

Fanconi Anämie

–

Entwicklung von hämatopoetischen Mosaiken

sowie

funktionelle Studien von FANCO (RAD51C)

und FANCN (PALB2)

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

DANIELA ENDT

geboren in Saalfeld/Saale

Würzburg 2015



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Detlev Schindler (Institut für Humangenetik)

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne (Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie)

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

gewidmet

MEINER FAMILIE

UND DENEN, DIE IMMER AN MICH GLAUBTEN

Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „*Fanconi Anämie - Entwicklung von hämatopoetischen Mosaiken sowie funktionelle Studien von FANCO (RAD51C) und FANCN (PALB2)*“ is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „*Fanconi Anämie - Entwicklung von hämatopoetischen Mosaiken sowie funktionelle Studien von FANCO (RAD51C) und FANCN (PALB2)*“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Lichtentanne, den _____

Unterschrift

Inhalt

Zusammenfassung.....	11
Summary	13
1 Einleitung.....	15
1.1 DNA Reparatur.....	15
1.1.1 DNA-Schäden.....	15
1.1.2 Zelluläre Schadensantwort: <i>DNA-Damage Response (DDR)</i>	15
1.1.3 DNA-Reparaturmechanismen	17
1.1.3.1 Exzisionsreparatur.....	17
1.1.3.1.1 Basenexzisionsreparatur (BER)	17
1.1.3.1.2 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)	18
1.1.3.1.3 Basenfehlpaarungsreparatur (Mismatchreparatur – MMR).....	18
1.1.3.2 Doppelstrangläsionsreparatur.....	18
1.1.3.2.1 Homologe Rekombination (HR).....	18
1.1.3.2.2 Non-Homologous End Joining (NHEJ).....	21
1.1.3.2.3 Transläsionssynthese (TLS).....	21
1.1.3.3 Interstrang-Crosslink-Reparatur (ICLR).....	21
1.1.3.3.1 Defekte in DNA-Reparaturwegen	21
1.2 Fanconi Anämie.....	22
1.2.1 Geschichte und Inzidenz	22
1.2.2 Der Phäno- und Genotyp.....	22
1.2.3 Die FA-Proteine in der ICL-Reparatur	25
1.2.4 Diagnostik.....	27
1.2.5 Mutationen, Reversionen und Mosaik in FA.....	27
1.2.6 Das Hämatopoetische System.....	28
1.2.7 Untersuchungsmethoden für somatische Mosaik.....	29
1.2.8 Behandlung hämatologischer Manifestationen	31
1.3 Die RAD51-Paraloge	32
1.3.1 Komplexbildung und Aufgaben	33
1.3.2 RAD51C (FANCO).....	33
1.3.3 Proteininteraktionsstudien mit RAD51C (FANCO)	34
1.4 Fragestellung.....	35
2 Materialien.....	36
2.1 Zellkultur.....	36
2.1.1 Chemo-kompetente Zellen.....	36
2.1.2 Human- / Insektenzelllinien	36
2.1.3 Zellkulturmedien und Kulturplatten	36
2.1.4 Antibiotika	37
2.2 Enzyme.....	37

2.2.1	Polymerasen	37
2.2.2	Restriktionsenzyme	37
2.2.3	weitere Enzyme	37
2.3	Nukleotide und Oligonukleotide.....	38
2.3.1	Oligonukleotidprimer für PCR, Sequenzierungen und Klonierungen:.....	38
2.3.2	Weitere Oligonukleotide	38
2.3.3	<i>E. coli</i> -Codon-optimierte Sequenz des humanen RAD51C in pMA-T	38
2.4	Expressionsvektoren.....	38
2.4.1	Mammalian Two-Three-Hybrid Assay	38
2.4.2	Mammalian Three-Hybrid Assay (<i>Konstrukte von Alexandra Sobeck</i>).....	38
2.4.3	Weitere Vektoren	39
2.5	Chemikalien und Reagenzien.....	39
2.6	Gele, Puffer.....	40
2.6.1	SDS-PAGE: Gele und Puffer (kommerziell)	40
2.6.2	SDS-PAGE: Gele und Puffer	40
2.6.3	Native Gele.....	40
2.6.4	Längenstandards	40
2.6.5	Gel-Ladepuffer	40
2.6.6	Sonstige Puffer und Lösungen.....	41
2.7	Pufferscreen: Thermal Shift Assay - alle Puffer [100 mM].....	42
2.8	Färbung.....	43
2.8.1	Farbstoffe	43
2.8.2	Lösungen für Färbungen.....	43
2.9	Antikörper.....	43
2.10	„Kits“ und Untersuchungssysteme.....	44
2.11	Sonstige Materialien.....	45
2.12	Geräte	46
2.13	Software, Datenbanken.....	48
3	Methoden.....	49
3.1	Nukleinsäure-basierende Methoden.....	49
3.1.1	Isolation von gDNA aus Vollblut	49
3.1.2	Isolation von gDNA aus Zellkulturen.....	49
3.1.3	Isolation von gDNA aus MACS-separierten Zelllinien.....	49
3.1.4	Isolation von RNA.....	49
3.1.5	Allelstabilisierung mit Cyclohexamid	50
3.1.6	cDNA-Synthese.....	50
3.1.7	Quantifizierung von DNA.....	50
3.1.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	50
3.2	Mutagenese	51
3.2.1	Einschritt-Mutagenese (QuickChange Site-Directed Mutagenese: QCM).....	51
3.2.2	Zweischritt-Mutagenese	51

3.2.3	Der DpnI-Verdau.....	52
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	52
3.2.5	ExoSAP-Verdau – enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte.....	52
3.2.6	Sequenzierung nach Sanger.....	52
3.2.7	Codon-Optimierung von RAD51C für die Expression in Bakterien.....	53
3.2.8	Hybridisierung von DNA-Strukturen.....	53
3.3	Zellkultur.....	54
3.3.1	Zellkultur-Eukaryonten.....	54
3.3.1.1	Kultur humaner Zellen.....	54
3.3.1.1.1	Verwendete Zelllinien.....	54
3.3.1.1.2	Auftauen der Zellen.....	54
3.3.1.1.3	Kultivierung und Ernte von Zellen.....	54
3.3.1.1.4	Einfrieren der Zellen.....	54
3.3.1.2	Kultur von Insektenzellen.....	55
3.3.1.2.1	Auftauen, Kultur und Ernte von Insektenzellen.....	55
3.3.1.2.2	Einfrieren von Insektenzellen.....	55
3.3.2	Gentransfer in Eukaryonten.....	55
3.3.2.1	Transfektion von humanen Zelllinien.....	55
3.3.2.2	Transfektion mit GeneJuice Transfection Reagent®.....	55
3.3.2.3	Virale Transfektion von Insektenzelllinien als Grundlage zur Herstellung von Proteinen für die DNA-Bindungsstudien.....	56
3.3.3	Zellkultur –Prokaryonten.....	57
3.3.3.1	Transformation, Bakterienkultur und Plasmidpräparation für Mutagenesen und für im Mammalian Two-/Three-Hybrid verwendete Plasmide.....	57
3.3.3.2	Transformation von <i>E. coli</i> zur Plasmid-DNA-Gewinnung.....	57
3.3.3.3	Transformation von <i>E. coli</i> zur Protein- und Bacmidgewinnung.....	57
3.3.3.4	Einsatz von Antibiotika zur Selektion.....	57
3.3.3.5	Analytische Plasmidisolation.....	58
3.3.3.6	Präparative Plasmidisolation.....	58
3.3.3.7	Bacmidpräparation.....	58
3.4	Klonierungen.....	59
3.4.1	Herkömmliche Klonierung für das <i>Mammalian Two-/Three-Hybrid</i> system (Klonierung über Restriktions-Schnittstellen).....	59
3.4.1.1	Restriktionsverdau.....	59
3.4.1.2	Ligation.....	60
3.4.2	In-Fusion-Klonierung (Klonierung über Homologe Rekombination).....	60
3.5	Proteinmethoden.....	61
3.5.1	Proteininteraktionen: Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....	61
3.5.2	Proteininteraktionen: Mammalian Two- und Three-Hybrid Analysen.....	61
3.5.2.1	Luciferase-Reporter-Analysen.....	62
3.5.2.2	Zellyse.....	63
3.5.2.3	Luciferase-Analyse.....	63

3.5.2.4	Auswertung der Mammalian Two- und Three-Hybrid Assays	63
3.5.3	Gewinnung und Aufreinigung von Proteinen	63
3.5.3.1	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)	64
3.5.3.2	Größenausschluss-Chromatographie	64
3.5.3.3	Isolation von Proteinen aus <i>E. coli</i> – Expressionsanalyse (kleine Mengen)	64
3.5.3.4	Isolation von Proteinen aus <i>E. coli</i> - Expressionsanalysen (2 l)	65
3.5.3.5	Isolation von Proteinen aus Insektenzellen - Initiale Expressionen	66
3.5.3.6	Isolation von Proteinen aus Insektenzellen- Expressionen in 10 ml	66
3.5.3.7	Isolation von Proteinen aus Insektenzellpellets der externen Expressionen (2 l)	66
3.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	66
3.5.5	Thermal Shift Assay	67
3.5.6	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	67
3.5.7	Nachweis von Proteinen	68
3.5.7.1	Denaturierende Gele - SDS Gele (SDS-PAGE)	68
3.5.7.2	Native Gele	68
3.5.7.3	Färbungen	68
3.5.8	Proteintransfer (Western-Blot)	68
3.5.8.1	Immunologische Detektion von Proteinen	68
3.6	Mosaikanalysen	69
3.6.1	Zweiparametrischen BrdU-Hoechst Zellzyklus-Analyse zur Bestimmung des G2-Phase-Arrests	69
3.6.2	Separation der Blutzellreihen CD3 ⁺ , CD14 ⁺ , CD15 ⁺ und CD19 ⁺ aus Vollblut (MACS)	70
3.6.3	Durchflusszytometrische Analysen zur Bestimmung von Zelltypen und Reinheitsgrad der MACS-Sortierungen	70
3.6.3.1	Zellstatus im Vollblut	70
3.6.3.2	Reinheitsbestimmung der separierten Zellreihen via Immuno-Phänotypisierung	71
3.6.4	Mosaikgradeinstufung heterozygoter Patienten via Sequenzanalyse	71
3.6.5	Chromosomenbruchanalysen aus Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierter Vollblutkultur	72
4	Ergebnisse	74
4.1	Studien zu Mosaiken bei FA-Patienten	74
4.1.1	Durchflusszytometrische Analysen	74
4.1.1.1	Blutmischungsreihen	75
4.1.2	MACS-Analysen	76
4.1.3	Reinheitsbestimmung via Durchflusszytometrie	76
4.1.3.1	Erzielte Reinheiten der Patientenzellsortierungen	77
4.1.4	DNA-sequenzbasierende Mosaikstatusbestimmung und Entwicklung von Mosaiken bei FA-Patienten	78
4.1.4.1	DNA-Mischungsreihe	78
4.1.5	Patient: 1 (FA-A)	81
4.1.5.1	Entwicklung der Blutwerte	81
4.1.5.2	Analysen zum G2-Phase-Arrest	82
4.1.5.3	Chromosomenbruchanalysen	82

