutert.

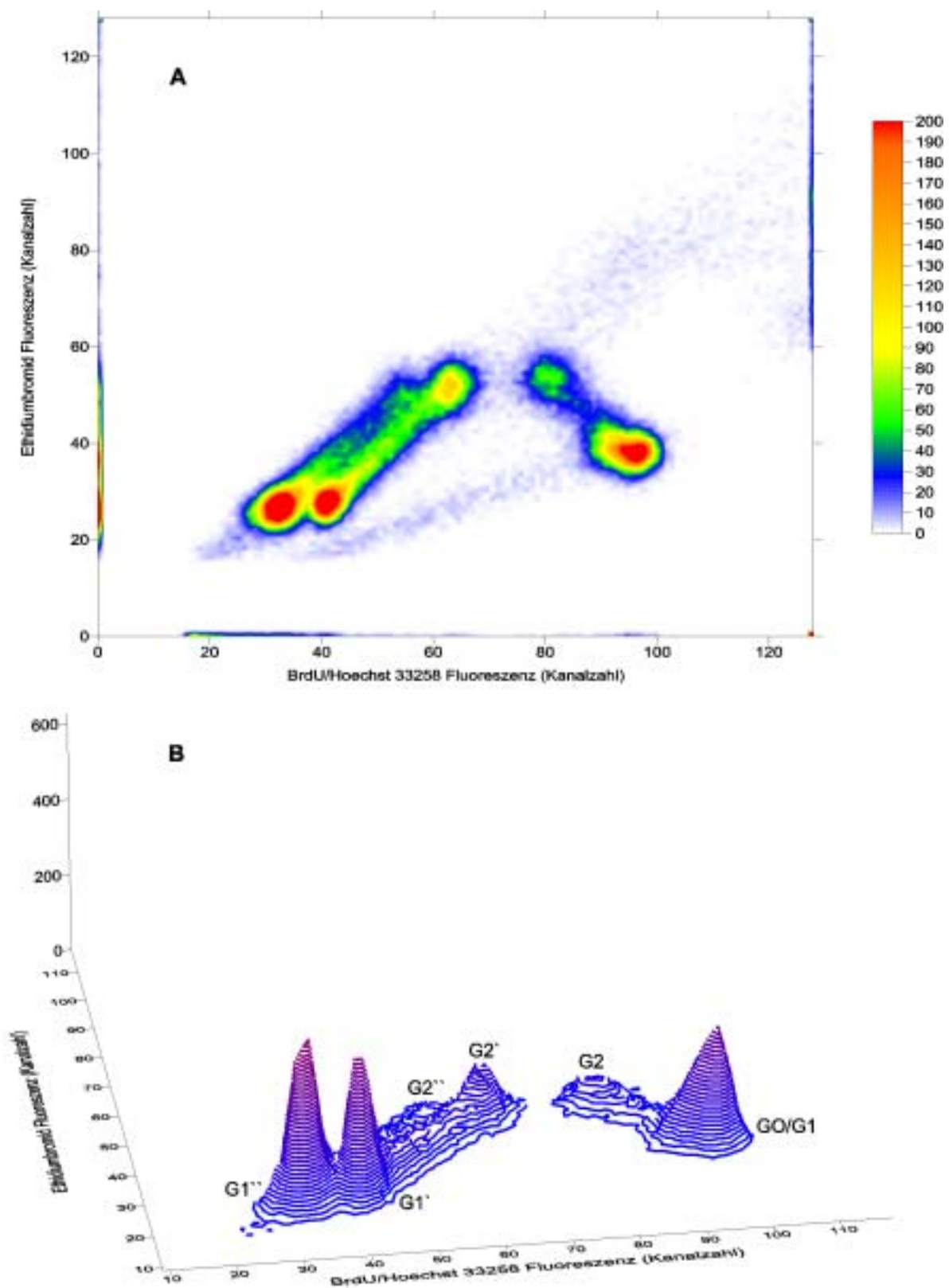


Abbildung 5: Zweidimensionale (A) und dreidimensionale (B) Darstellung der Zellzyklen einer Standardzellkultur mit peripheren Blutlymphozyten einer gesunden Kontrollperson. Auf der x-Achse ist in Abhängigkeit der Kanalzahl die BrdU/Hoechst 33258 Fluoreszenz dargestellt, auf der y-Achse die Ethidiumbromid Fluoreszenz. Die lineare Farbskala der Abbildung A gibt die Intensität der emittierten Fluoreszenzen wider, nicht deren Wellenlänge. In Abbildung B ist der x und y Achsenbereich von 10 bis 118 (Kanalzahl) verkürzt dargestellt. Die Zellzyklen sind für den ersten Zyklus mit G0-G1 und G2, den zweiten Zyklus mit G1' bis G2' und den dritten Zyklus mit G1'' bis G2'' beschriftet.

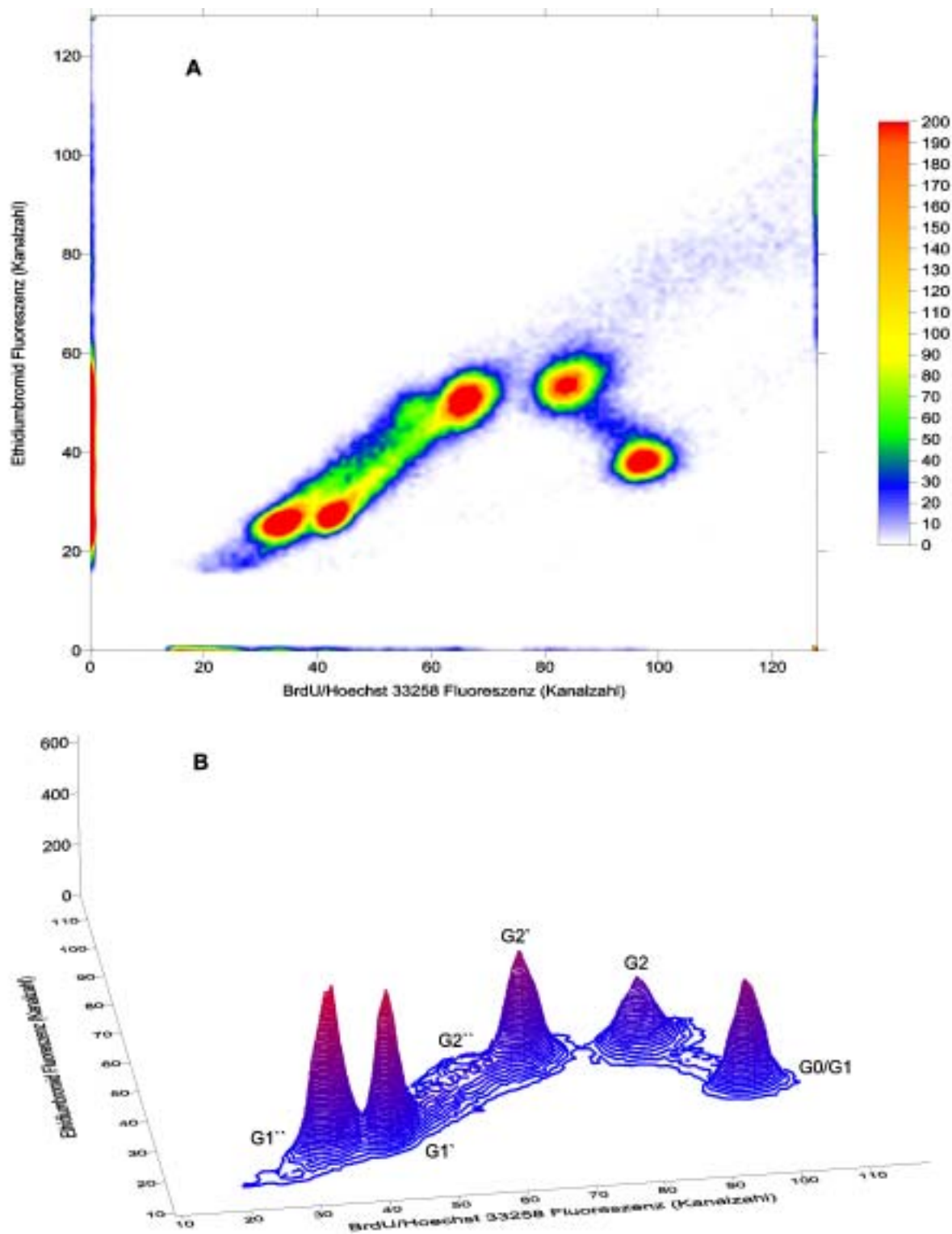


Abbildung 6: Zweidimensionale (A) und dreidimensionale (B) Darstellung von Zellzyklen einer Standardzellkultur mit peripheren Blutlymphozyten eines Fanconi Anämie Patienten. Auf der x-Achse ist in Abhängigkeit der Kanalzahl die BrdU/Hoechst 33258 Fluoreszenz dargestellt, auf der y-Achse die Ethidiumbromid Fluoreszenz. Die lineare Farbskala der Abbildung A gibt die Intensität der emittierten Fluoreszenzen wider, nicht deren Wellenlänge. In Abbildung B ist der x und y Achsenbereich von 10 bis 118 (Kanalzahl) verkürzt dargestellt. Die Zellzyklen sind für den ersten Zyklus mit G0-G1 und G2, den zweiten Zyklus mit G1' bis G2' und den dritten Zyklus mit G1'' bis G2'' beschriftet. Im Vergleich zur Abbildung 6 der Kontrollperson treten in beiden Darstellungen die G2 Phasenteile des ersten und zweiten Zellzyklus deutlicher hervor.

2.4 Statistisches Auswertungsprogramm (SPSS, Statistical Package for the Social Science)

2.4.1. Einführung

SPSS ist ein Programm für die statistische Datenanalyse.

Für den Vergleich der Messdaten sind die Windows-Versionen 8.0 bis 10.0 benutzt worden. Grundbestandteil des Programms ist das Basismodul, welches eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Datenerfassung und Datenmodifikation bietet. Darin enthalten sind Möglichkeiten für die einfache statistische Datenanalyse, t-Tests, nichtparametrische Tests und komplexere Verfahren, sowie einen Grafikteil und Tables zum Erstellen präsentationsreifer Tabellen (Bühl 1998). Das Zusatzmodul Professional Statistics erlaubt verschiedene Formen der Regressionsanalyse mit logistischer, nichtlinearer Regression, Probitanalyse, Reliabilitätsanalyse und multidimensionale Skalierung. Advanced Statistics dient der Varianzanalyse über den Ansatz des allgemeinen linearen Modells, Überlebensanalysen, inklusive der Kaplan-Meier-Methode, Cox-Regression und loglinearer, logit-loglinearer Modelle. Die einzelnen Programmbestandteile erlaubten eine übersichtliche Bearbeitung des umfangreichen Datenmaterials. Mit den Zusatzbestandteilen wurde ein Teil der Tabellen und Grafiken erstellt.

2.4.2. Datenbankerstellung anhand der Messwerte aus den Zellzyklusanalysen

Die Daten der durchflusszytometrischen Messungen von Zellkulturen mit peripheren, menschlichen Blutlymphozyten, lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und menschlichen Fibroblasten am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg sind für die statistische Datenanalyse in die Datenbank des Programms SPSS eingefügt worden. Dabei wurde im Laufe von zwei Jahren (1997 bis 1999) nahezu alle Parameter aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten erfasst. Der Anteil persönlicher Daten der Probanden wurde dabei auf Alter und Geschlecht reduziert. Die Identität der Personen wurde entsprechend der institutseigenen Nummerierung (F-Nummern) oder über eine Buchstabenkombination verschlüsselt. Kontrolluntersuchungen fanden durch einen numerischen Zusatz der Verschlüsselung ihre Berücksichtigung. Die verschiedenen Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) wurden einer ordinalen Skalierung zugeordnet, entsprechend die Altersverteilung der Probanden und die unterschiedlichen Konzentrationen von Mitomycin C. Weitere Angaben sind nicht für die statistische Datenanalyse herangezogen worden.

2.5 Gruppeneinteilung und statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erforderte die Einteilung der Probanden in Gruppen. Diese Unterteilung erfolgte unter Berücksichtigung der untersuchten Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und subkutane menschliche Fibroblasten).

Für die Zellkulturen mit menschlichen **peripheren Blutlymphozyten** bildete:

Gruppe 1 die Kontrollgruppe mit gesunden Probanden.

Gruppe 2 beinhaltet die obligat heterozygoten Patienten für Fanconi Anämie.

Gruppe 3 berücksichtigt die Patienten mit Fanconi Anämie.

Die Zellzyklusanalysen mit dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren von **lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)** wurden entsprechend obiger Einteilung zugeordnet.

Gruppe 4 entsprach den gesunden Probanden aus der Kontrollgruppe der untersuchten lymphoblastoiden Zellen (B-LCL).

Gruppe 5 beinhaltet die Zellzyklusparameter der Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen der obligat heterozygoten Probanden für Fanconi Anämie.

Gruppe 6 wurden die Patienten mit Fanconi Anämie zugeordnet.

Äquivalent für die untersuchten Zellproben von **subkutanen humanen Fibroblasten** erfolgte eine Einteilung in:

Gruppe 7 mit gesunden Versuchspersonen aus der Kontrollgruppe von Zellzyklusanalysen mit dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren von subkutanen menschlichen Fibroblasten.

Gruppe 8 erfasste die obligat heterozygoten Patienten für Fanconi Anämie.

Gruppe 9 beinhaltet die Zellzyklusparameter der Zellkulturen mit Fibroblasten von Probanden mit Fanconi Anämie.

In Tabelle 5 ist die Gruppeneinteilung für die Datenanalyse zusammengefasst.

| Zellart | Kontrollen | FaH | Fanconi |
|---------------------------------------|-------------------|------------|----------------|
| periphere Blutlymphozyten | Gruppe 1 | Gruppe 2 | Gruppe 3 |
| Lymphoblastoide Zellen (B-LCL) | Gruppe 4 | Gruppe 5 | Gruppe 6 |
| Humane Fibroblasten | Gruppe 7 | Gruppe 8 | Gruppe 9 |

Tabelle 5: Gruppeneinteilung für die statistische Datenanalyse.

Für den statistischen Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Gruppen (Abschnitt 3.6) wurde die parametrische Varianzanalyse genutzt (Analysis of Variance, ANOVA). Dabei können drei und mehr Stichproben aus normalverteilten oder fast normalverteilten Populationen analysiert werden (Hüsler und Zimmermann 1996; Faivre, Guardiola et al. 2000). Damit wurde multiples Testen mit

dem t-Test oder dem entsprechenden nichtparametrischen Test (Wilcoxon oder Mann-Whitney, U-Test) vermieden. Als Testvoraussetzung sollten Normalverteilung (oder fast normalverteilte Variablen), Unabhängigkeit der Gruppen und Varianzgleichheit vorliegen. Die Prüfung auf annähernd gleiche Varianzen wurde mit SPSS vor Testdurchführung mit dem Levene Test durchgeführt. Im vorliegenden Fall wurde aufgrund der besseren Übersicht jeweils eine zufällige Variable der verschiedenen Gruppen untersucht. Die getestete Nullhypothese lautete: Die Mittelwerte dieser zufälligen Variable sind nicht gleich. Demgegenüber wurde die Alternativhypothese formuliert: Die Mittelwerte sind gleich. Getestet wurde auf einem Signifikanzniveau mit 95 % für alle Mittelwertvergleiche. Da es sich bei der von SPSS ausgegebenen Signifikanzen p , um eine Irrtumswahrscheinlichkeit handelt, wird die Nullhypothese bei einem Signifikanzniveau von 95 % für $p > 0,05$ abgelehnt (Sicherheitswahrscheinlichkeit = $1 - \text{Irrtumswahrscheinlichkeit}$). Um die Unabhängigkeitsvorschrift des Testverfahrens für den Vergleich der konzentrationsabhängigen Zunahme der G2-Phasen zu wahren, wurden die beiden Variablen $\text{Increased } \Sigma G2+G2'/GF$ und $\text{Increased } \Sigma G2/GF$ über die Bildung der Differenzen abgeleitet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Häufigkeiten und Verteilungen der Diagnosegruppen**3.1.1 Übersicht**

In Kapitel 2.5 wurde die Gruppeneinteilung für die statistisch Datenanalyse vorgenommen. Eine Übersicht über die Anzahl und relativen Häufigkeiten aller Probanden in den einzelnen Diagnosegruppen gibt Tabelle 6.

| | | | Diagnosegruppe | | | | Gesamt |
|---------|------------------|------------------|----------------|---------|------|----------------|--------|
| | | | Kontrollen | Fanconi | FaH | ohne Zuordnung | |
| Zellart | pBlutlymphozyten | Anzahl | 86 | 36 | 3 | 19 | 144 |
| | | % der Gesamtzahl | 47,3% | 19,8% | 1,6% | 10,4% | 79,1% |
| | BLCL | Anzahl | 14 | 5 | 10 | | 29 |
| | | % der Gesamtzahl | 7,7% | 2,7% | 5,5% | | 15,9% |
| | Fibroblasten | Anzahl | 2 | 3 | 3 | 1 | 9 |
| | | % der Gesamtzahl | 1,1% | 1,6% | 1,6% | ,5% | 4,9% |
| Gesamt | | Anzahl | 102 | 44 | 16 | 20 | 182 |
| | | % der Gesamtzahl | 56,0% | 24,2% | 8,8% | 11,0% | 100,0% |

Tabelle 6: Prozentuale Häufigkeiten und Verteilung aller Probanden innerhalb der Diagnosegruppen.

Ingesamt wurden für den Vergleich der Zellzyklusparameter Zellproben von 182 Probanden (100 %) untersucht. Der Gesamtanteil der Probanden aus der Kontrollgruppe betrug dabei 102 Personen (56 %). Des weiteren lagen von 44 Patienten (24,2 %) mit Fanconi Anämie Messergebnisse aus den Zellzyklusanalysen vor. 16 heterozygote Probanden (8,8 % vom Gesamtanteil) konnten im Rahmen der Datenauswertung mit den anderen Diagnosegruppen verglichen werden. 20 Probanden (10,9 % vom Gesamtanteil) konnten keine der genannten Diagnosegruppen zugeordnet werden. Diese sind im Anhangsteil dieser Arbeit näher erläutert.

3.1.2 Geschlecht und Altersverteilung aller Probanden

Die relativen Häufigkeiten von Geschlecht und des Alters aller Probanden sind in Abbildung 7 dargestellt. 77 (47,5 %) der beobachteten Personen waren zwischen 0 und 15 Jahre alt. In der nächsthöheren Altersgruppe befanden sich 45 (27,8 %) Probanden. Die Anzahl der Versuchspersonen zwischen 31 und 45 Jahre betrug 35 (21,6 %). In der Altersgruppe über 45 Jahre konnten noch 5 (3,1 %) Versuchspersonen erfasst werden. Die für die Geschlechterverteilung ermittelten relativen Häufigkeiten betragen für die männlichen Probanden 48,1 % (78) und für weibliche Versuchspersonen 51,9 % (84).

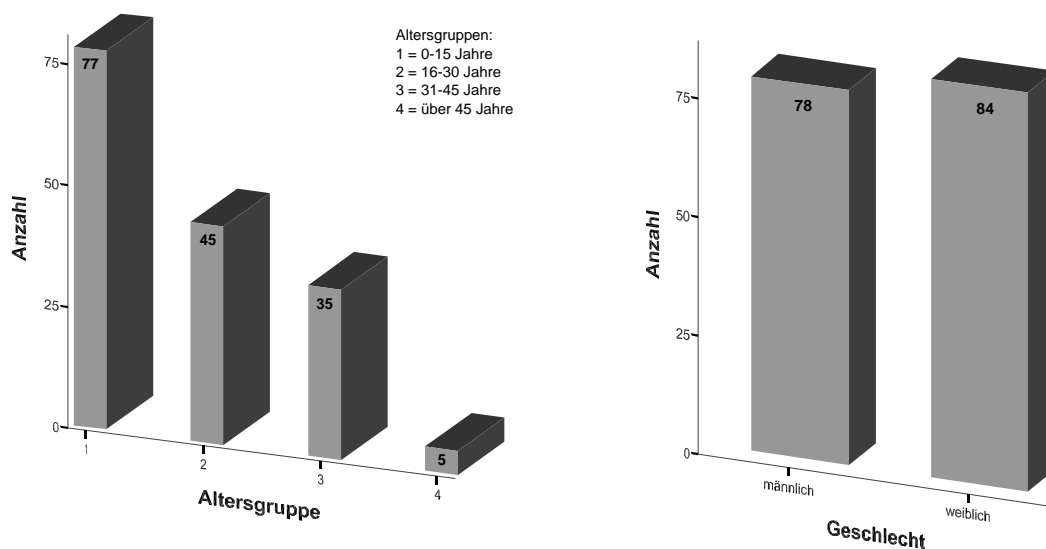


Abbildung 7: Beobachtete relative Häufigkeiten innerhalb der Altersgruppen und Geschlechtsverteilung aller Probanden.

3.2 Ergebnisse der Zellzyklusanalysen

Für den Vergleich der Zellzyklusparameter aller Diagnosegruppen wurde mit dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidumbromidverfahren für die Zellzyklen 1, 2, 3 und 4 die G₀-G₁, G₁, S und G₂ Phasenanteile ermittelt. Als abgeleitete Parameter wurden die Proliferationskapazität (Percent Increased Cells), Wachstumsfraktionen (Growth Fraction, GF), die Summe der G₂-Phasen (ΣG_2), die Summe der G₂-Phasen durch Wachstumsfraktion ($\Sigma G_2/GF$), sowie die konzentrationsabhängige Zunahme der G₂-Phasenanteile über die Summe der G₂-Phase des ersten und zweiten Zellzyklus durch Wachstumsfraktion ($\text{Increased } \Sigma G_2+G_2'/GF$) und die Summe der G₂-Phasen in allen Zellzyklen durch Wachstumsfraktion ($\text{Increased } \Sigma G_2/GF$) mit Hilfe des Softwareprogramms 2DAGE berechnet und miteinander verglichen.³

Empirische Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die jeweiligen Gruppen mit der Software SPSS bestimmt.

³ Formeln siehe Abschnitt 2.3.5

3.2.1 Menschliche periphere Blutlymphozyten

3.2.1.1 Zweidimensionale BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid Zytogramme von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten

Im Rahmen der Zellzyklusanalysen mit dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren wurden die durch Mitomycin C (MMC) induzierten Zellzyklusstörungen im Zellsystem der peripheren Blutlymphozyten untersucht und mit den spontan auftretenden Zellzyklusstörungen bei Fanconi-Anämie verglichen. Daneben wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von Mitomycin C (MMC) behandelt, um die Zellzykluseffekte und die erhöhte Sensivität bei Fanconi-Anämie zu charakterisieren. Exemplarisch für die durchgeführten Zellzyklusanalysen von 72 Stunden Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten sind in den Abschnitten 3.2.1.1.1 und 3.2.1.1.2 zweidimensionale Zytogramme einer gesunden Kontrollperson und eines Patienten mit Fanconi Anämie dargestellt. Gezeigt sind jeweils die zweidimensionalen Zytogramme der Standardzellkulturen, sowie der Zellkulturen mit Zugabe von 5, 10 und 50 ng/ml Mitomycin C (MMC).

In den Abbildungen ist auf der x-Achse in Abhängigkeit der Kanalzahl die BrdU/Hoechst 33258 Fluoreszenz dargestellt, auf der y-Achse die Ethidiumbromid Fluoreszenz. Die lineare Farbskala am rechten Rand der Abbildungen gibt die Intensität der emittierten Fluoreszenzen wider, nicht deren Wellenlänge.

3.2.1.1 Kontrollperson nach Mitomycin C Behandlung

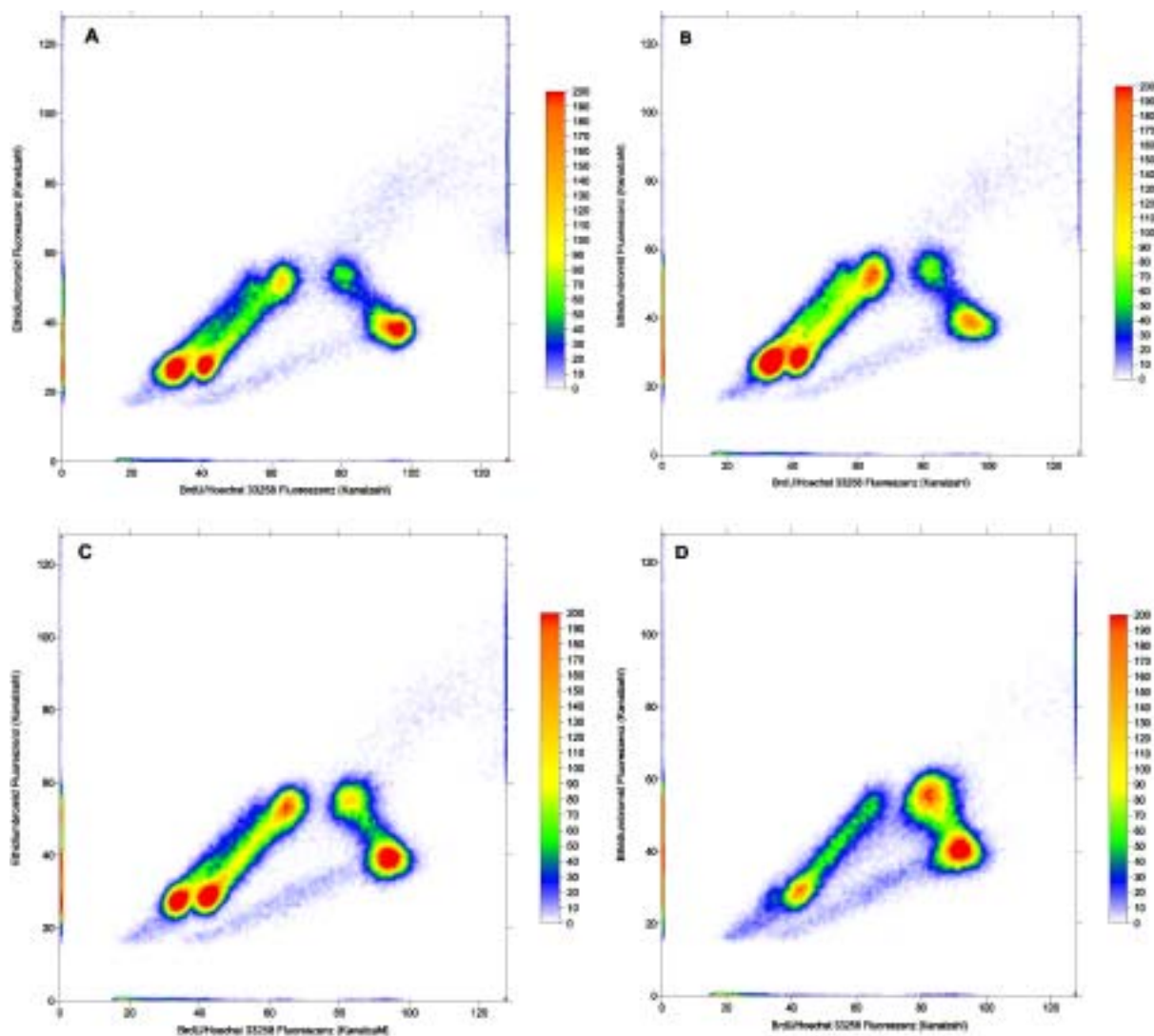


Abbildung 8: Zweidimensionale Zytogramme von 72 Stunden Zellkulturen mit menschlichen peripheren Blutlymphozyten einer gesunden Kontrollperson. Die Zellkulturen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen für Mitomycin C angesetzt. Bild A Zellkultur ohne Zusatz von Mitomycin C. Bild B mit 5 ng/ml MMC. Bild C mit 10 ng/ml MMC. Bild D mit 50 ng/ml MMC.

Abbildung 8 zeigt die zellkinetischen Effekte von Mitomycin C (MMC) anhand zweidimensionaler Zytogramme von 72 Stunden Zellkulturen mit menschlichen peripheren Blutlymphozyten einer Kontrollperson. Die proliferierenden Zellen durchlaufen bei der unbehandelten Kontrolle drei bis vier komplette Zellzyklen im Gegensatz zu den mit Mitomycin C behandelten Kulturen. Es lässt sich eine dosisabhängige Beeinträchtigung der Zellzyklusprogression erkennen. Die G2-Phasenanteile nehmen dabei ebenfalls mit steigender Konzentration für Mitomycin C (MMC) zu. Die quantitativen Daten zu den Abbildungen sind im Abschnitt 3.2.1.2 dieser Arbeit dargestellt.

Bild A zeigt ein zweidimensionales Zytogramm einer Standardzellkultur. Die proliferierenden Zellen durchlaufen dabei drei komplette Zellzyklen, ein Teil der Zellen erreicht noch die G1 Phase des vierten Zellzyklus. Diese Fraktion kann mit der Auswertungssoftware eindeutig von den anderen Zellzyklen abgetrennt werden. In **Bild B** der Zellkultur mit 5 ng/ml MMC kann anhand der Intensitätszunahme der emittierten Fluoreszenzen eine leichte Zunahme der G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus beobachtet werden. Die Zellen durchlaufen noch drei Zellzyklen. Für die Zellkultur mit 10 ng/ml MMC zeigt **Bild C** eine weitere Zunahme der Aggregation der Zellen in den G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus. Der Zellzyklus lässt eine dosisabhängige Beeinträchtigung der Proliferation erkennen. Es werden jedoch noch drei komplette Zellzyklen durchlaufen, wobei der Anteil der Zellen die die G2-Phase des dritten Zellzyklus erreichen deutlich verringert ist. Innerhalb des ersten Zellzyklus lässt sich eine Zunahme der G0-G1-Phase und der G2-Phase erkennen. Bei Zellkulturen peripherer Blutlymphozyten mit einer Konzentration von 50 ng/ml MMC (**Bild D**) kann nur noch ein kleiner Teil der Zellen die G1-Phase des dritten Zyklus erreichen. Wie aus der Abbildung hervorgeht lassen sich auch nur noch sehr wenige Zellen in der zweiten G2-Phase des zweiten Zellzyklus finden. Die G2-Phase des ersten Zyklus zeigt eine deutliche Zunahme der Zellen innerhalb diesen Kompartiments. Der Anteil der proliferierenden Zellen ist somit deutlich vermindert. Die blauen Farbstoffspuren vom linken unteren Bildrand in Richtung der G0-G1 und G1 Phasen der Zellzyklen kennzeichnen dabei Zellkerndetritus und nichtstöchiometrische Farbstoffbindungen.

3.2.1.1.2 Proband mit Fanconi Anämie nach Mitomycin C Behandlung

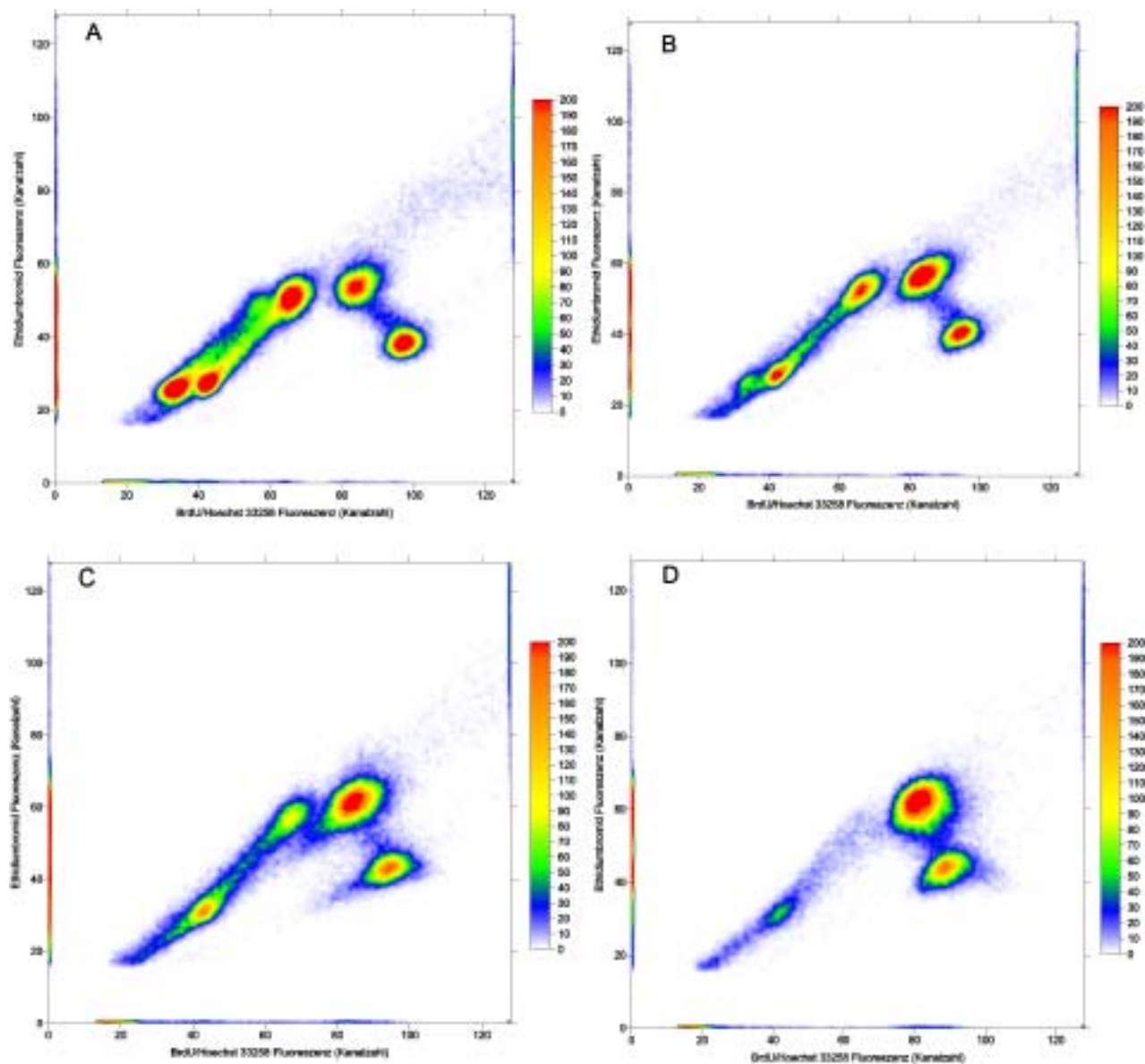


Abbildung 9: Zweidimensionale Zytogramme von 72 Stunden Zellkulturen mit menschlichen peripheren Blutlymphozyten eines Fanconi Anämie Patienten. Die Zellkulturen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen für Mitomycin C angesetzt. Bild A Standardzellkultur ohne Mitomycin C. Bild B mit 5 ng/ml MMC. Bild C mit 10 ng/ml MMC. Bild D mit 50 ng/ml MMC.

Abbildung 9 zeigt zweidimensionale BrdU/Hoechst 33258 Ethidiumbromid Zytogramme von 72 Stunden Standardkulturen eines Patienten mit Fanconi Anämie. Die Zellen durchlaufen drei vollständige Zellzyklen bei der unbehandelten Kontrolle. Auffällig jedoch sind im Vergleich zu der Zellkultur des gesunden Probanden in Abschnitt 3.2.1.1.1 die prominenten G2-Phasenanteile, was sich leicht anhand der Farbskala am rechten Bildrand über die Zunahme der emittierten Fluoreszenzen erkennen lässt. Vor allem die G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus treten deutlicher hervor.

In **Bild A** ist ein zweidimensionales Zytogramm einer Standardzellkultur mit peripheren Blutlymphozyten eines Patienten mit Fanconi Anämie dargestellt. Die starke Farbintensität der G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus lässt sich leicht als Unterschied gegenüber den Zytogrammen der Kontrollperson in **Abbildung 8** ausmachen. Im Zytogramm in **Bild B** lässt sich gut erkennen, dass es bereits bei einer Konzentration von 5 ng/ml MMC zu einer Beeinträchtigung der Zellzyklusprogression kommt. Die Zellen durchlaufen bei diesem Probanden lediglich noch zwei komplette Zyklen. Von einem Teil der Zellen wird noch die G1-Phase des dritten Zyklus erreicht. Gegenüber gesunden Kontrollpersonen ist die erste G2-Phase des ersten Zellzyklus deutlich erhöht. In **Bild C** präsentiert sich der Zellzyklus bei Zellkulturen mit 10 ng/ml MMC von Fanconi Anämie Patienten. Es lässt sich wiederum eine dosisabhängige Abnahme der proliferierenden Zellfraktionen festhalten. Die prominente G2-Phase des ersten Zellzyklus mit der höchsten Konzentration für Mitomycin C bei 50 ng/ml hält **Bild D** fest. Nur noch sehr wenige Zellen konnten dabei die G1-Phase des zweiten Zellzyklus erreichen.

3.2.1.2 Zellzyklusparameter der Zellkulturen mit menschlichen peripheren Blutlymphozyten

Die quantitativen Daten zu den Abbildungen in 3.2.1.1.1 und 3.2.1.1.2 der Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten sind für den direkten Vergleich der Diagnosegruppen untereinander in den Tabellen 7 bis 9 dargestellt.