4.1.5.4	DNA-Sequenz basierende Mosaikanalysen.....	83
4.1.6	Patient: 2 (FA-A).....	85
4.1.6.1	Entwicklung der Blutwerte.....	85
4.1.6.2	Analysen zum G2-Phase-Arrest.....	86
4.1.6.3	DNA-sequenzbasierende Mosaikanalysen.....	86
4.1.7	Patient: 3 (FA-A).....	89
4.1.7.1	Entwicklung der Blutwerte.....	89
4.1.7.2	Analysen zum G2-Phase-Arrest.....	90
4.1.7.3	Chromosomenbruchanalysen.....	90
4.1.7.4	DNA-sequenzbasierende Mosaikanalysen.....	91
4.1.8	Patient: 4 (FA-D2).....	93
4.1.8.1	Analysen zum G2-Phase-Arrest.....	93
4.1.8.2	Chromosomenbruchanalysen.....	94
4.1.8.3	DNA-sequenzbasierende Mosaikanalysen.....	94
4.1.9	Patient: 5 (FA-D2).....	96
4.1.9.1	Entwicklung der Blutwerte.....	96
4.1.9.2	Analysen zum G2-Phase-Arrest.....	97
4.1.9.3	Chromosomenbruchanalysen.....	97
4.1.9.4	DNA-sequenzbasierende Mosaikanalysen.....	98
4.1.10	Mutationen und Reversionen im Überblick.....	100
4.2	FANCO (RAD51C) Interaktionen mit den RAD51-Paralogen, RAD51 (FANCR) und FANCN: Wirkungen und Einflüsse der Mutation R285H und von MMC-Exposition der Zellen.....	103
4.2.1	Interaktionsanalysen via Mammalian Two- und Three-Hybrid System.....	103
4.2.1.1	Ausschluss von Selbstaktivierung und Homodimerbildung.....	104
4.2.1.2	Interaktion zwischen RAD51 und seinen Paralogen.....	104
4.2.1.3	Interaktion im CX3-Komplex.....	104
4.2.1.4	Interaktionen im BCDX2-Komplex.....	106
4.2.1.4.1	Die Subkomplexe BC und DX2.....	106
4.2.1.4.2	Interaktion zwischen den Subkomplexen.....	107
4.2.1.5	Einflüsse von Mitomycin C (MMC).....	109
4.2.1.5.1	MMC-Wirkung auf den CX3-Komplex.....	109
4.2.1.5.2	MMC-Wirkung auf den BCDX2-Komplex.....	109
4.2.1.6	Einflüsse der RAD51C-Mutante R258H auf die Paraloginteraktionen.....	111
4.2.1.7	RAD51C im FA/BRCA-Weg; Interaktion mit FANCN.....	111
4.2.2	Interaktionsanalysen via Western Blot.....	112
4.2.2.1	RAD51C-Co-IP: Interaktionen mit RAD51B und XRCC3.....	112
4.2.2.2	XRCC3-Co-IP: Interaktionen mit RAD51, RAD51B und RAD51C.....	113
4.2.2.3	Interaktionen von RAD51B und XRCC2.....	113
4.3	Expressions- und DNA-Interaktionsstudien mit RAD51C.....	115
4.3.1	Expression in <i>E. Coli</i>	115
4.3.1.1	Expression des RAD51C-Proteins.....	115

4.3.1.1.1	Expression von humanem RAD51C	115
4.3.1.1.2	Expression von humanem Codon-optimierten RAD51C	116
4.3.1.2	Co-Expression von Codon-optimierten RAD51C und XRCC3.....	118
4.3.2	Expression in Insektenzellen.....	119
4.3.2.1	Einzelexpression von RAD51C	119
4.3.2.2	Co-Expression von RAD51C und XRCC3	120
4.3.2.2.1	Puffertest: initiale Puffer	120
4.3.2.2.2	Puffertest: Phosphatpuffer	121
4.3.2.2.3	Puffertest: Variation nach Compton et al.	123
4.3.3	Proteinstabilität im Thermal Shift Assay	124
4.3.4	DNA-Interaktion via Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	125
5	Diskussion.....	128
5.1	Mosaik bei Fanconi Anämie.....	128
	Fibroblasten in der Diagnostik.....	129
	B-LCLs in der Diagnostik	129
	Beeinflussung der gDNA-Analysen durch falsch positive Selektion.....	130
	Mosaikstatusbestimmung in Zelllinien mittels DNA-Mischungskurve	131
	Reversionen im Patientenblut.....	132
	Welche Zellreihen revertierten?	135
	Welche Mutationen revertieren?	136
	Vergleich und Anwendbarkeit der einzelnen Methoden zur Abschätzung der Mosaikstatus im Patientenblut.....	138
5.2	FANCO (RAD51C): Mutationen, Interaktionen, Struktur	140
	Missense-Mutationen und DNA-Interaktion von RAD51C	142
	Qualitative und quantitative Untersuchung der FANCO (RAD51C)-Interaktionen innerhalb der RAD51-Paraloge, sowie mit RAD51 und FANCN- inklusive Beeinflussung durch MMC	144
	M2H-/M3H-Analysen in der Routinediagnostik.....	149
Anhang I	I
	Literaturverzeichnis.....	I
	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....	X
	Primersequenzen.....	XIII
	Codon-Optimierung.....	XVIII
	Vektorkarten.....	XIX
Anhang II	XXI
	Eigene Publikationen	XXI
	Auszeichnungen.....	XXII

Zusammenfassung

Zur Wahrung der Genomstabilität entwickelten sich verschiedene Reparaturmechanismen, deren Defekte zu diversen Erkrankungen führen. Der 1927 erstmals beschriebenen Fanconi Anämie (FA) (Fanconi 1927) liegt eine fehlerhafte Reparatur der DNA-Doppelstrang-Quervernetzung zugrunde. Als Ursache wurden Defekte innerhalb des FA/BRCA-Weges lokalisiert, welche zur Chromosomeninstabilität führen. Das Krankheitsbild der autosomal rezessiven oder X-chromosomalen Erkrankung wird meist von kongenitalen Fehlbildungen, progressivem Knochenmarkversagen sowie bereits im jugendlichen Alter erhöhten Tumorraten und Anämien geprägt. Bisher wurden Defekte in 19 verschiedenen Genen als ursächlich für diese Erkrankung diskutiert. Anhand des betroffenen Gens können nur begrenzt Rückschlüsse auf die Ausprägung des Phänotyps geschlossen werden, vielmehr scheinen die Art der Mutation und deren Position im Gen mit der Schwere der Erkrankung zu korrelieren. Im Laufe der Zeit wurden immer mehr Patienten mit mild ausgeprägtem Krankheitsbild beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern milde Mutationen, eine weitere das Vorhandensein von Mosaiken blutbildender Zellen. Zu letzterem führt die Reversion einer der beiden Mutationen. Diese Art der „natürlichen Gentherapie“ wurde bei 10-30% der FA-Patienten beobachtet. Um die Entwicklung von Reversionen besser zu verstehen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung verschiedener Zelllinien von 5 Patienten im Alter von 11 (Pat. 5) bis 33 (Pat. 4) Jahren. Die FA-A-Patienten 1 und 2 wurden bereits von Gross et al. 2002 als Mosaikpatienten beschrieben. Für die weiteren Patienten führten unterschiedliche Aspekte, wie normale Blutwerte, MMC-tolerante lymphoblastoide Zelllinien und gDNA-Analysen des Blutes zum Mosaikverdacht. Nähere Analysen bestätigten für die FA-D2-Patienten (Pat. 4, 5) ebenfalls das Vorliegen einer Reversion in den Blutzellen. Allen Patienten gemein war die Reversion in Form einer Rückmutation (Pat. 1: c.971T>G, Pat. 2: c.856 C>T, Pat. 4: c.3467-2A>G, Pat. 5: c.3707G>A), welche meist in einem oder in der Nähe eines Mutationsmotives vorlag. Zur Einschätzung des Mosaikstatus in den Patientenblutzellen wurden, neben der meist mehrjährigen Beobachtung der Blutwerte (Thrombo-, Mono-, Granulo-, Lymphozyten, Hämoglobin), gDNA-, Chromosomenbruch- und Zellzyklusanalysen durchgeführt. Chromosomenbruchanalysen von Metaphasen der T-Lymphozyten der Patienten 4 und 5 zeigten nach MMC-Behandlung die mosaiktypische bimodale Verteilung der Chromosomenbruchraten. Die nur moderat erhöhten Bruchraten in Metaphasen des Patienten 1 sprachen für eine starke Reversion. Zur besseren Abschätzung des Mosaikstatus wurden Zellzyklusanalysen an Mischungsreihen aus FA- und nicht FA- Blut durchgeführt. Die Detektionsgrenze für FA-Mosaik lag bei einem Anteil von 30% Zellen mit spontanem/MMC-induziertem G2-Phasen-Arrest. In Anlehnung an Mischungskurven wurden für die vier Patienten Reversionen von 0% (Pat. 4) bis 90-95% (Pat. 2) angenommen. Die gDNA-Analyse MACS-sortierter T-/B-Lympho-, Mono- und Granulozyten sowie von Fibroblasten und lymphoblastoiden Zelllinien ermöglichte einen detaillierten Einblick in die Mosaikstatus auf molekularer Ebene. Wir fanden bei allen Patienten einen unterschiedlich stark ausgeprägten Mosaikstatus ihrer Blutzellreihen. Tendenziell scheinen die Reversionsgrade mit der Zell-Lebensdauer korrelieren, hierbei zeigen kurzlebige Zellen (Mono-, Granulo-, B-Lymphozyten) höhere