Die Zellzyklusparameter des ersten Zellzyklus zeigen bei allen Probanden für die G0-G1-Phase und S-Phase bei allen Konzentrationen von Mitomycin C nur geringe Unterschiede. Demgegenüber sind die G2-Phaseanteile von Fanconi-Anämie Patienten (Gruppe 3) im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen (Gruppe 1) und Heterozygoten (Gruppe 2) deutlich erhöht. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht liegen die ermittelten Werte der G2-Phasen des ersten Zellzyklus von heterozygoten Probanden (Gruppe 2) etwas über denen der normalen Kontrollen.

| Parameter | G0-G1 (%) | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------|--------|----------|-------------|--------|----------|--------------|--------|----------|--------------|--------|----------|
| Konz. Gruppe | ohne MMC | | | 5 ng/ml MMC | | | 10 ng/ml MMC | | | 50 ng/ml MMC | | |
| | N | MW | Streuung | N | MW | Streuung | N | MW | Streuung | N | MW | Streuung |
| Gruppe 1 | 86 | 28,521 | 11,888 | 71 | 31,310 | 11,223 | 77 | 32,396 | 12,005 | 69 | 35,725 | 11,890 |
| Gruppe 2 | 3 | 32,600 | 5,345 | 2 | 33,500 | 2,970 | 3 | 34,367 | 7,901 | 3 | 37,900 | 7,016 |
| Gruppe 3 | 36 | 37,297 | 14,155 | 27 | 37,974 | 14,159 | 32 | 39,206 | 15,335 | 30 | 41,027 | 15,645 |
| | S (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 7,307 | 2,808 | 71 | 8,330 | 3,619 | 77 | 8,575 | 4,761 | 69 | 14,297 | 5,150 |
| Gruppe 2 | 3 | 8,067 | 2,765 | 2 | 9,850 | 1,626 | 3 | 7,767 | 2,515 | 3 | 14,000 | 3,740 |
| Gruppe 3 | 36 | 8,689 | 2,946 | 27 | 11,048 | 3,896 | 32 | 11,288 | 4,989 | 30 | 17,833 | 6,117 |
| | G2 (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 4,345 | 2,073 | 71 | 6,680 | 2,645 | 77 | 8,604 | 3,210 | 69 | 19,526 | 7,001 |
| Gruppe 2 | 3 | 5,300 | 1,819 | 2 | 9,350 | 1,909 | 3 | 12,033 | 4,189 | 3 | 24,467 | 2,013 |
| Gruppe 3 | 36 | 18,939 | 5,420 | 27 | 33,537 | 8,821 | 32 | 35,516 | 10,420 | 30 | 36,970 | 12,494 |
| | G1' (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 13,064 | 5,661 | 71 | 12,214 | 4,992 | 77 | 11,529 | 5,619 | 69 | 7,622 | 4,619 |
| Gruppe 2 | 3 | 12,233 | 1,401 | 2 | 11,000 | 0,566 | 3 | 9,533 | 0,874 | 3 | 6,067 | 2,178 |
| Gruppe 3 | 36 | 7,447 | 2,588 | 27 | 4,330 | 1,542 | 32 | 3,847 | 1,932 | 30 | 2,103 | 1,912 |
| | S' (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 12,517 | 6,079 | 71 | 13,216 | 6,600 | 77 | 13,255 | 5,924 | 69 | 12,986 | 4,643 |
| Gruppe 2 | 3 | 11,533 | 2,779 | 2 | 12,550 | 0,212 | 3 | 14,100 | 3,900 | 3 | 9,900 | 1,970 |
| Gruppe 3 | 36 | 9,186 | 3,529 | 27 | 6,882 | 3,712 | 32 | 5,625 | 3,610 | 30 | 2,110 | 2,142 |
| | G2' (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 6,036 | 2,185 | 71 | 7,517 | 3,010 | 77 | 8,436 | 3,531 | 69 | 5,520 | 3,418 |
| Gruppe 2 | 3 | 8,333 | 1,250 | 2 | 8,750 | 2,758 | 3 | 9,900 | 1,588 | 3 | 5,967 | 2,495 |
| Gruppe 3 | 36 | 9,164 | 4,523 | 27 | 5,167 | 3,610 | 32 | 3,125 | 2,856 | 30 | 0,243 | 0,448 |

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter des ersten und zweiten Zellzyklus von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten.

| Parameter | G1^{''} (%) | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------------|---------------|---------------|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|----------|--------------|---------------|---------------|
| Konz. | ohne MMC | | | 5 ng/ml MMC | | | 10 ng/ml MMC | | | 50 ng/ml MMC | | |
| | N | MW | Streuung | N | MW | Streuung | N | MW | Streuung | N | MW | Streuung |
| Gruppe | | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 11,211 | 3,634 | 71 | 9,314 | 3,688 | 77 | 7,882 | 3,108 | 69 | 2,388 | 1,819 |
| Gruppe 2 | 3 | 8,933 | 0,493 | 2 | 6,700 | 1,556 | 3 | 5,233 | 0,710 | 3 | 1,167 | 0,351 |
| Gruppe 3 | 36 | 4,886 | 3,156 | 27 | 0,767 | 0,588 | 32 | 0,491 | 0,683 | 30 | 1,667 E-02 | 5,921 E-02 |
| | S^{''} (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 10,365 | 5,632 | 71 | 7,773 | 4,851 | 77 | 6,404 | 4,455 | 69 | 1,536 | 2,570 |
| Gruppe 2 | 3 | 8,833 | 1,060 | 2 | 6,900 | 1,131 | 3 | 5,367 | 2,173 | 3 | 0,467 | 0,306 |
| Gruppe 3 | 36 | 3,169 | 2,629 | 27 | 0,244 | 0,318 | 32 | 0,169 | 0,455 | 30 | 0 | 0 |
| | G2^{''} (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 3,013 | 2,075 | 71 | 2,052 | 2,170 | 77 | 1,643 | 2,060 | 69 | 0,281 | 0,715 |
| Gruppe 2 | 3 | 2,300 | 0,361 | 2 | 1,200 | 0,566 | 3 | 1,133 | 1,286 | 3 | 3,333 E-02 | 5,774 E-02 |
| Gruppe 3 | 36 | 1,047 | 1,374 | 27 | 1,481 E-02 | 5,338 E-02 | 32 | 2,813 E-02 | 0,159 | 30 | 0 | 0 |
| | G1^{'''} (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 3,007 | 2,736 | 71 | 1,331 | 2,137 | 77 | 0,736 | 1,526 | 69 | 1,000 E-01 | 0,370 |
| Gruppe 2 | 3 | 1,400 | 1,836 | 2 | 0,200 | 0,283 | 3 | 0,400 | 0,608 | 3 | 0 | 0 |
| Gruppe 3 | 36 | 0,181 | 0,463 | 27 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 |
| | S^{'''} (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 0,563 | 0,714 | 71 | 0,169 | 0,487 | 77 | 6,494 E-02 | 0,137 | 69 | 1,449 E-03 | 1,204 E-02 |
| Gruppe 2 | 3 | 0,367 | 0,635 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0,133 | 0,231 | 3 | 0 | 0 |
| Gruppe 3 | 36 | 5,556 E-03 | 3,333 E-02 | 27 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 |
| | G2^{'''} (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 4,186 E-02 | 0,116 | 71 | 1,690 E-02 | 0,131 | 77 | 0 | 0 | 69 | 0 | 0 |
| Gruppe 2 | 3 | 3,333 E-02 | 5,774 E-02 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| Gruppe 3 | 36 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 |

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter des dritten und vierten Zellzyklus von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten.

Im zweiten Zellzyklus waren die G1- und S-Phasenanteile der Fanconi-Anämie Patienten (Gruppe 3) gegenüber den anderen beiden Diagnosegruppen reduziert. Die G2-Phasenanteile dieser Gruppe waren dagegen bei Standardzellkulturen erhöht, gingen aber bei steigenden Mitomycin C (MMC) Konzentrationen wieder zurück. Wiederum lagen die Mittelwerte der G2-Phaseanteile des zweiten Zellzyklus von heterozygoten Probanden (Gruppe 2) etwas über denen der normalen Kontrollen. Im dritten Zellzyklus zeigten alle Phasenanteile (G1-Phase, S-Phase und G2-Phase) der Probanden mit Fanconi-Anämie (Gruppe 3) eine deutliche Reduktion gegenüber den anderen beiden Diagnosegruppen. Bei Konzentrationen von 10 und 50 ng/ml Mitomycin C konnten nur noch sehr wenige oder fast gar keine Zellen mehr in diesen Kompartimenten beobachtet werden. Die ermittelten Werte der Phasenanteile (G1-Phase, S-Phase und G2-Phase) von heterozygoten Probanden (Gruppe 2) befanden sich etwa zwischen der Kontrollgruppe (Gruppe 1) und denen der Fanconi-Anämie Patienten (Gruppe 3).

Bei Zellkulturen mit Zugabe von 5 ng/ml Mitomycin C (MMC) durchliefen nur noch sehr wenige Zellen von gesunden Personen (Gruppe 1) den kompletten vierten Zellzyklus. Für höhere Konzentrationen konnten nur noch Zellen in den G1-Phase und S-Phaseanteilen beobachtet werden. Bei den durchgeführten Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten von heterozygoten Probanden (Gruppe 2) ließen sich noch Messdaten innerhalb der S-Phase des vierten Zellzyklus ermitteln. Im Gegensatz dazu konnten die untersuchten Zellen von Fanconi-Anämie Patienten (Gruppe 3) den vierten Zellzyklus bereits bei Standardzellkulturen nicht mehr vollständig durchlaufen.

Über die ermittelten Parameter aus den Zellzyklusanalysen wurden im Anschluss an die durchgeführten Messungen mit Hilfe des Softwareprogramms 2DAGE die abgeleiteten Größen berechnet. Eine Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferationskapazitäten (Percent Increased Cells), Wachstumsfraktionen (Growth Fraction, GF), Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) und Summe der G2-Phasen durch Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) gibt Tabelle 9.

Die Proliferationskapazitäten, Percent Increased Cells (Zellzahl pro Zellzyklus /Anzahl der Plot-Zellen des jeweiligen Zellzyklus) nahmen mit steigender Konzentration von Mitomycin C (MMC) ab. Die ermittelten Werte von Fanconi-Anämie Patienten (Gruppe 3) lagen dabei unterhalb der beider Vergleichsgruppen, was sich auch für die Wachstumsfraktion, Growth Fraction, GF (100 minus G0-G1) beobachten ließ. Die Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) und die Summe der G2-Phasen durch Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) von Patienten mit Fanconi-Anämie (Gruppe 3) war schon bei Standardzellkulturen erhöht und lag weiterhin bei allen Konzentrationen von Mitomycin C (MMC) über denen der Vergleichsgruppen. Die ermittelten Werte der heterozygoten Probanden

(Gruppe 2) lagen dabei zwischen den gesunden Probanden und denen der Fanconi-Anämie Patienten.

| Parameter | Percent Increased Cells (%) | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------------|---------|---------------|-------------|---------|---------------|--------------|---------|----------------|--------------|---------|---------------|
| Konz. | ohne MMC | | | 5 ng/ml MMC | | | 10 ng/ml MMC | | | 50 ng/ml MMC | | |
| | N | MW | Streuung | N | MW | Streuung | N | MW | Streuung | N | MW | Streuung |
| Gruppe 1 | 86 | 230,644 | 47,337 | 71 | 201,101 | 39,995 | 77 | 187,055 | 33,716 | 69 | 140,746 | 27,832 |
| Gruppe 2 | 3 | 205,200 | 17,271 | 2 | 178,100 | 0,566 | 3 | 172,633 | 14,167 | 3 | 126,967 | 2,994 |
| Gruppe 3 | 36 | 154,425 | 27,538 | 27 | 119,548 | 10,060 | 32 | 114,688 | 9,836 | 30 | 104,520 | 3,459 |
| | Growth Fraction (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 71,478 | 11,885 | 71 | 68,699 | 11,227 | 77 | 67,604 | 12,005 | 69 | 64,275 | 11,890 |
| Gruppe 2 | 3 | 67,400 | 5,345 | 2 | 66,500 | 2,970 | 3 | 65,633 | 7,901 | 3 | 62,100 | 7,016 |
| Gruppe 3 | 36 | 62,703 | 14,155 | 27 | 62,022 | 14,161 | 32 | 60,794 | 15,335 | 30 | 58,973 | 15,645 |
| | Σ G2 (%) | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 13,436 | 3,426 | 71 | 16,266 | 4,153 | 77 | 18,683 | 4,881 | 69 | 25,328 | 7,289 |
| Gruppe 2 | 3 | 15,967 | 2,608 | 2 | 19,300 | 4,101 | 3 | 23,067 | 4,080 | 3 | 30,467 | 4,291 |
| Gruppe 3 | 36 | 29,150 | 7,632 | 27 | 38,719 | 10,156 | 32 | 38,669 | 11,027 | 30 | 41,945 | 12,671 |
| | Σ G2/GF | | | | | | | | | | | |
| Gruppe 1 | 86 | 0,188 | 3,838 E-02 | 71 | 0,239 | 5,342 E-02 | 77 | 0,279 | 5,774 E-02 | 69 | 0,394 | 8,946 E-02 |
| Gruppe 2 | 3 | 0,236 | 2,077 E-02 | 2 | 0,289 | 4,876 E-02 | 3 | 0,353 | 6,3001 E-02 | 3 | 0,493 | 6,652 E-02 |
| Gruppe 3 | 36 | 0,468 | 7,078 E-02 | 27 | 0,622 | 5,912 E-02 | 32 | 0,633 | 5,865 E-02 | 30 | 0,620 | 9,169 E-02 |

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferationskapazitäten, Wachstumsfraktionen, Σ G2-Phasen und der Ratio Σ G2/GF von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten.

3.2.2 Ergebnisse der Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)

Die Zellzyklusparameter der 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) sind ebenfalls mit Hilfe der zweidimensionalen BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Durchflusszytometrie bestimmt worden. Durchgeführt wurde jeweils eine Standardzellkultur, sowie Zellkulturen mit Zugabe von 5, 10, 50 und 100 ng/ml Mitomycin C (MMC). Die Zugabe des Alkylanz erfolgte dabei zu Beginn der Zellkulturen (Zeitpunkt 0 Stunden). Für die durchgeführten Zellzyklusanalysen konnten tiefgefrorene Zellproben des Humangenetischen Instituts der Universität Würzburg genutzt werden. Zusätzlich zur graphischen Darstellung der quantitativen Daten aus den Messungen im Abschnitt 3.2.2.2 sind diese im Anhangteil tabellarisch aufgelistet (Tabellen 22 und 23).

3.2.2.1 Zweidimensionale Zytogramme von 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)

Exemplarisch für die Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) sind in den Abschnitten 3.2.2.1.1 und 3.2.2.1.2 zweidimensionale Zytogramme aus den Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren einer gesunden Kontrollperson und eines Probanden mit Fanconi Anämie dargestellt. In den Abbildungen ist auf der Ordinate die Ethidiumbromidfluoreszenz, auf der Abszisse die BrdU/Hoechst 33258-Fluoreszenz jeweils in Abhängigkeit der Kanalzahl aufgetragen. Im Vergleich zu den Zytogrammen mit peripheren Blutlymphozyten des vorangegangenen Abschnittes erscheint bei den Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) vor allem die G1-Phasen des zweiten und dritten Zellzyklus etwas prominent. Dies ist einerseits durch die Anpassung der linearen Farbskalierung an die Intensität der emittierten Fluoreszenz zu erklären (z-Achse, Skalierung von 0 bis 100). Andererseits kann dies durch die Akkumulation der Zellen innerhalb diesen Kompartiments mit der Ausscheidung von Zellen aus dem Zellzyklus zustande kommen. Die Zellen treten dabei in ein G0-ähnliches Ruhestadium ein. Bei Zellkulturen mit hohen Konzentrationen von Mitomycin C (MMC) finden sich deutlich ausgeprägte Spuren vom linken unteren Bildrand zur G0-G1-Phase des ersten Zellzyklus und zu den G1-Phasen der folgenden Zellzyklen. Diese zeigen nichtstöchiometrische Farbstoffbindungen und Zellkerndetritus.

3.2.2.1.1 Kontrollperson nach Mitomycin C Behandlung

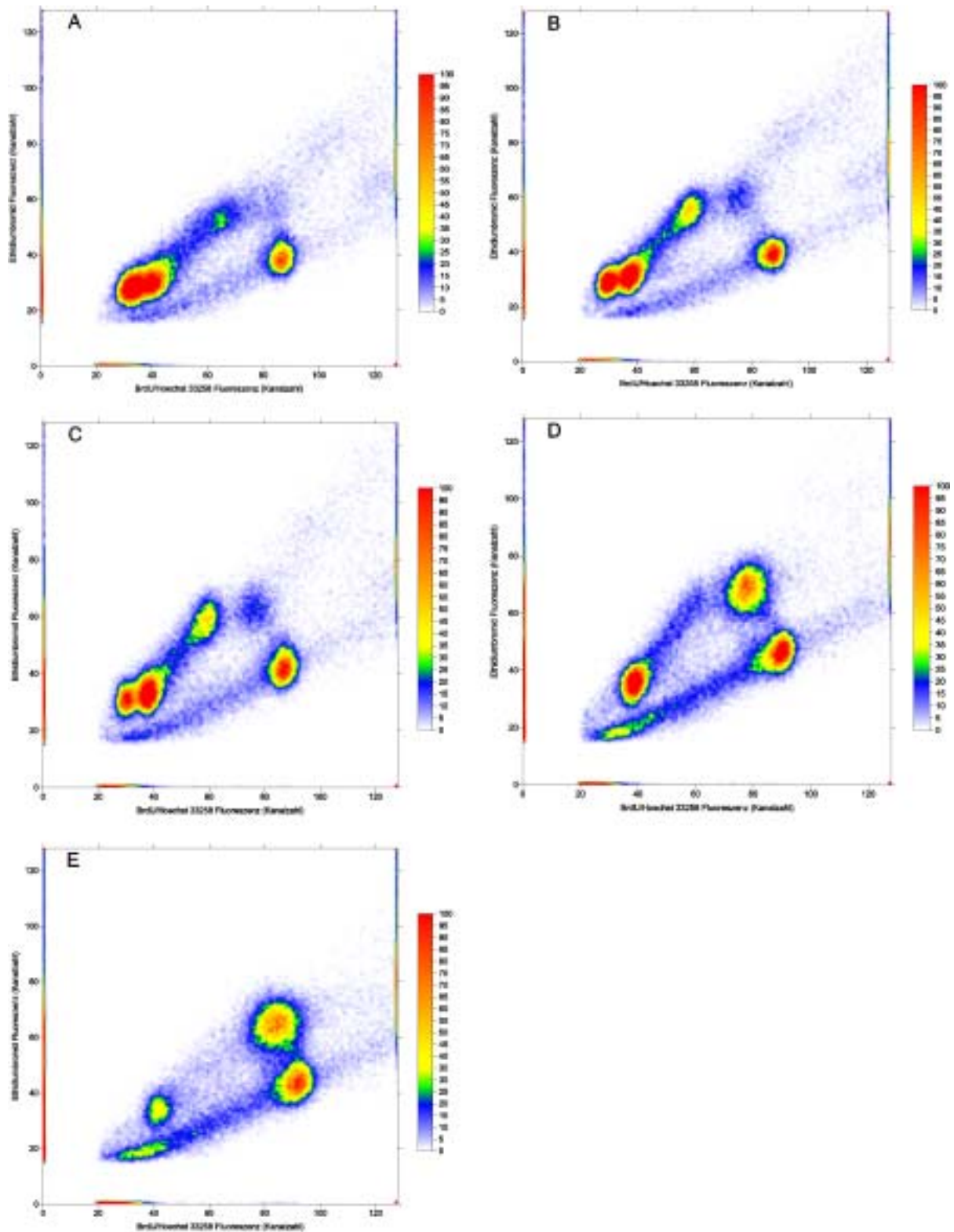


Abbildung 10: Zweidimensionale Zytogramme von 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) einer gesunden Kontrollperson. Die Zellkulturen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen für Mitomycin C angesetzt. Bild A Standardzellkultur ohne Mitomycin C. Bild B mit 5 ng/ml MMC. Bild C mit 10 ng/ml MMC. Bild D mit 50 ng/ml MMC. Bild E mit 100 ng/ml MMC.

Abbildung 10 zeigt zweidimensionale Zytogramme von 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) einer Kontrollperson die ohne Mitomycin C und mit Konzentration von 5, 10, 50 und 100 ng/ml Mitomycin C (MMC) angesetzt wurden. Bei den unbehandelten Kontrollen durchliefen die Zellen bis zu drei Zellzyklen. Wie auch bei den Kulturen mit peripheren Blutlymphozyten von gesunden Probanden ließ sich eine Mitomycin C induzierte dosisabhängige Beeinträchtigung der Zellzyklusprogression und Zunahme der G2-Phasen beobachten.

Bild A zeigt das zweidimensionale Zytogramm der Standardzellkultur mit lymphoblastoiden Zellkulturen (B-LCL) einer gesunden Versuchsperson. Die dosisabhängige Zunahme der G2-Phaseanteile des ersten und zweiten Zellzyklus lässt sich leicht über die ansteigende Intensität der emittierten Fluoreszenzen erkennen (**Bild B**, der Zellkultur mit 5 ng/ml Mitomycin C, MMC). Die G2-Phasen treten in der Abbildung der Zellkultur mit Zugabe von 10 ng/ml Mitomycin C (MMC) noch etwas deutlicher hervor (**Bild C**). Bei einer Konzentration von 50 ng/ml Mitomycin C (MMC) erreichte nur noch ein kleiner Teil der Zellen die G2-Phase des zweiten Zellzyklus, die meisten Zellen scheiden vorher aus dem Zellzyklus aus. In **Bild D** kann man deshalb eine prominente G2-Phase des ersten Zyklus erkennen. Für die Zellkultur mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) einer Kontrollperson mit Zugabe von 100 ng/ml Mitomycin C (MMC) lässt sich in **Bild E** nochmals eine Zunahme der G2-Phase des ersten Zellzyklus erkennen. Wie aus den Abbildungen (**Bild D und E**) hervorgeht, durchliefen die Zellen bei hohen Konzentrationen von Mitomycin C (MMC) nur noch zwei vollständige Zellzyklen, was für eine dosisabhängige Beeinträchtigung der Proliferationskapazität spricht.

3.2.2.1.2 Proband mit Fanconi Anämie nach Mitomycin C Behandlung

Äquivalent zu den Zytogrammen des vorherigen Abschnittes von Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) einer gesunden Versuchsperson sind in Abbildung 11 zweidimensionale Zytogramme von 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) eines Fanconi-Anämie Patienten gezeigt. Wiederum wurde eine Standardzellkultur und Zellkulturen mit einer Konzentration von 5, 10, 50 und 100 ng/ml Mitomycin C (MMC) angesetzt. Die zweidimensionalen Zytogramme aus den Zellzyklusanalysen sind in den entsprechenden Abbildungen dargestellt. Auf der Ordinate ist die Ethidiumbromidfluoreszenz, auf der Abszisse die BrdU/Hoechst 33258-Fluoreszenz, jeweils in Abhängigkeit der Kanalzahl aufgetragen. Die linearen Farbskalen am rechten Rand der Abbildungen geben die Intensität der emittierten Fluoreszenzen wider, nicht deren Wellenlänge.

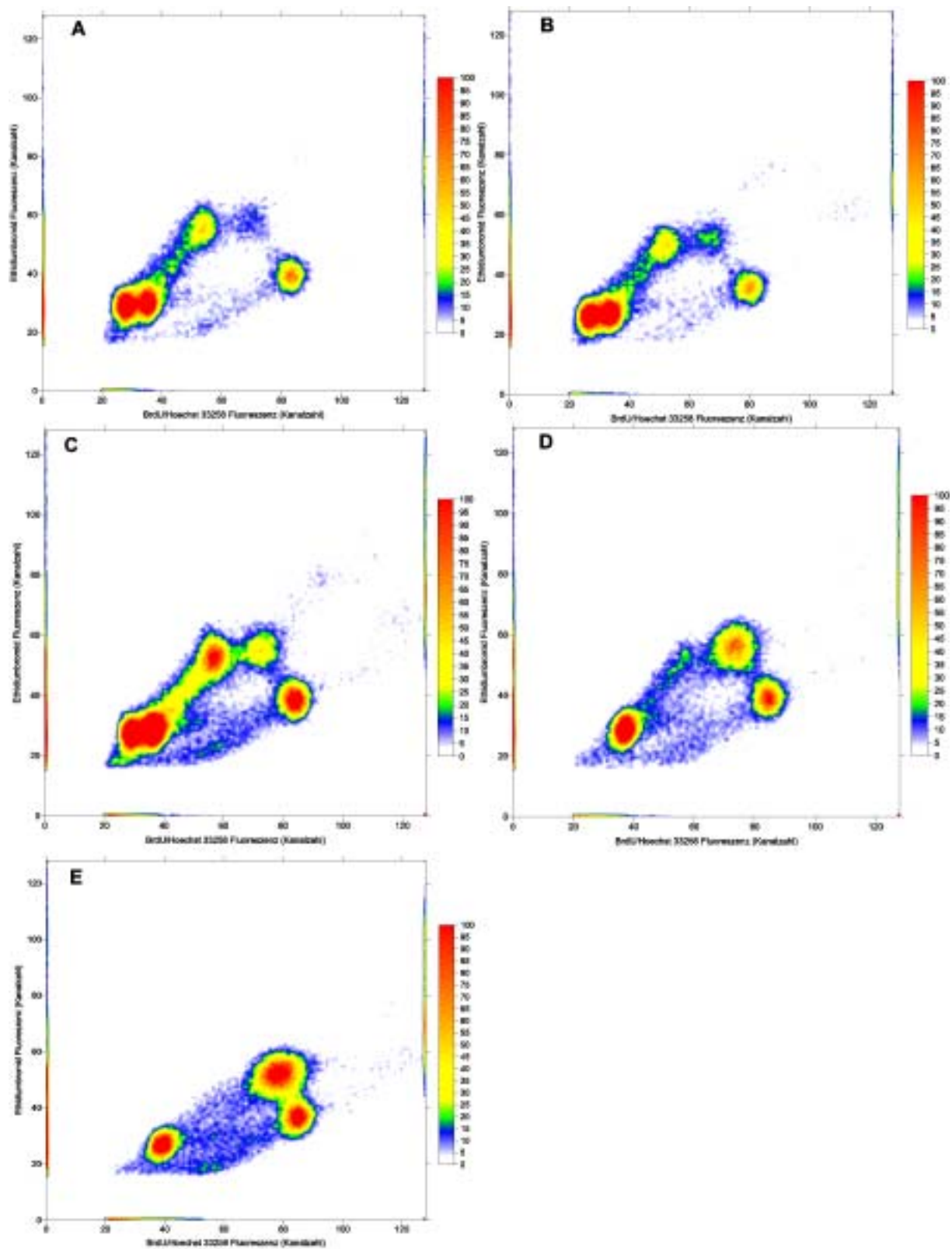


Abbildung 11: Zweidimensionale Zytogramme von 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) eines Fanconi Anämie Patienten. Die Zellkulturen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen für Mitomycin C angesetzt. Bild A Standardzellkultur ohne Mitomycin C. Bild B mit 5 ng/ml MMC. Bild C mit 10 ng/ml MMC. Bild D mit 50 ng/ml MMC. Bild E mit 100 ng/ml MMC.

In **Bild A** der Zellkultur ohne Zugabe von Mitomycin C treten die G2-Phasen prominenter im Vergleich zu den Standardzellkulturen der gesunden Kontrollpersonen hervor. Die Zellen konnten drei komplette Zellzyklen durchlaufen, wobei nur ein geringer Teil die G2-Phase des dritten Zyklus erreichen konnten. Bei Kulturen lymphoblastoider Zellen (B-LCL) von Fanconi-Anämie Patienten mit einer Zugabe von 5 ng/ml Mitomycin C ist vor allem die Intensität der emittierten Fluoreszenzen innerhalb der G2-Phase des ersten und zweiten Zellzyklus gegenüber gesunden Versuchspersonen verstärkt (**Bild B**). In **Bild C** ist das zweidimensionale Zytogramm von Zellkulturen mit einer Dosierung von 10 ng/ml MMC dargestellt. Deutlich treten die G2-Phaseanteile hervor. Die G1-Phasenanteile zeigen ebenfalls eine verstärkte Arretierung der Zellen innerhalb diesen Kompartiments. Unter der Zugabe von 50 ng/ml Mitomycin C (**Bild D**) erreichen nur noch sehr wenige Zellen die G2-Phase des zweiten Zellzyklus. Der größte Anteil der Zellen befindet sich innerhalb der Zellzyklusphasen des ersten Zyklus und der G1-Phase des zweiten Zellzyklus (**Bild D**). Das zweidimensionale Zytogramm der Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) von Fanconi-Anämie Patienten bei Konzentrationen von 100 ng/ml MMC (**Bild E**) zeigt nochmals eine stärkere Hervorhebung der Kompartimente des ersten Zellzyklus. Die Akkumulation in der G1-Phase des zweiten Zellzyklus ist gegenüber der Zellkultur mit 50 ng/ml Mitomycin C jedoch reduziert.

3.2.2.2 Zellzyklusparameter der lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)

In den Abbildungen 12 und 13 sind die Zellzyklusparameter aus den Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren von 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) graphisch aufgetragen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Zellzykluskompartimente (G0-G1, G1, S- und G2-Phase) und die Mittelwerte der abgeleiteten Größen der Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF), Proliferationskapazität (Percent Increased Cells), Summe der G2-Phasen (Σ G2) und Summe der G2-Phasen durch Wachstumsfraktion (Σ G2/GF). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes. Die quantitativen Daten der Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) sind mit deskriptiver Statistik im Anhangsteil dieser Arbeit dargestellt (Tabellen Nr. 22 und 23).

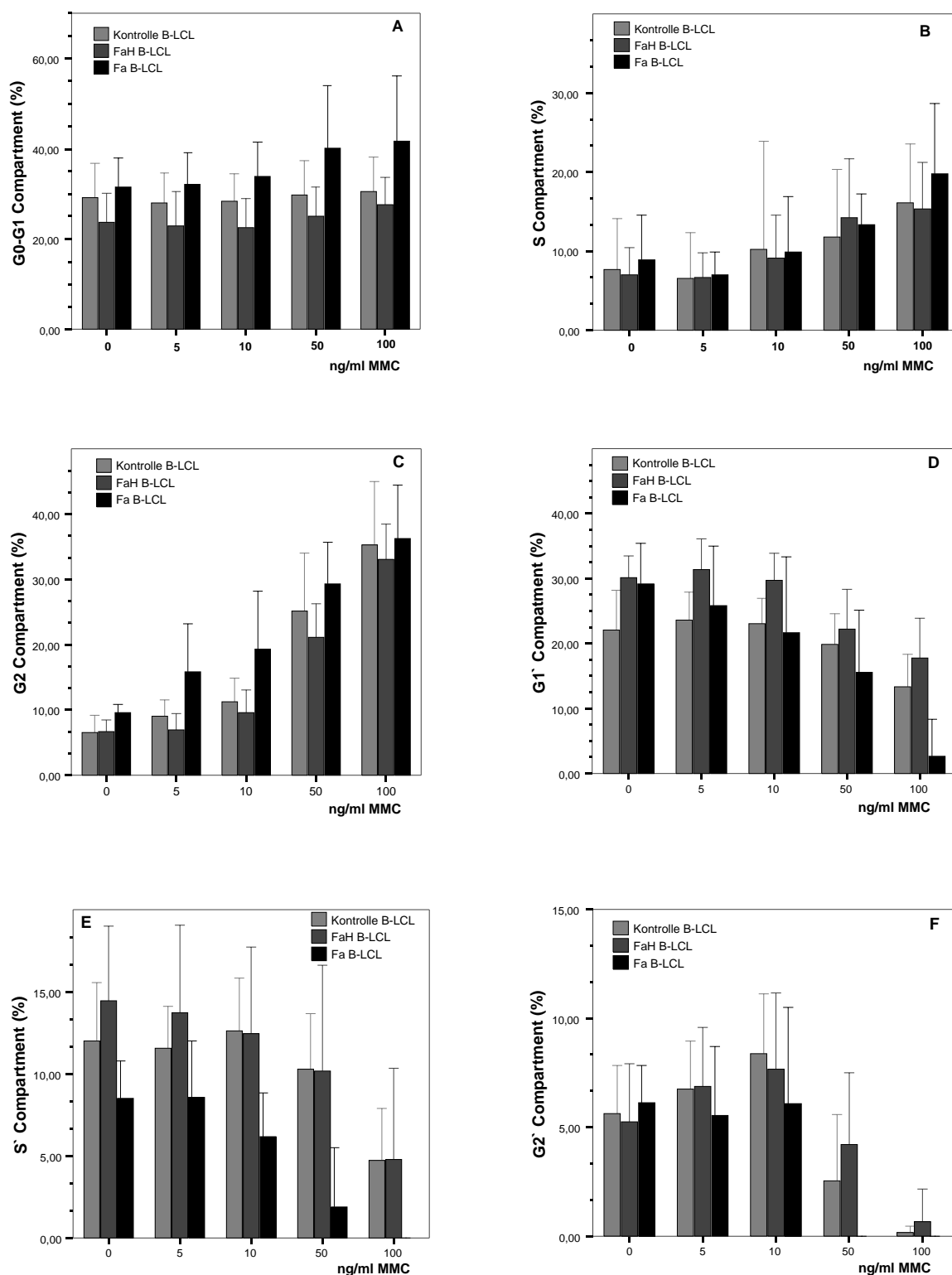


Abbildung 12: Zellzyklusparameter des ersten und zweiten Zellzyklus (Bild A bis F) der lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) im Vergleich für Probanden der Kontrollgruppe, Heterozygoten und Fanconi Anämie Patienten. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert des prozentualen Anteils der Zellen innerhalb der Kompartimente gegen die Konzentrationen von Mitomycin C. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte.

Wie aus den **Abbildungen 12 A, 12 B und 12 C** hervorgeht, lagen die Mittelwerte der Phasenanteile des ersten Zellzyklus (G0-G1, S- und G2-Phase) bei den untersuchten lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) von Fanconi-Anämie Patienten über denen der beiden Vergleichsgruppen. Bei heterozygoten Probanden entsprachen die G2-Phasenanteile des ersten Zellzyklus (**Abb. 12 C**) etwa denen der gesunden Versuchspersonen.

Die G1-Phase des zweiten Zellzyklus (**Abb. 12 D**) von heterozygoten Probanden und Fanconi-Anämie Patienten war gegenüber den Gesunden erhöht, was durch ein verstärktes Ausscheiden von Zellen aus dem Zellzyklus erklärt werden kann. Die Mittelwerte der S-Phasen des zweiten Zellzyklus nahmen mit steigender Konzentration von Mitomycin C (MMC) ab (**Abb. 12 E**). Die ermittelten Messdaten der G2-Phase des zweiten Zellzyklus (**Abb. 12 F**) von Fanconi-Anämie Patienten lagen wiederum, mit Ausnahme der Zellkulturen mit hohen Konzentrationen von MMC, über denen der Vergleichsgruppen.

Da sich bei den durchgeführten Zellzyklusanalysen vor allem bei hohen Dosen von Mitomycin C nur noch sehr geringe Messwerte für die einzelnen Kompartimente des dritten Zellzyklus ermitteln ließen, wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet. Die genauen Messdaten können jedoch aus den Tabellen Nr.22 und 23 im Anhangsteil dieser Arbeit entnommen werden. Das Verhalten der Zellen soll dennoch kurz beschrieben werden. Die Phasenanteile des dritten Zellzyklus (G0-G1, S- und G2-Phase) gingen mit steigender Konzentration von MMC zurück. Zellen von gesunden Probanden konnten noch bis zu einer Dosis von 50 ng/ml Mitomycin C den kompletten dritten Zellzyklus durchlaufen. Die untersuchten Zellen der heterozygoten Versuchspersonen zeigten ein den Zellen der Gesunden ähnliches Verhalten.

Der in den einzelnen Zellzyklen beobachtete konzentrationsabhängige Anstieg der Mittelwerte der G0-G1, S- und G2-Phasenanteile des ersten Zellzyklus wird durch das Ausscheiden von Zellen aus dem Zellzyklus verursacht. Somit geht die Anzahl der Zellen, die die darauffolgenden Zellzyklen noch durchlaufen können zurück. Dies kann einerseits durch die erhöhte Sensitivität der lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) gegenüber MMC, andererseits durch die zytotoxischen Effekte von Mitomycin C, mit starkem Rückgang des Zellwachstums erklärt werden.