Reversionsgrade als langlebige T-Lymphozyten. Das Auftreten von gleichen Reversionen in allen Zelllinien lässt eine Reversion in einer gemeinsamen Vorläuferzelle vermuten. Als Besonderheit fanden wir, unseren Erachtens erstmalig, eine komplette Reversion einer Knochenmark-Fibroblastenzelllinie (Pat. 1). Häufig in Kultur stattfindende Reversionen in lymphoblastoiden Zelllinien beobachteten wir für alle vier Patienten. Die Mosaikentstehung im Patientenblut konnte mit allen Methoden bestätigt werden. Jede Methode wies Vor- und Nachteile auf. Zur Abschätzung der Mosaikstatus empfiehlt sich deshalb eine Kombination der Methoden.

Ein weiteres Projekt beschäftigte sich mit Interaktionen des FANCO (RAD51C) innerhalb der RAD51 Paraloge (RAD51B, -C, -D, XRCC2, XRCC3) und mit RAD51. Die Analysen erfolgten im Mammalian Two- und Three-Hybrid (M2H/M3H) System. Die Untersuchungen bestätigten die meisten der bisher detektierten Interaktionen, welche zur Ausbildung des RAD51C-XRCC3 Komplexes und des, aus den Subkomplexen RAD51B-RAD51C (BC) und RAD51D-XRCC2 (DX2) bestehenden, BCDX2-Komplex führen. Die M3H-Analysen weisen auf eine wichtige Rolle des RAD51B-Proteins bei der Ausprägung dieses Komplexes hin. Es scheint die Ausbildung der RAD51C-RAD51D-Interaktion erst zu ermöglichen und zusätzlich, anders als bisher beobachtet, auch mit XRCC2 zu interagieren. Diese Interaktion wiederum wird durch die Anwesenheit von RAD51D stark gefördert. Unsere M2H-/M3H-Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Ausbildung der Subkomplexe für die Entstehung des BCDX2-Komplexes wichtig ist und dieser vermutlich als Ringstruktur vorliegt. Zusätzlich fanden wir Hinweise auf mögliche Wechselwirkungen zwischen den BCDX2- und den XRCC3-Komplexproteinen. Aufgrund der Beteiligung der Proteine an der Doppelstranglisionsreparatur wurde die Auswirkung von MMC-induzierten DNA-Schäden untersucht. Diese führten innerhalb der Subkomplexe zu gegensätzlichen Änderungen der Interaktionsintensität. Während die Substanz im DX2-Komplex zum Sinken der Interaktionsstärke führte, erhöhte sich diese im BC-Komplex. Die in der Literatur beschriebene und charakterisierte RAD51C-FANCN-Interaktion war im M2H-Test nicht darstellbar. Möglicherweise würde diese jedoch durch die Anwesenheit eines dritten Proteins gefördert werden. Zusätzlich wurde ein RAD51C-Protein, welches die Patientenmutation R258H enthielt, überprüft. Es zeigte nur in der M3H-Analyse, mit pMRAD51D und nativem RAD51B, nach Behandlung mit MMC eine reduzierte Interaktionsstärke im Vergleich zum Wildtyp. Dies unterstreicht einmal mehr die als hypomorph beschriebene Mutation des Proteins.

Das dritte Projekt, die angestrebte Strukturaufklärung des RAD51C-Proteins erwies sich als schwierig. Eine für eine Kristallisation ausreichende Proteinmenge konnte, weder im *E. coli*-System noch in Insektenzellen oder in Co-Expression mit seinem Interaktionspartner XRCC3, isoliert und aufgereinigt werden. Elektrophoretische Mobility Shift Assays des CX3-Proteinkomplexes mit DNA-Strukturen (ssDNA, Open Fork, 3'-/ 5'-Überhang-Struktur), zeigten eine Bevorzugung des 3'-Überhang-DNA-Substrates. Diese Art der Analyse könnte in weiterführenden Analysen zur Abschätzung der Auswirkung von Patientenmutationen herangezogen werden.

Summary

For maintaining genomic stability several repair mechanisms have evolved. Defects in these mechanisms lead to diverse diseases. One of these Fanconi Anemia (FA), first described in 1927, evoked by deficient mechanism of interstrand crosslinks. As causative reason defects within the FA-BRCA pathway were identified leading to chromosome instability. To date 19 different genes were found to cause Fanconi Anemia. Most commonly for the clinical picture of FA are congenital malformations, progressive bone marrow defects as like an increased tumor rates and anemia at a juvenile age. Knowing the affected gene only limited conclusions could be considered of the phenotypical appearance. More likely the kind of mutation and the affected position within the gene seems to correlate with the severity of the disease. Over the time an elevated number of patients with mild phenotype were observed. One possible explanation may be mild mutations another a mosaic state developed within the blood forming cells. The latter was caused by reversion of one of both mutations. This kind of “natural gene therapy” was observed in the blood of 10 up to 30 % FA- patients. To get better insights in to the mosaic development we investigated different cell lines of five patients aged between 11 (pat. 5) and 33 (pat. 4) years. Both FA-A patients (pat. 1, 2) were described as mosaic patients before by Gross et al. 2002. The other patients arouse suspicion for developing mosaicism by different aspects like normal blood counts, MMC tolerant lymphoblastoid cell lines and analyzing gDNA from blood. Detailed analyses confirmed the reversion of one mutation in blood of the FA-D2 patients (pat. 4, 5). In common for all four mosaic was the kind of reversion, a back mutation (pat. 1: c.971T>G, pat. 2: c.856 C>T, pat. 4: c.3467-2A>G, pat. 5: c.3707G>A) mostly in or near by a mutation motive. To get insights in to the mosaic state of the patients’ blood cells, gDNA, chromosomal breakage and cell cycle analyses were performed and blood cell counts of thrombo-, mono-, granulo-, lymphocytes and haemoglobin were observed for several years. Chromosomal breakage analyses of t-lymphocytes metaphases (pat. 4, 5) treated with MMC showed a mosaicism typical bimodal distribution. The only moderate increased chromosomal breakage rate in metaphases of patient 1 points out a strong pronounced reversion. For better estimation of the Mosaic state in patient blood we performed cell cycle analysis with mixtures of FA- and non FA-blood. Thereby we observed the border for mosaic detection at a degree of 30 % cells with spontaneous /MMC induced G2-phase arrest. Compared to the mixing study reversion degrees of 0 % (pat. 4) up to 90-95 % (pat. 2) were assumed for four of the patients. At molecular base gDNA analyses of MACS sorted T-/ B- lympho, mono and granulocytes as well as from fibroblasts and lymphoblastoid cell lines allowed a more detailed insight in to the mosaic statuses. In all patients we observed different distinct of mosaic state in their blood cell lines. We observed a tendency of correlation between reversion degree and the longevity of blood cells – cells with short life spans (mono-, granulo-, B-lymphocytes) showed higher reversion degrees than long living T-lymphocytes. The fact that we detected the same reversion in the different cell lines of a patient suggests a reversion within a common precursor cell. Further we observed, as we know for the first time, a reversion within a bone marrow fibroblast line (pat. 1). Four of our patients showed commonly observed reversions in cultured lymphoblas-

toide cell lines. With each of the tested methods we could show mosaic development in blood of our patients. Every of them showed pros and cons. For this reason a combination of the different methods would be recommendable for calculation of the mosaic state in patient blood.

The second project investigated the interactions of FANCO (RAD51C) within the group of the RAD51 paralogs (RAD51B, -C, -D, XRCC2, XRCC3) and with RAD51. Interactions were tested by Mammalian Two- and Three-Hybrid (M2H/M3H) System. Our investigations confirm most of the up to now detected interactions leading to RAD51C-XRCC3-complex (CX3) and RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2 complex (BCDX2) formation – latter consisting of the subcomplexes RAD51B-RAD51C (BC) and RAD51D-XRCC2 (DX2). M3H analyses give a hint for the importance of the RAD51B protein for the BCDX2 complex formation. The protein seems to be necessary for RAD51C-RAD51D interaction and also to interact, other than intended before, with XRCC2. In turn this interaction seems to be strongly promoted by RAD51D. In M2H and M3H analyses we found evidence of the importance of subcomplex formation for the formation of the whole BCDX2 complex and that the complex may be a circular structure. Additionally we observed evidence for interdependency between the BCDX2- and the XRCC3- complex proteins. Because of the proteins involvement into the double strand lesion repair the effect of MMC induced DNA lesions were tested. MMC treatment leads to different changes of interaction within the subcomplexes. We observed a decrease of interaction strength between RAD51D and XRCC2 and an increased interaction within the BC-complex. The interaction between RAD51C and FANCN was not detectable in our M2H assay but may be promoted by another protein in M3H analysis. Additionally we tested a RAD51C protein inherited the patient mutation R258H. Only in M3H analysis with pMRAD51D and native RAD51B and with additional MMC treatment reduced interaction strength was detectable compared to the wildtype RAD51C. This underlines the hypomorphic nature of the mutation described before.