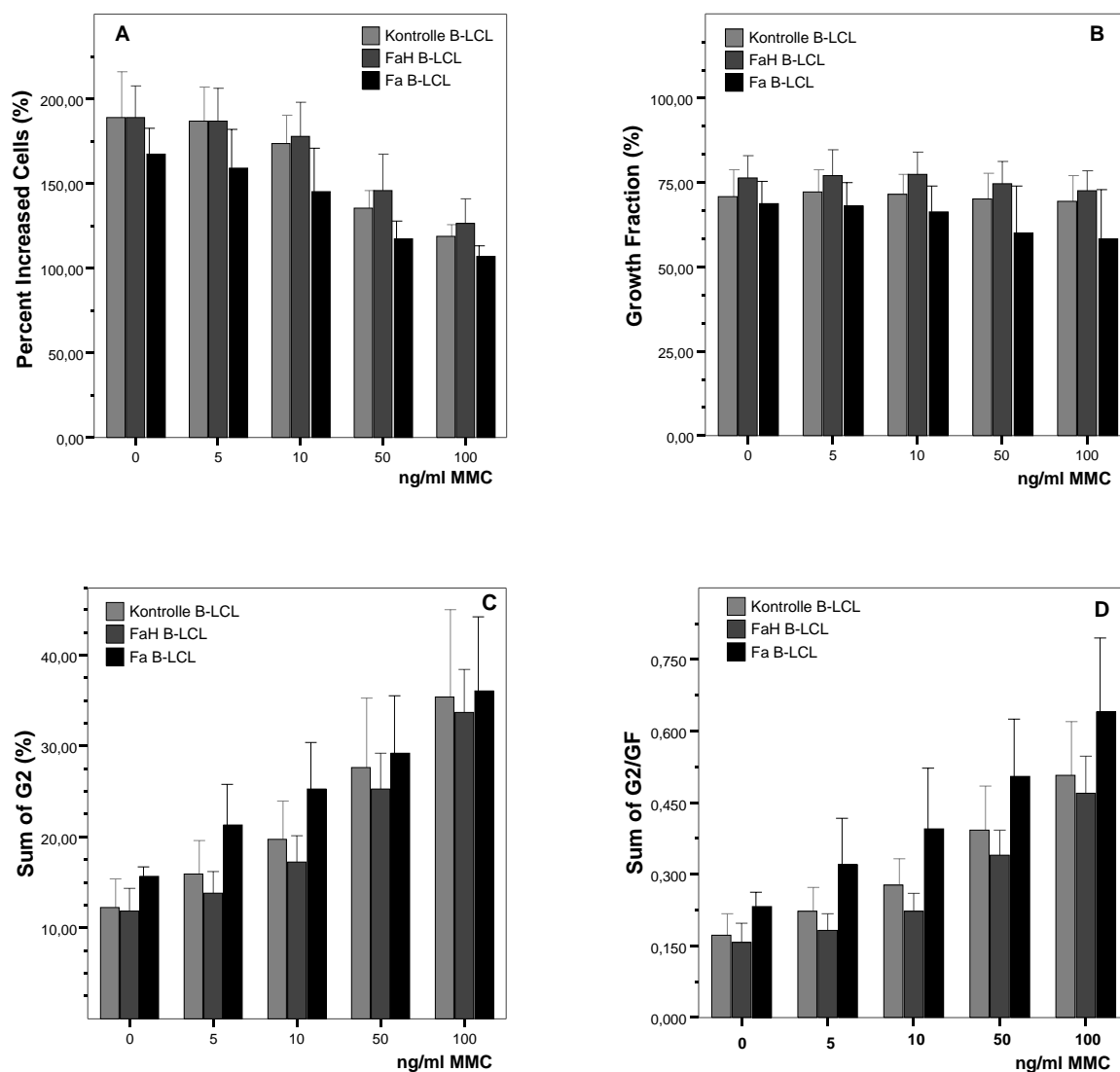


Abbildung 13: Proliferationskapazität (Bild A), Wachstumsfraktion (Bild B), Σ G2-Pasen (Bild C) und Σ G2/GF (Bild D) aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL). Die Balken zeigen die Mittelwerte der Parameter in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte.

Abbildung 13 A zeigt, dass die Proliferationskapazität (Percent Increased Cells, Zellzahl pro Zellzyklus) bei Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) in Abhängigkeit der Konzentration von Mitomycin C (MMC) zurückging. Die Mittelwerte der Proliferationskapazität (Percent Increased Cells) von Fanconi-Anämie Patienten lagen dabei etwas unter denen der beiden anderen Diagnosegruppen, was durch einen stärkeren Rückgang des Zellwachstums erklärt werden kann. Für den Eintritt von Zellen in den Zellzyklus, ausgedrückt mit der Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF über 100 minus G0-G1) ergaben sich mit Ausnahme von hohen Konzentrationen von MMC nur geringfügige Unterschiede (**Abb. 13 B**). Somit war die Zellaktivierung für alle Diagnosegruppen vergleichbar. Die Summe der G2-Phasen (Σ G2) stieg bei allen miteinander verglichenen Probanden in Abhängigkeit der Mitomycin C Dosierung an (**Abb.**

13 C). Wie aus der Abbildung leicht zu entnehmen ist, lagen die ermittelten Mittelwerte von Fanconi-Anämie Probanden über denen der Vergleichsgruppen. Die Summe der G2-Phasen durch Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$), mit dem neben der Erfassung der G2-Phasen Akkumulation auch eine Korrektur individueller Wachstumsunterschiede möglich ist, war bei den Fa-Individuen ebenfalls deutlich erhöht (**Abb. 13 D**). Die lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) der Erkrankten zeigten somit im Vergleich eine stärkere durch MMC induzierte Arretierung von Zellen in den G2-Phasen.

3.2.3 72 Stunden Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten

Als weiteres Zellsystem wurden subkutane humane Fibroblasten untersucht. Da es sich primär um asynchron wachsende Zellpopulationen handelte, mussten die Zellen im Rahmen der durchgeführten Zellkulturen durch Serumentzug über 48 Stunden synchronisiert werden. Bei durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren ist es zwar auch möglich asynchrone Zellpopulationen zu analysieren. Für die genaue Auflösung und anschließende Auswertung von bis zu vier Zellzyklen sind jedoch synchronisierte Zellen nötig. Die Auswertung asynchroner Zellpopulationen ist aber mit einem modifizierten Auswertungsschema für den ersten und zweiten Zellzyklus möglich.

3.2.3.1 Zellzyklusparameter von Zellkulturen mit humanen Fibroblasten

In den Abbildungen 14 und 15 sind die Zellzyklusparameter von 72 Stunden Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten aus den Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren graphisch aufgetragen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Zellzykluskompartimente (G0-G1, G1, S- und G2-Phase) und die Mittelwerte der abgeleiteten Größen, mit Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF), Proliferationskapazität (Percent Increased Cells), Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) und Summe der G2-Phasen durch Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte. Die genauen quantitativen Messdaten aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten können den Tabellen 24 und 25 im Anhangsteil der Arbeit entnommen werden.

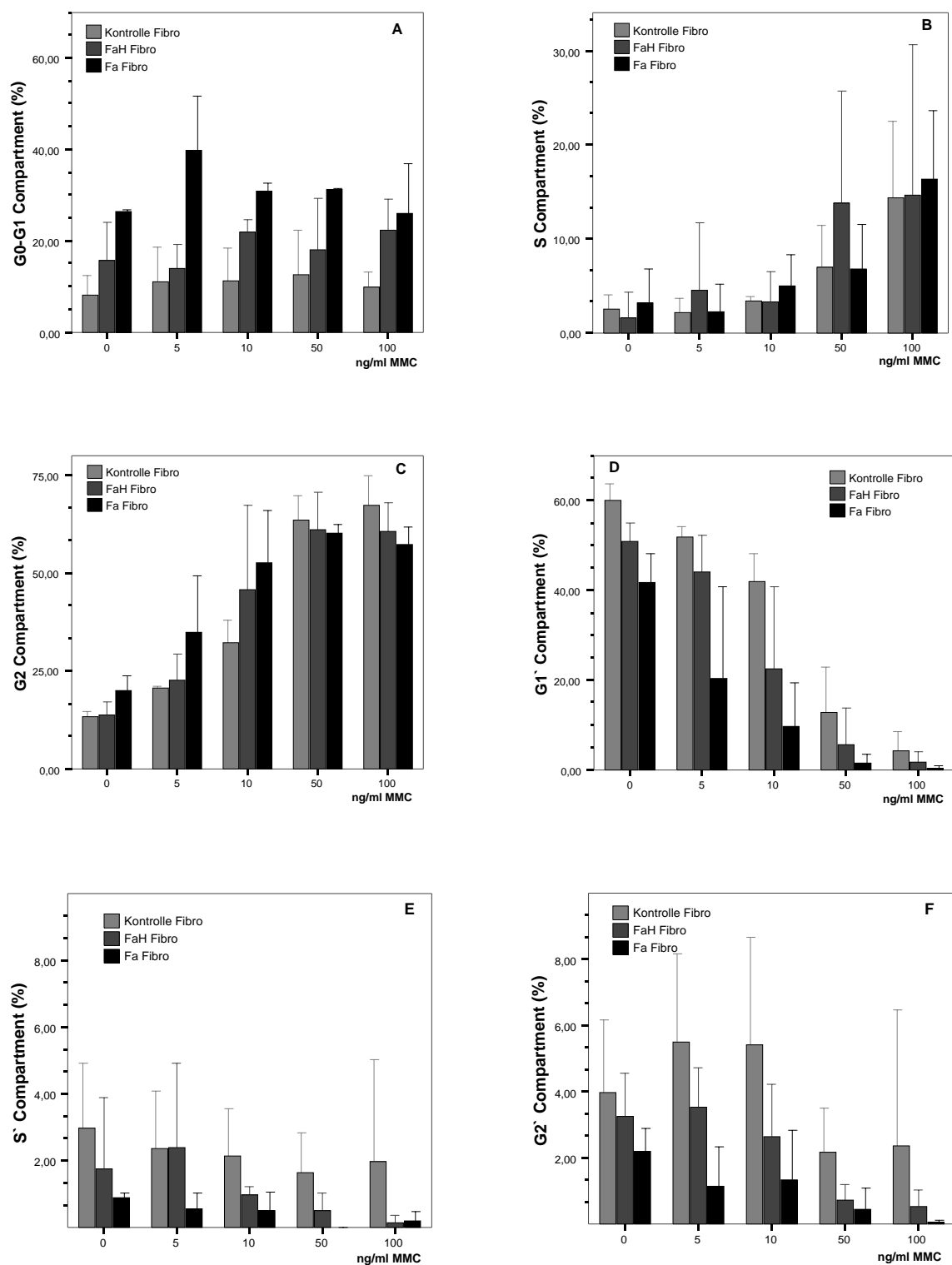


Abbildung 14: Zellzyklusparameter des ersten und zweiten Zellzyklus (Bild A bis F) von Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten. Aufgetragen jeweils im Vergleich für Probanden der Kontrollgruppe, Heterozygoten und Fanconi Anämie Patienten für unterschiedliche Konzentrationen von Mitomycin C. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte.

Wie aus **Abbildung 14 A** entnommen werden kann sind die G0-G1-Phasenanteile des ersten Zellzyklus bei Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten von Fanconi-Anämie Patienten und heterozygoten Probanden gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Dies bedeutet, dass der Anteil der proliferierenden Zellen, welche in den Zellzyklus eintreten vermindert ist. Weiterhin ist anhand den **Abbildungen 14 A, 14 B und 14 C** zu erkennen, dass die Phasenanteile des ersten Zellzyklus (G0-G1, G1, S- und G2-Phase) aufgrund des Ausscheidens von Zellen aus dem Zellzyklus zunehmen. Die ermittelten Messdaten der G2-Phase des ersten Zellzyklus von Fanconi-Anämie Patienten lagen dabei deutlich über denen der Vergleichsgruppen (**Abb. 14C**).

Für den zweiten Zellzyklus dagegen ging der Anteil der Zellen innerhalb der einzelnen Kompartimente (G1, G1, S- und G2-Phase) in Abhängigkeit von der Mitomycin C Konzentration zurück (**Abb. 14 D, 14 E und 14 F**).

Da innerhalb des dritten und vierten Zellzyklus vor allem bei hohen Dosen von Mitomycin C (MMC) nur noch wenige Zellen innerhalb der einzelnen Kompartimente beobachtet werden konnten, wurde auf eine graphische Darstellung der Messdaten verzichtet. Diese können jedoch den Tabellen 24 und 25 im Anhangsteil der Arbeit entnommen werden.

Die mit Hilfe des Softwareprogramms 2DAGE berechneten Größen der Proliferationskapazität (Percent Increased Cells), Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF), Summe der G2-Phasen (Σ G2) und Summe der G2-Phasen durch Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) sind in den **Abbildungen 15 A bis D** dargestellt. Wie aus **Abbildung 15 A** hervorgeht, nahmen die Zellzahlen pro Zellzyklus ausgedrückt über die Proliferationskapazität (Percent Increased Cells) in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration ab. Die Wachstumsfraktionen (Growth Fraction, GF) waren zwar bei heterozygoten Probanden und Erkrankten gegenüber den Kontrollpersonen etwas reduziert, im Verlauf zeigte sich jedoch nur eine geringe Beeinflussung durch den Anstieg der MMC Konzentration (**Abb. 15 B**). Das Eintreten von proliferierenden Zellen in den Zellzyklus war somit unbehindert möglich. Schon bei den durchgeführten Standardzellkulturen mit subkutanen Fibroblasten von Fa-Individuen lagen die ermittelten Werte der Summe der G2-Phasen (Σ G2) und Summe der G2-Phasen durch Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) über denen der Vergleichsgruppen (**Abb. 15 C und 15 D**). Für hohe Konzentrationen ging die Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen aber zurück, was durch die zytotoxischen Effekte von Mitomycin C mit starken Rückgang des Zellwachstums erklärt werden kann. Für die untersuchten Zellen der heterozygoten Probanden ergaben sich für die Summe der G2-Phasen durch Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) Messwerte, die oberhalb denen der gesunden Kontrollen lagen.

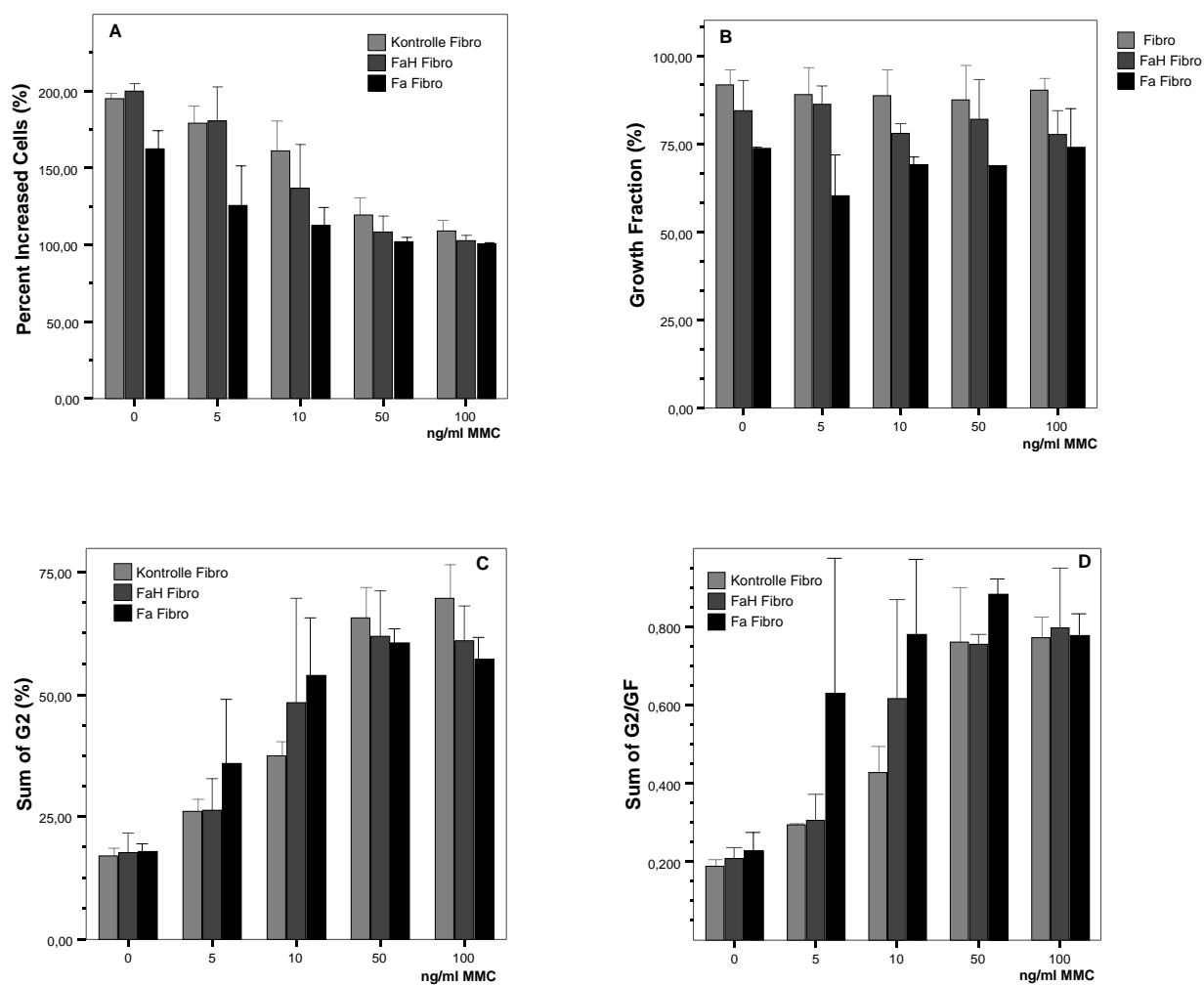


Abbildung 15: Proliferationskapazität (Bild A), Wachstumsfraktion (Bild B), Σ G2-Pasen (Bild C) und Σ G2/GF (Bild D) der Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Parameter in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte.

3.3 Zellzyklusparametervergleich aller Gruppen

Um relevante Unterschiede der untersuchten Zellsysteme (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) im Zellzyklusverhalten bei Standardzellkulturen, sowie bei Zellkulturen mit Zugabe von Mitomycin C (MMC) zu erkennen, sind die Messwerte aus den Zellzyklusanalysen im folgenden Abschnitt vergleichend dargestellt.

Bei den Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258 Ethidiumbromid Verfahren zeigte sich für 72 Stunden Zellkulturen mit periphere Blutlymphozyten bis zu vier gut voneinander abgrenzbare Zellzyklen. Die untersuchten lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) durchliefen bis zu drei komplette Zellzyklen innerhalb von 48 Stunden. Fibroblasten gelangten bei den durchgeführten 72 Stunden Zellkulturen bis in den vierten Zellzyklus.

Die G0-G1 Phasenanteile des ersten Zellzyklus aller Zellarten nahmen in Abhängigkeit der Mitomycin C (MMC) Dosis gegenüber den anderen Diagnosegruppen etwas stärker für Fanconi Anämie Patienten zu. Die vergleichbar geringsten Anteile innerhalb diesen Kompartiments wiesen dabei Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten auf, diese Zellen zeigten somit den höchsten Anteil von Zellen, welche in den Zellzyklus eintreten. Abbildung 16 zeigt die Mittelwerte der G0-G1-Phasen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration.

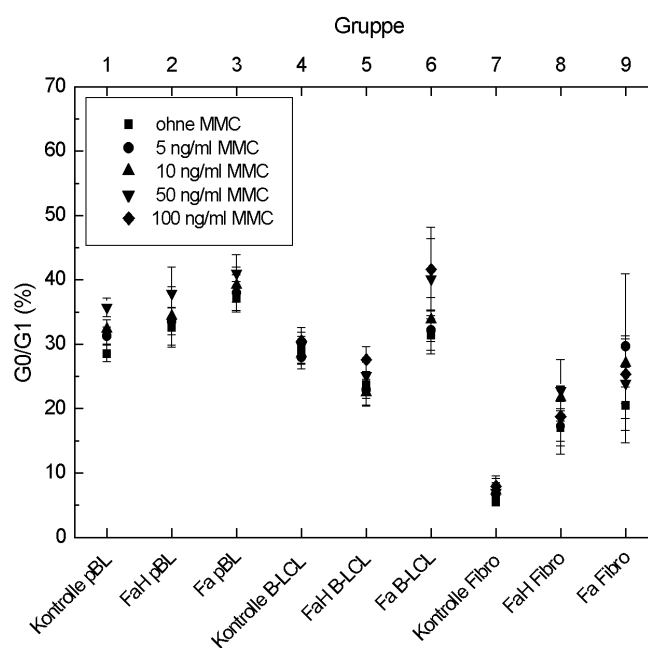


Abbildung 16: Mittelwerte der prozentualen Anteile der G0-G1 Fraktionen aller untersuchten Zellarten in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Messpunkte zeigen den Mittelwert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Geringe S-Phasenanteile des ersten Zellzyklus wiesen die Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblastenzellkulturen auf. Bei hohen Konzentrationen von Mitomycin C lagen die ermittelten Werte der S-Phasen des ersten Zellzyklus von Fanconi-Anämie Patienten über denen der

Vergleichsgruppen. Die Arretierung von Zellen in den G2-Phasen war bei Fa-Individuen gegenüber den heterozygoten Probanden und gesunden Versuchspersonen, mit Ausnahme hoher Konzentrationen von Mitomycin C (MMC) erhöht. Für die untersuchten Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) zeigten Fibroblasten dabei den stärksten Anstieg der G2-Phasen bei Zugabe von Mitomycin C.

Der geringste Anteil der G1-Phasen innerhalb des zweiten Zellzyklus lag bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten vor, somit ergaben sich für diese Zellart die geringsten Anhaltspunkte für ein Ausscheiden von Zellen aus dem Zellzyklus. Wie auch für die S-Phasenanteile des ersten Zellzyklus wurden bei Fibroblastenzellkulturen beim zweiten Zyklus gleichfalls nur eine geringe Anzahl von Zellen innerhalb dieses Kompartiments beobachtet. Die Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen des zweiten Zellzyklus war wiederum bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten und lymphoblastoiden Zellen von Fanconi-Anämie Patienten erhöht, diese nahm jedoch bei Zugabe von MMC rasch ab und lag dann unter den beiden Vergleichsgruppen.

Ab einer Dosierung von 50 ng/ml Mitomycin C konnten lymphoblastoide Zellen und subkutane Fibroblasten von Fanconi-Anämie Patienten die G1-Phase des dritten Zellzyklus schon nicht mehr erreichen. Aus diesem Grund konnten bei den durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen keine Messdaten mehr für die G1-, S- und G2-Phasenanteile des dritten Zellzyklus ermittelt werden.

Der komplette vierte Zellzyklus wurde bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten nur noch von heterozygoten und gesunden Versuchspersonen durchlaufen. Fibroblasten von gesunden Versuchspersonen konnten noch die G1-Phase des vierten Zellzyklus erreichen.

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, nahm die Wachstumsfraktionen (Growth-Fraction, GF, 100 minus G0-G1) bei allen Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) mit zunehmender MMC Konzentration nur leicht ab. Der Eintritt von proliferierenden Zellen in den Zellzyklus war bei den untersuchten Zellen von Fanconi-Anämie Patienten geringer.

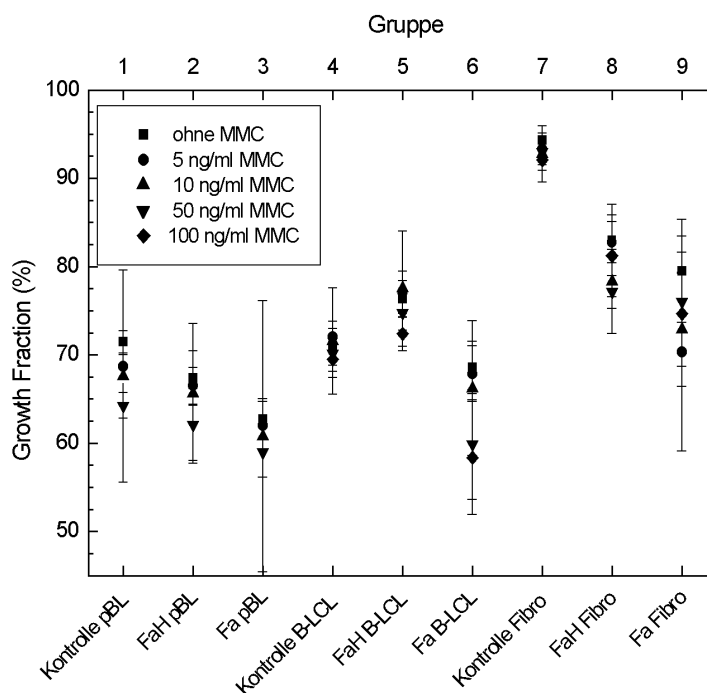


Abbildung 17: Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes der Wachstumsfraktionen (Growth-Fraction, 100 minus G0-G1) aller Diagnosegruppen unter Berücksichtigung der untersuchten Zellarten und Konzentrationen von Mitomycin C. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Die Proliferationskapazität (Percent Increased Cells) von Fanconi-Anämie Patienten lag bei den untersuchten Zellarten etwas unterhalb den Vergleichsgruppen. Wie aus der Abbildung hervorgeht waren die Zellzahlen innerhalb der Zellzyklen bei heterozygoten Probanden ebenfalls gegenüber der Kontrollgruppen leicht reduziert, die ermittelten Werte bewegten sich jedoch innerhalb des Standardfehlerbereiches des Mittelwertes (Abbildung 18).

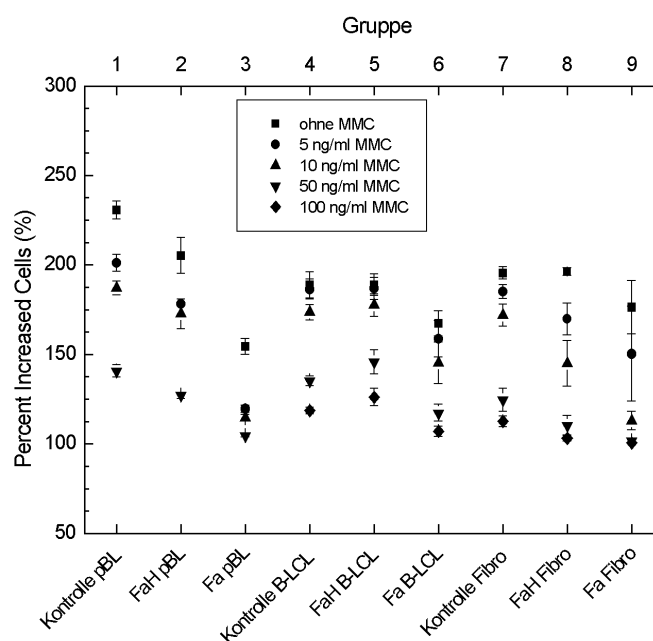


Abbildung 18: Mittelwerte der Proliferationskapazität (Percent Increased Cells, Anzahl der Plot-Zellen des jeweiligen Zellzyklus) aller Diagnosegruppen unter Berücksichtigung der untersuchten Zellarten und Mitomycin C Konzentrationen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Da die G2-Phase des Zellzyklus für die intakte Weitergabe der genetischen Informationen, der DNA-Reparatur und als wichtiger Kontrollpunkt des Zellzyklusses eine besondere Bedeutung hat, wurden die durch Mitomycin C induzierte Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen bei gesunden Kontrollpersonen den spontanen Erhöhungen der G2-Phasen bei Fanconi-Anämie Patienten gegenübergestellt. Des weiteren wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von MMC behandelt, um die erhöhte Sensivität gegenüber alkylierenden Substanzen bei Fanconi-Anämie näher zu charakterisieren.

Die Akkumulation von Zellen innerhalb der G2-Phasen konnte über die abgeleiteten Parameter Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) und die Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) erfasst werden und ist in den folgenden Abschnitten für alle Zellarten und Diagnosegruppen vergleichend dargestellt und statistisch analysiert worden. Die konzentrationsabhängige Zunahme der Arretierung von Zellen in den G2-Phasen wurde mit den beiden abgeleiteten Größen Increased $\Sigma G2+G2'/GF$ (Zunahme der G2-Phasen innerhalb der ersten beiden Zellzyklen) und der Increased $\Sigma G2/GF$ (Zunahme der G2-Phasen in allen Zellzyklen) untersucht (siehe hierzu 3.5.1 und 3.5.2).

3.4 Statistische Datenanalyse der zufälligen Variable $\Sigma G2/GF$

Zur Untersuchung der Induktion von Zellzyklusstörungen durch die alkylierende Substanz Mitomycin C (MMC) wurde die zufällige Variable Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) als abgeleiteter Parameter untersucht. Er dient zur Erfassung der DNA-Schädigungen innerhalb aller G2-Phasen ($\Sigma G2$) und enthält über die Quotientenbildung mit der Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF) eine für das Zellwachstum korrigierte Größe. Unterschiede in der G2-Phasenarretierung werden dabei durch den Vergleich der Summen der G2-Phasen und Summen der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ausgeglichen.

Die $\Sigma G2/GF$ wird im Rahmen der Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren als diagnostisches Kriterium bei Vorliegen von Fanconi-Anämie benutzt. Die ermittelten Werte der $\Sigma G2/GF$ bei den durchgeführten Zellzyklusanalysen mit Zellen von FA-Individuen liegen dabei bereits bei unbehandelten Zellkulturen über denen von gesunden Probanden.

3.41 Mittelwerte, Varianzen und Standardabweichung Summe der G2

Phasen/Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) aller Gruppen

Tabelle 10 gibt einen Überblick über Mittelwerte, Varianzen, Spannweiten und Standardabweichungen der Variable Summe der G2 Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) aller Gruppen bei Standardzellkulturen. Wie aus der Tabelle hervorgeht liegen die Mittelwerte der Σ G2/GF von Fanconi-Anämie Patienten für alle untersuchten Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) über denen der normalen Kontrollen. Besonders deutlich ist der Unterschied bei den durchgeführten Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten (Gruppe 3).

| SG2GF | | | | | | |
|-------------------------------|----|------------|----------|--------------------|------------|--------|
| Gruppe | N | Mittelwert | Varianz | Standardabweichung | Spannweite | Median |
| Gruppe 1 / Kontrolle pBL | 86 | ,188 | 1,47E-03 | 3,838E-02 | ,196 | ,192 |
| Gruppe 2 / FaH pBL | 3 | ,236 | 4,31E-04 | 2,077E-02 | 3,941E-02 | ,243 |
| Gruppe 3 / Fa pBL | 36 | ,468 | 5,01E-03 | 7,077E-02 | ,271 | ,476 |
| Gruppe 4 / Kontrolle B-LCL | 14 | ,172 | 2,03E-03 | 4,503E-02 | ,132 | ,177 |
| Gruppe 5 / FaH B-LCL | 10 | ,157 | 1,48E-03 | 3,843E-02 | ,110 | ,151 |
| Gruppe 6 / Fa B-LCL | 5 | ,231 | 9,10E-04 | 3,017E-02 | 7,061E-02 | ,232 |
| Gruppe 7 / Kontrolle Fibro | 2 | ,181 | 4,50E-04 | 2,121E-02 | 3,000E-02 | ,181 |
| Gruppe 8 / FaH Fibro | 3 | ,193 | 3,10E-05 | 5,570E-03 | 1,100E-02 | ,194 |
| Gruppe 9 / Fa Fibro | 3 | ,231 | 1,12E-03 | 3,344E-02 | 6,500E-02 | ,240 |

Tabelle 10: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der zufälligen Variable Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) bei Standardzellkulturen aller Diagnosegruppen.

Mit Ausnahme der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) aus den Zellzyklusanalysen von Standardzellkulturen lymphoblastoider Zellen lagen die ermittelten Werte der heterozygoten Probanden etwas über den Messdaten gesunder Versuchspersonen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Σ G2/GF Fraktion der Gruppe 1 (Kontrollgruppe, pBL) und 3 (Fanconi Anämie Patienten, pBL) sind im Rahmen der exemplarisch durchgeführten Normalverteilungsprüfung in den Abschnitten 3.4.2.1 und 3.4.2.2 zusätzlich graphisch dargestellt. Am Beispiel der in der Tabelle eingetragenen Mediane lassen die gewonnenen Messdaten aus den Zellzyklusanalysen eine symmetrische Verteilung erwarten.

3.4.2 Test auf Normalverteilung

Mit dem Shapiro–Francia-Test wurde die Prüfung auf Normalverteilung der zufälligen Variable Σ G2/GF vorgenommen. Dieser Test wird vor allem bei einer Stichprobengröße unter 50 verwendet. Liegt die Stichprobengröße darüber, wird von SPSS äquivalent dazu der Kolmogorov-Smirnov-Test benutzt. Die Nullhypothese, die dabei getestet wird, heißt die zufälligen Variablen seien normalverteilt. Berechnet wird hierbei eine Testgröße r (Shapiro-Francia-Testgröße). Der Wert der Testgröße r ist in den Tabellen der Spalte mit Namen Statistik zu entnehmen (siehe hierzu Tabelle 12). Über die deskriptiven Testverfahren des Programms SPSS kann diese Größe leicht errechnet werden und mit der Schranke $r_{\alpha}(n)$ verglichen werden, wobei α die Sicherheitswahrscheinlichkeit des Test darstellt (95%) und n dem Umfang der Stichprobe entspricht. Ist nun $r \leq r_{\alpha}(n)$, so ist die Normalitätsvermutung abzulehnen. Um das Nachschlagen der Testschranke $r_{\alpha}(n)$ zu vermeiden, liefert SPSS das zugehörige Signifikanzniveau, bei der der Test abzulehnen ist. Diese ist in den Tabellen mit Namen Signifikanz zu entnehmen. Im weiteren werden diese Signifikanzniveaus bei jedem Test angegeben. Die Normalitätsprüfung der zufälligen Variable Σ G2/GF der Gruppe 1 (Kontrollgruppe, pBL) und Gruppe 3 (Fanconi Anämie Patienten, pBL) von Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten sind in den Abschnitten 3.4.2.1 und 3.4.2.2 exemplarisch dargestellt. Für alle weiteren zufälligen Variablen wurde mit dem Shapiro–Francia-Testverfahren ebenfalls die Normalverteilungsprüfung vollzogen. Diese können den Tabellen 26 bis 30 im Anhangsteil der Arbeit entnommen werden.

3.4.2.1 Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion der Kontrollgruppe bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten

Für die Normalitätsvermutung der Variable Σ G2/GF bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten von gesunden Kontrollpersonen (Gruppe 1) lagen folgende Werte vor:

| Test auf Normalverteilung | | | |
|---------------------------|---------------------------------|----|-------------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | |
| | Statistik | N | Signifikanz |
| S G2/GF | ,097 | 86 | ,043 |

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 11: Normalitätsprüfung der Variable Σ G2/GF der Gruppe 1 mit dem Kolmogorov-Smirnov Test. Die Testgröße r entspricht der Statistik in der Tabelle.

Somit gilt $r > r_{\alpha}(n)$. Die Normalverteilungsvermutung ist somit nicht abzulehnen. Wie aus der Tabelle hervorgeht kann der Nullhypothese bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95,7 % (über $p = 1 - 0,043$) zugestimmt werden.

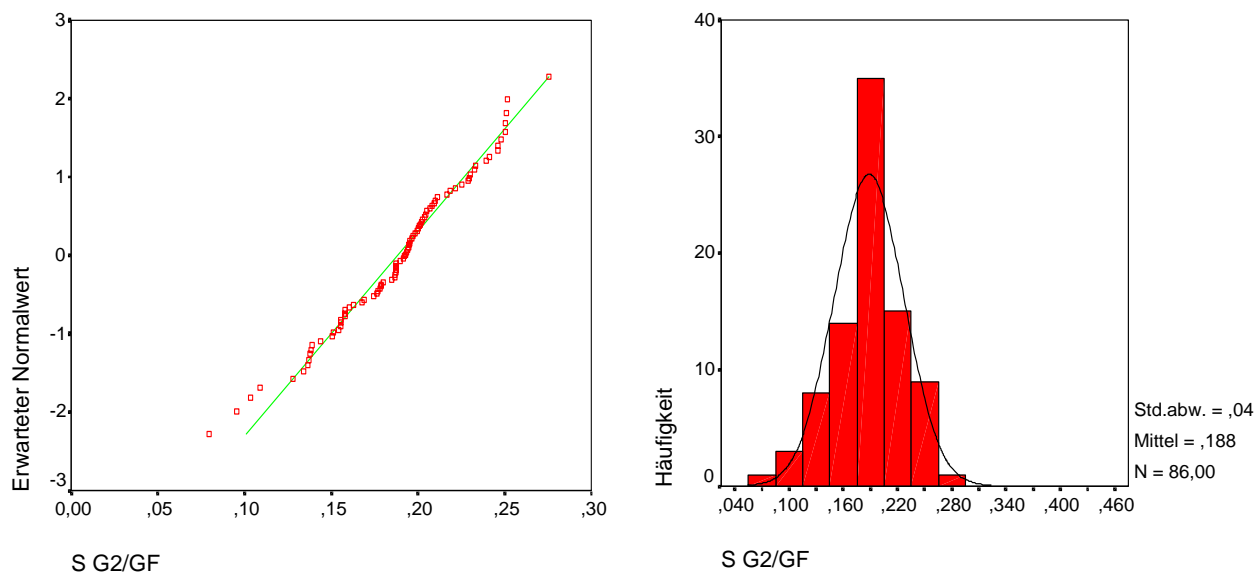


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Variable Σ G2/GF der Gruppe 1 bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten. Die linke Abbildung zeigt das Q-Q Diagramm. Im Histogramm der rechten Abbildung ist die Normalverteilungskurve mit eingezeichnet worden.

Im Q-Q Diagramm der Abbildung 19 streuen die Einzelwerte um eine Gerade und zeigen somit qualitatives Übereinstimmen mit Normalverteilung (linke Abbildung). Die rechte Abbildung zeigt dazu das zweidimensionale Histogramm mit eingezeichneter Normalverteilungskurve.

3.4.2.2 Darstellung der Σ G2/GF bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten von Fanconi Anämie Patienten (Gruppe 3)

Die Normalitätsprüfung der zufälligen Variable Summe Σ G2/GF bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten von Fanconi Anämie Patienten (Gruppe 3) wurde analog den Angaben unter 3.4.2 durchgeführt. Mit dem Shapiro–Francia-Testverfahren konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden:

Test auf Normalverteilung

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------|---------------------------------|----|-------------|--------------|----|-------------|
| | Statistik | N | Signifikanz | Statistik | N | Signifikanz |
| S G2/GF | ,090 | 36 | ,200* | ,952 | 36 | ,219 |

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 12: Normalitätsprüfung der Variable Σ G2/GF der Gruppe 3 nach dem Shapiro-Wilk-Verfahren. Die Testgröße r entspricht dabei der Spalte mit Namen Statistik in der Tabelle.

Somit gilt $r > r_{\alpha}(n)$. Die Normalverteilungsvermutung ist somit aufgrund des vorgegebenen Signifikanzniveaus (siehe 3.4.2) nicht abzulehnen. Wie aus der Tabelle in der Spalte Signifikanz des

Shapiro-Wilk-Testes deutlich zu entnehmen ist, wäre der Test erst ab einem Signifikanzniveau kleiner 78,1 % (über $p = 1 - \text{Signifikanz}$) abzulehnen.