The third project – the elucidation of the RAD51C protein structure proved to be difficult. We could not isolate and purify enough protein for crystallization, neither by expression within a *E.coli* or an insect cell system not even by co-expression of the complex partner XRCC3. Electrophoretic mobility shift assays of the CX3 complex with different DNA-structures (ssDNA, open fork, 3'- and 5'- overhang structures) showed preference for the 3'-overhang DNA substrate. This method may be used for further investigations of mutations in patient DNA in future.

1 Einleitung

1.1 DNA Reparatur

1.1.1 DNA-Schäden

Auch wenn die evolutionäre Grundlage der hohen Biodiversität, der Vielfalt alles Lebens, welches uns umgibt, in Veränderungen auf genomischer Ebene beruht, so ist doch Genomische Stabilität die oberste Prämisse des Lebens.

Täglich entstehen durch spontane Reaktionen (z.B. Hydrolysen), intrinsische metabolische Produkte (z.B. reaktive Stickstoff-, Sauerstoff- (ROS) und Karbonspezies, alkylierende Agentien, Lipidperoxidations-, Estrogen- und Cholesterolmetabolite) oder externe Noxen physikalischer und chemischer Natur unzählige Läsionen (Hoeijmakers 2009). Hydrolytische Prozesse wie Depyrimidierung und Depurinisierung verursachen abasische Stellen innerhalb der DNA. Außerdem kommt es auf Basis von Desaminierung zu Basenkonvertierungen (Adenin>Hypoxanthin, 5-Methyl-Cytosin>Thymin, Guanin>Xantin). Intrinsische Metabolite führen unter anderem zu DNA-Addukten wie 8-oxo-dG (Oxidation), 3-Methyladenine, 7-Methylguanin, O⁴-Methylthymine, (2-Hydroxyethyl) Guanin und O⁶-Methylguanin (Methylierung) (De Bont and van Larebeke 2004). Weitere zellulär bedingte DNA-Veränderungen, wie auch Basenfehlpaarungen aus denen Basentransitionen (GC>AT) resultieren, entstehen während der Replikation (Ciccia and Elledge 2010). Aber auch Umwelteinflüsse tragen zur Schädigung der DNA bei. So führt ionisierende Strahlung (Kosmische-, Röntgen-, sowie Radiostrahlung) zu DNA Oxidation und somit zu Doppel-/ Einzelstrangbrüchen. Durch UV-Strahlung kommt es zur Bildung von → Cyclobutanpyrimidindimeren und 6-4-Photoproducten und durch Chemikalien (alkyliernde Substanzen wie Methansulfonat (MMS), Temozolomid; Mitomycin C (MMC), Cis-Platin, Psoralen, oder Nitrogen Mustard entstehen Doppelstrangquervernetzung durch kovalente Bindungen(Ciccia and Elledge 2010; Sinha and Hader 2002). Hierbei wird die Häufigkeit der so entstehenden DNA-Läsionen auf ca. 10⁶ pro Zelle und Tag geschätzt (Rihs et al. 2009).

1.1.2 Zelluläre Schadensantwort: *DNA-Damage Response (DDR)*

Um dieser enormen Anzahl von DNA-Schäden entgegenzuwirken und die genomische Integrität gewährleisten zu können, entwickelte sich eine Fülle ein- und mehrstufiger DNA-Reparaturmechanismen (einstufig z.B.: O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, Photoreaktivierung; mehrstufig: Nukleotid-/Basenexzisionsreparatur (NER/BER), Basenfehlpaarungsreparatur, Doppelstrangbruchreparatur über Homologe Rekombination (HR), Non-homologous end joining (NHEJ), Interstrang-Crosslink-Reparatur (ICLR) (De Bont and van Larebeke 2004; Sinha and Hader 2002). Für die Behebung von DNA-Schäden,

und somit zur Gewährleistung einer möglichst fehlerfreien DNA-Weitergabe an die Tochterzelle, wird Zeit benötigt. Um den Raum für diese wichtigen Prozesse zu schaffen, sind im Zellzyklus verschiedene DNA-Schadenkontrollpunkte (Checkpoints) verankert: *G1-S DNA-Damage-Checkpoint*, *intra S-Phase checkpoint*, *G2-M DNA-Damage-Checkpoint* (Poon 2014). Nach einem Schadensereignis kann an diesen eine Progression des Zyklus gestoppt werden. Um die Reparatur der durch interne und externe Einflüsse und die bei der Replikation entstandenen Schäden zu koordinieren, greift die Zelle auf ein Netzwerk, bestehend aus Sensoren, Transduktoren und Effektoren, zurück (Abb. 1). Im Zentrum dieser Signalkaskade für die DDR stehen die beiden *Phosphatidylinositol-3-Kinase like*-Proteine (PIKKs), welche auch die Aktivierung der *DNA damage checkpoints* nach DNA-Schädigung, über CHK1 und CHK2, regulieren. Für die Schadenserkennung stehen sogenannte Sensorproteine zur Verfügung.

Der MRN-Komplex (MRE11/RAD50/NBS1) erkennt Doppelstrangbrüche (DSBs), was zur Aktivierung und Rekrutierung von ATM an die Schadenstelle führt (Harper and Elledge 2007). Die resultierende Phosphorylierung des MRN-Komplexes durch ATM stellt einen wichtigen Schritt für das *Downstream-Signaling* dar. Kommt es während der DNA-Verdoppelung zu einer Blockade der Replikationsgabel, wird folgender Mechanismus verwendet. MCM-Helikasen entwinden die DNA, die dadurch freigelegten 3'-Einzelstränge (ssDNA) werden von dem Sensorprotein RPA ummantelt. Dies führt zu einer Rekrutierung von ATR und ATRIP sowie von RAD17. Letzteres lädt den 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1)-Komplex auf die DNA. Die Kollokalisation von 9-1-1 mit ATR/ATRIP führt zur Phosphorylierung von RAD17/911 was seinerseits ein *Downstream-Signaling* auslöst (Harper and Elledge 2007). Die Effektorproteine dieser DDR-Wege werden entweder durch ATM und ATR direkt oder durch die Proteinkinasen CHK1 oder CHK2 und

auch durch andere Proteine wie CK2, p38 und MK2 phosphoryliert (Ciccia and Elledge 2010). Einen der Effektoren der Signalkaskaden stellt das für das *Checkpoint-Signaling* wichtige Protein TopBP1 dar. Es bindet den 911 Komplex aber auch ATRIP. Durch das Binden an ATRIP stimuliert es die ATR-Aktivität (Harper and Elledge 2007) 199. Da TopBP1 gleichzeitig auch selbst als Substrat von ATR sowie ATM fungiert, verstärkt es zusätzlich die Schadensantwort. Bedeutend für die DNA-schadensbedingte Regulie-

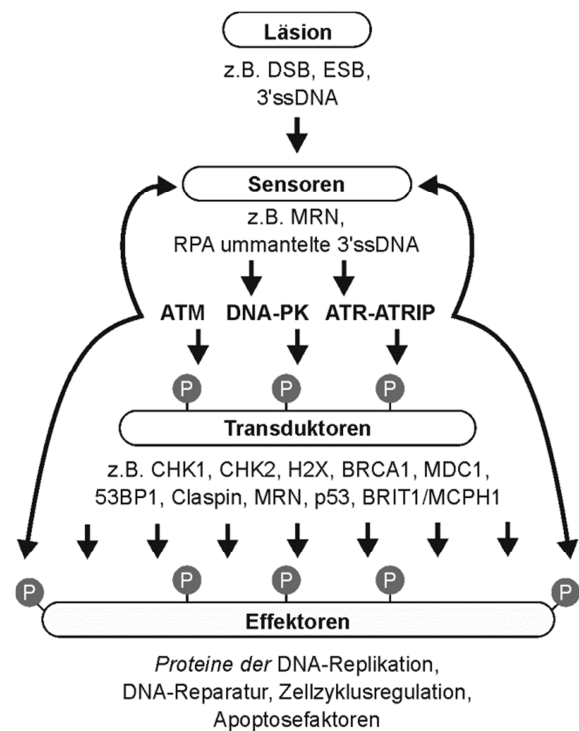


Abb. 1: Signalkaskade in der DNA-Reparatur. Sensoren nehmen Läsionen der DNA wahr und signalisieren ihren entsprechenden Partner-Kinasen den Schaden. Nach ihrer Aktivierung phosphorylieren diese ihre *downstream* gelegenen Targets. Hierbei kann es sich um Transduktoren, Effektoren oder auch in der Signalkaskade vor ihnen gelegene Proteine handeln. Durch diese Kaskade wird ein ganzes Netzwerk von Effektoren unterschiedlicher Aufgaben aktiviert (DNA-Replikation: z.B. TopBP1, MCMs, ORCs, RFC, GINS; DNA-Reparatur: z.B. RAD51 für HR, FANCD2 für ICL-Reparatur; Zellzyklusregulation: CHK1, CHK2; Apoptosefaktoren: Caspasen). Es kommt zur Verstärkung des Signals, zum Zellzyklusarrest, zur Schadensreparatur oder auch zur Apoptose.

regung des Zellzyklus ist das Herunterregulieren der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK)-Aktivität. Dies kann durch direkte oder transduktorvermittelte (z.B. TP53BPI, BRCA1, MDC1, TopBPI) Phosphorylierung der CHK1- und CHK2-Kinasen, unter Mithilfe von weiteren Faktoren (z.B. p53), erfolgen. Aufgrund der Inhibition werden die Zellzyklus-*Checkpoints* (G1-S, intra-S und G2-M) aktiviert und der Zellzyklus verlangsamt, beziehungsweise angehalten (Jackson and Bartek 2009). Neben der Regulation des Zellzyklus besteht die Aufgabe von ATM und ATR darin, die DDR zu fördern. Dies erfolgt über verschiedene Ansätze: Erstens, der Rekrutierung von unterstützenden Reparaturfaktoren, zweitens die transkriptionale oder post-transkriptionale Induzierung von Reparaturproteinen und drittens der Beeinflussung von Reparaturproteinen durch Modifikationen an ihrer Phosphorylierung, Ubiquitynylierung, Acetylierung und Sumoylierung (Huen and Chen 2008). Können die Schäden nicht repariert werden, oder sind sie zu gravierend, wird die p53-vermittelte Apoptose eingeleitet.

Weitere wichtige Proteine für die Vermittlung der DDR stellen die DNA-PK und die beiden Mitglieder der PARP-Familie (*poly(ADP-ribose)polymerase*) PARP1 sowie PARP2 dar. Letztere werden durch Einzelstrangbrüche (SSB) und Doppelstrangbrüche (DSB) aktiviert. Sie katalysieren durch Anhängen von Poly-ADP-Ribose-Ketten an Proteine, die Rekrutierung von DDR-Faktoren an das Chromatin (Ciccia and Elledge 2010). Die Aktivierung von DNA-PK wird, wie die von ATM, durch DNA-schädigende Ereignisse ausgelöst, die zu DSBs führen (z.B. IR). Im Unterschied zu ATM, dem viele verschiedene Substrate nachgeschaltet sind, reguliert die DNA-PK nur eine kleine Gruppe von Proteinen, die im DSB-End Joining eine Rolle spielen (Ciccia and Elledge 2010).

1.1.3 DNA-Reparaturmechanismen

1.1.3.1 Exzisionsreparatur

1.1.3.1.1 Basenexzisionsreparatur (BER)

Über diese Art der Reparatur werden hauptsächlich durch Alkylierung, Desaminierung oder Oxidation entstehende kleine Nukleotid-Läsionen entfernt. Für die Entfernung stehen verschieden Variationen des Reparaturweges zur Verfügung, die im Wesentlichen aus fünf Schritten bestehen. Eine DNA-Glycosylase erkennt und entfernt die falsche beziehungsweise defekte Base unter Bildung eines abasischen Intermediates. Anschließend wird die DNA an der betreffenden Stelle von einer apurinischen /apyrimidinischen (AP) Endonuklease oder einer AP-Lyase eingeschnitten und das verbleibende Zuckerfragment durch eine Phosphodiesterase oder Lyase entfernt. Danach füllt eine DNA-Polymerase die entstandene Lücke auf und das Rückgrat wird durch eine DNA-Ligase verschlossen (Kim and Wilson 2012).

1.1.3.1.2 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Dieser Reparaturweg entfernt verschiedene DNA-Veränderungen, insbesondere solche, welche die helikale Struktur zerstören. Zu ihnen gehören, durch chemische Agentien wie Cisplatin oder Benzopyren verursachte Addukte, 6-4PP's, Lipidperoxidationsprodukte und ROS-induzierte Schädigungen. Hierbei werden mehrere Basen ersetzt. In dem vierstufigen Prozess sind rund 40 Proteine involviert. Er gliedert sich in: Erkennung des Schadens, beiderseitigem Einschneiden der DNA neben dem Schaden und Entfernen des Fragments, Einfügen der fehlenden Basen und Verbinden des DNA-Rückgrates. Die NER teilt sich in die globale Genomreparatur (GG-NER) und die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TC-NER). Letztere ist auf die Entfernung von RNA-Polymerase blockierenden Läsionen auf dem zu transkribierenden Strang spezialisiert (Iyama and Wilson 2013).

1.1.3.1.3 Basenfehlpaarungsreparatur (Mismatchreparatur – MMR)

Über diesen hochkonservierten Reparaturweg werden Basenfehlpaarungen, Insertions- sowie Deletions-loops (IDLs) erkannt und repariert, die hauptsächlich als Fehler während der Replikation oder als Zwischenprodukte der HR entstehen. Der in *E. coli* entdeckte Reparaturweg besteht aus den Komponenten MutS und MutL. Die eukaryotischen Äquivalente von MutS, MutS α und MutS β , bestehen aus jeweils zwei Untereinheiten, welche unterschiedliche Fehlpaarungen erkennen: MutS α (MSH2-MSH6) - Einzelbasenfehlpaarungen und 1-2 Basen IDLs; MutS β (MSH2-MSH3) - IDLs mit zwei oder mehr Fehlpaarungen. Die humanen Homologe von MutL, MutL α (MLH1-PMS2) und MutL γ (MLH1-PMS1) besitzen Endonukleaseaktivität und schneiden den defekten Strang neben der Schadstelle ein. Anschließend entfernt PCNA in Verbindung mit Exo1 die Fehlpaarung, die Lücke wird von einer Polymerase aufgefüllt und von der LIG1-Ligase versiegelt (Iyama and Wilson 2013).

1.1.3.2 Doppelstrangläsionsreparatur

Doppelstrangläsionen (DSBs) zählen zu den schwersten DNA-Schäden. Sie entstehen während der Replikation, verursacht durch Zellmetabolite (z.B. ROS), sowie exogene Einflüsse (z.B. IR, Chemotherapeutika) aber auch gewollt bei der V(D)J Rekombination der Antikörperbildung. Zur Behebung dieser Schäden stehen der Zelle zwei Hauptarten der Reparatur zur Verfügung. Zum einen das NHEJ (hauptsächlich in G1-Phase) und zum anderen die ICLR und fehlerfreie HR (G2- und S-Phase) (Bohgaki et al. 2010; Jackson and Bartek 2009) Abb. 2 I-II. Als weitere Reparaturmechanismen stehen das alternative NHEJ (alt-NHEJ) und das Einzelstrangannealing (SSA) zur Verfügung (Ciccio and Elledge 2010) Abb. 2 III-IV.

1.1.3.2.1 Homologe Rekombination (HR)

Für die fehlerfreie HR, welche zur Reparatur auf Schwesterchromatide zurückgreift, haben sich verschiedene Abläufe entwickelt. Allen gemein ist ihre Initiierung durch den MRN-Komplex, welcher DSBs der DNA erkennt. Dieser führt gemeinsam mit der CtIP und Exo1 eine 5'-3'-Resektion durch. Dies geschieht

vermutlich in Verbindung mit der Bloom-Helikase. So entstehen an den Bruchstellen 3'-Überhänge, welche durch RPA stabilisiert werden. Die darauf folgende RAD52-Rekrutierung fördert den Ersatz von RPA durch RAD51 (FANCR). Diese Bindung wird zusätzlich von BRCA2 (FANCD1) unterstützt. Zusätzlich aktiviert RPA, in Verbindung mit dem *ATR-interacting*-Protein (ATRIP), ATR, welches wiederum den Zellzyklus-Checkpoint aktiviert. Es bilden sich RAD51-Nukleofiliamente aus. Die Ummantelung der DNA ermöglicht nun eine Stranginvasion der homologen Schwesterchromatide. Klassischerweise entsteht so nach Ausbildung eines *D-Loops* eine doppelte *Holliday-Junction (HJ)* -Struktur. Sie wird unter Entstehung von *Crossover*- oder *non-Crossover*-Produkten aufgelöst. Eine weitere, an die D-Loop Bildung anschließende Reparaturmöglichkeit bildet das *Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA)*, aus welchem, durch Neusynthese des fehlenden Stranges, *non-crossover*-Produkte hervorgehen. Eine andere Variante zur DSB-Reparatur bildet die SSA, hier führen RAD52 und RPA die Rekombination aus (Iyama and Wilson 2013). Einen Überblick des Ablaufes der HR gibt Abb. 2 II.