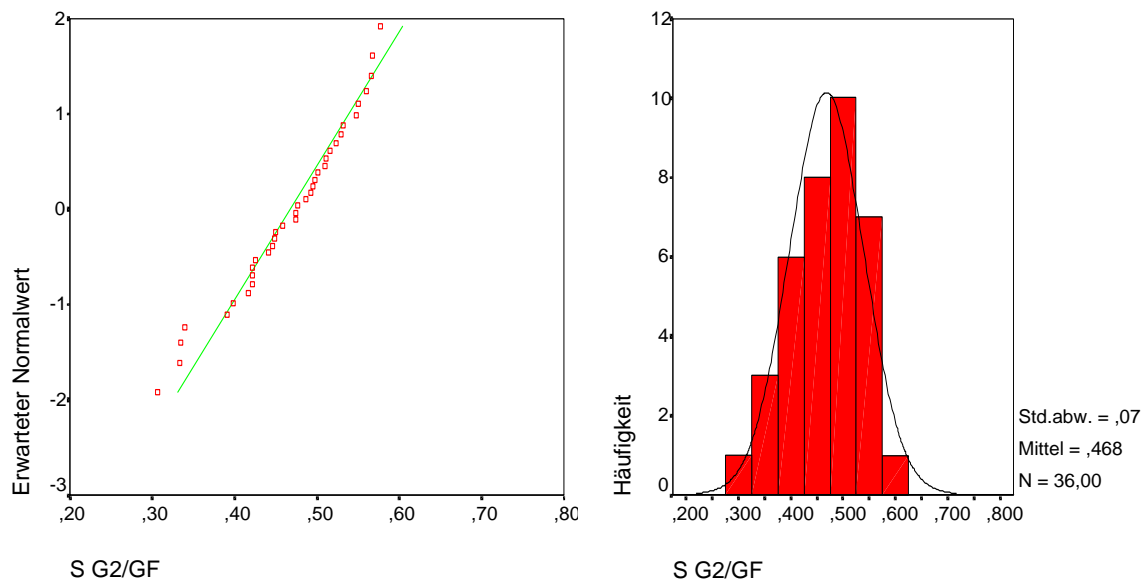


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Variable Σ G2/GF bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten der Fanconi-Anämie Patienten (Gruppe 3). Die linke Abbildung zeigt das Q-Q Diagramm. Im Histogramm der rechten Abbildung ist die Normalverteilungskurve mit eingezeichnet worden.

Abbildung 20 zeigt einen linearen Verlauf der Einzelwerte im QQ-Plot (linke Abbildung). Für sehr kleine und große Werte weichen die einzelnen Werte der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten von Fanconi-Anämie Patienten allerdings etwas vom Verlauf der Gerade ab. Dadurch wird die etwas niedrigere Sicherheitswahrscheinlichkeit erklärt mit der die Normalverteilungsvermutung der Σ G2/GF angenommen werden kann. Das zweidimensionale Histogramm der Abbildung 20 zeigt die Verteilung der Mittelwerte der Σ G2/GF mit eingezeichneter Normalverteilungskurve (rechte Abbildung).

3.5 Statistische Datenanalyse der Zunahme der G2 Phasen⁴ in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration

In den zweidimensionalen Zytoprogrammen eines Fanconi-Anämie Patienten im Abschnitt 3.2.1.1 fallen im Vergleich zu der gesunden Kontrollpersonen die deutlich erhöhten G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus auf. Um die durch Mitomycin C (MMC) induzierten konzentrationsabhängige Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen der einzelnen Zellzyklen

⁴ Formeln der Variable Zunahme der G2-Phasen siehe Abschnitt 2.3.5

besser beurteilen zu können, wurde deshalb neben der Summe der G2-Phasen in allen Zellzyklen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) als weiterer Vergleichsparameter die Summe der G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2+G2'/GF$) für die Auswertung mit herangezogen. Zusätzlich wurde über die Differenzbildung der entsprechenden Werte von der höheren mit der niederen Konzentration (z.B. $\Sigma G2+G2'/GF_{5\text{ ng/ml MMC}}$ $\Sigma G2+G2''/GF_{\text{ohne MMC}}$) die konzentrationsabhängige Zunahme der G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus (Increased $\Sigma G2+G2'/GF$) erfasst. Äquivalent dazu ist mit der Variable Increased $\Sigma G2/GF$ die konzentrationsabhängige Zunahme der G2-Phasen in allen Zellzyklen ausgedrückt worden. Wiederum war über die Quotientenbildung mit der Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF) eine für das Zellwachstum korrigierende Größe enthalten.

Die deskriptive Statistik der beiden abgeleiteten Größen (siehe 3.5.1 und 3.5.2) wurde mit Hilfe der Syntax Editor Funktion des Programms SPSS berechnet. Diese bildeten die Grundlage für die graphische Darstellung und den Vergleich der Mittelwerte im Abschnitt 3.6.3 und 3.6.4. Die Normalverteilungen wurden zuvor mit dem Shapiro–Francia-Test überprüft (siehe Tabellen 31 bis 38 im Anhangsteil). Bei den Probanden der Gruppe 1 bis 3 (periphere Blutlymphozyten) wurden keine Zellkulturen mit 100 ng/ml Mitomycin C (MMC) angesetzt (schraffierte Felder in den Tabellen).

3.5.1 Anstieg der G2-Phasen innerhalb des 1 und 2 Zellzyklus

Mit der Variable Increased $\Sigma G2+G2'/GF$ wurde die konzentrationsabhängige Zunahme der G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus erfasst.

Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, stiegen die G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus aller untersuchten Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen, subkutane humane Fibroblasten) von gesunden Kontrollpersonen in Abhängigkeit der Mitomycin C (MMC) Konzentration kontinuierlich an.

Für die untersuchten Zellen der heterozygoten Probanden ergaben sich unterschiedliche Beobachtungsmuster, so lag z.B. die Increased $\Sigma G2+G2'/GF$ Fraktion bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten und Fibroblasten etwas über den errechneten Werten von Normalpersonen.

Bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten und Fibroblasten von Fanconi-Anämie Patienten nahm die Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus bei Zugabe von Mitomycin C (MMC) zwar rasch zu, blieb dann jedoch auf einem stabilen Niveau. Die durch Mitomycin C induzierte Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen bei Fa-Individuen war somit nicht beliebig steigerbar.

| Gruppe | | Increased G2 + G2'/GF (5 ng/ml MMC) | Increased G2 + G2'/GF (10 ng/ml MMC) | Increased G2 + G2'/GF (50 ng/ml MMC) | Increased G2 + G2'/GF (100 ng/ml MMC) |
|-------------------------------|--------------------|---|--|--|---|
| Gruppe 1 / Kontrolle pBL | N | 71 | 77 | 69 | |
| | Mittelwert | 6,271E-02 | ,108 | ,243 | |
| | Varianz | 1,311E-03 | 2,195E-03 | 7,178E-03 | |
| | Standardabweichung | 3,621E-02 | 4,685E-02 | 8,472E-02 | |
| | Median | 5,783E-02 | ,100 | ,242 | |
| Gruppe 2 / FaH pBL | N | 2 | 3 | 3 | |
| | Mittelwert | 5,320E-02 | ,134 | ,291 | |
| | Varianz | 3,993E-03 | 4,529E-03 | 7,285E-03 | |
| | Standardabweichung | 6,319E-02 | 6,730E-02 | 8,535E-02 | |
| | Median | 5,320E-02 | ,120 | ,322 | |
| Gruppe 3 / Fa pBL | N | 27 | 32 | 30 | |
| | Mittelwert | ,164 | ,183 | ,165 | |
| | Varianz | 3,708E-03 | 5,529E-03 | 1,339E-02 | |
| | Standardabweichung | 6,090E-02 | 7,436E-02 | ,116 | |
| | Median | ,167 | ,180 | ,159 | |
| Gruppe 4 / Kontrolle B-LCL | N | 14 | 14 | 14 | 14 |
| | Mittelwert | 4,735E-02 | ,103 | ,221 | ,335 |
| | Varianz | 1,176E-03 | 2,750E-03 | 8,415E-03 | 1,128E-02 |
| | Standardabweichung | 3,429E-02 | 5,244E-02 | 9,174E-02 | ,106 |
| | Median | 4,752E-02 | 7,997E-02 | ,201 | ,373 |
| Gruppe 5 / FaH B-LCL | N | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | Mittelwert | 2,329E-02 | 6,483E-02 | ,182 | ,311 |
| | Varianz | 1,641E-04 | 6,863E-04 | 1,797E-03 | 4,610E-03 |
| | Standardabweichung | 1,281E-02 | 2,620E-02 | 4,239E-02 | 6,790E-02 |
| | Median | 2,361E-02 | 5,994E-02 | ,177 | ,302 |
| Gruppe 6 / Fa B-LCL | N | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Mittelwert | 8,862E-02 | ,162 | ,272 | ,407 |
| | Varianz | 7,174E-03 | 1,287E-02 | 1,180E-02 | 1,658E-02 |
| | Standardabweichung | 8,470E-02 | ,113 | ,109 | ,129 |
| | Median | 7,018E-02 | ,107 | ,255 | ,445 |
| Gruppe 7 / Kontrolle Fibro | N | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Mittelwert | ,113 | ,208 | ,515 | ,617 |
| | Varianz | 3,861E-04 | 3,242E-03 | 1,739E-02 | 1,338E-04 |
| | Standardabweichung | 1,965E-02 | 5,694E-02 | ,132 | 1,157E-02 |
| | Median | ,113 | ,208 | ,515 | ,617 |
| Gruppe 8 / FaH Fibro | N | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Mittelwert | ,119 | ,308 | ,604 | ,569 |
| | Varianz | 4,783E-03 | 2,370E-02 | 6,115E-03 | 2,390E-02 |
| | Standardabweichung | 6,916E-02 | ,154 | 7,820E-02 | ,155 |
| | Median | 9,459E-02 | ,300 | ,568 | ,519 |
| Gruppe 9 / Fa Fibro | N | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Mittelwert | ,233 | ,525 | ,568 | ,517 |
| | Varianz | ,109 | 3,837E-02 | 5,932E-04 | 5,228E-03 |
| | Standardabweichung | ,330 | ,196 | 2,436E-02 | 7,230E-02 |
| | Median | 4,217E-02 | ,617 | ,564 | ,479 |

Tabelle 13: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen und Mediane der Variable $\Sigma G2+G2'/GF$. Bei den Probanden der Gruppe 1 bis 3 (periphere Blutlymphozyten) wurden keine Zellkulturen mit 100 ng/ml Mitomycin C angesetzt (schraffierte Felder).

Dagegen stiegen die Mittelwerte der Increased $\Sigma G2+G2'/GF$ bei Kulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) von Fanconi-Anämie Patienten konzentrationsabhängig an. Diese lagen dabei deutlich über denen der normalen Kontrollen.

Wie man weiterhin aus der Tabelle entnehmen kann, reagierten die untersuchten subkutanen Fibroblasten am sensitivsten auf die Zugabe von Mitomycin C (MMC). Die Zellen zeigten eine höhere Arretierung von Zellen in den G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus als lymphoblastoide Zellen (B-LCL) oder periphere Blutlymphozyten.

Der Verlauf der Zunahme der G2-Phasen Akkumulation innerhalb des ersten und zweiten Zellzyklus (Increased $\Sigma G2+G2'/GF$) ist im Abschnitt 3.6.3 graphisch dargestellt.

3.5.2 Zunahme der G2-Phasen in allen Zellzyklen

Mit der Variable Increased $\Sigma G2/GF$ wurde die konzentrationsabhängige Zunahme der G2-Phasen in allen Zellzyklen erfasst. In Tabelle 14 sind die Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen und Mediane dargestellt.

Im Vergleich zu der in Abschnitt 3.5.1 untersuchten Increased $\Sigma G2+G2'/GF$ Fraktion ergaben sich für Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten (Gruppe 1 bis 3) niedrigere Mittelwerte. Periphere Blutlymphozyten zeigten somit eine stärkere Zunahme der Mitomycin C (MMC) induzierten G2-Phasen Arretierung innerhalb des ersten und zweiten Zellzyklus. Bei den untersuchten Zellen von Fanconi-Anämie Patienten steig die Increased $\Sigma G2/GF$ wiederum rasch an, blieb dann konstant und nahm bei hohen Konzentration (periphere Blutlymphozyten und Fibroblasten) infolge des starken Rückgangs des Zellwachstums und der zytotoxischen Effekte von Mitomycin C (MMC) wieder ab. Bei lymphoblastoiden Zellen, B-LCL (Gruppen 4 bis 6) ergaben sich nur geringe Unterschiede im Vergleich zur G2-Phasen Arretierung des ersten und zweiten Zellzyklus (Increased $\Sigma G2+G2'/GF$). Der Verlauf der konzentrationsabhängigen Zunahme der G2-Phasen Akkumulation in allen Zellzyklen (Increased $\Sigma G2/GF$) ist im Abschnitt 3.6.4 graphisch dargestellt.

| Gruppe | | Increased Sum of G2/GF (5 ng/ml MMC) | Increased Sum of G2/GF (10 ng/ml MMC) | Increased Sum of G2/GF (50 ng/ml MMC) | Increased Sum of G2/GF (100 ng/ml MMC) |
|-------------------------------|--------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Gruppe 1 / Kontrolle pBL | N | 71 | 77 | 69 | |
| | Mittelwert | 5,265E-02 | 9,048E-02 | ,205 | |
| | Varianz | 1,223E-03 | 1,879E-03 | 6,871E-03 | |
| | Standardabweichung | 3,497E-02 | 4,335E-02 | 8,289E-02 | |
| | Median | 5,421E-02 | 8,899E-02 | ,208 | |
| Gruppe 2 / FaH pBL | N | 2 | 3 | 3 | |
| | Mittelwert | 4,157E-02 | ,117 | ,257 | |
| | Varianz | 2,986E-03 | 4,125E-03 | 6,521E-03 | |
| | Standardabweichung | 5,465E-02 | 6,422E-02 | 8,076E-02 | |
| | Median | 4,157E-02 | ,119 | ,293 | |
| Gruppe 3 / Fa pBL | N | 27 | 32 | 30 | |
| | Mittelwert | ,149 | ,167 | ,150 | |
| | Varianz | 3,264E-03 | 5,031E-03 | 1,176E-02 | |
| | Standardabweichung | 5,713E-02 | 7,093E-02 | ,108 | |
| | Median | ,148 | ,154 | ,149 | |
| Gruppe 4 / Kontrolle B-LCL | N | 14 | 14 | 14 | 14 |
| | Mittelwert | 4,922E-02 | ,104 | ,220 | ,334 |
| | Varianz | 1,124E-03 | 2,798E-03 | 8,505E-03 | 1,119E-02 |
| | Standardabweichung | 3,353E-02 | 5,290E-02 | 9,222E-02 | ,106 |
| | Median | 4,805E-02 | 7,997E-02 | ,201 | ,372 |
| Gruppe 5 / FaH B-LCL | N | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | Mittelwert | 2,316E-02 | 6,470E-02 | ,182 | ,311 |
| | Varianz | 1,668E-04 | 6,900E-04 | 1,795E-03 | 4,611E-03 |
| | Standardabweichung | 1,292E-02 | 2,627E-02 | 4,237E-02 | 6,790E-02 |
| | Median | 2,361E-02 | 5,994E-02 | ,177 | ,302 |
| Gruppe 6 / Fa B-LCL | N | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Mittelwert | 8,862E-02 | ,162 | ,272 | ,407 |
| | Varianz | 7,174E-03 | 1,287E-02 | 1,180E-02 | 1,658E-02 |
| | Standardabweichung | 8,470E-02 | ,113 | ,109 | ,129 |
| | Median | 7,018E-02 | ,107 | ,255 | ,445 |
| Gruppe 7 / Kontrolle Fibro | N | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Mittelwert | ,113 | ,208 | ,513 | ,617 |
| | Varianz | 3,645E-04 | 3,280E-03 | 1,730E-02 | 1,445E-04 |
| | Standardabweichung | 1,909E-02 | 5,728E-02 | ,132 | 1,202E-02 |
| | Median | ,113 | ,208 | ,513 | ,617 |
| Gruppe 8 / FaH Fibro | N | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Mittelwert | ,116 | ,304 | ,597 | ,563 |
| | Varianz | 4,011E-03 | 2,147E-02 | 7,141E-03 | 2,527E-02 |
| | Standardabweichung | 6,333E-02 | ,147 | 8,450E-02 | ,159 |
| | Median | 9,400E-02 | ,300 | ,565 | ,518 |
| Gruppe 9 / Fa Fibro | N | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Mittelwert | ,282 | ,573 | ,616 | ,565 |
| | Varianz | 8,864E-02 | 1,166E-02 | 8,061E-03 | 5,819E-03 |
| | Standardabweichung | ,298 | ,108 | 8,978E-02 | 7,628E-02 |
| | Median | ,193 | ,610 | ,594 | ,594 |

Tabelle 14: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen und Mediane der Variable Zunahme der Σ G2/GF. Bei den Probanden der Gruppe 1 bis 3 (periphere Blutlymphozyten) wurden keine Zellkulturen mit 100 ng/ml Mitomycin C angesetzt (schraffierte Felder).

3.6 Entwicklung von Mittelwert und Streuung der Mittelwerte der G2-Phasen

Die durch Mitomycin C (MMC) induzierte Arretierung von Zellen in den G2-Phasen wurde mit der Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) und Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) erfasst. Die konzentrationsabhängige Zunahme der G2-Phasen im ersten und zweiten Zellzyklus und in allen Zellzyklen wurde über die beiden abgeleiteten Parameter $\Sigma G2 + G2^*/GF$ und $\Sigma G2/GF$ untersucht. Deren Verlauf ist in den folgenden Abschnitten dargestellt. Der Vergleich der Mittelwerte wurde mit der parametrischen Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.5). Im vorliegenden Fall wurde aufgrund der besseren Übersicht jeweils die Mittelwerte einer Variable untersucht und miteinander verglichen. Die getestete Nullhypothese hierbei lautete: Die Mittelwerte der zufälligen Variable sind nicht gleich. Demgegenüber wurde die Alternativhypothese formuliert: Die Mittelwerte der zufälligen Variable sind gleich. Getestet wurde dabei auf einem Signifikanzniveau von 95 % (Sicherheitswahrscheinlichkeit). Da es sich bei der von SPSS ausgegebenen Signifikanz p um eine Irrtumswahrscheinlichkeit handelt, wird die Nullhypothese bei einem Signifikanzniveau von 95 % für $p > 0,05$ abgelehnt (Sicherheitswahrscheinlichkeit = $1 - \text{Irrtumswahrscheinlichkeit}$).

3.6.1 Verlauf der Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$)

Der Verlauf der Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) aller Diagnosegruppen ist in Abbildung 21 dargestellt. Dazu ist auf der y-Achse der Mittelwert der $\Sigma G2$ -Phasen aufgetragen worden. Der untere x-Achsbereich zeigt die Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Zellart. Zusätzlich ist auf der oberen x-Achse die Gruppennummer hinzugefügt. Die Messpunkte bei den unterschiedlichen Konzentrationen von Mitomycin C (MMC) sind mit Symbolen innerhalb der Abbildung gekennzeichnet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, nahmen die Mittelwerte der Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) bei allen untersuchten Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) von gesunden Probanden in Abhängigkeit der Mitomycin C Dosis zu. Sehr sensitiv gegenüber Mitomycin C (MMC) reagierten subkutane humane Fibroblasten bei Konzentrationen von 50 ng/ml MMC [§] und 100 ng/ml MMC [◆]. Sie wiesen im Vergleich zu den untersuchten peripheren Blutlymphozyten und lymphoblastoiden Zellen deutlich höhere Werte der Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) auf.

Schon bei Standardzellkulturen waren die $\Sigma G2$ -Phasen bei Fanconi-Anämie Patienten gegenüber den anderen Diagnosegruppen erhöht. Große Unterschiede ergaben sich für die Mittelwerte der Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) von Fa-Individuen im Vergleich zu den gesunden und

heterozygoten Probanden bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten bei Zugabe von 5 und 10 ng/ml Mitomycin C [4], sowie bei Fibroblastenkulturen mit Zugabe von 10 ng/ml MMC [4]. Bei hohen Konzentrationen von Mitomycin C ging die Summe der G2-Phasen (Σ G2) bei Fanconi-Anämie Patienten, mit Ausnahme der Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen, wieder zurück, (pBL bei 50 ng/ml MMC [5] ebenso Fibroblastenkulturen bei 100 ng/ml MMC [4]). Die Abnahme kann durch den starken Rückgang des Zellwachstums durch die zytotoxischen Effekte von Mitomycin C (MMC) erklärt werden.

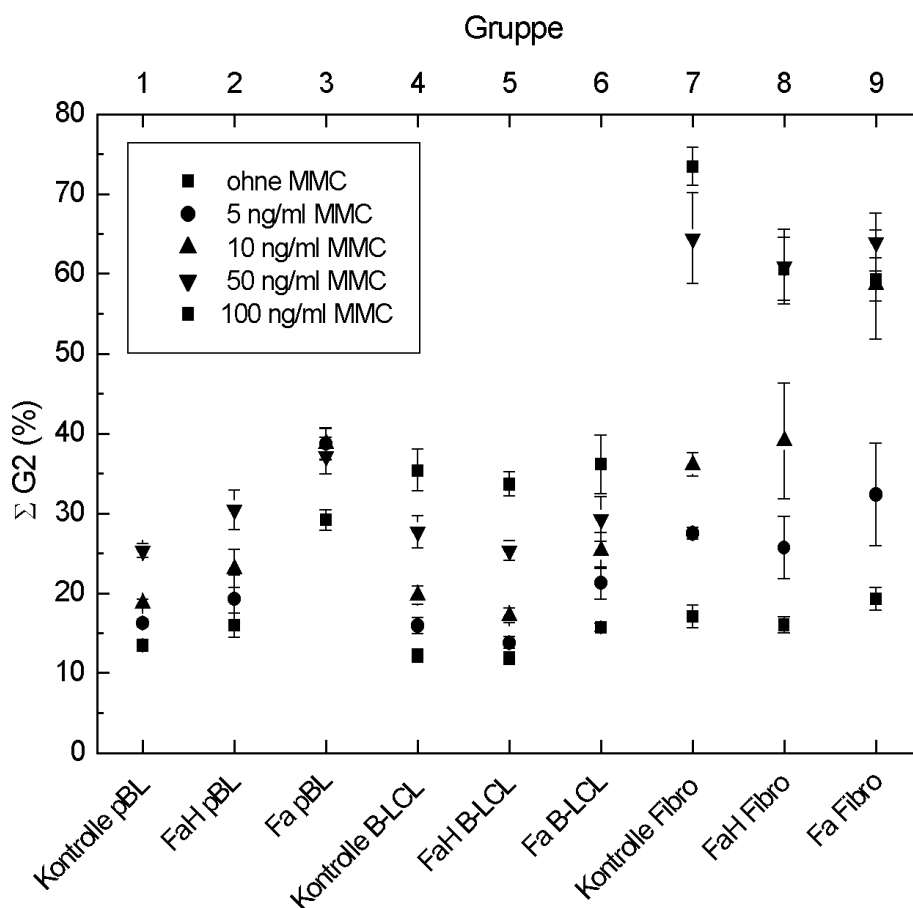


Abbildung 21: Mittelwerte der Summe der G2-Phasen (Σ G2) aller Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten von heterozygoten Probanden (FaH pBL bei [■, ●, ▲, ▼, ◆]) lagen die Mittelwerte der Summe der G2-Phasen (Σ G2) etwas über denen der Kontrollen, jedoch noch innerhalb des Standardfehlerbereiches der Gesunden. Ähnlich verhielten sich die Werte der Σ G2-Phasen (Σ G2) bei Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) dieser Diagnosegruppe (FaH B-LCL bei [■, ●, ▲, ▼, ◆]). Die untersuchten Fibroblasten der heterozygoten Versuchspersonen zeigten wie auch die der gesunden Probanden und der Erkrankten die höchste Sensitivität gegenüber Mitomycin C (MMC). Ab einer Konzentration von

50 ng/ml Mitomycin C (MMC) nahmen die Mittelwerte der Summe der G2-Phasen (Σ G2) jedoch wieder ab (FaH B-LCL bei [♦]).

Im Mittelwertvergleich wurde zunächst die Summe der G2-Phasen (Σ G2) der einzelnen Gruppen unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellart (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) miteinander verglichen.

Wie aus Tabelle 15 entnommen werden kann, sind die Mittelwerte der Summe der G2-Phasen (Σ G2) bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten von Fanconi-Anämie Patienten signifikant von den gesunden Kontrollpersonen zu unterscheiden. Signifikant unterschiedlich war auch die Akkumulation von Fibroblasten in den G2-Phasen bei einer Konzentration von 10 ng/ml Mitomycin C (MMC). Demgegenüber konnten heterozygote Probanden über den Vergleich der Σ G2-Phasen nicht von den gesunden Versuchspersonen abgegrenzt werden.

| Gruppe / Zellart | Konzentration | FaH | Fa |
|-------------------|---------------|---------|----------|
| Kontrolle / pBL | ohne MMC | p=0,991 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | ohne MMC | p=1 | p=0,870 |
| Kontrolle / Fibro | ohne MMC | p=1 | p=1 |
| Kontrolle / pBL | 5 ng/ml | p=0,999 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 5 ng/ml | p=0,995 | p=0,728 |
| Kontrolle / Fibro | 5 ng/ml | p=1 | p=0,994 |
| Kontrolle / pBL | 10 ng/ml | p=0,977 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 10 ng/ml | p=0,993 | p=0,829 |
| Kontrolle / Fibro | 10 ng/ml | p=1 | p=0,010* |
| Kontrolle / pBL | 50 ng/ml | p=0,985 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 50 ng/ml | p=0,999 | p=1 |
| Kontrolle / Fibro | 50 ng/ml | p=1 | p=1 |
| Kontrolle / B-LCL | 100 ng/ml | p=0,994 | p=1 |
| Kontrolle / Fibro | 100 ng/ml | p=0,472 | p=0,361 |

Tabelle 15: Mittelwertvergleich der Σ G2-Phasen unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellart. Getestet wurde die Nullhypothese „die Mittelwerte der Σ G2-Phasen sind nicht gleich“ gegenüber der Kontrollgruppe. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden.

Wie weiterhin aus Tabelle 15 hervorgeht, waren bei Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) die Mittelwerte der Summe der G2-Phasen (Σ G2) aller Diagnosegruppen nicht signifikant zu unterscheiden.

3.6.2 Verlauf der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF)

Mit der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) wird die Akkumulation von Zellen in allen G2-Phasen des Zellzyklus erfasst. Im Gegensatz zu der in Abschnitt 3.6.1 untersuchten Summe der G2-Phasen (Σ G2) ist über die Quotientenbildung mit der Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF) eine für das Zellwachstum korrigierende Größe enthalten. Der Verlauf der Mittelwerte der Σ G2/GF ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Messpunkte der Mittelwerte der Σ G2/GF sind unter Berücksichtigung der Mitomycin C Konzentration in der Abbildung mit verschiedenen Symbolen gekennzeichnet [■,), 4, 5 und ♦]. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Die Ordinate gibt den Mittelwert der Σ G2/GF an. Auf der unteren Abszisse ist die Diagnosegruppe unter Berücksichtigung der Zellart aufgetragen. Die obere Abszisse zeigt die Gruppennummer. Bei einem Probanden aus der Kontrollgruppe lagen für eine Zellkultur mit peripheren Blutlymphozyten bei einer Konzentration von 20 ng/ml Mitomycin C (MMC) Ergebnisse aus den Zellzyklusanalysen vor. Der zusätzliche Messpunkt der Σ G2/GF ist in einer gleichen Abbildung im Anhangsteil dieser Arbeit wiedergeben (Abbildung 26).

Wie aus Abbildung 22 hervorgeht nahm die Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) bei allen untersuchten Zellarten von gesunden Versuchspersonen konzentrationsabhängig zu. Besonders sensitiv gegenüber der Zugabe von Mitomycin C (MMC) waren Fibroblasten (Kontrolle Fibro bei 50 ng/ml [5] und 100 ng/ml [♦] MMC).

Unter Berücksichtigung des Standardfehlerbereichs der Σ G2/GF bei Fibroblastenzellkulturen (Fa Fibro bei [j]), lagen die Mittelwerte der Σ G2/GF von Fanconi-Anämie Patienten deutlich über denen der Vergleichsgruppen. Mit Ausnahme der untersuchten lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) der FA-Individuen ging der Mittelwert der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) bei hohen Konzentrationen von Mitomycin C (MMC) wieder zurück (Zellkulturen mit 50 ng/ml MMC [5] und 100 ng/ml MMC [♦]). Dies kann durch die zytotoxischen Effekte von Mitomycin C (MMC) und den dadurch bedingten starken Rückgang des Zellwachstums erklärt werden. Wie der Abbildung weiterhin entnommen werden kann lag die Σ G2/GF bei den heterozygoten Versuchspersonen etwas über denen der Kontrollgruppe (FaH pBL und Fibro bei [■,), 4, 5 und ♦]), diese ging aber ebenfalls bei hohen Dosierungen von Mitomycin C (MMC) zurück (FaH Fibro [♦]).

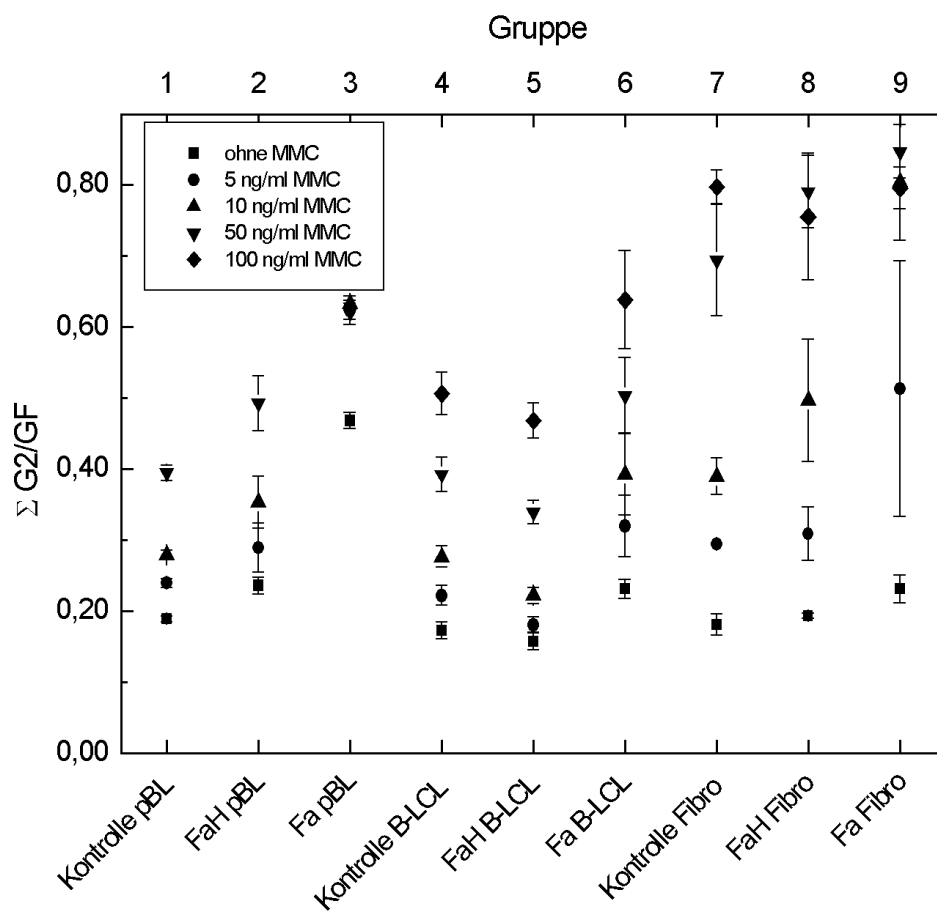


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Σ G2/GF aller Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Balken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Die Ergebnisse des Mittelwertvergleiches der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) sind in Tabelle 16 gezeigt. Wie auch im Vergleich der Summe der G2-Phasen (Σ G2) in Abschnitt 3.6.1 war die Σ G2/GF von Fanconi-Anämie Patienten bereits bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten signifikant von den gesunden Kontrollpersonen zu unterscheiden. Bei den untersuchten lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und Fibroblasten zeigten sich diese Unterschiede erst bei Zellkulturen mit Zugabe von Mitomycin C (5 und 10 ng/ml MMC). Demgegenüber ergaben sich für die Mittelwerte der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) von heterozygoten und gesunden Versuchspersonen keine signifikanten Differenzen.

| Gruppe / Zellart | Konzentration | FaH | Fa |
|-------------------|---------------|---------|----------|
| Kontrolle / pBL | ohne MMC | p=0,751 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | ohne MMC | p=0,998 | p=0,308 |
| Kontrolle / Fibro | ohne MMC | p=1 | p=0,966 |
| Kontrolle / pBL | 5 ng/ml | p=0,983 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 5 ng/ml | p=0,867 | p=0,121 |
| Kontrolle / Fibro | 5 ng/ml | p=1 | p=0,012* |
| Kontrolle / pBL | 10 ng/ml | p=0,564 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 10 ng/ml | p=0,504 | p=0,014* |
| Kontrolle / Fibro | 10 ng/ml | p=0,659 | p=0,000* |
| Kontrolle / pBL | 50 ng/ml | p=0,627 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 50 ng/ml | p=0,879 | p=0,283 |
| Kontrolle / Fibro | 50 ng/ml | p=0,959 | p=0,620 |
| Kontrolle / B-LCL | 100 ng/ml | p=0,958 | p=0,218 |
| Kontrolle / Fibro | 100 ng/ml | p=0,998 | p=1 |

Tabelle 16: Mittelwertvergleich der Σ G2/GF unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellart. Getestet wurde die Nullhypothese „die Mittelwerte der Σ G2/GF Fraktion sind nicht gleich“ gegenüber der Kontrollgruppe. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden.

Um Unterschiede in der G2-Phasen Arretierung für die untersuchten Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) zu erfassen, wurden zusätzlich die Mittelwerte der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) innerhalb der einzelnen Gruppen miteinander verglichen (Tabelle 17, 18 und 19).

Wie aus Tabelle 17 zu entnehmen ist, ergaben sich im Vergleich der Zellarten von Kontrollpersonen signifikante Unterschiede für Fibroblastenzellkulturen bei hohen Dosierungen von Mitomycin C (MMC). Somit zeigten Fibroblasten eine stärkere Reaktion auf die Zugabe von

Mitomycin C als lymphoblastoide Zellen und periphere Blutlymphozyten. Da für periphere Blutlymphozyten keine Zellkulturen mit 100 ng/ml MMC durchgeführt wurden, ist für diese Konzentration in der Gruppenkombination Kontrolle, B-LCL mit Kontrolle, Fibro getestet ($p=0,016^*$) worden.

| Gruppe / Zellart | Konzentration | Kontrolle / B-LCL | Kontrolle Fibro |
|------------------|---------------|-------------------|-----------------|
| Kontrolle / pBL | ohne MMC | $p=0,964$ | $p=1$ |
| Kontrolle / pBL | 5 ng/ml | $p=0,994$ | $p=0,968$ |
| Kontrolle / pBL | 10 ng/ml | $p=1$ | $p=0,276$ |
| Kontrolle / pBL | 50 ng/ml | $p=1$ | $p=0,000^*$ |

Tabelle 17: Mittelwertvergleich der Σ G2/GF von gesunden Kontrollpersonen der untersuchten Zellarten unter Berücksichtigung der Mitomycin C Dosierung. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Die Mittelwerte der Σ G2/GF sind somit verschieden.

In Tabelle 18 sind die Mittelwerte der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) von heterozygoten Probanden für die verschiedenen Zellarten miteinander verglichen worden. Signifikante Unterschiede ergaben sich wiederum für Zellkulturen mit hohen Konzentrationen von Mitomycin C (bei Zellkulturen mit 100 ng/ml MMC $p=0,005^*$). Die untersuchten lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und Fibroblasten waren dabei aufgrund der höheren Sensivität der Zellen gegenüber Mitomycin C (MMC) ab 10 ng/ml MMC bzw. 50 ng/ml MMC von peripheren Blutlymphozyten zu unterscheiden.

| Gruppe / Zellart | Konzentration | FaH / B-LCL | FaH / Fibro |
|------------------|---------------|-------------|-------------|
| FaH / pBL | ohne MMC | $p=0,229$ | $p=0,974$ |
| FaH / pBL | 5 ng/ml | $p=0,489$ | $p=1$ |
| FaH / pBL | 10 ng/ml | $p=0,048^*$ | $p=0,131$ |
| FaH / pBL | 50 ng/ml | $p=0,174$ | $p=0,001^*$ |

Tabelle 18: Mittelwertvergleich der Σ G2/GF von heterozygoten Versuchspersonen der untersuchten Zellarten unter Berücksichtigung der Mitomycin C Dosierung. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Die Mittelwerte der Σ G2/GF sind somit verschieden.