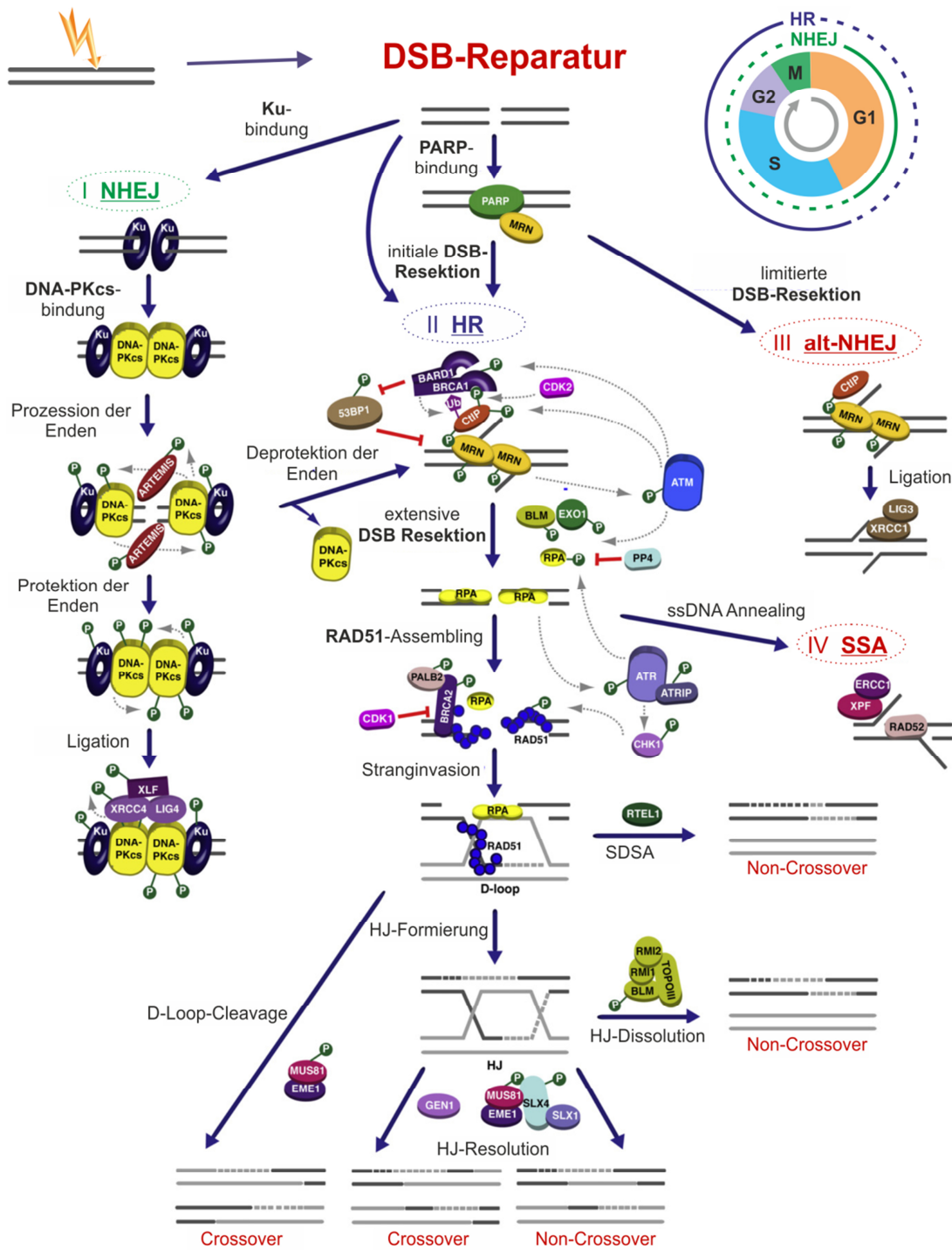


Abb.2: DNA Doppelstrangbruchreparatur; **I:** Das NHEJ wird durch das Anlagern von Ku und die Rekrutierung von DNA-PKcs an den DSBs gefördert. Die PKcs werden innerhalb des Reparaturprozesses an verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert. Es kommt zu einer Prozession der freien Enden über ARTEMIS mit anschließender Protektion selbiger über die PKcs und abschließend zur DNA-Ligation. **II:** MRN, welches durch PARP zum DSB rekrutiert wird, vermittelt die initiale DSB-Resektion gemeinsam mit CtIP und BRCA1, dies fördert die HR in der S- und G2-Phase. 53BP1 übt eine inhibierende Wirkung auf die Resektion aus, dies wird negativ über BRCA1 reguliert. Über den MRN/CtIP/BRCA1-Komplex kann die DSB-Resektion im Falle fehlgeschlagener NHEJ ebenfalls durchgeführt werden. Die extensive DSB-Resektion und das Umhüllen der 3' ssDNA-Enden mit RPA wird von EXO und BLM in Gang gesetzt. Während der DSB-Resektion spielt ATM eine wichtige, regulierende Rolle. Die RPA-Verdrängung durch RAD51-Filamente von der ssDNA wird über BRCA2 vermittelt. Sie führt zur Stranginvasion homologer DNA-Bereiche. Die Rekrutierung von RAD51 wird über einen ATR-Weg geregelt, der durch die DSB-Resektion aktiviert wird. Die durch Stranginvasion entstandene D-Loop wird entweder durch MUS81/EME1 aufgeschnitten, oder über RTEL1 während der SDSA in Crossover- oder Non-Crossover-Produkte überführt. Weitere Non-Crossover-Produkte entstehen durch das Auflösen der HJ über den BLM/TOPOII-Komplex. Die Auflösung der HJ über die Nukleasen GEN1 und SLX1/SLX4 in Verbindung mit MUS81/EME1 führt zu Crossover- und Non-Crossover-Produkten. **III:** Während der G1-Phase erfolgt zusätzlich eine eingeschränkte DSB-Resektion über alt-NHEJ, dies geschieht über CtIP und MRN. **IV:** Nach der DSB-Resektion können 3' ssDNA-Enden über homologe Sequenzen direkt durch RAD52 annealt werden. (Modifiziert nach Ciccia and Elledge 2010 und Iyama and Wilson 2013.)

1.1.3.2.2 Non-Homologous End Joining (NHEJ)

Das fehleranfällige NHEJ wird durch den Ku-Komplex (Ku70-Ku80) initiiert, welcher die Proteinkinase DNA-PKcS aktiviert. Diese wiederum bildet mit dem Artemis-Protein einen DNA-abhängigen Endonuklease-Komplex, der DNA-Substrate mit *Loops*, *Flaps* und *Gaps* schneidet. Die entstandenen Lücken werden in Zusammenarbeit des XRCC4-LIG4-Komplexes und XLF aufgefüllt und die Enden verbunden (Iyama and Wilson 2013; Ma et al. 2005). Einen weiteren Ku-vermittelten Reparaturweg stellt der alternative NHEJ (alt-NHEJ) dar, welcher auch als *Microhomology Mediated End-Joining* (MMEJ) bezeichnet wird (Ciccia and Elledge 2010; Jackson and Bartek 2009). Einen Einblick in weitere Details der Mechanismen verschafft Abb. 2 I+III.

1.1.3.2.3 Transläsionssynthese (TLS)

Dieser fehlerbehaftete Reparaturweg wird von der Replikationsmaschinerie genutzt, um geschädigte Bereiche in der DNA zu umgehen, ohne diese zu reparieren. Die beteiligten Transläsionspolymerasen (DNA-Polymerasen der Y-Familie: Pol η , Pol κ , Pol ι , Rev1 und Pol ζ) arbeiten hierbei weniger genau, sind dafür aber in der Lage, geschädigte DNA zu replizieren (Wang 2007; Xie et al. 2012).

1.1.3.3 Interstrang-Crosslink-Reparatur (ICLR)

Die kovalente Vernetzung beider DNA-Stränge durch ICLs führt zum Stagnieren der Replikationsgabel und ist somit ein schwerwiegendes, toxisches Ereignis, welches Deletionen, Chromosomenbrüche und chromosomale Aberrationen, bis hin zu Chromosomenverlusten, verursacht (Wang and Gautier 2010). Zur Reduzierung solcher Folgeschäden reagiert die Zelle mit Zellzyklusarrest und setzt verschiedene Reparaturmechanismen in Gang. Um ein Fortschreiten der Replikation zu ermöglichen, müssen die Quervernetzungen aus der DNA entfernt werden. Dies geschieht, je nach Zeitpunkt ihrer Detektion (S- oder G1-Phase), über verschiedene Mechanismen (Deans and West 2011). Innerhalb der G0/G1-Phase wird die Reparatur mittels NER und TLS aus der DNA entfernt. Während der S-Phase spielen die Proteine des FA/BRCA-Wegs eine wichtige Rolle (1.2.3).

1.1.3.3.1 Defekte in DNA-Reparaturwegen

Bedingt durch Ineffizienzen in diesen Reparaturwegen häufen sich Mutationen und Chromosomenaberrationen im Genom an, aus denen ein erhöhtes Risiko für verschiedene Tumorarten resultiert. In Verbindung mit solchen Defekten wurden verschiedene, seltene Krankheiten wie Ataxia Telangiectasia (AT), Bloom Syndrom (BS), Cockayne Syndrom (CS), Nijmegen Breakage Syndrom (NBS), photosensitive Trichothiodystrophie (TTD), Werner Syndrom (WS) und Xeroderma Pigmentosum (XP) oder die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Fanconi Anämie (FA) beobachtet. Diese Krankheiten weisen, trotz ihres Spektrums verschiedener Symptome, einige Gemeinsamkeiten, wie Wachstumsretardierung, abnormale Pigmentierung, frühzeitiges Altern sowie ein erhöhtes Risiko für verschiedenartige Tumore, auf (Taniguchi and D'Andrea 2006).

1.2 Fanconi Anämie

1.2.1 Geschichte und Inzidenz

Diese seltene, autosomal-rezessiv sowie X-chromosomal vererbte DNA-Reparatur-Erkrankung wurde erstmals 1927 durch den Schweizer Kinderarzt Doktor Guido Fanconi beschrieben (Wang 2007). Sie tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 bis 5 Erkrankungen pro eine Millionen Geburten auf, wobei ihre heterozygote Trägerfrequenz in den verschiedenen ethnischen Gruppen auf 0,3 bis 1 Prozent geschätzt wird (Joenje and Patel 2001). Eine relativ hohe Trägerfrequenz ist hierbei in Populationen mit hohen Verwandtschaftsgraden wie den spanischen Zigeunern (1/64-1/70), weißen Südafrikanern (1/83) und der israelischen Bevölkerung (1/66-1/128) (Callen et al. 2005; Rosenberg et al. 2011; Rosendorff et al. 1987) zu beobachten.

1.2.2 Der Phäno- und Genotyp

Der heterogene Phänotyp der Erkrankung ist geprägt von progressivem Knochenmarksversagen mit Panzytopenie, welches sich typischerweise in der ersten Lebensdekade manifestiert und oft mit initialer Thrombozytopenie und Leukopenie einhergeht. Die mediane Manifestierung liegt hierbei in einem Alter von 7 Jahren, mit einer Streuung beginnend mit der Geburt bis hin zu 32 Jahren (MacMillan and Wagner 2010). Bis zum 40. Lebensjahr entwickeln 90% aller Patienten eine Aplastische Anämie (Rose et al. 2014).



Abb. 3: Unterschiedliche Ausprägung der FA-Phänotypen: Philipp mit (6 Jahre, links), Dominik (7 Jahre, mittig), Michael (25 Jahre, rechts). (Quelle: (Schindler and Hoehn 2007) Mit freundlicher Genehmigung der S. Karger AG, Basel.

Des Weiteren sind bei 60-75% der Patienten verschiedene kongenitale Fehlbildungen (u. a. Hypo- und Aplasie von Daumen und Radius, skelettale Veränderungen, Mikrozephalie, Mikrophtalmie, Fehlbildungen von Nieren, Verdauungstrakt, Herz, zentralem Nervensystem) und andere physiologische Veränderungen wie Defekte des Außenohrs, Minderwuchs, Café-au-lait-Flecken, Hypogonitismus sowie Wachstumsverzögerungen in unterschiedlichen Ausprägungen zu beobachten. Zusätzlich zeigen alle Patienten eine Prädisposition für maligne Veränderungen, vor allem Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbe-

reich, der Haut, sowie des gastrointestinalen Traktes oder der Genitalien (Alter and Kupfer 1993; Schindler et al. 2012; Taniguchi and D'Andrea 2006; Wang 2007). Hierbei können die Ausprägung und die Anzahl dieser physiologischen Auffälligkeiten in einem hohen Maße variieren (Abb. 3). Ein Fehlen von Malformationen stellt im Falle von FA jedoch kein Ausschlusskriterium dar, wie das Beispiel der Estren-Dameshek-Variante zeigt (Neveling et al. 2009). Eine weitere Herausforderung in der Diagnostik stellen Patienten mit Mosaiken (1.2.5) dar.

Wie man zum heutigen Zeitpunkt weiß, beruht die hohe phänotypische Diversität der Krankheit nicht auf dem vielfältigen genetischen Hintergrund. Zwar wurden bisher 19 verschiedene Gene identifiziert (Tab. 1): *FANCA*, *-C*, *-D1*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-I*, *-J*, *-L*, *-M*, *-N*, *-O*, *-P*, *-Q*, *R*, *-S*, *-T* und *-B* (X-chromosomal), deren biallelische beziehungsweise monoallelische (im Falle des *FANCR*-Patienten (Wang et al. 2015) und bei männlichen *FANCB*-Patienten) Defekte mit FA assoziiert werden (Bogliolo et al. 2013; Rickman et al. 2015; Sawyer et al. 2015; Virts et al. 2015; Wang et al. 2015). Wobei die Zugehörigkeit von *FANCM* zu den FA-Genen umstritten bleibt. So wurden in der DNA des ersten beschriebenen *FANCM*-Patienten (Meetei et al. 2005), zusätzlich zwei biallelische *FANCA*-Mutationen detektiert (Singh et al. 2009). Außerdem scheint der homozygote Verlust von *FANCM* laut Lim et al. 2014 nicht zur Entstehung von FA zu führen (Lim et al. 2014). Eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Erkrankung scheint neben dem betroffenen Gen auch die Art der zugrundeliegenden Mutation zu sein. Die einzigen Ausnahmen bilden hierbei *FANCD1*- und *FANCN*-Patienten bei denen es sehr früh zu einer Manifestation der Erkrankung kommt (Neveling et al. 2009). Weitere wichtige Komponenten für die Ausprägung des Phänotyps stellen

Umwelt, Onto- und Epigenetik dar. Wie sehr der genetische Hintergrund und „Modifizier“-Gene Einfluss auf das Krankheitsbild ausüben, zeigt das Beispiel zweier Schwestern, welche trotz gleicher ererbter Mutationen in *FANCA* (*EX15_20del*; *c.3788_3790del* (*p.F1293del*)), sehr unterschiedliche Phänotypen und Krankheitsverläufe aufwiesen (Neveling et al. 2009). Die Häufigkeiten der FA-Untergruppen schwanken sehr stark, so entfallen die meisten Patienten auf die Gruppen FA-A (60-70%), FA-C (14%) und FA-G (10%) die weiteren Verteilungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Des Weiteren konnten bisher nicht alle diagnostizierten FA-Patienten einer Untergruppe zugeordnet werden. Außerdem ist bekannt, dass Träger von verschiedenen FA-Mutationen eine Prädisposition für verschiedene Tumore aufweisen: *D1* (*BRCA2*) und *O* (*RAD51C*): für Brust- und Ovarialtumore; *J* und *N*: Brusttumore mit niedriger Penetranz; *D1*, *C*, und andere: für Pankreastumore (Romick-Rosendale et al. 2013). Auf molekularer Ebene zeigen die Zellen aller FA-Untergruppen eine hohe phänotypische Homogenität. Sie zeichnet sich durch eine typisch hohe, spontane Chromosomenbruchrate (1-3 Brü-

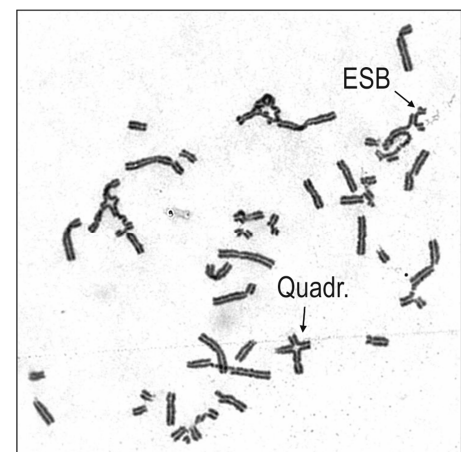


Abb. 4: Blutlymphozyten-Metaphase nach MMC-Behandlung (100 ng/ml) einer Zellkultur, typisch für FA ≥ 10 Chromosomenbrüche, ESB: Einzelstrangbruch, Quadr.:Quadriradialstruktur

che/Metaphase) sowie Sensibilität gegenüber doppelstrangquervernetzenden Substanzen wie Diepoxybutan (DEB), Mitomycin C (MMC) oder Cisplatin (CDDP) aus. Eine Exposition gegenüber diesen Stoffen führt zu einem dosisabhängigen, erhöhtem Anstieg der chromosomalen Bruchraten und Aberrationen wie Translokationen und Ringchromosomen, sowie einer gesteigerten Mortalität und zu verzögertem G2-Phase-Durchlauf (Arrest) (Kupfer 2013; Neveling et al. 2009). Als weiteres gemeinsames Merkmal zeigt sich auch die Sensibilität von verschiedenen Kulturen wie primären Lymphozyten (Joenje et al. 1981), Lymphoblasten (Poot et al. 1996), Fibroblasten (Schindler and Hoehn 1988), erythropoetischen Vorläuferzellen (Alter et al. 1991), primäre Knochenmarkszellen (Cohen-Haguenauer et al. 2006) gegenüber Sauerstoff.

Tab. 1: Auflistung der bisher bekannten FA-Gene, ihr Lokus, sowie deren Häufigkeiten; modifiziert und erweitert nach Alter BP, Kupfer G. Fanconi Anemia. 2002 Feb 14 [Updated 2013 Feb]. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/>) Zu beachten ist die fragliche Zugehörigkeit von FFANCM zu den FA-Genen

Gen (weitere Bezeichnung)	Komplementationsgruppe	chromosomaler Lokus	Anteil der Untergruppe bezogen auf bekannten Mutationen
<i>FANCA</i>	FA-A	16q24.3	60%-70%
<i>FANCB (FAAP95)</i>	FA-B	Xp22.2	~2%
<i>FANCC</i>	FA-C	9q22.32	~14%
<i>FANCD1 (BRCA2)</i>	FA-D1	13q13.1	~3%
<i>FANCD2</i>	FA-D2	3p25.3	~3%
<i>FANCE</i>	FA-E	6p21.31	~3%
<i>FANCF</i>	FA-F	11p14.3	~2%
<i>FANCG (XRCC9)</i>	FA-G	9p13.3	~10%
<i>FANCI (KLA1794)</i>	FA-I	15q26.1	~1%
<i>FANNCJ (BRIP1, BACH1)</i>	FA-J	17q23.2	~2%
<i>FANCL (FAAP43)</i>	FA-L	2p16.1	~0.2%
<i>FANCM (Hef)</i> **	FA-M **	14q21.2	~0.2%
<i>FANCN (PALB2)</i>	FA-N	16p12.2	~0.7%
<i>FANCO (RAD51C)</i>	FA-O	17q22	~0.2%
<i>FANCP (SLX4)</i>	FA-P	16p13.3	~0.2%
<i>FANCQ (XPF, ERCC4)</i>	FA-Q	16p13.3*	gering****
<i>FANCR (RAD51)</i> ***	FA-R***	15q15.1*	gering****
<i>FANCS (BRCA1)</i>	FA-S	17q21.31*	gering****
<i>FANCT (UBE2T)</i>	FA-T	1q32.1*	gering****
<i>unbekannt</i>	?	?	?

* <http://www.genenames.org/> ** fragliche Zugehörigkeit zu FA-Genen *** dominante Mutation beschrieben **** keine Literaturangaben

1.2.3 Die FA-Proteine in der ICL-Reparatur

Die Produkte der FA-Gene bilden gemeinsam mit weiteren Proteinen den sogenannten FA/BRCA-Weg, in welchem die Proteine in verschiedene Gruppen aufgeteilt werden können. Er wird in Abb. 5 dargestellt und nachfolgend anhand dieser beschrieben. Der Weg spielt während der S-Phase und nach Kontakt mit DNA-quervernetzenden Substanzen, wie MMC, eine wichtige Rolle in der Erkennung von kovalenten, replikationsgabelblockierenden DNA-Quervernetzungen, sogenannten *Interstrand Crosslinks* (ICLs). Außerdem koordiniert er ihre Entfernung über NER, TLS und HR (Schindler et al. 2012). Die sich replizierende DNA wird durch den **Remodelingkomplex (I)** (ATP-abhängiges FANCM, FAAP24 und MHF1-MHF2-Heterodimer) umfasst und gescannt. Detektiert dieser einen ICL, rekrutiert er die anderen Kernkomplexproteine (**Kernkomplexes (II)**: FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L, -T) und FAAP100 an die Schadenstelle (Deans and West 2011; Schindler et al. 2012). Außerdem wird FANCM eine Beteiligung an der DNA-Schaden-Signalisierung über ATR zugesprochen (Collis et al. 2008).