Bei den untersuchten Zellen von Fanconi-Anämie Probanden (Tabelle 19) zeigte sich im durchgeführten Mittelwertvergleich der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) mit Ausnahme von Zellkulturen mit hohen Konzentrationen von Mitomycin C (MMC), nahezu keine Übereinstimmung (bei 100 ng/ml MMC, $p=0,382$). Die Zellen der FA-Individuen ließen somit eine unterschiedliche durch Mitomycin C induzierte Arretierung von Zellen in den G2-Phasen erkennen.

| Gruppe / Zellart | Konzentration | Fa / B-LCL | Fa / Fibro |
|------------------|---------------|------------|------------|
| Fa / pBL | ohne MMC | p=0,000* | p=0,000* |
| Fa / pBL | 5 ng/ml | p=0,000* | p=0,167 |
| Fa / pBL | 10 ng/ml | p=0,000* | p=0,000* |
| Fa / pBL | 50 ng/ml | p=0,140 | p=0,001* |

Tabelle 19: Mittelwertvergleich der Σ G2/GF von Fanconi-Anämie Patienten der untersuchten Zellarten unter Berücksichtigung der Mitomycin C Dosierung. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Die Mittelwerte der Σ G2/GF sind somit verschieden.

3.6.3 Verlauf der Zunahme der G2-Phasen Arretierung innerhalb des ersten und zweiten Zellzyklus (Increased Σ G2+G2` /GF)

Die Zunahme der durch Mitomycin C induzierten G2-Phasenarretierung innerhalb des ersten und zweiten Zellzyklus wurde mit dem Parameter Increased Σ G2+G2`/GF erfasst. Der Verlauf ist in Abbildung 23 dargestellt. Die einzelnen Messpunkte zeigen die Mittelwerte und sind mit Symbolen [■,), 4 und 5] gekennzeichnet. Auf der Ordinate kann der Wert abgelesen werden. Der untere Abszissenbereich kennzeichnet die Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Zellart. Auf der Skala des oberen Abszissenbereiches ist die Gruppennummer dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehlerbereich des Mittelwertes.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigten die untersuchten Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) von gesunden Versuchspersonen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Mitomycin C (MMC) induzierten G2-Phasen Arretierung innerhalb des ersten und zweiten Zellzyklus. Fibroblasten reagierten dabei stärker auf die Zugabe von Mitomycin C als lymphoblastoide Zellen (B-LCL) und periphere Blutlymphozyten (Kontrolle, Fibro bei 50 ng/ml [4] und 100 ng/ml MMC [5]).

Periphere Blutlymphozyten von Fanconi-Anämie Patienten zeigten dagegen eine konstante Arretierung bei Zugabe von Mitomycin C (Fa pBL bei [■,) und 4]). Somit war im Vergleich zu gesunden Versuchspersonen die Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen nicht beliebig durch Mitomycin C (MMC) steigerbar. Die Messpunkte stellen sich deshalb in der Abbildung nahezu überlagert dar. Für die untersuchten lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und Fibroblasten von Fa-Individuen ließ sich zwar eine Zunahme der G2-Phasen Arretierung innerhalb des ersten und zweiten Zellzyklus durch Mitomycin C (MMC) erreichen, diese ging jedoch bei hohen Konzentrationen wieder zurück (Fa Fibro bei [4,5]). Die Ursache hierfür kann durch den starken Rückgang des Zellwachstums aufgrund der zytotoxischen Effekte von Mitomycin C (MMC) erklärt werden.

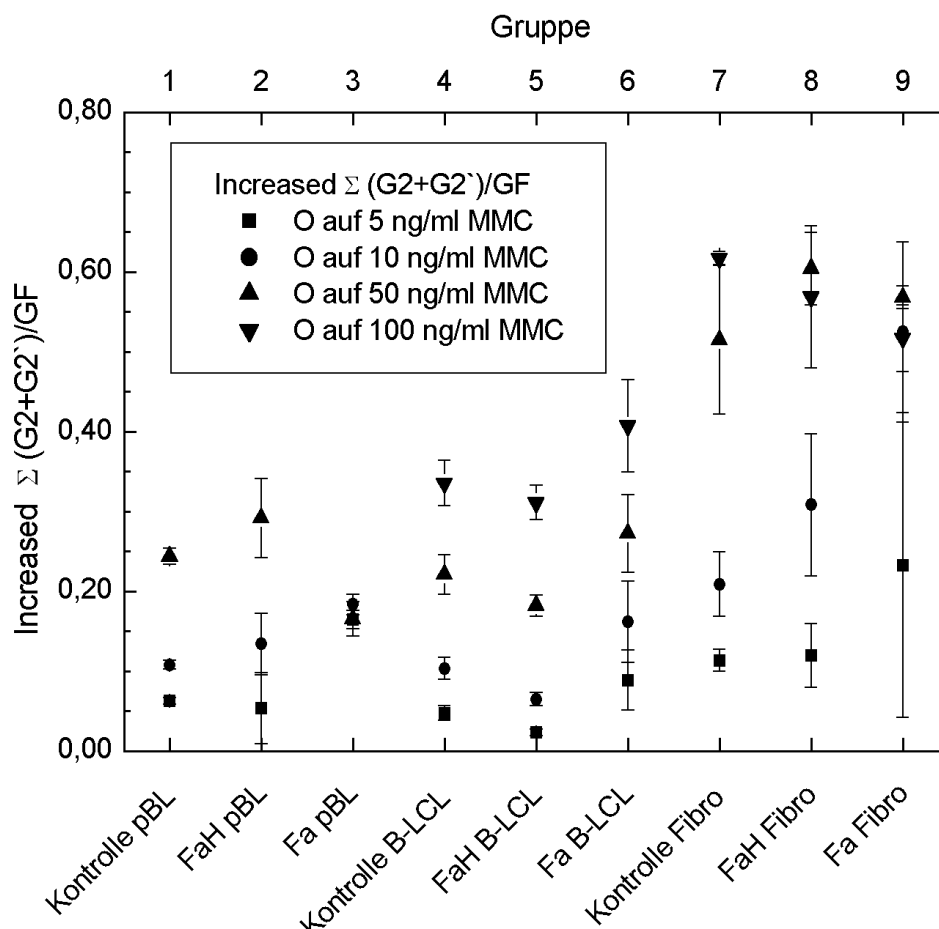


Abbildung 23: Zunahme der $\Sigma G2+G2'/GF$ aller Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Wie der Abbildung noch entnommen werden kann, lagen die Mittelwerte der $\Sigma G2+G2'/GF$ von heterozygoten Versuchspersonen meist etwas über denen der gesunden Kontrollen oder innerhalb des Standardfehlerbereiches des Mittelwertes. Besonders sensitiv auf die Zugabe von Mitomycin C (MMC) reagierten wiederum die untersuchten Fibroblasten (FaH Fibro bei [], 4 und 5]).

Im durchgeführten Mittelwertvergleich der Increased $\Sigma G2+G2'/GF$ war die konzentrationsabhängige Akkumulation von peripheren Blutlymphozyten der Fanconi-Anämie Patienten innerhalb des ersten und zweiten Zellzyklus gegenüber der Akkumulation gesunder Kontrollpersonen signifikant zu unterscheiden. Wie aus Tabelle 23 hervorgeht, waren die Erkrankten dabei bei allen Konzentrationen von Mitomycin C gegenüber den gesunden Kontrollen abgrenzbar. Demgegenüber konnten die Mittelwerte der Increased $\Sigma G2+G2'/GF$ von heterozygoten Probanden nicht von den gesunden Versuchspersonen unterschieden werden.

| Gruppe / Zellart | Konzentration | FaH | Fa |
|-------------------|-------------------|---------|----------|
| Kontrolle / pBL | 0 auf 5 ng/ml MMC | p=1 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 0 auf 5 ng/ml MMC | p=0,989 | p=0,928 |
| Kontrolle / Fibro | 0 auf 5 ng/ml MMC | p=1 | p=0,427 |
| Kontrolle / pBL | 0 auf 10 ng/ml | p=0,999 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 0 auf 10 ng/ml | p=0,875 | p=0,704 |
| Kontrolle / Fibro | 0 auf 10 ng/ml | p=0,739 | p=0,000* |
| Kontrolle / pBL | 0 auf 50 ng/ml | p=0,994 | p=0,003* |
| Kontrolle / B-LCL | 0 auf 50 ng/ml | p=0,983 | p=0,978 |
| Kontrolle / Fibro | 0 auf 50 ng/ml | p=0,979 | p=0,999 |
| Kontrolle / B-LCL | 0 auf 100 ng/ml | p=0,992 | p=0,741 |
| Kontrolle / Fibro | 0 auf 100 ng/ml | p=0,995 | p=0,880 |

Tabelle 20: Mittelwertvergleich der $\Sigma G2+G2'/GF$ unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellart. Getestet wurde die Nullhypothese „die Mittelwerte sind nicht gleich“ gegenüber der Kontrollgruppe. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden.

Bei Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) konnten im Mittelwertvergleich der $\Sigma G2+G2'/GF$ keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Die untersuchten Fibroblasten von Fanconi-Anämie Patienten zeigten eine stärkere durch Mitomycin C induzierte Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus als die beiden Vergleichsgruppen. Für die Mittelwerte der $\Sigma G2+G2'/GF$ ergaben sich somit signifikante Unterschiede.

3.6.4 Verlauf der Zunahme der G2-Phasen Arretierung in allen Zellzyklen (Increased $\Sigma G2/GF$)

Im Unterschied zu den im vorhergehenden Abschnitt untersuchten G2-Phasen Arretierungen des ersten und zweiten Zellzyklus wurde mit der Increased $\Sigma G2/GF$ die durch Mitomycin C induzierte Zunahme der G2-Phasen in allen Zellzyklen erfasst. In Abbildung 24 sind die ermittelten Messpunkte der Increased $\Sigma G2/GF$ dargestellt. Auf der y-Achse ist der Mittelwert der Increased $\Sigma G2/GF$ aufgetragen worden. Die untere x-Achse zeigt die Diagnosegruppen unter Berücksichtigung der untersuchten Zellarten, die obere x-Achse die dazugehörigen Gruppennummern. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes wider.

Wie aus der Abbildung 24 hervorgeht, nahm die durch Mitomycin C induzierte Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen in allen Zellzyklen bei den untersuchten Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) von Probanden aus der

Kontrollgruppe konzentrationsabhängig zu. Der größte Anstieg erfolgte dabei bei Zellkulturen mit Fibroblasten unter Zugabe von 50 ng/ml [4] und 100 ng/ml [5] Mitomycin C (MMC). Die untersuchten Zellen von heterozygoten Probanden zeigten ein ähnliches Verhalten in der G2-Phasen Arretierung wie die Zellen der gesunden Probanden. Die Mittelwerte der Increased Σ G2/GF lagen dabei etwas über denen der gesunden Kontrollen, aber noch innerhalb des Standardfehlerbereiches der Mittelwerte.

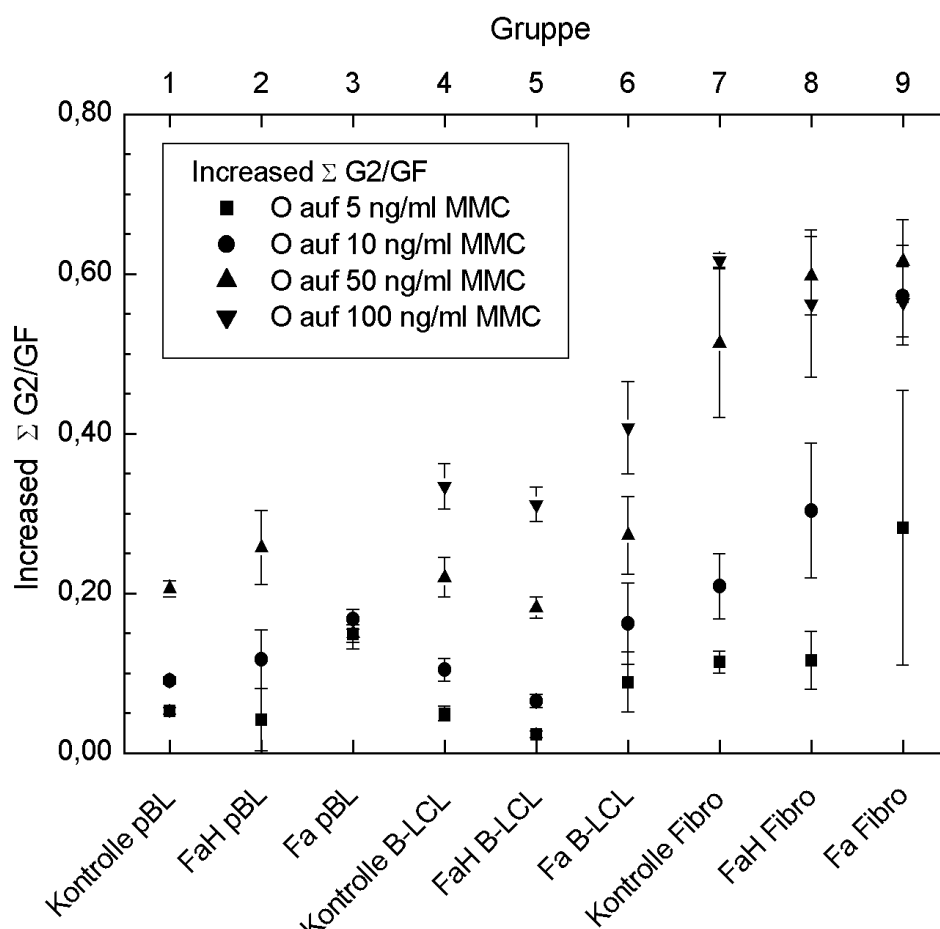


Abbildung 24: Zunahme der Σ G2/GF aller Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Wie schon in Abbildung 23 (Verlauf der Increased Σ G2+G2'/GF) stellen sich die Messpunkte der Increased Σ G2/GF bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten von Fanconi-Anämie Patienten nahezu überlagert dar. Die Arretierung von Zellen in den G2-Phasen aller Zellzyklen ließ sich somit durch die Zugabe von Mitomycin C (MMC) nicht beliebig steigern. Im Gegensatz zur Increased Σ G2+G2'/GF ergaben sich aber für die Increased Σ G2/GF niedrigere Mittelwerte, sodass periphere Blutlymphozyten vor allem eine durch Mitomycin C (MMC) induzierte Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus aufwiesen. Die untersuchten lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und Fibroblasten der Fa-Individuen zeigten eine

höhere Sensivität gegenüber Mitomycin C (MMC) auf als peripheren Blutlymphozyten. Die Mittelwerte der Increased Σ G2/GF Fraktion nahmen zunächst konzentrationsabhängig zu, gingen jedoch bei hohen Konzentrationen von Mitomycin C wieder zurück (Fa, Fibro bei [5]). Die Ursache hierfür kann durch den starken Rückgang des Zellwachstums aufgrund der zytotoxischen Effekte von MMC erklärt werden.

Tabelle 21 zeigt den Mittelwertvergleich der Increased Σ G2/GF Fraktion. Bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten und Fibroblasten waren die Mittelwerte der Increased Σ G2/G von Fanconi-Anämie Patienten und gesunden Probanden signifikant zu unterscheiden. Mit der Ausnahme der Zellkulturen mit hohen Konzentrationen Mitomycin C.

| Gruppe / Zellart | Konzentration | FaH | Fa |
|-------------------|-------------------|---------|----------|
| Kontrolle / pBL | 0 auf 5 ng/ml MMC | p=1 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 0 auf 5 ng/ml MMC | p=0,971 | p=0,917 |
| Kontrolle / Fibro | 0 auf 5 ng/ml MMC | p=1 | p=0,028* |
| Kontrolle / pBL | 0 auf 10 ng/ml | p=0,997 | p=0,000* |
| Kontrolle / B-LCL | 0 auf 10 ng/ml | p=0,786 | p=0,601 |
| Kontrolle / Fibro | 0 auf 10 ng/ml | p=0,684 | p=0,000* |
| Kontrolle / pBL | 0 auf 50 ng/ml | p=0,988 | p=0,105 |
| Kontrolle / B-LCL | 0 auf 50 ng/ml | p=0,984 | p=0,970 |
| Kontrolle / Fibro | 0 auf 50 ng/ml | p=0,983 | p=0,942 |
| Kontrolle / B-LCL | 0 auf 100 ng/ml | p=0,994 | p=0,727 |
| Kontrolle / Fibro | 0 auf 100 ng/ml | p=0,991 | p=0,993 |

Tabelle 21: Mittelwertvergleich der Increased Σ G2/GF unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellart. Getestet wurde die Nullhypothese „die Mittelwerte sind nicht gleich“ gegenüber der Kontrollgruppe. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden.

Für die Mittelwerte der Increased Σ G2/GF von heterozygoten und gesunden Versuchspersonen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, die Zellen zeigten somit ähnliches Verhalten in der durch Mitomycin C induzierten G2-Phasen Arretierung.

4 DISKUSSION

4.1 Anmerkungen zur Methodik

Die Durchflusszytometrie ist ein besonders geeignetes Verfahren, mit der man innerhalb kürzester Zeit Informationen über die Zellzyklusprogression und Zellaktivierung gewinnen kann. Als weiterentwickeltes Verfahren der ursprünglich angewendeten eindimensionalen Durchflusszytometrie, ist es durch die Verwendung zweier Fluoreszenzfarbstoffe bei dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Verfahren möglich bis zu vier Zellzyklen voneinander abzugrenzen und Informationen über die Verteilung der Zellen in den Zyklen zu erhalten (Kubbies 1989).

Mit dieser Arbeit wurde erstmals eine größere Anzahl von Messdaten aus Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Verfahren miteinander verglichen.

Im Vergleich der untersuchten Zellsysteme waren Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten am einfachsten durchführbar. Innerhalb von vier Tagen war es möglich Ergebnisse aus den Zellzyklusanalysen zu erhalten. Da die mononukleären Zellen des Blutes als natürliche synchrone Populationen vorliegen, waren aufwendigere Verfahren mit Synchronisierung der Zellen durch Serumentzug nicht notwendig. Weiterhin ließen sich periphere Blutlymphozyten für die Zellzyklusanalysen aufgrund der größeren Anzahl potentieller Spender leichter gewinnen. Demgegenüber waren tiefgefrorene Zellproben von lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und Fibroblasten ständig verfügbar. Bei den durchgeführten Zellzyklusanalysen zeigten periphere Blutlymphozyten mit Darstellung von bis zu vier Zellzyklen im Vergleich zu den anderen beiden analysierten Zellarten (lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) eine bessere Auflösung. Ebenso wiesen lymphoblastoide Zellen (B-LCL) und Fibroblasten ein höheres Ausscheiden von Zellen aus den Zellzyklen auf, was sich durch höhere G1-Phasenanteile im zweiten und dritten Zellzyklus manifestierte.

Des weiteren muss erwähnt werden, dass sich vor allem bei Fanconi-Anämie Patienten (lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten) Probleme für die Verfügbarkeit von ausreichend Zellmaterial für die durchflußzytometrischen Analysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Verfahren ergaben. Für diese Arbeit konnten zwar tiefgefrorene Zellproben aus der Zellbank des Humangenetischen Instituts der Universität Würzburg genutzt werden. In der Praxis ist es jedoch schwierig bei Fanconi-Anämie Patienten entsprechendes Zellmaterial zu gewinnen, da bei den manifest Erkrankten typischerweise eine Aplasie mit geringen Zellzahlen vorliegt. Ein weiterer Grund ist die Seltenheit der Fanconi Anämie (Joenje und Patel 2001). Somit konnte nur eine relativ geringe Anzahl von Zellzyklusanalysen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und Fibroblasten von Fa-Individuen und auch heterozygoten Probanden durchgeführt

werden. Bei den Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten von Fanconi-Anämie Patienten war es möglich, dass nur eine geringe Zellzahl isoliert werden konnte und somit nur Standardzellkulturen angesetzt werden konnten.

Im Hinblick auf die Genauigkeit des Testverfahrens ist bekannt, dass bei Fanconi Anämie Patienten mit Mosaikbildung oder bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS) bei den Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Verfahren falsch negative Ergebnisse auftreten können (Seyschab, Friedl et al. 1995; LoTenFoe, Kwee et al. 1997). FA-Individuen mit Mosaikbildung besitzen zwei Subpopulationen von peripheren Blutlymphozyten, von denen eine Mitomycin C (MMC) resistent ist, während die andere auf MMC reagiert (Dandrea und Grompe 1997). Die Zellen dieser Patienten können daher bei durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen ein den gesunden Kontrollpersonen vergleichbares Verhalten zeigen. Des weiteren sind etablierte lymphoblastoide Ziellinien (B-LCL) Mitomycin C resistent. Im Vergleich zu den zytogenetischen Analysen mit peripheren Blutlymphozyten nach dem DEB-Testverfahren zeigt sich ebenfalls keine, oder nur eine leicht erhöhte Chromosomenbruchrate gegenüber gesunden Kontrollpersonen. Die Diagnose von Fanconi-Anämie Patienten mit Mosaikbildung basiert daher vor allem auf Mutationsanalysen sowie zytogenetischen Untersuchungen mit menschlichen subkutanen Fibroblasten oder anderen Zellen aus nichthämatologischen Geweben (Cassinat, Guardiola et al. 2000).

4.1.1 Sensivität der einzelnen Parameter

Bei den durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen wurden die durch Mitomycin C (MMC) induzierten dosisabhängigen DNA-Schädigungen über die Akkumulation der Zellen in den G2-Phasen mit verschiedenen Parametern erfasst.

Mit der Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) konnten die durch MMC induzierten DNA-Schädigungen über die Akkumulation von Zellen innerhalb aller G2-Phasen der Zellzyklen festgehalten werden. Die individuelle Verteilung von proliferierenden Zellen auf ein bis vier Zellzyklen wurde über die abgeleitete Größe der Summen der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) berücksichtigt. Zusätzlich konnten Unterschiede des Zellwachstums über die Quotientenbildung mit der Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF) ausgeglichen werden. Anhand der beiden abgeleiteten Parameter Increased $\Sigma G2+G2'/GF$ und Increased $\Sigma G2/GF$ wurde die konzentrationsabhängige Zunahme der Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen des ersten und zweiten (Increased $\Sigma G2+G2'/GF$) sowie in allen Zellzyklen (Increased $\Sigma G2/GF$) erfasst. Unterschiede des Zellwachstums konnten wiederum mit der Quotientenbildung über die Wachstumsfraktion (Growth Fraction, GF) ausgeglichen werden.

Im Rahmen von durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen wird bei Verdacht auf Fanconi-Anämie die Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) als diagnostisches Kriterium für das Vorliegen von Fanconi-Anämie benutzt. Bereits bei unbehandelten Zellkulturen von Fanconi-Anämie Patienten liegt die Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion dabei deutlich über denen von Kontrollpersonen. Mit der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ist es zusätzlich möglich den Verlauf der Erkrankung nach durchgeführter Knochenmarkstransplantation zu dokumentieren. Die ermittelten Werte sollten dabei etwa im Kontrollbereich von gesunden Personen liegen. Weiterhin können mit der $\Sigma G2/GF$, wenn gleichzeitig der Anteil der nichtproliferierenden Zellen der G0-G1-Fraktion berücksichtigt wird, Patienten mit Fanconi-Anämie und gesunde Personen gegenüber Patienten mit aplastischer Anämie (AA) abgegrenzt werden. Die AA-Patienten weisen dabei hohe G0-G1-Phasenanteile bei normalen Werten für die Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) auf.

Für die Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen ($\Sigma G2$) muss berücksichtigt werden, dass ältere Personen höhere Basiswerte der G2-Phasenanteile aufweisen. Studien zeigten jedoch, dass über die proliferationsunabhängige Beurteilung der G2-Phasen mit dem abgeleiteten Parameter $G2 / GF$, die Zunahme der G2-Phasen als Funktion des Alters darstellbar ist und somit Unterschiede zwischen jungen und adulten Probanden ausgeglichen werden können (Schindler, Kubbies et al. 1988; Seyschab, Sun et al. 1993).

4.2 Induktion von Zellzyklusstörungen durch Mitomycin C

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Induktion von Zellzyklusstörungen durch die alkylierende Verbindung Mitomycin C (MMC) untersucht und mit genetisch bedingten Störungen des Zellzyklus bei Fanconi-Anämie verglichen. Daneben wurden die Zellen (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) mit steigenden Konzentrationen von Mitomycin C behandelt, um die Zellzykluseffekte und die erhöhte Sensivität bei Fa-Individuen zu charakterisieren.

Als bifunktionelles Alkylanz gehört Mitomycin C zur Gruppe der zytotoxischen Antibiotika, welches mit der DNA in vivo und in vitro reagieren kann. Nach erfolgter metabolischer Aktivierung von Mitomycin C entsteht ein mono- und bifunktionelles Alkylanz, welches irreversibel DNA-Seitenstränge verbindet und Strangbrüche induziert, daneben sind DNA-Proteinverknüpfungen und DNA-Schädigungen über Freisetzung von Radikalen beschrieben (Tomasz, Lipman et al. 1987; Dusre, Rajagopalan et al. 1990). Die induzierten DNA-Schädigungen führen dabei letztendlich zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Chromosomenbruchrate (Brendel und Ruhland 1984). Zusätzlich kann Mitomycin C als bifunktionelles

Chemotherapeutikum Zelltod durch Apoptosis herbeiführen (Papouli, Lafon et al. 2000). In der Klinik wird Mitomycin C hauptsächlich in der Tumortherapie als Mono- oder Kombinationstherapeutikum für die Behandlung von gastrointestinalen Adenokarzinomen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (non-small cell lung cancer, NSCLC) eingesetzt (Forth, Henschler et al. 1987; Dorr und von Hoff 1994). Des Weiteren wird Mitomycin C (MMC) neben Diepoxybutane (DEB) für die zytogenetische Diagnostik der Fanconi-Anämie verwendet.

Die durch Mitomycin C induzierten DNA-Strangvernetzungen (DNA-crosslinks) gehören zu den DNA-Schädigungen die hoch toxisch für Organismen sind. So kann in reparaturdefizienten Bakterien oder Hefezellen durch eine einzige, in reparaturdefizienten Säugetierzellen durch etwa 40 DNA-Strangvernetzungen die Zelle abgetötet werden (Magana-Schwencke, Henriques et al. 1982; Lawley und Phillips 1996). Des Weiteren können DNA-Strangvernetzungen Mutationen und DNA-Strukturveränderungen verursachen, die unreguliertes Zellwachstum und Tumorbildung induzieren. In der Literatur ist vor allem die Wirkung von Mitomycin C, Cisplatin, Nitrogen Mustard, sowie weiteren Substanzen und deren Derivate anhand von Studien mit Bakterien (*E.coli*) und Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* und *S. pombe*) gut dokumentiert worden (Carr und Hoekstra 1995; Dronkert und Kanaar 2001). Aber auch für natürliche Stoffe wie die Furocumarine, die in vielen Pflanzen und kosmetischen Produkten vorkommen, sind Induktionen von DNA-Strangvernetzungen beschrieben worden (Scott, Pathak et al. 1976). Eine Besonderheit in der Reparatur von DNA-Strangvernetzungen (DNA-crosslinks) ist dabei, dass mehrere oder verschiedene Mechanismen an der Reparatur beteiligt sein können. Diese DNA-Reparaturmechanismen sind in Säugetierzellsystemen vor allem durch Untersuchungen an chinesischen Hamsterzellen (CHO) genetisch und biochemisch näher charakterisiert worden. Als besonders wertvoll haben sich dabei Studien mit hypersensitiven Mutanten erwiesen, die jeweils mit einem spezifischen Gendefekt korrespondieren (Hickson und Harris 1988; Jones 1994). Bisher konnte eine Vielzahl von Mutanten mit Hypersensitivität gegenüber UV-Strahlung, ionisierender Strahlung und DNA interkalierenden Substanzen isoliert werden (Hickson und Harris 1988). Über die Klassifikation der Mutanten in genetische Komplementationsgruppen ist es möglich, Information über die an der DNA-Reparatur beteiligten Gene und Mechanismen zu erhalten (Thompson, Busch et al. 1981; Busch, Greiner et al. 1994). Bei Komplementationsstudien mit Mitomycin C hypersensitiven chinesischen Hamsterzellmutanten (UV40) und Zellen von FA-Individuen, die ebenfalls eine erhöhte Sensivität gegenüber alkylierenden Substanzen zeigen, konnte so ein Krankheitsgen für Fanconi-Anämie (9p13) identifiziert werden (de Winter, Waisfisz et al. 1998). Daneben ergaben sich Homologien von Zellen einer Mitomycin C hypersensitiven Hamsterzellmutante (V-H4) zu Zellen von FA-Individuen die der Komplementationsgruppe FANCA angehören (Arwert, Rooimans et al. 1991). Weiterführenden Studien könnten somit zur

Identifikation noch unbekannter Gendefekte für Fanconi-Anämie beitragen. Erschwerend sind hierbei die komplexen Wirkungen von Mitomycin C auf den Organismus und die große Anzahl von Genen, an der sich die Reparatur der DNA-Schädigungen vollziehen kann (Thompson 1989). Auf zellkinetischer Ebene zeigt sich nach der Induktion von DNA-Schäden eine Arretierung von Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus, in denen die Reparatur der DNA stattfindet und in denen somit die genetische Stabilität gewährleistet ist (Carr und Hoekstra 1995). Die Arretierung erfolgt dabei über eine Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte (cell cycle checkpoints). Deren Steuerung wird über Proteine erreicht, die zunächst die DNA-Schädigung (Sensorproteine) feststellen, anschließend die Transskription der Reparaturgene beeinflussen, die Modifikation von Reparaturproteinen induzieren und am DNA-Reparaturprozeß beteiligt sind. Die Regulation der Zellzykluskontrollpunkte nach Induktion von DNA-Schädigungen in Säugetierzellsystemen ist dabei vergleichbar mit der Steuerung in Hefezellen (Zhou und Elledge 2000). Das menschliche Transduktionsprotein ATM, homolog zu dem Mec1 Protein in Hefe, ist für genetische Instabilität und die Prädisposition zur Tumorentstehung bei Ataxia teleangiectasia verantwortlich. Gemeinsam mit anderen Proteinen (ATR, Chk1 und Chk2) phosphoryliert das ATM Protein verschiedene Effektorproteine (Nbs1, p53 und Brca 1), welche Zellzyklusarretierungen, Apoptosis und DNA-Reparaturmechanismen induzieren können (Zhou und Elledge 2000). Außer für Nbs1, p53, Brca1 und Brca2 wird für weitere Effektorproteine eine Beteiligung sowohl an der Regulation der Zellzykluskontrollpunkte als auch an den DNA-Reparaturmechanismen postuliert (Lavin und Khanna 1999). Treten Mutationen in den ATM, NBS1, BRCA1 und BRCA2 Genen auf, entsteht chromosomale Instabilität, Sensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen und eine reduzierte p53 Induktion. NBS1 ist das Gen welches für das Nijmwegen breakage Syndrom ursächlich ist, dessen zellulärer Phänotyp mit Ataxia teleangiectasia vergleichbar ist (Lavin und Khanna 1999). BRCA1 und BRCA2 wird korreliert mit der Entstehung von Mammakarzinomen und Ovarialtumoren. Im Hinblick auf die Hypersensivität gegenüber alkylierenden Substanzen, die durch Mutationen in den oben genannten Genen verursacht werden, konnte bisher nicht geklärt werden, ob dies aufgrund der Beteiligung ihrer Proteine an der Zellzyklusregulation oder aufgrund der DNA-Reparaturmechanismen zustande kommt (Garcia-Higuera, Taniguchi et al. 2001). Sind für die Proteine von Ataxia teleangiectasia und dem Nijmwegen breakage Syndrom Homologien zu Proteinen in Hefezellen gefunden worden, so ist dies für die Fa-Proteine noch nicht gelungen (siehe 4.3.).

Als Manifestation der durch Mitomycin C induzierten DNA-Strangvernetzungen (DNA-crosslink) ist auf zellkinetischer Ebene eine Arretierung von Zellen in den G2-Phasen des Zellzyklus beschrieben worden (Carr und Hoekstra 1995; Franchitto, Pichierrì et al. 1998). Die Beeinflussung der Zellzyklusregulation und der Zellzykluskontrollpunkte (cell cycle checkpoints) ist dabei von

besonderer Bedeutung. Ursächlich für die G₂-Phasen Arretierung bzw. G₂-Phasen Verlängerung wird einerseits eine permanente oder transiente Inaktivierung des Cyclin B / cdc2 Kinase Komplexes verantwortlich gemacht, andererseits eine Regulationsstörung von mitotischem Cyclin B (Kruyt, Dijkmans et al. 1997). Der Cyclin B / cdc2 Kinase Komplex bildet normalerweise einen zunächst inaktiven reifungsfördernden Faktor (MPF, maturation promoting factor), dessen Kinaseaktivität nach erfolgter Dephosphorylierung angeschaltet wird und dann über die Initiierung verschiedener Zielproteine den Eintritt der Zelle in die Mitose reguliert (Ducommun, Brambilla et al. 1991; Alberts, Bray et al. 1995). Die Arretierung von Zellen in den G₂-Phasen des Zellzyklus ist außer für Mitomycin C (MMC) noch für eine ganze Reihe weiterer alkylierender Substanzen beschrieben worden (Dronkert und Kanaar 2001).

Bei den durchgeführten Zellzyklusanalysen zeigte sich bei allen untersuchten Zellarten (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten) der gesunden Kontrollpersonen eine durch Mitomycin C induzierte dosisabhängige Akkumulation von Zellen in den G₂-Phasen. Anhand der abgeleiteten Parameter Increased Σ G₂/GF und Σ G₂+G₂'/GF konnte festgestellt werden, dass für die untersuchten peripheren Blutlymphozyten hauptsächlich eine Arretierung in den G₂-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus vorlag. Anhand der durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen war es somit möglich die durch Mitomycin C induzierten Zellzyklusstörungen konzentrationsabhängig über die Akkumulation von Zellen in den G₂-Phasen zu erfassen. Die gewonnenen Ergebnisse stehen dabei im Einklang mit den spontanen Zellzyklusstörungen und der beobachteten Hypersensivität gegenüber alkylierenden Substanzen (siehe 4.3) bei FA-Individuen (Dutrillaux, Aurias et al. 1982).

4.3 Zellzyklusstörungen bei Fanconi-Anämie

Fanconi-Anämie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die in klinischer Hinsicht durch eine progrediente Knochenmarksaplasie, angeborene Skelettfehlbildungen und ein hohes Krebsrisiko ausgezeichnet ist. Bisher sind Defekte in acht verschiedenen Genen (FANCA, B, C, D1, D2, E, F und G) bekannt (Buchwald, Strathdee et al. 1993; Joenje, Oostra et al. 1997; de Winter, Waisfisz et al. 1998; de Winter, Rooimans et al. 2000; Hejna, Timmers et al. 2000; Timmers, Taniguchi et al. 2001; Taniguchi, Garcia-Higuera et al. 2002). Die FA-Gene kodieren dabei für Proteine, die bisher keinen unmittelbaren Zusammenhang mit einer biochemischen Funktion erkennen lassen. Der zelluläre Phänotyp bei Fanconi-Anämie ist charakterisiert durch eine spontan erhöhte Chromosomenbrüchigkeit und Hypersensivität gegenüber alkylierenden Substanzen. Deshalb wird die Fanconi-Anämie zu den Chromosomenbruchsyndromen mit verminderter Fähigkeit DNA-Läsionen zu reparieren, speziell der Reparatur von DNA-Strangvernetzungen (DNA-crosslinks), gezählt. Der vermutete Defekt konnte aber noch nicht nachgewiesen werden

(Buchwald und Moustacchi 1998; Grompe und D'Andrea 2001). Da die bisher klonierten sechs FA-Proteine keine Gemeinsamkeiten mit Proteinen in Prokaryonten (*E.coli*) oder Eukaryonten (*S.cerevisiae*) zeigten, ist es schwierig ihre Bedeutung für die DNA-Reparaturmechanismen zu entschlüsseln. Für das Fa-Protein FANCD2 konnte allerdings Übereinstimmung mit Proteinen in Pflanzen (*A.thaliana*) und Insekten (*D.melanogaster*, *C.elegans*) gefunden werden (Timmers, Taniguchi et al. 2001). Vor allem aufgrund der fehlenden Homologien der Fa-Proteine zu Proteinen in Hefezellen, wird für diese deshalb eine spezifische Funktion für die DNA-Reparaturmechanismen in Säugetierzellsystemen vermutet, die in eukaryonten Organismen nicht vorhanden sind. Um die Bedeutung der Fa-Proteine für die DNA-Reparatur und die Zellzyklusregulation festzustellen, hat sich eine Vielzahl von Arbeiten mit den zellulären Lokalisationen und Interaktionen der Fa-Proteine beschäftigt. Bei Studien, die Verbindungen des FANCD2 Proteins mit dem Brca1 Protein nachweisen konnten, ergaben sich Hinweise auf die molekularen Funktionen der Fa-Proteine (Joenje und Arwert 2001). Als Modell für die Interaktionen der Fa-Proteine wird ein Fa-Proteinkomplex (FANCA, FANCC, FANCF, FANCG und FANCE) mit Lokalisation im Zellkern angenommen, der als Sensorprotein fungiert und DNA-Schäden erkennt, anschließend die Aktivierung des FANCD2 Proteins initiiert, welches über die Verbindung mit dem Brca1 Protein die DNA-Reparatur einleitet und Zellzykluskontrollpunkte (cell cycle checkpoints) regulieren kann. Die FA-Proteine arbeiten dabei unter Bildung eines stabilen Komplexes, an dem alle FA-Proteine beteiligt sind, oder in der Bildung eines dynamischen Komplexes, bei der nur ein Teil der FA-Proteine involviert ist zusammen. Die FA-Proteine sind so direkt oder indirekt an der DNA-Reparatur beteiligt und tragen zum Erhalt der genetischen Stabilität bei (Dronkert und Kanaar 2001). Dabei muss berücksichtigt werden, dass noch viele der komplexen Interaktionen der Fa-Proteine und zwei Krankheitsgene (FANCB und FANCD1) sowie deren Proteine unbekannt sind (Joenje und Patel 2001).

Zytogenetisch sind Fanconi-Anämie Zellen durch die spontan erhöhte Chromosomenbruchrate charakterisiert, welche durch Zugabe von Alkylanzien wie Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutane (DEB) stark gesteigert werden kann und deshalb im Rahmen von Testverfahren als diagnostisches Kriterium für das Vorliegen von Fanconi-Anämie benutzt wird (Auerbach, Adler et al. 1981; Auerbach 1993). Die erhöhte Sensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen bei Fanconi-Anämie ist außer für Mitomycin C (MMC) und Diepoxybutane (DEB) auch für Psoralen + UVA, Cis-Diaminodichlorid-Platinum II (cis-Pt), Nitrogen Mustard (NM) und Cyclophosphamid, sowie weitere Substanzen beschrieben worden (Berger, Bernheim et al. 1980; Ishida und Buchwald 1982; Auerbach 1993; Carreau, Alon et al. 1999).

Bei zellkinetischen Untersuchungen zeigt sich bei Fanconi-Anämie eine spontane Verlängerung und Akkumulation von Zellen innerhalb der G2-Phasen des Zellzyklus, die durch alkylierende

Substanzen gesteigert werden kann. Die Arretierung von Zellen in den G2-Phasen kann dabei als primäre Manifestation von unreparierten DNA-Schädigungen verstanden werden (Seyschab, Sun et al. 1993). Die Beobachtungen sind vergleichbar mit weiterführenden Untersuchungen, die an lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) von Fanconi-Anämie Patienten durchgeführt wurden. Für die durch Mitomycin C induzierte G2-Phasen Arretierung wurden dabei eher DNA-Schädigungen verantwortlich gemacht, als Störungen der Zellzyklusregulation unter Beteiligung der FA-Proteine (Heinrich, Hoatlin et al. 1998). Dennoch ergaben sich bei Studien Hinweise auf eine Beteiligung der FA-Proteine an der Regulation des Zellzyklus. So ist für das FANCC Protein eine direkte Reaktion mit dem Cyclin B / cdc2 Kinase Komplex nachgewiesen worden (Kruyt, Dijkmans et al. 1997; Kupfer, Yamashita et al. 1997). Der Cyclin B / cdc2 Kinase Komplex ist für die G2-Zellzyklusprogression und den Eintritt der Zellen in die Mitose verantwortlich. Somit ist es denkbar, dass die Fanconi-Anämie Proteine sowohl an den DNA-Reparaturmechanismen als auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Grompe und D'Andrea 2001).

Bei den durchgeführten Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Verfahren zeigte sich schon bei Standardzellkulturen von Fanconi-Anämie Patienten eine erhöhte Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen. Die ermittelten Werte des Verhältnis Σ G2/GF als proliferationsunabhängiger Parameter lagen dabei vor allem bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten im Bereich von gesunden Kontrollpersonen, deren Zellkulturen mit hohen Konzentrationen von Mitomycin C behandelt worden waren. Bei den beobachteten Erhöhungen der G2-Phasenanteile handelte es sich vor allem um eine Verlängerung der G2-Phasen und Aggregation von Zellen innerhalb dieses Kompartiments (Kubbies, Schindler et al. 1985). Eine Arretierung von Zellen in den G2-Phasen des Zellzyklus ist auch bei Ataxia teleangiectasia (strahleninduziert) und Nijmegen Breakage Syndrom (strahleninduziert) beschrieben worden, diese treten im Gegensatz zu Fanconi-Anämie aber erst nach Behandlung der Zellen mit ionisierter Strahlung oder Bleomycin auf (Schindler, Seyschab et al. 1987; Seyschab, Schindler et al. 1991; Hong, Gatti et al. 1994). Bei den untersuchten peripheren Blutlymphozyten von Fanconi-Anämie Patienten zeigte sich eine konstante Zunahme der G2-Phasen / Wachstumsfraktion in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration, der dennoch unter Berücksichtigung der zytotoxischen Effekte bei hohen Dosierungen von Mitomycin C gegenüber dem Ausgangswert erhöht war. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen ließ sich aber ein starker Anstieg der Σ G2/GF gegenüber dem Basiswert bei Zellen von FA-Individuen durch Zugabe von Mitomycin C nicht erreichen. Demgegenüber war bei lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und Fibroblasten die Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen konzentrationsabhängig steigerbar. Diese Beobachtungen sind vereinbar mit Studien, welche für immortalisierte lymphoblastoide Ziellinien (B-LCL) und Fibroblasten von Fanconi-Anämie Patienten eine stark erhöhte Sensivität gegenüber

alkylierenden Substanzen zeigen (Latt, Kaiser et al. 1982; Tomkins, Care et al. 1998; Carreau, Alon et al. 1999; Joenje und Patel 2001).

4.4 Diagnostische Implikationen bei heterozygoten Genträgern für Fanconi-Anämie

Bisherige Studien zeigten, dass für die heterozygoten Träger des genetischen Defektes bei Fanconi-Anämie eine normale Lebenserwartung besteht und klinische Symptome fehlen. Im Gegensatz zu den heterozygoten Patienten bei Ataxia teleangiectasia (AT) ist für heterozygote Fa-Individuen, kein, oder nur ein sehr geringes Risiko für das Auftreten maligner Erkrankungen beschrieben worden (Swift, Caldwell et al. 1980; Schroeder 1982; Heim, Lench et al. 1992; Meyn 1997). Nicht zuletzt wegen der heterozygoten Frequenz von 0,3 bis 1 % für Fanconi Anämie besteht dennoch großes Interesse ein geeignetes Testverfahren für die Detektion von Fa-heterozygoten Genträgern zu entwickeln (Verlander, Kaporis et al. 1995; Auerbach, Buchwald et al. 2001). In der Literatur sind eine ganze Reihe von Arbeiten dokumentiert, bei denen als Ansatzpunkt vor allem die Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien und die spontan erhöhte Chromosomenbruchrate, wie sie bei Fanconi-Anämie Patienten vorliegt, dient (Dallapiccola, Porfirio et al. 1985). Um einen Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu ermöglichen, sind einige der durchgeführten Studien im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Bei zytogenetischen Untersuchungen von Fa-Heterozygoten konnten bisher keine Anhaltspunkte für eine spontane erhöhte Chromosomenbruchrate wie sie bei homozygoten Fa-Individuen vorliegt gefunden werden (Rosendorff und Bernstein 1988). Für das Standarddiagnoseverfahren bei Fanconi-Anämie, dem DEB Test, liegen unterschiedliche Ergebnisse vor (Auerbach 1993). Einerseits ist in der Literatur eine etwas erhöhte Sensivität der Fa-heterozygoten Genträger gegenüber DNA-schädigenden Substanzen (DEB) beschrieben worden, andererseits konnte die Chromosomenbruchrate im DEB Testverfahren nicht von Kontrollpersonen unterschieden werden (Auerbach und Wolman 1979; Auerbach, Adler et al. 1981; Dandrea und Grompe 1997). Das zytogenetische Diagnoseverfahren (DEB-Test) kann daher vermutlich nur innerhalb Familien mit Fanconi-Anämie Patienten eingesetzt werden, um heterozygote Träger des genetischen Defektes zu erkennen (Auerbach, Adler et al. 1981). Demgegenüber konnte bei zytogenetischen Untersuchungen mit dem Radiomimetikum Bleomycin eine erhöhte Chromosomenbruchrate im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden (Barquinero, Barrios et al. 2001). Ebenso erscheint mit neueren Testverfahren (Komet Assay, Single-Cell Gel Electrophoresis), bei der als spezifisches Klastogen ionisierendere Strahlung verwendetet wird, ein Nachweis obligat heterozygoter Träger des genetischen Defektes für Fanconi-Anämie möglich zu sein (Djuzenova, Rothfuss et al. 2001).

Bei den durchgeführten Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Verfahren im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich für die Fa-heterozygoten Individuen keine Abgrenzung gegenüber den Kontrollgruppen der jeweiligen Zellart. Die ermittelten Werte der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) lagen zwar vor allem bei Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten und Fibroblasten etwas über denen der untersuchten gesunden Probanden. Die massiven endogenen Erhöhungen der G2-Phasenanteile des Zellzyklusses, wie sie bei Fanconi-Anämie Patienten vorliegen, konnten jedoch bei den heterozygoten Fa-Individuen nicht beobachtet werden. Für die induzierten Zellzyklusstörungen durch Mitomycin C (MMC) ergaben sich ebenfalls nur geringfügige Unterschiede gegenüber den gesunden Kontrollen. Die konzentrationsabhängige Zunahme der Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen des Zellzyklus wich dabei nur wenig von denen der Vergleichspersonen ab. Mit den hier vorgelegten Daten aus den Zellzyklusanalysen war somit keine Unterscheidung zwischen den obligat heterozygoten Fa-Individuen und den gesunden Probanden möglich. Die Ergebnisse sind dennoch mit den zytogenetischen Untersuchungen auf erhöhte Chromosomenbruchraten anhand des DEB-Testverfahrens vereinbar (Dallapiccola, Porfirio et al. 1985).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die durch Mitomycin C (MMC) exogen induzierten Zellzyklusstörungen mit den endogenen Störungen des Zellzyklusses bei Fanconi-Anämie in unterschiedlichen Zellsystemen (periphere Blutlymphozyten, lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten) verglichen werden.

Die Zellzyklusanalysen wurden mit der zweidimensionalen Durchflusszytometrie nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Verfahren durchgeführt. Mit diesem Verfahren ist es möglich zwischen proliferierenden und nichtproliferierenden Zellen (Ellwart, Stunkel et al. 1981) zu unterscheiden und Verteilungen der Zellen in bis zu vier Zellzyklusphasen mit quantitativer Analyse der Populationen während der G₀-G₁-, G₁-, S- und G₂-Phasen zu erfassen (Kubbies 1989). Das Ausscheiden von Zellen aus dem Zellzyklus kann dabei über die Akkumulation in den entsprechenden Phasenanteilen des Zellzyklus erfasst werden.

Die Induktion von Zellzyklusstörungen erfolgte mit dem bifunktionellen Alkylanz Mitomycin C. Die Applikation von Mitomycin C (MMC) führte dabei vor allem zu einer dosisabhängigen Zunahme der G₂-Phasenanteile der Zellzyklen, was als Akkumulation von Zellen innerhalb diesen Kompartiments zu verstehen ist. Diese Akkumulation konnte bei den durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen mit der abgeleiteten Größe Summe der G₂-Phasen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G_2/GF$) proliferationsunabhängig erfasst werden. Die konzentrationsabhängige Zunahme der G₂-Phasenakkumulation und die unterschiedliche Verteilung innerhalb der Zellzyklen wurden mit den beiden Parametern Increased $\Sigma G_2+G_2'/GF$ und Increased $\Sigma G_2/GF$ festgehalten und ausgewertet. Die Untersuchungen mit peripheren Blutlymphozyten, lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und Fibroblasten von gesunden Kontrollpersonen zeigten, dass sich die durch Mitomycin C induzierten DNA-Schädigungen bei durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen vor allem als G₂-Phasenakkumulation darstellen. Demgegenüber lagen die ermittelten Werte der $\Sigma G_2/GF$ von Fanconi-Individuen bereits bei Standardzellkulturen über denen der gesunden Versuchspersonen. Vor allem bei den Zellzyklusstudien mit peripheren Blutlymphozyten von Fanconi-Anämie Patienten zeigten sich bereits endogen eine massive Erhöhung der G₂-Phasenanteile. Im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen war die Mitomycin C induzierte Akkumulation von Zellen in den G₂-Phasen nicht beliebig steigerbar. Die untersuchten Zellsysteme zeigten verschiedene Proliferationsmuster und reagierten mit einer unterschiedlich starken Arretierung von Zellen in den G₂-Phasen bei Zugabe von Mitomycin C. Als sensitivste Zellart reagierten subkutane menschliche Fibroblasten bei Applikation von Mitomycin C. Bei den durchgeführten Zellzyklusanalysen zeigte sich aber auch, dass bei hohen Konzentration von Mitomycin C (MMC) die zytotoxischen Effekte von Mitomycin C überwiegen und es zu einem starken Rückgang des Zellwachstums kommt. Da

die exogen induzierten Zellzyklusstörungen durch Mitomycin C bei gesunden Kontrollpersonen mit den typischen endogenen Störungen des Zellzyklusses bei Fa-Individuen vergleichbar waren, kann als mögliche Ursache für Fanconi-Anämie auf einen DNA-Reparaturdefekt geschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Zellen von obligat heterozygoten Fa-Individuen mit dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Verfahren untersucht. Waren bei Fa-homozygoten Patienten bereits endogen die Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen deutlich gegenüber den gesunden Kontrollpersonen erhöht, so konnte dies für Fa-heterozygote Individuen nicht gezeigt werden. Die ermittelten Werte der Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) lagen zwar dabei vor allem bei den untersuchten peripheren Blutlymphozyten und subkutanen Fibroblasten etwas über den Kontrollen. Mit den hier vorgelegten Daten aus den Zellzyklusanalysen war aber keine Unterscheidung zwischen den obligat heterozygoten Fa-Individuen und den gesunden Probanden möglich. Die Ergebnisse stehen dennoch im Einklang mit den zytogenetischen Untersuchungen auf erhöhte Chromosomenbruchraten bei Verdacht auf Fanconi-Anämie.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson (1995). "Molekularbiologie der Zelle." 3. Aufl.- Weinheim; New York; Basel; Cambridge;Tokyo: VCH 1995: 1019-1076.

Al-Moghrabi, N. M., I. S. Al-Sharif und A. Aboussekhra (2001). "The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9 cell cycle checkpoint gene is required for optimal repair of UV-induced pyrimidine dimers in both G(1) and G(2)/M phases of the cell cycle." Nucleic Acids Research **29**(10): 2020-2025.

Alter, B. P. (1996). "Fanconi's anemia and malignancies." American Journal of Hematology **53**(2): 99-110.

Alter, B. P., C. L. Frizzera, D. S. Halperin, M. H. Freedman, U. Chitkara, E. Alvarez, L. Lynch, B. Adlerbrecher und A. D. Auerbach (1991). "Fanconis Anemia and Pregnancy." British Journal of Haematology **77**(3): 410-418.

Arwert, F., M. A. Rooimans, A. Westerveld, J. Simons und M. Z. Zdzienicka (1991). "The Chinese-Hamster Cell Mutant V-H4 Is Homologous to Fanconi Anemia (Complementation Group-a)." Cytogenetics and Cell Genetics **56**(1): 23-26.

Auerbach, A., M. Buchwald und H. Joenje (2001). "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (ed. Scriver, C. R. et al)." McGraw-Hill, New York, 2001: 753-768.

Auerbach, A. und S. R. Wolman (1979). "Carcinogen-induced chromosome breakage in chromosome instability syndromes." Cancer Genetics and Cytogenetics **1**: 21-28.

Auerbach, A. D. (1993). "Fanconi-Anemia Diagnosis and the Diepoxybutane (Deb) Test." Experimental Hematology **21**(6): 731-733.

Auerbach, A. D., B. Adler und R. S. K. Chaganti (1981). "Prenatal and Postnatal Diagnosis and Carrier Detection of Fanconi Anemia by a Cytogenetic Method." Pediatrics **67**(1): 128-135.

Auerbach, A. D. und R. G. Allen (1991). "Leukemia and Preleukemia in Fanconi Anemia Patients - a Review of the Literature and Report of the International Fanconi Anemia Registry." Cancer Genetics and Cytogenetics **51**(1): 1-12.

Auerbach, A. D., A. Rogatko und T. M. Schroederkurth (1989). "International Fanconi Anemia Registry - Relation of Clinical Symptoms to Diepoxybutane Sensitivity." Blood **73**(2): 391-396.

- Barquinero, J. F., L. Barrios, M. Ribas, J. Egozcue und M. R. Caballin (2001). "Cytogenetic sensitivity of three Fanconi anemia heterozygotes to bleomycin and ionizing radiation." Cancer Genetics and Cytogenetics **124**(1): 80-83.
- Berger, R., A. Bernheim, M. Leconiat, D. Vecchione und G. Schaison (1980). "Sister Chromatid Exchanges Induced by Nitrogen-Mustard in Fanconis Anemia - Application to the Detection of Heterozygotes and Interpretation of the Results." Cancer Genetics and Cytogenetics **2**(3): 259-267.
- Berkovitz, G. D., W. H. Zinkham und C. J. Migeon (1984). "Gonadal-Function in 2 Siblings with Fanconis Anemia." Hormone Research **19**(3): 137-141.
- Bigelow, S. B., J. M. Rary und M. A. Bender (1979). "G2 chromosomal radiosensitivity in Fanconi's anemia." Mutation Research **63**: 189.
- Bohmer, R. M. und J. Ellwart (1981). "Combination of BrdU-Quenched Hoechst Fluorescence with DNA- Specific Ethidium-Bromide Fluorescence for Cell-Cycle Analysis with a 2-Parametrical Flow Cytometer." Cell and Tissue Kinetics **14**(6): 653-658.
- Bootsma, D. (1978). "Xeroderma Pigmentosum." Journal of Supramolecular Structure: 26-26.
- Brendel, M. und A. Ruhland (1984). "Relationships between functionally and genetic toxicology of selected DNA-damaging agents." Mutation Research **133**: 51-85.
- Broxmeyer, H. E., J. Kurtzberg, E. Gluckman, A. D. Auerbach, G. Douglas, S. Cooper, J. H. F. Falkenburg, J. Bard und E. A. Boyse (1991). "Umbilical-Cord Blood Hematopoietic Stem and Repopulating Cells in Human Clinical Transplantation." Blood Cells **17**(2): 313-329.
- Buchwald, M. (1995). "Complementation Groups - One or More Per Gene." Nature Genetics **11**(3): 228-230.
- Buchwald, M. und E. Moustacchi (1998). "Is Fanconi anemia caused by a defect in the processing of DNA damage?" Mutation Research-DNA Repair **408**(2): 75-90.
- Buchwald, M., C. A. Strathdee, H. Gavish, W. Shannon, C. C. Dossantos, R. Wevrick, A. Savoia und C. A. Ryan (1993). "Cloning of the Fanconi-Anemia-C Gene by Functional Complementation." Experimental Hematology **21**(5): 711-711.
- Bühl, A. Z., P. (1998). "Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows in: SPSS Version 8 (Medienkombination), Bühl A., Zöfel P. (eds.)." Addison-Wesley-Longman Verlag GmbH, Bonn.

- Busch, D., C. Greiner, K. L. Rosenfeld, R. Ford, J. Dewit, J. H. J. Hoeijmakers und L. H. Thompson (1994). "Complementation Group Assignments of Moderately Uv-Sensitive Cho Mutants Isolated by Large-Scale Screening (Faecb)." Mutagenesis **9**(4): 301-306.
- Carr, A. M. und M. F. Hoekstra (1995). "The Cellular-Responses to DNA-Damage." Trends in Cell Biology **5**(1): 32-40.
- Carreau, M., N. Alon, L. Bosnoyan-Collins, H. Joenje und M. Buchwald (1999). "Drug sensitivity spectra in Fanconi anemia lymphoblastoid cell lines of defined complementation groups." Mutation Research-DNA Repair **435**(1): 103-109.
- Cassinat, B., D. Darsin, P. Guardiola, M. E. Toubert, J. D. Rain, E. Gluckman und M. H. Schlageter (2001). "Intermethod discordance for alpha-fetoprotein measurements in Fanconi anemia." Clinical Chemistry **47**(8): 1405-1409.
- Cassinat, B., P. Guardiola, S. Chevret, M. H. Schlageter, M. E. Toubert, J. D. Rain und E. Gluckman (2000). "Constitutive elevation of serum alpha-fetoprotein in Fanconi anemia." Blood **96**(3): 859-863.
- Catalogue, P. (2001-2002). "Partec taking Flow Cytometry to the next generation." Catalogue: I-3.
- Cervenka, J., D. Arthur und C. Yasis (1981). "Mitomycin-C Test for Diagnostic Differentiation of Idiopathic Aplastic-Anemia and Fanconi Anemia." Pediatrics **67**(1): 119-127.
- Cervenka, J. und B. Hirsch (1982). "Mitomycin-C and Diepoxybutane Induced Chromosome-Damage in Fanconi Anemia, Fa Heterozygotes and Idiopathic Aplastic-Anemia." American Journal of Human Genetics **34**(6): A120-A120.
- Dallapiccola, B., B. Porfirio, V. Mokini, G. Alimena, G. Isacchi und E. Gandini (1985). "Effect of Oxidants and Antioxidants on Chromosomal Breakage in Fanconi Anemia Lymphocytes." Human Genetics **69**(1): 62-65.
- Dandrea, A. D. und M. Grompe (1997). "Molecular biology of Fanconi anemia: Implications for diagnosis and therapy." Blood **90**(5): 1725-1736.
- de Winter, J. P., M. A. Rooimans, L. van der Weel, C. G. M. van Berkel, N. Alon, L. Bosnoyan-Collins, J. de Groot, Y. Zhi, Q. Waisfisz, J. C. Pronk, F. Arwert, C. G. Mathew, R. J. Scheper, M. E. Hoatlin, M. Buchwald und H. Joenje (2000). "The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM." Nature Genetics **24**(1): 15-16.

de Winter, J. P., Q. Waisfisz, M. A. Rooimans, C. G. M. van Berkel, L. Bosnoyan-Collins, N. Alon, M. Carreau, O. Bender, I. Demuth, D. Schindler, J. C. Pronk, F. Arwert, H. Hoehn, M. Digweed, M. Buchwald und H. Joenje (1998). "The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9." Nature Genetics **20**(3): 281-283.

Dean, P. N. (1985). "Methods of Data Analysis in Flow Cytometry, Academic Press Inc., London Ltd."

Djuzenova, C. S., A. Rothfuss, U. Oppitz, G. Speit, D. Schindler, H. Hoehn und M. Flentje (2001). "Response to x-irradiation of Fanconi anemia homozygous and heterozygous cells assessed by the single-cell gel electrophoresis (comet) assay." Laboratory Investigation **81**(2): 185-192.

Dorr, R. T. und D. T. von Hoff (1994). "Mitomycin C." In: Cancer Chemotherapy Handbook, 2nd Edn. (Eds. Dorr, R.T. und von Hoff, D.T DD.) Appleton & Lange, East Norwalk.

Dronkert, M. L. G., J. de Wit, M. Boeve, M. L. Vasconcelos, H. van Steeg, T. L. R. Tan, J. H. J. Hoeijmakers und R. Kanaar (2000). "Disruption of mouse SNM1 causes increased sensitivity to the DNA interstrand cross-linking agent mitomycin C." Molecular and Cellular Biology **20**(13): 4553-4561.

Dronkert, M. L. G. und R. Kanaar (2001). "Repair of DNA interstrand cross-links." Mutation Research-DNA Repair **486**(4): 217-247.

Ducommun, B., P. Brambilla, M. A. Felix, B. R. Franza, E. Karsenti und G. Draetta (1991). "Cdc2 Phosphorylation Is Required for Its Interaction with Cyclin." Embo Journal **10**(11): 3311-3319.

Dusre, L., S. Rajagopalan, H. M. Eliot, J. M. Covey und B. K. Sinha (1990). "DNA Interstrand Cross-Link and Free-Radical Formation in a Human Multidrug-Resistant Cell-Line from Mitomycin-C and Its Analogs." Cancer Research **50**(3): 648-652.

Dutrillaux, B., A. Aurias, A. M. Dutrillaux, D. Buriot und M. Prieur (1982). "The Cell-Cycle of Lymphocytes in Fanconi Anemia." Human Genetics **62**(4): 327-332.

Ellwart, J., K. Stunkel und R. M. Bohmer (1981). "Detection and Quantitation of the Proliferative and Non- Proliferative Fraction of Lymphocytes in Culture after Allogeneic and Mitogenic Stimulation Using a New Flow Cytometric Method." Immunobiology **160**(1): 23-23.

Faivre, L., P. Guardiola, C. Lewis, I. Dokal, W. Ebell, Z. Zatterale, C. Altay, J. Poole, D. Stones, M. L. Kwee, M. van Weel-Sipman, C. Havenga, N. Morgan, J. de Winter, M. Digweed, A. Savoia, J. Pronk, T. de Ravel, S. Jansen, H. Joenje, E. Gluckman und C. G. Mathew (2000). "Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia." Blood **96**(13): 4064-4070.

Fanconi, G. (1927). "Familiäre infantile perniziösaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution)." Jb. Kinderheilk. **117**: 257.

Feilotter, H., C. Lingner, R. Rowley und P. G. Young (1992). "Regulation of the G2-Mitosis Transition." Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire **70**(10-11): 954-971.

Forth, W., D. Henschler und W. Rummel (1987). "Pharmakologie und Toxikologie." (5. Auflage): 735.

Franchitto, A., P. Pichierri, P. Mosesso und F. Palitti (1998). "Caffeine effect on the mitotic delay induced by G2 treatment with UVC or mitomycin C." Mutagenesis **13**(5): 499-505.

Fu, K. L., J. L. R. tenFoe, H. Joenje, K. W. Rao, J. M. Liu und C. E. Walsh (1997). "Functional correction of Fanconi anemia group A hematopoietic cells by retroviral gene transfer." Blood **90**(9): 3296-3303.

Fujiwara, Y., M. Tatsumi und M. S. Sasaki (1977). "Cross-link repair in human cells and its possible defect in Fanconi's anaemia cells." Biochemistry Biophysics Acta **113**: 635.

Funk, J. O. und P. Kind (1997). "Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs." Der Hautarzt **48**: 157-165.

Garcia-Higuera, I., T. Taniguchi, S. Ganesan, M. S. Meyn, C. Timmers, J. Hejna, M. Grompe und A. D'Andrea (2001). "Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway." Molecular Cell **7**: 249-262.

German, J., S. Schonberg, S. Caskie, D. Warburton, C. Falk und J. H. Ray (1987). "A Test for Fanconis Anemia." Blood **69**(6): 1637-1641.

Giampietro, P. F., B. Adlerbrecher, P. C. Verlander, S. G. Pavlakis, J. G. Davis und A. D. Auerbach (1993). "The Need for More Accurate and Timely Diagnosis in Fanconi- Anemia - a Report from the International-Fanconi-Anemia- Registry." Pediatrics **91**(6): 1116-1120.

Gibson, R. A., J. C. Pronk, A. Savoia, N. V. Morgan, M. Wijker, S. Hassock, D. Vetrie, M. Olavesen, E. Kendall, S. Faure, J. Weissenbach, N. A. Doggett, H. Joenje, F. Arwert und C. G. Mathew (1996). "Localization of the Fanconi anemia complementation group A gene to chromosome 16q24.3." Cytogenetics and Cell Genetics **72**(4): 11-11.

Gluckman, E., A. D. Auerbach, M. M. Horowitz, K. A. Sobocinski, R. C. Ash, M. M. Bortin, A. Butturini, B. M. Camitta, R. E. Champlin, W. Friedrich, R. A. Good, E. C. Gordonsmith, R. E. Harris, J. P. Klein, J. J. Ortega, R. Pasquini, N. K. C. Ramsay, B. Speck, M. R. Vowels, M. J. Zhang und R. P. Gale (1995). "Bone-Marrow Transplantation for Fanconi-Anemia." Blood **86**(7): 2856-2862.

Grompe, M. und A. D'Andrea (2001). "Fanconi anemia and DNA repair." Human Molecular Genetics **10**(20): 2253-2259.

Hagerman, D. A. und G. P. Williams (1993). "Some Features of Fanconi-Anemia." New England Journal of Medicine **329**(16): 1168-1168.

Hartwell, L. H. und T. A. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." Science **246**: 629- 634.

Heim, R. A., N. J. Lench und M. Swift (1992). "Heterozygous Manifestations in 4 Autosomal Recessive Human Cancer-Prone Syndromes - Ataxia Telangiectasia, Xeroderma- Pigmentosum, Fanconi Anemia, and Bloom Syndrome." Mutation Research **284**(1): 25-36.

Heinrich, M. C., M. E. Hoatlin, A. J. Zigler, K. V. Silvey, A. C. Bakke, W. W. Keeble, Y. Zhi, C. A. Reifsteck, M. Grompe, M. G. Brown, R. E. Magenis, S. B. Olson und G. C. Bagby (1998). "DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function." Blood **91**(1): 275-287.

Hejna, J. A., C. D. Timmers, C. Reifsteck, D. A. Bruun, L. W. Lucas, P. M. Jakobs, S. Toth-Fejel, N. Unsworth, S. L. Clemens, D. K. Garcia, S. L. Naylor, M. J. Thayer, S. B. Olson, M. Grompe und R. E. Moses (2000). "Localization of the fanconi anemia complementation group D gene to a 200-kb region on chromosome 3p25.3." American Journal of Human Genetics **66**(5): 1540-1551.

Herold, G. (1999). "Innere Medizin." 43-46.

Hickson, I. D. und A. L. Harris (1988). "Mammalian DNA repair - use of mutants hypersensitive to cytotoxic agents." Science **4**(4): 101-106.

Hong, J. H., R. A. Gatti, Y. K. Huo, C. S. Chiang und W. H. McBride (1994). "G(2) M-Phase Arrest and Release in Ataxia-Telangiectasia and Normal-Cells after Exposure to Ionizing-Radiation." Radiation Research **140**(1): 17-23.

Howlett, N. G., T. Taniguchi, S. Olson, B. Cox, Q. Waisfisz, C. de Die-Smulders, N. Persky, M. Grompe, H. Joenje, G. Pals, H. Ikeda, A. F. Fox und A. D'Andrea (2002). "Biallelic Inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia." Science **297**(5581): 606-609.

Hüsler, J. und H. Zimmermann (1996). "Statistische Prinzipien für medizinische Projekte." Bern, Göttingen, Toronto, Seattle, Huber, **1996**(2.,erg. Auflage): 159.

Ishida, R. und M. Buchwald (1982). "Susceptibility of Fanconis Anemia Lymphoblasts to DNA-Cross- Linking and Alkylating-Agents." Cancer Research **42**(10): 4000-4006.

Jakobs, P. M., E. FiddlerOdell, C. Reifsteck, S. Olson, R. E. Moses und M. Grompe (1997). "Complementation group assignments in Fanconi anemia fibroblast cell lines from North America." Somatic Cell and Molecular Genetics **23**(1): 1-7.

Joenje, H. (1996). "Fanconi anaemia complementation groups in Germany and the Netherlands." Human Genetics **97**(3): 280-282.

Joenje, H. und F. Arwert (2001). "Connecting Fanconi anemia to BRCA1." Nature Medicine **7**(4): 406-407.

Joenje, H., A. B. Oostra, M. Wijker, F. M. diSumma, C. G. M. vanBerkel, M. A. Rooimans, W. Ebell, M. vanWeel, J. C. Pronk, M. Buchwald und F. Arwert (1997). "Evidence for at least eight Fanconi anemia genes." American Journal of Human Genetics **61**(4): 940-944.

Joenje, H. und K. J. Patel (2001). "The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia." Nature Reviews Genetics **2**(6): 446-457.

Jones, N. J. (1994). "Genetic analysis of mitomycin C-hypersensitive Chinese hamster cell mutants." Mutagenesis **9**(5): 477-482.

Kruyt, F. A. E., L. M. Dijkmans, F. Arwert und H. Joenje (1997). "Involvement of the Fanconi's anemia protein FAC in a pathway that signals to the cyclin B/cdc2 kinase." Cancer Research **57**(11): 2244-2251.

Kubbies, M. (1990). "Flow Cytometric Recognition of Clastogen Induced Chromatin Damage in G0/G1 Lymphocytes by Nonstoichiometric Hoechst Fluorochrome Binding." Cytometry **11**(3): 386-394.

Kubbies, M. (1990). "High-Resolution Cell Cycle Analysis: The Flow Cytometric Bromodeoxyuridine-Hoechst Quenching Technique." Flow Cytometry **9**: 75-85.

Kubbies, M. und P. S. Rabinovitch (1983). "Flow Cytometric Analysis of Factors Which Influence the Brdurd- Hoechst Quenching Effect in Cultivated Human-Fibroblasts and Lymphocytes." Cytometry **3**(4): 276-281.

Kubbies, M., D. Schindler, H. Hoehn, A. Schinzel und P. S. Rabinovitch (1985). "Endogenous Blockage and Delay of the Chromosome Cycle Despite Normal Recruitment and Growth-Phase Explain Poor Proliferation and Frequent Edomitosis in Fanconi Anemia Cells." American Journal of Human Genetics **37**(5): 1022-1030.

Kubbies, M. H., H. Schindler, D. Chen, Y.C. Rabinovitch, P.S. (1989). "Cell cycle analysis via BrdU-Hoechst flow cytometry: principles and applications, in: Flow Cytometry, Yen, A. (ed.), Florida." **2**: 5.

Kupfer, G. und A. D'Andrea (1996). "The effect of the Fanconi anemia polypeptide, FAC, upon p53 induction and G2 checkpoint regulation." Blood **88**: 1019.

Kupfer, G. M., T. Yamashita, D. Naf, A. Suliman, S. Asano und A. D. Dandrea (1997). "The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin- dependent kinase, cdc2." Blood **90**(3): 1047-1054.

Latt, S. A., T. N. Kaiser, A. Lojewski, C. Dougherty, L. Juergens, S. Brefach, E. Sahar, K. Gustashaw, R. R. Schreck, M. Powers und M. Lalande (1982). "Cytogenetic and Flow Cytometric Studies of Cells from Patients with Fanconi Anemia." Cytogenetics and Cell Genetics **33**(1-2): 133-138.

Lavin, M. F. und K. K. Khanna (1999). "ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia teleangiectasia." International Journal of Radiation Biology **75**: 1201-1214.

Lawley, P. D. und D. H. Phillips (1996). "DNA adducts from chemoterapeutic agents." Mutation Research **355**: 13-40.

Lehmann, A. R. (1996). "Molecular biology of DNA repair in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Mutation Research-DNA Repair **363**(3): 147-161.

Lehmann, A. R., B. A. Bridges, P. C. Hanawalt, R. T. Johnson, R. Kanaar, H. E. Krokan, S. Kyrtopoulos, B. Lambert, D. W. Melton, E. Moustacchi, A. T. Natarajan, M. Radman, A. Sarasin, E. Seeberg, M. J. Smerdon, C. A. Smith, P. J. Smith, J. Thacker, J. Thomale, R. Waters, G. Weeda, S. C. West, A. A. vanZeeland und M. Z. Zdzienicka (1996). "Workshop on processing of DNA damage." Mutation Research-DNA Repair **364**(3): 245-270.

Lindahl, T. (1982). "DNA repair enzymes." Annual Review Biochemistry **51**: 61-87.

- Liu, J. M., M. Buchwald, C. E. Walsh und N. S. Young (1994). "Fanconi-Anemia and Novel Strategies for Therapy." Blood **84**(12): 3995-4007.
- LoTenFoe, J. R., M. L. Kwee, M. A. Rooimans, A. B. Oostra, A. J. P. Veerman, M. vanWeel, R. M. Pauli, N. T. Shahidi, I. Dokal, I. Roberts, C. Altay, E. Gluckman, R. A. Gibson, C. G. Mathew, F. Arwert und H. Joenje (1997). "Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Molecular basis and clinical significance." European Journal of Human Genetics **5**(3): 137-148.
- Macdougall, L. G., M. C. Greeff, J. Rosendorff und R. Bernstein (1990). "Fanconi Anemia in Black-African Children." American Journal of Medical Genetics **36**(4): 408-413.
- Magana-Schwencke, N., J. A. Henriques, R. Chanut und E. Moustacchi (1982). "The fate of 8-methoxy-psoralen photo-induced cross-links in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**(1722-1726).
- Matsushime, H., M. F. Roussel, R. A. Ashum und C. J. Sherr (1991). "Colony stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle." Cell **65**: 701-713.
- Meyn, M. S. (1997). Chromosome instability syndromes: Lessons for carcinogenesis. Genetic Instability and Tumorigenesis. Berlin 33, Springer-Verlag Berlin. **221**: 71-148.
- Morrell, D., C. L. Chase, L. L. Kupper und M. Swift (1986). "Diabetes-Mellitus in Ataxia-Telangiectasia, Fanconi Anemia, Xeroderma-Pigmentosum, Common Variable Immune-Deficiency, and Severe Combined Immune-Deficiency Families." Diabetes **35**(2): 143-147.
- Murken, J. und H. Cleve (1996). "Humangenetik." 6., durchges. Aufl. bearb. von J. Murken und T. Meitinger(Stuttgart: Enke, 1996 (Enke-Reihe zur AO, [ÄO])).
- Murray, A. W. (1992). "Creative blocks: cell cycle checkpoints and feedback controls." Nature **359**: 599-601.
- Norbury, C. und P. Nurse (1992). "Animal cell cycles and their control." Annual Review Biochemistry **61**: 441-470.
- Nurse, P. (1990). "Universal control mechanism regulating onset of M-Phase." Nature **344**: 503-508.
- Ormerod, M. G. und M. Kubbies (1992). "Cell-Cycle Analysis of Asynchronous Cell-Populations by Flow- Cytometry Using Bromodeoxyuridine Label and Hoechst-Propidium Iodide Stain." Cytometry **13**(7): 678-685.

Pan, S. S., P. A. Andrews, C. J. Glover und N. R. Bachur (1984). "Reductive activation of mitomycin C and mitomycin C metabolites catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase and xanthine oxidase." Journal of Biological Chemistry **259**: 959-966.

Papouli, E., C. Lafon, A. Valette, M. Z. Zdzienicka, M. Defais und F. Larminat (2000). "Involvement of apoptosis in mitomycin C hypersensitivity of Chinese hamster cell mutants." Biochemical Pharmacology **59**(9): 1101-1107.

Paz, M. M., D. Arunangshu und M. Tomasz (1999). "Mitomycin C Linked to DNA Minor Groove Binding Agents: Syntheses, Reductive Activation, DNA Binding and Cross Linking Properties and In Vitro Antitumor Activity." Bioorganic and Medicinal Chemistry(7): 2713-2726.

Rabinovitch, P. S., M. Kubbies, Y. C. Chen, D. Schindler und H. Hoehn (1988). "BrdU-Hoechst Flow-Cytometry - a Unique Tool for Quantitative Cell-Cycle Analysis." Experimental Cell Research **174**(2): 309-318.

Raffael A., N. C. T., Valet G., (1994). "Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Schmitz G., Rothe G., (eds) Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Stuttgart: Schattauer." 3-49.

Robinson, J. P. (1993). "Handbook of flow cytometry methods. New York: Wiley-List."

Rosendorff, J. und R. Bernstein (1988). "Fanconis Anemia - Chromosome Breakage Studies in Homozygotes and Heterozygotes." Cancer Genetics and Cytogenetics **33**(2): 175-183.

Rosselli, F., J. Sanceau, J. Wietzerbin und E. Moustacchi (1992). "Abnormal lymphokine production: Anovel feature of the genetic disease Fanconi anemia." Human Genetics **89**: 42.

Savoia, A., A. Zatterale, D. DelPrincipe und H. Joenje (1996). "Fanconi anaemia in Italy: High prevalence of complementation group A in two geographic clusters." Human Genetics **97**(5): 599-603.

Schindler, D. und H. Hoehn (1988). "Fanconi Anemia Mutation Causes Cellular-Susceptibility to Ambient Oxygen." American Journal of Human Genetics **43**(4): 429-435.

Schindler, D., M. Kubbies, R. E. Priest, H. Hoehn und P. S. Rabinovitch (1988). "The Phytohemagglutinin Response of Human Peripheral-Blood Lymphocytes as a Function of Donor Age - a Re-Examination Using BrdU-Hoechst Flow-Cytometry." Mechanisms of Ageing and Development **44**(3): 253-263.

Schindler, D., H. Seyschab, M. Poot, H. Hoehn, A. Schinzel, J. P. Fryns, N. Tommerup und P. S. Rabinovitch (1987). "Screening-Test for Ataxia Telangiectasia." Lancet **2**(8572): 1398-1399.

Schroeder, T. M. (1982). "Genetically-Determined Chromosome Instability Syndromes." Cytogenetics and Cell Genetics **33**(1-2): 119-132.

Schroeder, T. M., F. Anschutz und A. Knopp (1964). "Spontaneous Chromosomal Aberrations in Family Panmyelopathy." Humangenetik **1**(2): 194-196.

Scott, B. R., M. A. Pathak und G. R. Mohn (1976). "Molecular and genetic basis of furocumarin reactions." Mutation Research **39**: 29-74.

Seyschab, H. (1992). "Exogen und genetisch bedingte Störungen des Zellzyklus: Durchflußzytometrische Untersuchungen an menschlichen Blutlymphzyten." 34.

Seyschab, H., R. Friedl, Y. J. Sun, D. Schindler, H. Hoehn, S. Hentze und T. Schroederkurth (1995). "Comparative-Evaluation of Diepoxybutane Sensitivity and Cell- Cycle Blockage in the Diagnosis of Fanconi-Anemia." Blood **85**(8): 2233-2237.

Seyschab, H., D. Schindler, T. Schroederkurth und H. Hoehn (1991). "Rapid Diagnosis of Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia Using Bivariate Brud-Hoechst Flow-Cytometry." American Journal of Human Genetics **49**(4): 290-290.

Seyschab, H., Y. J. Sun, R. Friedl, D. Schindler und H. Hoehn (1993). "G2 Phase Cell-Cycle Disturbance as a Manifestation of Genetic Cell-Damage." Human Genetics **92**(1): 61-68.

Stetten, G., S. A. Latt und R. L. Davidson (1976). "33258 Hoechst Enhancement of Photosensitivity of Bromodeoxyuridine-Substituted Cells." Somatic Cell Genetics **2**(3): 285-290.

Strathdee, C. A., H. Gavish, W. R. Shannon und M. Buchwald (1992). "Cloning of Cdnas for Fanconis Anemia by Functional Complementation." Nature **356**(6372): 763-767.

Swift, M. (1971). "Fanconis Anaemia in Genetics of Neoplasia." Nature **230**(5293): 370-&.

Swift, M., R. J. Caldwell und C. Chase (1980). "Reassessment of Cancer Predisposition of Fanconi Anemia Heterozygotes." Journal of the National Cancer Institute **65**(5): 863-867.

Taniguchi, T., I. Garcia-Higuera, B. Xu, P. R. Andreassen, R. C. Gregory, S. T. Kim, W. S. Lane, M. B. Kastan und A. D. D'Andrea (2002). "Convergence of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways." Cell **109**(4): 459-472.

Thompson, L. H. (1989). "Somatic-Cell Genetics Approach to Dissecting Mammalian DNA-Repair." Environmental and Molecular Mutagenesis **14**(4): 264-281.

Thompson, L. H., D. B. Busch, K. Brookman, C. L. Mooney und D. A. Glaser (1981). "Genetic Diversity of Uv-Sensitive DNA-Repair Mutants of Chinese-Hamster Ovary Cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences **78**(6): 3734-3737.

Timmers, C., T. Taniguchi, J. Hejna, C. Reifsteck, L. Lucas, D. Bruun, M. Thayer, B. Cox, S. Olson, A. D. D'Andrea, R. Moses und M. Grompe (2001). "Positional cloning of a novel fanconi anemia gene, FANCD2." Molecular Cell **7**(2): 241-248.

Timms, A. R., H. Steingrimsdottir, A. R. Lehmann und B. A. Bridges (1992). "Mutant Sequences in the Rpsl Gene of Escherichia-Coli B/R - Mechanistic Implications for Spontaneous and Ultraviolet-Light Mutagenesis." Molecular & General Genetics **232**(1): 89-96.

Tomasz, M. (1995). "Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective)." Chemistry Biology **2**: 575-579.

Tomasz, M., R. Lipman, D. Chowdary, J. Pawlak, G. L. Verdine und K. Nakanishi (1987). "Isolation and Structure of a Covalent Cross-Link Adduct Between Mitomycin C and DNA." Science **235**: 1204-1208.

Tomkins, D. J., M. Care, M. Carreau und M. Buchwald (1998). "Development and characterization of immortalized fibroblastoid cell lines from an FA(C) mouse model." Mutation Research-DNA Repair **408**(1): 27-35.

Tuteja, N. und R. Tuteja (2001). "Unraveling DNA repair in human: Molecular mechanisms and consequences of repair defect." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **36**(3): 261-290.

Verlander, P. C., A. Kaporis, Q. Liu, Q. Zhang, U. Seligsohn und A. D. Auerbach (1995). "Carrier Frequency of the Ivs4+4 a-JT Mutation of the Fanconi- Anemia Gene Fac in the Ashkenazi-Jewish Population." Blood **86**(11): 4034-4038.

Walsh, C. E., A. W. Nienhuis, R. J. Samulski, M. G. Brown, J. L. Miller, N. S. Young und J. M. Liu (1994). "Phenotypic Correction of Fanconi-Anemia in Human Hematopoietic- Cells with a Recombinant Adenoassociated Virus Vector." Journal of Clinical Investigation **94**(4): 1440-1448.

Weinert, T. und L. Hartwell (1989). "Control of G2 Delay by the Rad9-Gene of *Saccharomyces-Cerevisiae*." Journal of Cell Science: 145-148.

Weinert, T. A. und L. H. Hartwell (1988). "The Rad9 Gene Controls the Cell-Cycle Response to DNA Damage in *Saccharomyces-Cerevisiae*." Science **241**(4863): 317-322.

Wijker, M., N. V. Morgan, S. Herterich, C. G. M. van Berkel, A. J. Tipping, H. J. Gross, J. J. P. Gille, G. Pals, M. Savino, C. Altay, S. Mohan, I. Dokal, J. Cavenagh, J. Marsh, M. Van Weel, J. J. Ortega, D. Schuler, E. Samochatova, M. Karwacki, A. N. Bekassy, M. Abecasis, W. Ebell, M. L. Kwee, T. de Ravel, R. A. Gibson, E. Gluckman, F. Arwert, H. Joenje, A. Savoia, H. Hoehn, J. C. Pronk und C. G. Mathew (1999). "Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene." European Journal of Human Genetics **7**(1): 52-59.

Wittenberg, C., K. Sugimoto und S. I. Reed (1990). "G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: Cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone and association with the p34CDC28 protein kinase." Cell **65**: 225-237.

Zhou, B. B. und S. J. Elledge (2000). "The damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**: 433-439.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------------------|--|
| α -TG | α -Monothioglycerol |
| BrdU | 5-Bromo-2`-desoxyuridin |
| BSA | Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine) |
| B-LCL | Lymphoblastoide Zellen |
| DC | Desoxyctidin |
| DEB | Diepoxybutan |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EB | Ethidiumbromid |
| FA | Fanconi-Anämie |
| FaH | Heterozygoter Träger des genetischen Defektes für Fanconi-Anämie |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| Fibro | Fibroblasten |
| G0/G1 | G0/G1-Phase des ersten Zellzyklus |
| G1` | G1`-Phase des zweiten Zellzyklus |
| G1`` | G1``-Phase des dritten Zellzyklus |
| G1```` | G1````-Phase des vierten Zellzyklus |
| G2 | G2-Phase des ersten Zellzyklus |
| G2` | G2`-Phase des zweiten Zellzyklus |
| G2`` | G2``-Phase des dritten Zellzyklus |
| G2```` | G2````-Phase des vierten Zellzyklus |
| Σ G2 | Summe aller G2-Phasen |
| Σ G2/GF | Quotient aus Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion |
| GF | Wachstumsfraktion |
| Increased Σ G2+G2`/GF | Zunahme der G2-Phasenanteile des ersten und zweiten Zellzyklus |
| Increased Σ G2/GF | Zunahme der G2-Phasenanteile in allen Zellzyklen |
| HBSS | Hank`s Balanced Salt Solution |
| KMT | Knochenmarkstransplantation |
| MEM | Modified Essential Medium |
| MMC | Mitomycin C |
| Mill. | Millionen |
| NP40 | Non-idet P40 |
| o.A. | ohne Angabe (in der Lit. lagen noch keine eindeutigen Angaben vor) |
| pBL | Periphere Blutlymphozyten |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| RPMI 1640 | Zellkulturmedium |
| RT | Raumtemperatur |
| S | S-Phase des ersten Zellzyklus |
| S` | S`-Phase des zweiten Zellzyklus |
| S`` | S``-Phase des dritten Zellzyklus |
| S```` | S````-Phase des vierten Zellzyklus |
| SZT | Stammzelltransplantation |

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Strukturformel von Mitomycin..... | 4 |
| Abbildung 2 (Raffael A. 1994): Aufbau eines Flowzytometers..... | 18 |
| Abbildung 3 (Catalogue 2001-2002): Particle Analysing System PAS (Modell Galaxy, 1999).. | 20 |
| Abbildung 4 (Seyschab 1992): Zweidimensionale Zytogramme von PHA-stimulierten humanen peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Probanden..... | 22 |
| Abbildung 5: Zweidimensionale (A) und dreidimensionale (B) Darstellung der Zellzyklen einer Standardzellkultur mit peripheren Blutlymphozyten einer gesunden Kontrollperson. | 26 |
| Abbildung 6: Zweidimensionale (A) und dreidimensionale (B) Darstellung von Zellzyklen einer Standardzellkultur mit peripheren Blutlymphozyten eines Fanconi Anämie Patienten. | 27 |
| Abbildung 7: Beobachtete relative Häufigkeiten innerhalb der Altersgruppen und Geschlechtsverteilung aller Probanden..... | 32 |
| Abbildung 8: Zweidimensionale Zytogramme von 72 Stunden Zellkulturen mit menschlichen peripheren Blutlymphozyten einer gesunden Kontrollperson..... | 34 |
| Abbildung 9: Zweidimensionale Zytogramme von 72 Stunden Zellkulturen mit menschlichen peripheren Blutlymphozyten eines Fanconi Anämie Patienten..... | 36 |
| Abbildung 10: Zweidimensionale Zytogramme von 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) einer gesunden Kontrollperson. Die Zellkulturen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen für Mitomycin C angesetzt..... | 43 |
| Abbildung 11: Zweidimensionale Zytogramme von 48 Stunden Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) eines Fanconi Anämie Patienten. Die Zellkulturen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen für Mitomycin C angesetzt..... | 45 |
| Abbildung 12: Zellzyklusparameter des ersten und zweiten Zellzyklus (Bild A bis F) der lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) im Vergleich für Probanden der Kontrollgruppe, Heterozygoten und Fanconi Anämie Patienten..... | 47 |
| Abbildung 13: Proliferationskapazität (Bild A), Wachstumsfraktion (Bild B), Σ G2-Pasen (Bild C) und Σ G2/GF (Bild D) aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)..... | 49 |
| Abbildung 14: Zellzyklusparameter des ersten und zweiten Zellzyklus (Bild A bis F) von Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten. Aufgetragen jeweils im Vergleich für Probanden der Kontrollgruppe, Heterozygoten und Fanconi Anämie Patienten für unterschiedliche Konzentrationen von Mitomycin C..... | 51 |
| Abbildung 15: Proliferationskapazität (Bild A), Wachstumsfraktion (Bild B), Σ G2-Pasen (Bild C) und Σ G2/GF (Bild D) der Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten. | 53 |
| Abbildung 16: Mittelwerte der prozentualen Anteile der G0-G1 Fraktionen aller untersuchten Zellarten in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Messpunkte zeigen den Mittelwert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte. | 54 |
| Abbildung 17: Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes der Wachstumsfraktionen (Growth-Fraction, 100 minus G0-G1) aller Diagnosegruppen unter Berücksichtigung der untersuchten Zellarten und Konzentrationen von Mitomycin C. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte. | 56 |
| Abbildung 18: Mittelwerte der Proliferationskapazität (Percent Increased Cells, Anzahl der Plot-Zellen des jeweiligen Zellzyklus) aller Diagnosegruppen unter Berücksichtigung der untersuchten Zellarten und Mitomycin C Konzentrationen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte. | 56 |
| Abbildung 19: Graphische Darstellung der Variable Σ G2/GF der Gruppe 1 bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten. Die linke Abbildung zeigt das Q-Q Diagramm. Im Histogramm der rechten Abbildung ist die Normalverteilungskurve mit eingezeichnet worden..... | 60 |

- Abbildung 20: Graphische Darstellung der Variable $\Sigma G2/GF$ bei Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten der Fanconi-Anämie Patienten (Gruppe 3). Die linke Abbildung zeigt das Q-Q Diagramm. Im Histogramm der rechten Abbildung ist die Normalverteilungskurve mit eingezeichnet worden.....61
- Abbildung 21: Mittelwerte der Summe der G2-Phasen ($\Sigma G2$) aller Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.....67
- Abbildung 22: Graphische Darstellung der $\Sigma G2/GF$ aller Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Balken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte..70
- Abbildung 23: Zunahme der $\Sigma G2+G2'/GF$ aller Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.74
- Abbildung 24: Zunahme der $\Sigma G2/GF$ aller Diagnosegruppen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.....76
- Abbildung 25 (Paz, Arunangshu et al. 1999): Biochemische Aktivierung und DNA Interaktionen von Mitomycin C.109
- Abbildung 26: Mittelwerte der $\Sigma G2/GF$ aller Diagnosegruppen. Aufgetragen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.121

9 TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Übersicht über Krankheitsbilder mit erhöhter chromosomaler Instabilität..... | 5 |
| Tabelle 2: Komplementationsgruppen, Genlokalisierung und Häufigkeiten bei Fanconi Anämie (Joenje 1996; Savoia, Zatterale et al. 1996)..... | 8 |
| Tabelle 3: Messparameter in der Durchflusszytometrie | 17 |
| Tabelle 4: Beeinflussung des Quencheffektes..... | 19 |
| Tabelle 5: Gruppeneinteilung für die statistische Datenanalyse..... | 29 |
| Tabelle 6: Prozentuale Häufigkeiten und Verteilung aller Probanden innerhalb der Diagnosegruppen..... | 31 |
| Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter des ersten und zweiten Zellzyklus von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten. | 38 |
| Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter des dritten und vierten Zellzyklus von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten. | 39 |
| Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferationskapazitäten, Wachstumsfraktionen, Σ G2-Phasen und der Ratio Σ G2/GF von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten. | 41 |
| Tabelle 10: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der zufälligen Variable Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (Σ G2/GF) bei Standardzellkulturen aller Diagnosegruppen..... | 58 |
| Tabelle 11: Normalitätsprüfung der Variable Σ G2/GF der Gruppe 1 mit dem Kolmogorov-Smirnov Test. Die Testgröße r entspricht der Statistik in der Tabelle. | 59 |
| Tabelle 12: Normalitätsprüfung der Variable Σ G2/GF der Gruppe 3 nach dem Shapiro-Wilk-Verfahren. Die Testgröße r entspricht dabei der Spalte mit Namen Statistik in der Tabelle. | 60 |
| Tabelle 13: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen und Mediane der Variable Σ G2+G2`/GF. Bei den Probanden der Gruppe 1 bis 3 (periphere Blutlymphozyten) wurden keine Zellkulturen mit 100 ng/ml Mitomycin C angesetzt (schraffierte Felder)..... | 63 |
| Tabelle 14: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen und Mediane der Variable Zunahme der Σ G2/GF. Bei den Probanden der Gruppe 1 bis 3 (periphere Blutlymphozyten) wurden keine Zellkulturen mit 100 ng/ml Mitomycin C angesetzt (schraffierte Felder)..... | 65 |
| Tabelle 15: Mittelwertvergleich der Σ G2-Phasen unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellart. Getestet wurde die Nullhypothese „die Mittelwerte der Σ G2-Phasen sind nicht gleich“ gegenüber der Kontrollgruppe. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden. | 68 |
| Tabelle 16: Mittelwertvergleich der Σ G2/GF unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellart. Getestet wurde die Nullhypothese „die Mittelwerte der Σ G2/GF Fraktion sind nicht gleich“ gegenüber der Kontrollgruppe. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden..... | 71 |
| Tabelle 17: Mittelwertvergleich der Σ G2/GF von gesunden Kontrollpersonen der untersuchten Zellarten unter Berücksichtigung der Mitomycin C Dosierung. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Die Mittelwerte der Σ G2/GF sind somit verschieden..... | 72 |
| Tabelle 18: Mittelwertvergleich der Σ G2/GF von heterozygoten Versuchspersonen der untersuchten Zellarten unter Berücksichtigung der Mitomycin C Dosierung. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Die Mittelwerte der Σ G2/GF sind somit verschieden. | 72 |
| Tabelle 19: Mittelwertvergleich der Σ G2/GF von Fanconi-Anämie Patienten der untersuchten Zellarten unter Berücksichtigung der Mitomycin C Dosierung. Bei * mit $p < 0,05$ kann die | |

| | |
|--|-----|
| getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Die Mittelwerte der Σ G2/GF sind somit verschieden..... | 73 |
| Tabelle 20: Mittelwertvergleich der Σ G2+G2`/GF unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellart. Getestet wurde die Nullhypothese „die Mittelwerte sind nicht gleich“ gegenüber der Kontrollgruppe. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden..... | 75 |
| Tabelle 21: Mittelwertvergleich der Increased Σ G2/GF unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellart. Getestet wurde die Nullhypothese „die Mittelwerte sind nicht gleich“ gegenüber der Kontrollgruppe. Bei * mit $p < 0,05$ kann die getestete Nullhypothese nicht abgelehnt werden..... | 77 |
| Tabelle 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL). | 111 |
| Tabelle 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL). | 112 |
| Tabelle 24: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter des ersten, zweiten und dritten Zellzyklus von Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten..... | 113 |
| Tabelle 25: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter des vierten Zellzyklus, Proliferationskapazität, Wachstumsfraktion, Σ G2-Phasen und Σ G2/GF von Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten. | 114 |
| Tabelle 26 Normalitätsverteilungen der Variable Σ G2/GF bei Standardzellkulturen. Die Testgröße r (Shapiro-Francia-Testgröße) wurde durch SPSS berechnet und mit der Testschranke $r_{\alpha}(n)$ verglichen..... | 115 |
| Tabelle 27: Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei 5 ng/ml Mitomycin C. | 115 |
| Tabelle 28: Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei 10 ng/ml Mitomycin C. | 116 |
| Tabelle 29: Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei 50 ng/ml Mitomycin C. | 116 |
| Tabelle 30: Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei 100 ng/ml Mitomycin C..... | 116 |
| Tabelle 31: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus bei Zugabe von 5 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder)..... | 117 |
| Tabelle 32: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus bei Zugabe von 10 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder). Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder). | 117 |
| Tabelle 33: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus bei Zugabe von 50 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder)..... | 118 |
| Tabelle 34: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus bei Zugabe von 100 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder)..... | 118 |
| Tabelle 35: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen in allen Zellzyklen/Wachstumsfraktion bei Zugabe von 5 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder)..... | 119 |
| Tabelle 36: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen in allen Zellzyklen/Wachstumsfraktion bei Zugabe von 10 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder)..... | 119 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 37: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen in allen Zellzyklen/Wachstumsfraktion bei Zugabe von 50 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder)..... | 119 |
| Tabelle 38: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen in allen Zellzyklen/Wachstumsfraktion bei Zugabe von 100 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder)..... | 120 |
| Tabelle 39: Zellzyklusparameter der Kontrollgruppe von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten mit Serum FCS A bei Nullkonzentrationen für Mitomycin C..... | 122 |
| Tabelle 40: Zellzyklusparameter der Probanden mit Fanconi Anämie (Gruppe 3) von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten mit Serum FCS A bei Nullkonzentrationen für Mitomycin C. | 122 |

10 ANHANG

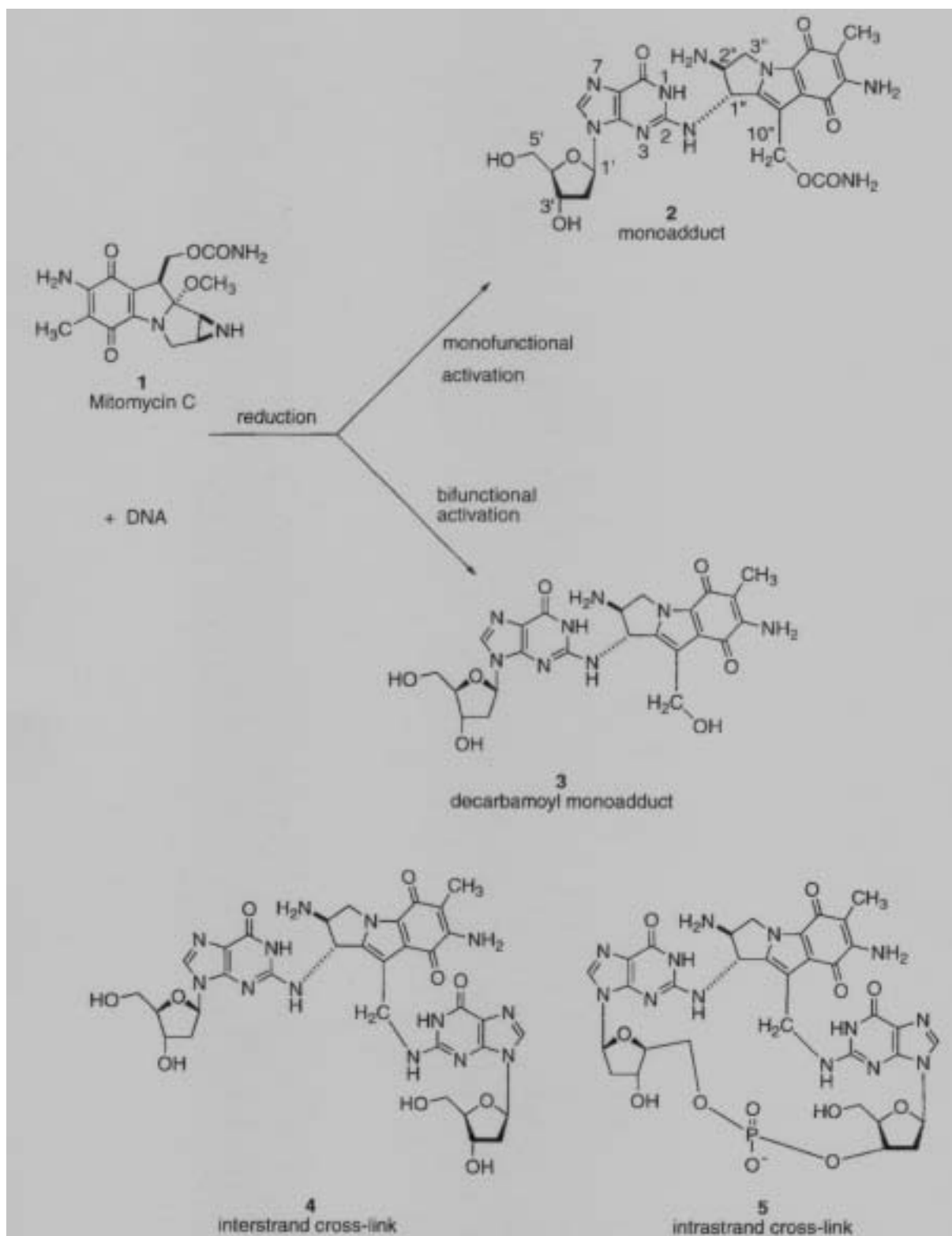
Biochemische Aktivierung und DNA Interaktionen von Mitomycin C:

Abbildung 25 (Paz, Arunangshu et al. 1999): Biochemische Aktivierung und DNA Interaktionen von Mitomycin C.

Datenbankerstellung:

Soweit diese vorhanden waren sind weitere Angaben aus den Krankenakten für nachfolgende Untersuchungen in die Datenbank des Programms SPSS mit aufgenommen worden. Es handelte sich hierbei hauptsächlich um Informationen über Datum der Zellkultur, Angaben über klinische Untersuchungsergebnisse, Blutanalyseparameter, durchgeführte Knochenmarkstransplantationen und Angaben zur Therapie. Die Eingaben wurden jedoch nicht für die statistische Datenanalyse verwendet.

Messwerte ohne Zuordnung:

20 Probanden (10,9 % vom Gesamtanteil) konnten keiner der genannten Diagnosegruppen zugeordnet werden. Bei sieben Probanden lag die G0-G1-Fraktion bei den durchgeführten Zellzyklusanalysen im Bereich von Patienten mit aplastischer Anämie, was durch weitere klinische Nachuntersuchungen bestätigt werden konnte. Bei den restlichen Probanden ging aus den Krankenunterlagen keine eindeutige Zuordnung hervor (11 Probanden). Dies konnte unterschiedliche Gründe haben. Entweder lag sehr wenig Zellmaterial für die Zellzyklusanalysen vor, oder das Zellmaterial war von verminderter Qualität und es zeigte sich bei den durchgeführten Zellzyklusanalysen nach dem BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromidverfahren ein starker Zellerfall. Daneben kam noch eine Kontamination des Untersuchungsmaterials in Betracht (zwei Probanden). Bei Patienten die sich aufgrund der genannten Ursachen keiner der Diagnosegruppen zuordnen ließen, wurde deshalb Zellmaterial für Nachuntersuchungen angefordert und die Befunde entsprechend in den Krankenunterlagen vermerkt.

Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit **lymphoblastoiden Zellen (B-LCL)** sind in Tabelle 22 und 23 dargestellt.

| Gruppe | Konzentration MMC in ng/ml | | G0/G1 | S | G2 | G1' | S' | G2' | G1'' | S'' | G2'' | |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|------|
| Gruppe 4 / Kontrolle B-LCL | 0 MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | |
| | | Mittelwert | 29,107 | 7,564 | 6,471 | 21,979 | 12,000 | 5,586 | 13,329 | 2,993 | ,107 | |
| | | Standardabweichung | 7,774 | 6,534 | 2,635 | 6,155 | 3,503 | 2,214 | 6,449 | 2,334 | ,159 | |
| | 5 ng/ml MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| | | Mittelwert | 27,964 | 6,464 | 8,907 | 23,521 | 11,521 | 6,743 | 11,893 | 2,729 | ,250 | |
| | | Standardabweichung | 6,700 | 5,776 | 2,612 | 4,411 | 2,585 | 2,215 | 5,456 | 1,507 | ,367 | |
| | 10 ng/ml MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| | | Mittelwert | 28,450 | 10,157 | 11,214 | 22,964 | 12,593 | 8,350 | 8,221 | 1,457 | ,164 | |
| | | Standardabweichung | 6,001 | 13,625 | 3,568 | 3,896 | 3,215 | 2,741 | 3,581 | 1,383 | ,356 | |
| | 50 ng/ml MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| | | Mittelwert | 29,821 | 11,764 | 25,100 | 19,764 | 10,257 | 2,536 | ,629 | 9,29E-02 | 2,86E-02 | |
| | | Standardabweichung | 7,608 | 8,484 | 8,914 | 4,807 | 3,371 | 3,041 | 1,082 | ,295 | 8,25E-02 | |
| | 100 ng/ml MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| | | Mittelwert | 30,493 | 16,114 | 35,250 | 13,229 | 4,721 | ,129 | 6,43E-02 | ,000 | ,000 | |
| | | Standardabweichung | 7,681 | 7,378 | 9,698 | 5,016 | 3,122 | ,300 | ,241 | ,000 | ,000 | |
| | Gruppe 5 / FaH B-LCL | 0 MMC | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | | | Mittelwert | 23,670 | 6,950 | 6,610 | 30,070 | 14,440 | 5,240 | 10,800 | ,900 | ,000 |
| | | | Standardabweichung | 6,591 | 3,440 | 1,839 | 3,400 | 4,540 | 2,666 | 5,421 | 1,189 | ,000 |
| 5 ng/ml MMC | | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| | | Mittelwert | 22,920 | 6,630 | 6,920 | 31,290 | 13,720 | 6,870 | 11,200 | ,490 | ,000 | |
| | | Standardabweichung | 7,586 | 3,061 | 2,457 | 4,767 | 5,297 | 2,709 | 4,686 | ,433 | ,000 | |
| 10 ng/ml MMC | | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| | | Mittelwert | 22,480 | 9,040 | 9,530 | 29,670 | 12,420 | 7,640 | 8,970 | ,250 | ,000 | |
| | | Standardabweichung | 6,532 | 5,425 | 3,429 | 4,172 | 5,283 | 3,501 | 4,701 | ,372 | ,000 | |
| 50 ng/ml MMC | | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| | | Mittelwert | 25,170 | 14,220 | 21,100 | 22,240 | 10,120 | 4,190 | 2,940 | ,000 | ,000 | |
| | | Standardabweichung | 6,336 | 7,363 | 5,039 | 6,051 | 6,461 | 3,299 | 3,979 | ,000 | ,000 | |
| 100 ng/ml MMC | | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| | | Mittelwert | 27,610 | 15,300 | 33,010 | 17,790 | 4,750 | ,640 | ,900 | ,000 | ,000 | |
| | | Standardabweichung | 6,120 | 5,836 | 5,423 | 6,017 | 5,551 | 1,512 | 2,846 | ,000 | ,000 | |
| Gruppe 6 / Fa B-LCL | | 0 MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | | | Mittelwert | 31,440 | 8,800 | 9,580 | 29,140 | 8,460 | 6,120 | 5,920 | ,460 | ,000 |
| | | | Standardabweichung | 6,628 | 5,705 | 1,148 | 6,236 | 2,283 | 1,683 | 6,154 | ,555 | ,000 |
| | 5 ng/ml MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| | | Mittelwert | 32,140 | 6,980 | 15,760 | 25,800 | 8,540 | 5,520 | 5,200 | 4,00E-02 | ,000 | |
| | | Standardabweichung | 7,041 | 2,908 | 7,323 | 9,147 | 3,409 | 3,170 | 5,414 | 8,94E-02 | ,000 | |
| | 10 ng/ml MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| | | Mittelwert | 33,800 | 9,800 | 19,240 | 21,680 | 6,160 | 6,060 | 3,260 | ,000 | ,000 | |
| | | Standardabweichung | 7,635 | 7,067 | 8,847 | 11,561 | 2,659 | 4,418 | 4,085 | ,000 | ,000 | |
| | 50 ng/ml MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| | | Mittelwert | 40,140 | 13,260 | 29,280 | 15,480 | 1,840 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | |
| | | Standardabweichung | 13,926 | 3,859 | 6,322 | 9,642 | 3,618 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | |
| | 100 ng/ml MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| | | Mittelwert | 41,620 | 19,680 | 36,140 | 2,580 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | |
| | | Standardabweichung | 14,508 | 8,937 | 8,182 | 5,769 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | |

Tabelle 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL).

| Gruppe | Konzentration MMC in ng/ml | | ICELLS | GFRACT | Sum of G2 | Sum of G2/GF | |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|---------|-----------|--------------|-----------|
| Gruppe 4 / Kontrolle B-LCL | 0 MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | |
| | | Mittelwert | 188,843 | 70,893 | 12,164 | ,172 | |
| | | Standardabweichung | 27,226 | 7,774 | 3,154 | 4,503E-02 | |
| | 5 ng/ml MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | |
| | | Mittelwert | 186,421 | 72,036 | 15,900 | ,222 | |
| | | Standardabweichung | 20,583 | 6,700 | 3,708 | 5,052E-02 | |
| | 10 ng/ml MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | |
| | | Mittelwert | 173,521 | 71,550 | 19,729 | ,276 | |
| | | Standardabweichung | 16,381 | 6,001 | 4,223 | 5,560E-02 | |
| | 50 ng/ml MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | |
| | | Mittelwert | 135,236 | 70,179 | 27,664 | ,392 | |
| | | Standardabweichung | 10,327 | 7,608 | 7,661 | 9,240E-02 | |
| | 100 ng/ml MMC | N | 14 | 14 | 14 | 14 | |
| | | Mittelwert | 118,636 | 69,493 | 35,379 | ,506 | |
| | | Standardabweichung | 7,139 | 7,676 | 9,707 | ,113 | |
| | Gruppe 5 / FaH B-LCL | 0 MMC | N | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | | | Mittelwert | 188,930 | 76,330 | 11,860 | ,157 |
| | | | Standardabweichung | 18,749 | 6,591 | 2,496 | 3,843E-02 |
| 5 ng/ml MMC | | N | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| | | Mittelwert | 186,890 | 77,080 | 13,790 | ,180 | |
| | | Standardabweichung | 19,536 | 7,586 | 2,408 | 3,553E-02 | |
| 10 ng/ml MMC | | N | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| | | Mittelwert | 177,530 | 77,520 | 17,170 | ,222 | |
| | | Standardabweichung | 20,212 | 6,532 | 2,900 | 3,611E-02 | |
| 50 ng/ml MMC | | N | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| | | Mittelwert | 145,800 | 74,770 | 25,290 | ,339 | |
| | | Standardabweichung | 21,489 | 6,310 | 3,928 | 5,110E-02 | |
| 100 ng/ml MMC | | N | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| | | Mittelwert | 126,030 | 72,390 | 33,650 | ,468 | |
| | | Standardabweichung | 15,190 | 6,120 | 4,836 | 7,906E-02 | |
| Gruppe 6 / Fa B-LCL | | 0 MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | | | Mittelwert | 167,340 | 68,560 | 15,700 | ,231 |
| | | | Standardabweichung | 15,548 | 6,628 | 1,056 | 3,017E-02 |
| | 5 ng/ml MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| | | Mittelwert | 158,640 | 67,860 | 21,280 | ,320 | |
| | | Standardabweichung | 23,022 | 7,041 | 4,517 | 9,737E-02 | |
| | 10 ng/ml MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| | | Mittelwert | 145,160 | 66,200 | 25,300 | ,393 | |
| | | Standardabweichung | 25,887 | 7,635 | 5,058 | ,129 | |
| | 50 ng/ml MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| | | Mittelwert | 117,300 | 59,860 | 29,280 | ,503 | |
| | | Standardabweichung | 10,584 | 13,926 | 6,322 | ,120 | |
| | 100 ng/ml MMC | N | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| | | Mittelwert | 107,000 | 58,380 | 36,140 | ,638 | |
| | | Standardabweichung | 6,451 | 14,508 | 8,182 | ,155 | |

Tabelle 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit lymphoblastoiden Zellen (B-LCL).

Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Zellzyklusanalysen von Zellkulturen mit **subkutanen humanen Fibroblasten** sind in Tabelle 24 und 25 dargestellt.

| Gruppe | Konzentration | | G0/G1 | S | G2 | G1' | S' | G2' | G1'' | S'' | G2'' |
|-------------------------------|---------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|------|
| Gruppe 7 / Kontrolle Fibro | 0 MMC | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | Mittelwert | 5,700 | 2,900 | 12,300 | 62,100 | 4,050 | 4,750 | 8,100 | ,100 | ,000 |
| | | Standardabweichung | ,141 | 1,980 | ,424 | ,283 | ,778 | 2,475 | 1,131 | ,141 | ,000 |
| | 5 ng/ml | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | Mittelwert | 6,700 | 2,800 | 20,500 | 52,100 | 3,300 | 6,950 | 7,200 | ,300 | ,000 |
| | | Standardabweichung | 2,546 | 1,414 | ,424 | 3,253 | ,849 | 1,344 | ,283 | ,283 | ,000 |
| | 10 ng/ml | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | Mittelwert | 7,250 | 3,100 | 28,750 | 45,150 | 2,950 | 7,300 | 5,300 | ,150 | ,000 |
| | | Standardabweichung | 3,182 | ,283 | 2,051 | 4,031 | ,212 | ,000 | 1,414 | ,212 | ,000 |
| | 50 ng/ml | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | Mittelwert | 7,000 | 9,500 | 61,650 | 16,150 | 2,300 | 2,850 | ,650 | ,000 | ,000 |
| | | Standardabweichung | 2,970 | ,849 | 7,283 | 11,667 | ,424 | ,919 | ,919 | ,000 | ,000 |
| | 100 ng/ml | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | Mittelwert | 7,950 | 10,050 | 69,900 | 5,450 | 2,950 | 3,550 | ,250 | ,000 | ,000 |
| | | Standardabweichung | ,354 | 4,313 | 8,344 | 5,303 | 3,606 | 5,020 | ,354 | ,000 | ,000 |
| Gruppe 8 / FaH Fibro | 0 MMC | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 17,000 | 2,133 | 12,700 | 52,400 | ,633 | 2,833 | 10,667 | ,267 | ,500 |
| | | Standardabweichung | 7,015 | 2,380 | 1,852 | 4,949 | ,379 | 1,305 | 1,305 | ,306 | ,700 |
| | 5 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 17,267 | 4,567 | 22,733 | 45,867 | ,800 | 2,767 | 5,100 | ,167 | ,233 |
| | | Standardabweichung | 4,041 | 7,144 | 6,740 | 9,411 | ,300 | ,208 | 1,114 | ,115 | ,208 |
| | 10 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 21,700 | 3,433 | 36,967 | 32,233 | ,733 | 2,000 | 2,467 | 6,67E-02 | ,100 |
| | | Standardabweichung | 3,045 | 3,225 | 14,022 | 11,940 | ,252 | 1,375 | 1,986 | ,115 | ,173 |
| | 50 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 22,833 | 7,900 | 60,233 | 7,433 | ,533 | ,700 | ,400 | ,000 | ,000 |
| | | Standardabweichung | 8,277 | 12,075 | 8,363 | 6,996 | ,493 | ,458 | ,608 | ,000 | ,000 |
| | 100 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 18,800 | 18,300 | 60,067 | 2,067 | ,133 | ,533 | ,167 | ,000 | ,000 |
| | | Standardabweichung | 7,990 | 16,338 | 7,129 | 2,108 | ,231 | ,503 | ,208 | ,000 | ,000 |
| Gruppe 9 / Fa Fibro | 0 MMC | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 20,500 | 2,100 | 19,200 | 44,733 | 2,000 | 2,700 | 7,900 | ,433 | ,233 |
| | | Standardabweichung | 10,136 | 3,132 | 2,946 | 6,983 | 1,908 | 1,000 | 4,854 | ,321 | ,321 |
| | 5 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 29,667 | 1,700 | 29,833 | 28,733 | 2,133 | 2,400 | 5,133 | ,133 | ,100 |
| | | Standardabweichung | 19,515 | 2,272 | 13,232 | 20,608 | 2,765 | 2,326 | 6,676 | ,231 | ,173 |
| | 10 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 27,100 | 4,500 | 56,533 | 8,467 | ,733 | 2,100 | ,600 | ,000 | ,000 |
| | | Standardabweichung | 6,465 | 2,458 | 11,712 | 7,128 | ,569 | 1,670 | ,721 | ,000 | ,000 |
| | 50 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 23,933 | 11,000 | 63,333 | 1,033 | 6,67E-02 | ,600 | 3,33E-02 | ,000 | ,000 |
| | | Standardabweichung | 12,760 | 8,088 | 5,894 | 1,620 | ,115 | ,520 | 5,77E-02 | ,000 | ,000 |
| | 100 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | Mittelwert | 25,333 | 14,933 | 59,200 | ,367 | ,133 | 3,33E-02 | ,000 | ,000 | ,000 |
| | | Standardabweichung | 7,862 | 5,713 | 4,716 | ,351 | ,231 | 5,77E-02 | ,000 | ,000 | ,000 |

Tabelle 24: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter des ersten, zweiten und dritten Zellzyklus von Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten.

| Gruppe | Konzentration MMC in ng/ml | | G1 ^{***} | S ^{***} | G2 ^{***} | ICELLS | GFRACT | Sum of G2 | Sum of G2/GF | |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|---------|---------|-----------|-----------------|-----------|
| Gruppe 7 / Kontrolle Fibro | 0 MMC | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 195,450 | 94,300 | 17,050 | ,181 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | 5,020 | ,141 | 2,051 | 2,121E-02 | |
| | 5 ng/ml | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 184,950 | 93,300 | 27,500 | ,295 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | 5,445 | 2,546 | ,990 | 2,121E-03 | |
| | 10 ng/ml | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 171,800 | 92,750 | 36,100 | ,389 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | 8,768 | 3,182 | 2,121 | 3,606E-02 | |
| | 50 ng/ml | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 124,550 | 93,000 | 64,450 | ,694 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | 9,263 | 2,970 | 8,132 | ,110 | |
| | 100 ng/ml | N | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 112,600 | 92,050 | 73,400 | ,798 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | 4,243 | ,354 | 3,394 | 3,323E-02 | |
| | Gruppe 8 / FaH Fibro | 0 MMC | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | | Mittelwert | ,833 | ,000 | ,000 | 196,167 | 83,000 | 16,033 | ,193 |
| | | | Standardabweichung | 1,274 | ,000 | ,000 | 3,754 | 7,015 | 1,767 | 5,570E-03 |
| 5 ng/ml | | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | Mittelwert | ,567 | ,000 | ,000 | 169,733 | 82,733 | 25,700 | ,309 | |
| | | Standardabweichung | ,814 | ,000 | ,000 | 15,186 | 4,041 | 6,773 | 6,561E-02 | |
| 10 ng/ml | | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | Mittelwert | ,300 | ,000 | ,000 | 144,967 | 78,300 | 39,067 | ,497 | |
| | | Standardabweichung | ,520 | ,000 | ,000 | 21,812 | 3,045 | 12,496 | ,150 | |
| 50 ng/ml | | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 110,200 | 77,167 | 60,900 | ,790 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | 9,558 | 8,277 | 8,119 | 8,821E-02 | |
| 100 ng/ml | | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 103,200 | 81,200 | 60,600 | ,756 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | 2,944 | 7,990 | 6,843 | ,155 | |
| Gruppe 9 / Fa Fibro | | 0 MMC | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | | Mittelwert | ,133 | ,000 | ,000 | 176,333 | 79,500 | 19,300 | ,231 |
| | | | Standardabweichung | ,115 | ,000 | ,000 | 25,881 | 10,136 | 2,506 | 3,344E-02 |
| | 5 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | Mittelwert | ,133 | ,000 | ,000 | 150,267 | 70,333 | 32,333 | ,513 | |
| | | Standardabweichung | ,231 | ,000 | ,000 | 46,003 | 19,515 | 11,159 | ,316 | |
| | 10 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 113,000 | 72,900 | 58,633 | ,804 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | 8,937 | 6,465 | 11,763 | ,141 | |
| | 50 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 101,800 | 76,067 | 63,967 | ,847 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | 1,908 | 12,760 | 6,263 | 6,482E-02 | |
| | 100 ng/ml | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | Mittelwert | ,000 | ,000 | ,000 | 100,567 | 74,667 | 59,233 | ,796 | |
| | | Standardabweichung | ,000 | ,000 | ,000 | ,666 | 7,862 | 4,661 | 5,151E-02 | |

Tabelle 25: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzyklusparameter des vierten Zellzyklus, Proliferationskapazität, Wachstumsfraktion, Σ G2-Phasen und Σ G2/GF von Zellkulturen mit subkutanen humanen Fibroblasten.

Normalverteilungstests der Variable Σ G2/GF

In den Tabellen 26 bis 30 sind die Normalitätsprüfungen der zufälligen Variable Σ G2/GF unter Berücksichtigung der Diagnosegruppen und der untersuchten Zellarten dargestellt. Im Falle der hellgrau unterlegten Felder in den Tabellen konnte aufgrund der geringen Stichprobenanzahl ($n < 5$) mit keinem der Testverfahren eine Prüfung auf Normalverteilung vorgenommen werden. Unter Berücksichtigung der annähernd gleichen Varianzen, welche im Rahmen der Mittelwertvergleiche mit dem Levene-Test überprüft wurde, konnten die ermittelten Werte der Σ G2/GF dennoch mit den anderen Gruppen verglichen werden.

Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei Standardzellkulturen:

| S G2/GF | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|----|--------------|--------------|----|--------------|
| | r-Faktor | N | Testschranke | r-Faktor | N | Testschranke |
| Gruppe 1 | ,097 | 86 | ,043 | | | |
| Gruppe 2 | ,309 | 3 | | | | |
| Gruppe 3 | ,090 | 36 | ,200* | ,952 | 36 | ,219 |
| Gruppe 4 | ,222 | 14 | ,059 | ,899 | 14 | ,129 |
| Gruppe 5 | ,167 | 10 | ,200* | ,935 | 10 | ,485 |
| Gruppe 6 | ,214 | 5 | ,200* | ,879 | 5 | ,341 |
| Gruppe 7 | ,260 | 2 | | | | |
| Gruppe 8 | ,239 | 3 | | | | |
| Gruppe 9 | ,274 | 3 | | | | |

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 26 Normalitätsverteilungen der Variable Σ G2/GF bei Standardzellkulturen. Die Testgröße r (Shapiro-Francia-Testgröße) wurde durch SPSS berechnet und mit der Testschranke $r_{\alpha}(n)$ verglichen.

Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei Zellkulturen mit 5 ng/ml Mitomycin C:

| S G2/GF | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|----|-------------|--------------|----|-------------|
| | Statistik | N | Signifikanz | Statistik | N | Signifikanz |
| Gruppe 1 | ,072 | 71 | ,200* | | | |
| Gruppe 2 | ,260 | 2 | | | | |
| Gruppe 3 | ,136 | 27 | ,200* | ,876 | 27 | ,010** |
| Gruppe 4 | ,111 | 14 | ,200* | ,966 | 14 | ,765 |
| Gruppe 5 | ,162 | 10 | ,200* | ,937 | 10 | ,492 |
| Gruppe 6 | ,318 | 5 | ,110 | ,747 | 5 | ,041 |
| Gruppe 7 | ,260 | 2 | | | | |
| Gruppe 8 | ,267 | 3 | | | | |
| Gruppe 9 | ,321 | 3 | | | | |

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

**.. Dies ist eine obere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 27: Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei 5 ng/ml Mitomycin C.

Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei Zellkulturen mit 10 ng/ml Mitomycin C:

| S G2/GF | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|----|-------------|--------------|----|-------------|
| | Statistik | N | Signifikanz | Statistik | N | Signifikanz |
| Gruppe 1 | ,070 | 77 | ,200* | | | |
| Gruppe 2 | ,303 | 3 | | | | |
| Gruppe 3 | ,098 | 32 | ,200* | ,941 | 32 | ,104 |
| Gruppe 4 | ,190 | 14 | ,185 | ,956 | 14 | ,635 |
| Gruppe 5 | ,155 | 10 | ,200* | ,970 | 10 | ,882 |
| Gruppe 6 | ,322 | 5 | ,099 | ,735 | 5 | ,033 |
| Gruppe 7 | ,260 | 2 | | | | |
| Gruppe 8 | ,176 | 3 | | | | |
| Gruppe 9 | ,296 | 3 | | | | |

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 28: Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei 10 ng/ml Mitomycin C.

Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei Zellkulturen mit 50 ng/ml Mitomycin C:

| S G2/GF | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|----|-------------|--------------|----|-------------|
| | Statistik | N | Signifikanz | Statistik | N | Signifikanz |
| Gruppe 1 | ,102 | 69 | ,074 | | | |
| Gruppe 2 | ,357 | 3 | | | | |
| Gruppe 3 | ,144 | 30 | ,115 | ,931 | 30 | ,067 |
| Gruppe 4 | ,128 | 14 | ,200* | ,971 | 14 | ,841 |
| Gruppe 5 | ,223 | 10 | ,171 | ,891 | 10 | ,225 |
| Gruppe 6 | ,153 | 5 | ,200* | ,972 | 5 | ,849 |
| Gruppe 7 | ,260 | 2 | | | | |
| Gruppe 8 | ,335 | 3 | | | | |
| Gruppe 9 | ,202 | 3 | | | | |

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 29: Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei 50 ng/ml Mitomycin C.

Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei Zellkulturen mit 100 ng/ml Mitomycin C:

| S G2/GF | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|----|-------------|--------------|----|-------------|
| | Statistik | N | Signifikanz | Statistik | N | Signifikanz |
| Gruppe 4 | ,139 | 14 | ,200* | ,976 | 14 | ,906 |
| Gruppe 5 | ,210 | 10 | ,200* | ,931 | 10 | ,457 |
| Gruppe 6 | ,200 | 5 | ,200* | ,958 | 5 | ,739 |
| Gruppe 7 | ,260 | 2 | | | | |
| Gruppe 8 | ,267 | 3 | | | | |
| Gruppe 9 | ,321 | 3 | | | | |

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 30: Normalverteilungstest der Variable Σ G2/GF bei 100 ng/ml Mitomycin C.

Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable $\Sigma G2+G2'/GF$ (Zunahme G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus) sind in den Tabellen 31 bis 34 dargestellt. Im Falle der hellgrau unterlegten Felder in den Tabellen konnte aufgrund der geringen Stichprobenanzahl ($n < 5$) mit keinem der Testverfahren eine Prüfung auf Normalverteilung vorgenommen werden. Unter Berücksichtigung der annähernd gleichen Varianzen, welche im Rahmen der Mittelwertvergleiche mit dem Levene-Test überprüft wurde, konnten die ermittelten Werte der $\Sigma G2/GF$ dennoch mit den anderen Gruppen verglichen werden.

Increased G2 1 + 2 Cycle (5 ng/ml MMC)

| Gruppe | N | Mittelwert | Varianz | Standardabweichung | Spannweite | Median |
|-----------|-----|------------|----------|--------------------|------------|------------|
| Gruppe 1 | 71 | 6,27E-02 | 1,31E-03 | 3,6208E-02 | ,180 | 5,7827E-02 |
| Gruppe 2 | 2 | 5,32E-02 | 3,99E-03 | 6,3190E-02 | ,089 | 5,3195E-02 |
| Gruppe 3 | 27 | ,16438 | 3,71E-03 | 6,0897E-02 | ,253 | ,16730 |
| Gruppe 4 | 14 | 4,74E-02 | 1,18E-03 | 3,4293E-02 | ,113 | 4,7519E-02 |
| Gruppe 5 | 10 | 2,33E-02 | 1,64E-04 | 1,2810E-02 | ,032 | 2,3611E-02 |
| Gruppe 6 | 5 | 8,86E-02 | 7,17E-03 | 8,4698E-02 | ,215 | 7,0179E-02 |
| Gruppe 7 | 2 | ,11340 | 3,86E-04 | 1,9649E-02 | ,028 | ,11340 |
| Gruppe 8 | 3 | ,11922 | 4,78E-03 | 6,9159E-02 | ,132 | 9,4587E-02 |
| Gruppe 9 | 3 | ,23280 | ,109 | ,33025 | ,572 | 4,2175E-02 |
| Insgesamt | 137 | 8,48E-02 | 5,90E-03 | 7,6781E-02 | ,629 | 6,8614E-02 |

Tabelle 31: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus bei Zugabe von 5 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro-Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder).

Increased G2 1 + 2 Cycle (10 ng/ml MMC)

| Gruppe | N | Mittelwert | Varianz | Standardabweichung | Spannweite | Median |
|-----------|-----|------------|----------|--------------------|------------|----------|
| Gruppe 1 | 77 | ,10795 | 2,20E-03 | 4,6851E-02 | ,214 | ,10018 |
| Gruppe 2 | 3 | ,13371 | 4,53E-03 | 6,7298E-02 | ,132 | ,11951 |
| Gruppe 3 | 32 | ,18321 | 5,53E-03 | 7,4360E-02 | ,315 | ,18014 |
| Gruppe 4 | 14 | ,10325 | 2,75E-03 | 5,2443E-02 | ,158 | 8,00E-02 |
| Gruppe 5 | 10 | 6,48E-02 | 6,86E-04 | 2,6197E-02 | ,081 | 5,99E-02 |
| Gruppe 6 | 5 | ,16188 | 1,29E-02 | ,11344 | ,273 | ,10670 |
| Gruppe 7 | 2 | ,20850 | 3,24E-03 | 5,6939E-02 | ,081 | ,20850 |
| Gruppe 8 | 3 | ,30809 | 2,37E-02 | ,15396 | ,308 | ,29983 |
| Gruppe 9 | 3 | ,52474 | 3,84E-02 | ,19587 | ,358 | ,61682 |
| Insgesamt | 149 | ,13688 | 8,93E-03 | 9,4497E-02 | ,634 | ,11343 |

Tabelle 32: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus bei Zugabe von 10 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro-Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder). Mit dem Shapiro-Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder).

Increased G2 1 + 2 Cycle (50 ng/ml MMC)

| Gruppe | N | Mittelwert | Varianz | Standardabweichung | Spannweite | Median |
|-----------|-----|------------|----------|--------------------|------------|--------|
| Gruppe 1 | 69 | ,24340 | 7,18E-03 | 8,4722E-02 | ,525 | ,24215 |
| Gruppe 2 | 3 | ,29147 | 7,29E-03 | 8,5353E-02 | ,162 | ,32229 |
| Gruppe 3 | 30 | ,16524 | 1,34E-02 | ,11570 | ,545 | ,15859 |
| Gruppe 4 | 14 | ,22099 | 8,42E-03 | 9,1736E-02 | ,286 | ,20065 |
| Gruppe 5 | 10 | ,18200 | 1,80E-03 | 4,2394E-02 | ,132 | ,17671 |
| Gruppe 6 | 5 | ,27245 | 1,18E-02 | ,10864 | ,249 | ,25501 |
| Gruppe 7 | 2 | ,51452 | 1,74E-02 | ,13188 | ,187 | ,51452 |
| Gruppe 8 | 3 | ,60391 | 6,11E-03 | 7,8196E-02 | ,143 | ,56756 |
| Gruppe 9 | 3 | ,56808 | 5,93E-04 | 2,4356E-02 | ,048 | ,56374 |
| Insgesamt | 139 | ,24063 | 1,58E-02 | ,12585 | ,806 | ,22831 |

Tabelle 33: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus bei Zugabe von 50 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder).

Increased G2 1 + 2 Cycle (100 ng/ml MMC)

| Gruppe | N | Mittelwert | Varianz | Standardabweichung | Spannweite | Median |
|-----------|----|------------|----------|--------------------|------------|--------|
| Gruppe 4 | 14 | ,33535 | 1,13E-02 | ,10620 | ,347 | ,37315 |
| Gruppe 5 | 10 | ,31117 | 4,61E-03 | 6,7901E-02 | ,215 | ,30245 |
| Gruppe 6 | 5 | ,40730 | 1,66E-02 | ,12877 | ,341 | ,44500 |
| Gruppe 7 | 2 | ,61708 | 1,34E-04 | 1,1565E-02 | ,016 | ,61708 |
| Gruppe 8 | 3 | ,56873 | 2,39E-02 | ,15460 | ,297 | ,51873 |
| Gruppe 9 | 3 | ,51685 | 5,23E-03 | 7,2304E-02 | ,129 | ,47903 |
| Insgesamt | 37 | ,38740 | 1,85E-02 | ,13594 | ,575 | ,38934 |

Tabelle 34: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen des ersten und zweiten Zellzyklus bei Zugabe von 100 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro–Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder).

Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Increased Σ G2/GF (Zunahme G2-Phasen/Wachstumsfraktion in allen Zellzyklen) sind in den Tabellen 35 bis 38 dargestellt.

Increased G2/GF (5 ng/ml MMC)

| Gruppe | N | Mittelwert | Varianz | Standardabweichung | Spannweite | Median |
|-----------|-----|------------|----------|--------------------|------------|----------|
| Gruppe 1 | 71 | 5,27E-02 | 1,22E-03 | 3,4973E-02 | ,209 | 5,42E-02 |
| Gruppe 2 | 2 | 4,16E-02 | 2,99E-03 | 5,4648E-02 | ,077 | 4,16E-02 |
| Gruppe 3 | 27 | ,14903 | 3,26E-03 | 5,7134E-02 | ,238 | ,14767 |
| Gruppe 4 | 14 | 4,92E-02 | 1,12E-03 | 3,3526E-02 | ,101 | 4,80E-02 |
| Gruppe 5 | 10 | 2,32E-02 | 1,67E-04 | 1,2917E-02 | ,032 | 2,36E-02 |
| Gruppe 6 | 5 | 8,86E-02 | 7,17E-03 | 8,4698E-02 | ,215 | 7,02E-02 |
| Gruppe 7 | 2 | ,11350 | 3,64E-04 | 1,9092E-02 | ,027 | ,11350 |
| Gruppe 8 | 3 | ,11566 | 4,01E-03 | 6,3330E-02 | ,121 | 9,40E-02 |
| Gruppe 9 | 3 | ,28194 | 8,86E-02 | ,29773 | ,575 | ,19300 |
| Insgesamt | 137 | 7,76E-02 | 5,60E-03 | 7,4863E-02 | ,650 | 6,47E-02 |

Tabelle 35: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen in allen Zellzyklen/Wachstumsfraktion bei Zugabe von 5 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro-Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder).

Increased G2/GF (10 ng/ml MMC)

| Gruppe | N | Mittelwert | Varianz | Standardabweichung | Spannweite | Median |
|-----------|-----|------------|----------|--------------------|------------|----------|
| Gruppe 1 | 77 | 9,05E-02 | 1,88E-03 | 4,3350E-02 | ,263 | 8,90E-02 |
| Gruppe 2 | 3 | ,11727 | 4,12E-03 | 6,4223E-02 | ,128 | ,11873 |
| Gruppe 3 | 32 | ,16732 | 5,03E-03 | 7,0931E-02 | ,302 | ,15361 |
| Gruppe 4 | 14 | ,10393 | 2,80E-03 | 5,2898E-02 | ,166 | 8,00E-02 |
| Gruppe 5 | 10 | 6,47E-02 | 6,90E-04 | 2,6268E-02 | ,081 | 5,99E-02 |
| Gruppe 6 | 5 | ,16188 | 1,29E-02 | ,11344 | ,273 | ,10670 |
| Gruppe 7 | 2 | ,20850 | 3,28E-03 | 5,7276E-02 | ,081 | ,20850 |
| Gruppe 8 | 3 | ,30366 | 2,15E-02 | ,14652 | ,293 | ,30000 |
| Gruppe 9 | 3 | ,57275 | 1,17E-02 | ,10800 | ,206 | ,61024 |
| Insgesamt | 149 | ,12504 | 9,33E-03 | 9,6576E-02 | ,682 | 9,96E-02 |

Tabelle 36: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen in allen Zellzyklen/Wachstumsfraktion bei Zugabe von 10 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro-Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder).

Increased G2/GF (50 ng/ml MMC)

| Gruppe | N | Mittelwert | Varianz | Standardabweichung | Spannweite | Median |
|-----------|-----|------------|----------|--------------------|------------|--------|
| Gruppe 1 | 69 | ,20539 | 6,87E-03 | 8,2893E-02 | ,605 | ,20841 |
| Gruppe 2 | 3 | ,25704 | 6,52E-03 | 8,0755E-02 | ,149 | ,29296 |
| Gruppe 3 | 30 | ,14987 | 1,18E-02 | ,10844 | ,522 | ,14949 |
| Gruppe 4 | 14 | ,21982 | 8,51E-03 | 9,2224E-02 | ,287 | ,20065 |
| Gruppe 5 | 10 | ,18187 | 1,79E-03 | 4,2366E-02 | ,132 | ,17671 |
| Gruppe 6 | 5 | ,27245 | 1,18E-02 | ,10864 | ,249 | ,25501 |
| Gruppe 7 | 2 | ,51300 | 1,73E-02 | ,13152 | ,186 | ,51300 |
| Gruppe 8 | 3 | ,59744 | 7,14E-03 | 8,4503E-02 | ,159 | ,56500 |
| Gruppe 9 | 3 | ,61620 | 8,06E-03 | 8,9781E-02 | ,175 | ,59400 |
| Insgesamt | 139 | ,21845 | 1,67E-02 | ,12931 | ,827 | ,20313 |

Tabelle 37: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen in allen Zellzyklen/Wachstumsfraktion bei Zugabe von 50 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro-Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder).

Increased G2/GF (100 ng/ml MMC)

| Gruppe | N | Mittelwert | Varianz | Standardabweichung | Spannweite | Median |
|-----------|----|------------|----------|--------------------|------------|--------|
| Gruppe 4 | 14 | ,33377 | 1,12E-02 | ,10578 | ,343 | ,37245 |
| Gruppe 5 | 10 | ,31104 | 4,61E-03 | 6,7903E-02 | ,215 | ,30181 |
| Gruppe 6 | 5 | ,40730 | 1,66E-02 | ,12877 | ,341 | ,44500 |
| Gruppe 7 | 2 | ,61650 | 1,45E-04 | 1,2021E-02 | ,017 | ,61650 |
| Gruppe 8 | 3 | ,56261 | 2,53E-02 | ,15898 | ,309 | ,51844 |
| Gruppe 9 | 3 | ,56455 | 5,82E-03 | 7,6281E-02 | ,144 | ,59364 |
| Insgesamt | 37 | ,39011 | 1,96E-02 | ,14015 | ,572 | ,38934 |

Tabelle 38: Mittelwerte, Varianzen, Standardabweichungen, Spannweiten und Mediane der Variable Zunahme G2-Phasen in allen Zellzyklen/Wachstumsfraktion bei Zugabe von 100 ng/ml MMC. Mit dem Shapiro-Francia-Test wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft (hellgraue Felder).

Ergebnisse der Σ G2/GF der Zellkultur peripherer Blutlymphozyten mit Zugabe von 20 ng/ml MMC bei einem Probanden der Kontrollgruppe:

Der Messpunkt bei Zugabe von 20 ng/ml Mitomycin C ist mit [★] in Abbildung 26 gekennzeichnet.

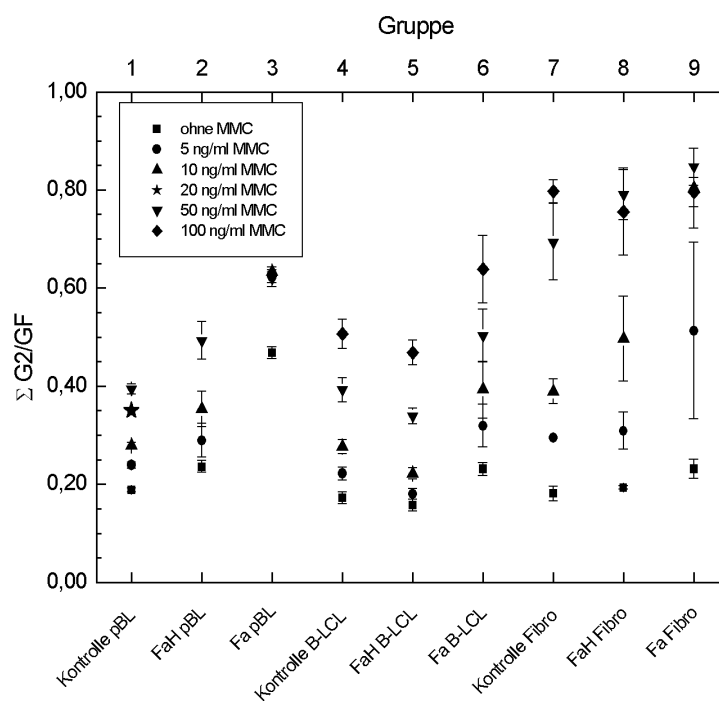


Abbildung 26: Mittelwerte der Σ G2/GF aller Diagnosegruppen. Aufgetragen in Abhängigkeit der Mitomycin C Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Bei den durchgeführten Standardzellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten wurde bei 62 der Probanden der Kontrollgruppe (Gruppe 1) und 34 Fanconi Anämie Patienten (Gruppe 3) eine zusätzliche Zellkultur mit Serum FCS A angesetzt. Die Messergebnisse mit Mittelwerten, Standardabweichungen, Varianzen, Spannweiten und Medianen sind in den Tabellen 39 und 40 dargestellt.

GROUPA: Kontrolle pBL

| | N | Mittelwert | Standardabweichung | Varianz | Spannweite | Median |
|---------------------|----|------------|--------------------|----------|------------|----------|
| G0/G1 | 62 | 28,7129 | 10,7558 | 115,687 | 76,70 | 28,0500 |
| S | 62 | 7,6468 | 2,5241 | 6,371 | 13,10 | 7,6500 |
| G2 | 62 | 3,9774 | 1,7221 | 2,966 | 8,70 | 3,8500 |
| G1 ¹ | 62 | 12,2887 | 6,0982 | 37,189 | 43,00 | 10,7500 |
| S ¹ | 62 | 10,5661 | 3,3677 | 11,342 | 15,00 | 10,4000 |
| G2 ¹ | 62 | 6,2581 | 1,9880 | 3,952 | 9,40 | 6,1000 |
| G1 ² | 62 | 12,0806 | 3,8571 | 14,877 | 23,80 | 11,7500 |
| S ² | 62 | 11,3371 | 5,1000 | 26,010 | 23,70 | 12,0000 |
| G2 ² | 62 | 3,2855 | 2,1371 | 4,567 | 8,40 | 3,1000 |
| G1 ³ | 62 | 3,1290 | 2,9677 | 8,807 | 17,30 | 2,7000 |
| S ³ | 62 | ,6210 | ,8505 | ,723 | 4,40 | ,2000 |
| G2 ³ | 62 | 7,74E-02 | ,3256 | ,106 | 2,50 | ,0000 |
| Increased Cells (%) | 62 | 236,0613 | 47,6749 | 2272,897 | 307,50 | 230,7500 |
| Growth-Fraction (%) | 62 | 71,2871 | 10,7558 | 115,687 | 76,70 | 71,9500 |
| Sum of G2 (%) | 62 | 13,5984 | 3,5723 | 12,761 | 20,80 | 13,3500 |
| Sum of G2/GF | 62 | ,19006 | 4,0156E-02 | 1,61E-03 | ,198 | ,19060 |

Tabelle 39: Zellzyklusparameter der Kontrollgruppe von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten mit Serum FCS A bei Nullkonzentrationen für Mitomycin C.

GROUPA: Fa pBL

| | N | Mittelwert | Standardabweichung | Varianz | Spannweite | Median |
|---------------------|----|------------|--------------------|----------|------------|----------|
| G0/G1 | 34 | 37,4529 | 15,6586 | 245,192 | 67,50 | 38,7500 |
| S | 34 | 9,1235 | 2,8688 | 8,230 | 12,10 | 9,0000 |
| G2 | 34 | 19,3912 | 5,8123 | 33,783 | 20,40 | 19,4000 |
| G1 ¹ | 34 | 6,9206 | 2,6257 | 6,894 | 11,60 | 6,8500 |
| S ¹ | 34 | 9,0647 | 4,0586 | 16,472 | 20,10 | 8,3000 |
| G2 ¹ | 34 | 9,0706 | 4,4986 | 20,237 | 17,00 | 9,0000 |
| G1 ² | 34 | 4,6941 | 2,9899 | 8,939 | 11,40 | 4,2500 |
| S ² | 34 | 3,0294 | 2,4556 | 6,030 | 8,40 | 2,5500 |
| G2 ² | 34 | 1,0647 | 1,4516 | 2,107 | 6,80 | ,6000 |
| G1 ³ | 34 | ,1882 | ,3991 | ,159 | 2,00 | ,0000 |
| S ³ | 34 | 5,88E-03 | 2,388E-02 | 5,70E-04 | ,10 | ,0000 |
| G2 ³ | 34 | ,0000 | ,0000 | ,000 | ,00 | ,0000 |
| Increased Cells (%) | 34 | 152,7353 | 26,8452 | 720,665 | 101,80 | 155,0000 |
| Growth-Fraction (%) | 34 | 62,5471 | 15,6586 | 245,192 | 67,50 | 61,2500 |
| Sum of G2 (%) | 34 | 29,5265 | 8,5549 | 73,186 | 34,10 | 29,7000 |
| Sum of G2/GF | 34 | ,47274 | 6,3609E-02 | 4,05E-03 | ,279 | ,48004 |

Tabelle 40: Zellzyklusparameter der Probanden mit Fanconi Anämie (Gruppe 3) von Zellkulturen mit peripheren Blutlymphozyten mit Serum FCS A bei Nullkonzentrationen für Mitomycin C.

Reagenzien, Medien und Lösungen:

Ampuwa, Fresenius AG

HBSS, Gibco, 041-04020

Ficoll-Paque, Pharmacia, 17-0840-03

RPMI 1640, Gibco, 041-01870

L-Glutamin, Gibco, 043-05030

Essigsäure, Merck, 56

Trypanblau, Gibco, 043-05250

FCS (fetal calf serum), Gibco, 011-06290

BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin), Sigma, B 5002

DC (2'-Deoxycytidin), Sigma, D 3897

α -TG (α -Thioglycerol), Sigma, M 1753

PHA (Phytohämagglutinin), Wellcome Diagnostics, HA 16

DMSO (Dimethylsulfoxid), Merck, 802912

PBS, Gibco, 041-04190

MEM, Gibco, 041-01090

Trypsin, Gibco, 043-05090

MMC (Mitomycin C), Sigma, M 0503

Reagenzien für die Durchflusszytometrie:

EB (Ethidiumbromid), Serva, 21238

DAPI, Serva, 18860

HCL, Merck, 314

Hoechst 33258, Sigma, B 2883

MgCl₂, Merck, 5833

Na-Acid, Merck, 6688

NaCl, Merck, 6404

NP40 (Nonidet P-40), Sigma, N 6507

CaCl₂, Sigma, C 3881

BSA (Albumine, Bovine), Sigma, A 4503

Trisma Base, Sigma, T 1503

DANKSAGUNGEN/WIDMUNGEN

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr.med. D.Schindler für die Überlassung des Themas und sein großes Vertrauen welches er in mich gesetzt hat. Seine aufmunternden Worte haben letztendlich zum Abschluss dieser Arbeit geführt.

Des Weiteren möchte ich mich recht herzlich beim Institutsleiter Herrn Professor Dr.med. H.Höhn bedanken, nicht zuletzt für die Übernahme des Koreferates für diese Arbeit.

Dank auch meiner Frau und meiner Tochter Sofie, die mich mit Ihren tollen Buntstiften bei der Farbauswahl der angefertigten Grafiken inspiriert hat.

Einen lieben Gruß und vielen Dank schulde ich auch an Herrn Prof. Dr.med Kenzo Takeshita der Tottori Universität in Yonago, Japan, der sich immer wieder nach dem Fortgang dieser Arbeit erkundigt hat und mich zu konsequentem Arbeiten angehalten hat.

Meinen Eltern die sich ebenfalls für das Gelingen verdient gemacht haben.

Bei den Mitarbeitern des Instituts habe ich mich sehr wohl gefühlt und ich bedanke mich vor allem bei Frau G.Emmert in die Einführung der Grundlagen in die Zellkulturen. Für die technische Unterstützung bei allen messtechnischen Problemen sei Herrn R.Friedl gedankt. Ebenso sei den zahlreichen freiwilligen Blutspendern gedankt.

Dozo yuoroshukai onegai shimasu!

(Japanisch für: „besonders großen Dank“, wörtlich, „Ich bitte Sie um Ihr Wohlwollen“)

LEBENS LAUF

Karlheinz Endres

Persönliche Informationen

- Familienstand: verheiratet, eine Tochter
- Geburtsdatum: 18.11.1966
- Geburtsort: Berlin/Schmargendorf

Schulbildung

09/1973 bis 02/1984 Grundschule/Realschule/Fachoberschule in
Bad Neustadt/Saale

09/1991 bis 06/1995 Abendgymnasium des Mozartgymnasiums in
Würzburg, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

11/1995 bis 10/2001 Studium der Humanmedizin an der Universität
Würzburg

24.09.1997 Ärztliche Vorprüfung

27.08.1998 1.Staatsexamen

11.09.2000 2.Staatsexamen

23.10.2001 3.Staatsexamen

Doktorarbeit am Institut der Humangenetik der Universität Würzburg
bei Priv.-Doz. Dr.med. D.Schindler, Thema: Zellzykluseffekte von
Mitomycin C (Fanconi Anämie)

praktisches Jahr

10/2000 bis 02/2001 Chirurgische Universitätsklinik, Würzburg

02/2001 bis 06/2001 Juliusspital Würzburg, Innere Medizin

06/2001 bis 09/2001 Uniklinik Greifswald, Kinderheilkunde

Famulaturen

08 bis 10/1999 Universität Tottori in Yonago, Japan

02/2000 Gemeinschaftspraxis Drs. Geier, Würzburg

03/2000 Innere Abteilung, KKH Ochsenfurt

berufliche Tätigkeit

05/2002 bis 11/2002 Arzt im Praktikum, Innere Medizin,
Krankenhaus Rothenburg o.d.T.

seit 12/2002 Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik II, am Klinikum
Ansbach

Sonstiges

06 bis 08/1995 Besuch der Sommerschule an der Universität Oslo,
Norwegen
01/1986 bis 03/1987 Grundwehrdienst, Veitshöchheim

Berufsausbildung

09/1984 bis 09/1985 private Berufsfachschule für med.-kfm.-
Assistenten, Stuttgart
04/1988 bis 03/1991 Staatl. Berufsfachschule für Krankenpflege, Bad
Neustadt/Saale, Abschluss: Krankenpflegeexamen

berufliche Qualifikation als Krankenpfleger

04 bis 10/1991 Intensivstation am KKH Bad Neustadt/Saale
11/1991 bis 04/1994 Neurochirurgischer OP und Urologische
Frauenstation, Universitätskliniken Würzburg
05/1994 bis 07/1997 Unfallchirurgische Station, Juliusspital Würzburg

Karinne Fuchs