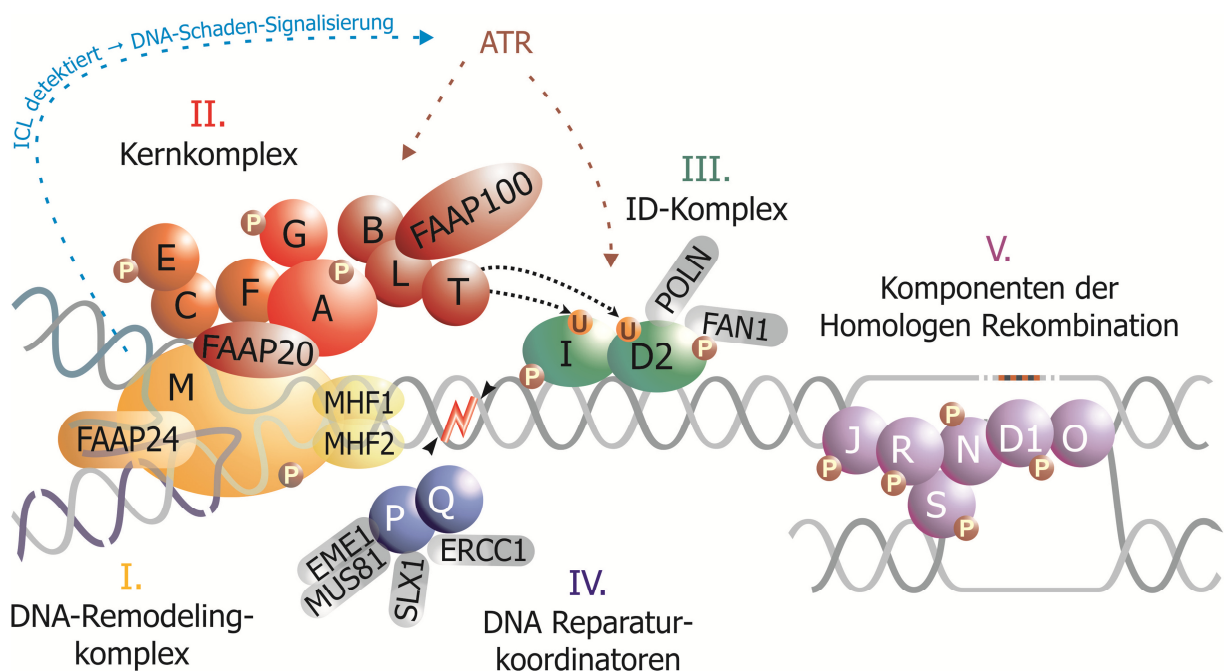


Abb. 5: Schematische Darstellung des FA/BRCA-Weges bestehend aus fünf verschiedenen Proteinuntergruppen (I-V). I: DNA-Remodelingkomplex (Gelbtöne); II: Kernkomplex (Rot/Orange); III: ID-Komplex (Grün); IV: DNA-Reparaturkoordinatoren (Blau); V: Komponenten der Homologen Rekombination (Lila). Der Komplex rund um FANCM (I) scant die sich replizierende DNA rekrutiert nach Detektion eines ICL den Kernkomplex (II) zur Schadenstelle. Zusätzlich spielt FANCM eine Rolle in der ATR-abhängigen DNA-Schaden-Signalisierung. Die Proteine des Kernkomplexes (II) monoubiquitinieren (U) FANCD2 und FANCI und rekrutieren diesen Komplex zum Chromatin. Durch strukturspezifische Endonukleasen wird die Läsion aus der DNA herausgeschnitten (Pfeile, Reparaturkoordinatoren IV). Die entstandene Lücke wird durch Polymerasen mit geringer Spezifität und Translasionssynthese aufgefüllt. Für die korrekte Reparatur wird auf die Homologe Rekombination zurückgegriffen. Am Prozess beteiligte FA-Proteine sind: FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L, -T (II) und FAAP100 (II). Die grau hinterlegten Proteine spielen ebenfalls eine Rolle in diesem DNA-Reparaturweg, gehören aber nicht zu den bekannten FA-Proteinen. Für die nähere Beschreibung siehe Text. (Modifiziert nach Schindler et al. 2012 und Schindler et al. 2015 Manuscript befindet sich in Reviewprozess)

An die DNA gebunden, besteht die Hauptaufgabe des Kernkomplexes in der Monoubiquitinierung der **ID-Komplexproteine (III)** an hoch konservierten Lysin-Resten (D2: Lys561, I: 523). Dieser Schlüssel-

schritt des FA/BRCA-Weges erfolgt (Garcia-Higuera et al. 2001; Longerich et al. 2014) durch das Anhängen des Ubiquitinrestes mittels FANCL, dem eine Ligase 3-Aktivität zugeschrieben wird. Zusätzlich wird FANCT (UBE2T), ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) für diesen Prozess benötigt (Longerich et al. 2014). Die Monoubiquitinierung beider Proteine ist wichtig für die ID-Komplexbildung, für die Aktivierung des FA-Weges scheint jedoch nur die von FANCD2 notwendig zu sein (Wang and Gautier 2010). Wichtig für diesen Schritt ist zusätzlich die Phosphorylierung beider Proteine (Andreassen et al. 2004; Ishiai et al. 2008). Diese und die der Kernkomplexproteine FANCA, -G und -F erfolgt in Abhängigkeit durch CHK1 oder ATR (Ishiai et al. 2008). FANCD2-L, die monoubiquitinierte Form von FANCD2, kolokalisiert mit FANCR (RAD51), FANCS (BRCA1) und weiteren DNA-Reparaturproteinen wie, γ H2AX und PCNA in sogenannten Foci (Bogliolo et al. 2007; Romick-Rosendale et al. 2013), welche als Orte der DNA-Reparatur beschrieben wurden. Der durch die Monoubiquitinierung stabilisierte ID-Komplex (Garner and Smogorzewska 2011) bindet an das Chromatin (Deans and West 2011). Er rekrutiert verschiedene, *downstream* vom ID-Komplex gelegene, FA-Proteine (**DNA-Reparaturkoordinatoren (IV):** P, Q; **Komponenten der HR (V):** D1, J, N, O, R, S) und interagiert mit weiteren Reparaturproteinen, wie der Endo-/Exonuklease FAN1 (Fanconi anemia Associated Nuclease 1) sowie POLN (Deans and West 2011; Garner and Smogorzewska 2011; Romick-Rosendale et al. 2013). Die Helikase FANCI ist bekannt für ihre Interaktion mit der BLM-Helikase und FANCS (BRCA1), welches für das Zusammenfügen und die Verknüpfung gebrochener DNA-Strängen benötigt wird (Hansmann et al. 2012). Ihre genaue Aufgabe im FA/BRCA-Weg ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben (Garner and Smogorzewska 2011; Suhasini and Brosh 2012; Tu et al. 2011). FANCD2 (XPF) spielt gemeinsam mit MUS81 eine Rolle in der ICL-Entfernung. *In vitro* wurde für FANCP (SLX4), im Zusammenhang mit seinem Interaktionspartner SLX1, eine Holliday-Struktur auflösende Aktivität beobachtet. Dabei herrscht Unklarheit welche Aktivität von SLX4 für die ICL-Reparatur wichtig ist (Garner and Smogorzewska 2011). Die Proteine FANCD1 (BRCA2), FANCN (PALB2), FANCO (RAD51C) und FANCT (RAD51) spielen eine wichtige Rolle in der HR (Iyama and Wilson 2013; Schindler et al. 2012) (1.1.3.2.1). Nach dem „Unhooking“ des ICL, dem „Nachaußenklappen“ der Quervernetzung, erfolgt die Reparatur über HR und der NER (1.1.3.1.2) sowie das Auffüllen der DNA-Lücke via TLS (Romick-Rosendale et al. 2013) (1.1.3.3.1). Im Anschluss an die Schadensbehebung wird der FA/BRCA-Weg durch Deubiquitinierung des ID-Komplexes mittels USP1 beendet (Romick-Rosendale et al. 2013).

Zusätzlich zu der replikationsabhängigen ICL-Reparatur findet eine Entfernung dieser Art des DNA-Schadens auch in der G0/G1-Phase des Zellzyklus statt. In diesem HR-unabhängigen Mechanismus, in den NER-Komponenten (XPC und XPA) involviert sind, spielen verschiedene FA-Proteine ebenfalls eine Rolle. Eine Mitwirkung von FANCD2, -I und den Kernkomplexproteinen wurde beschrieben (Garner and Smogorzewska 2011). Des Weiteren wird der FA-Weg durch verschiedene andere Formen von genotoxischem Stress, wie UV- und ionisierende Strahlung, sowie oxidativem Stress aktiviert (Romick-Rosendale et al. 2013).

1.2.4 Diagnostik

Auf Grund der hohen phänotypischen Variabilität kann in einigen Fällen die Diagnose FA nur auf Zellbasis gestellt werden. Hierfür wird die für alle Untergruppen einheitliche Sensitivität gegenüber DNA-doppelstrangquervernetzenden Substanzen genutzt (siehe oben). Diese hohe Empfindlichkeit ermöglicht auch die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen FA und anderen DNA-Reparaturerkrankungen wie Bloom Syndrom, Ataxia Telangiectasia, Xeroderma Pigmentosum, Cockayne Syndrom, oder photosensitive Trichothiodystrophie mit Defekten in der NER (Iyama and Wilson 2013).

Als Standards in der Routinediagnostik werden zweierlei Methoden angewendet, Die Chromosomenbruchanalyse und die zweiparametrische BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Durchflusszytometrie. Mit der Chromosomenbruchanalyse werden die Bruchraten in Metaphasen von Patientenzellen nach Behandlung mit unterschiedlichen MMC- bzw. DEB-Konzentrationen bestimmt (Schroeder-Kurth 1989) (3.6.5). So zeigen 80-100% der PHA-stimulierten peripheren Blut-Lymphozyten von FA-Patienten nach einer DEB-Behandlung (100 ng/ml), Chromatidbrüche und -austausche. Diese Konzentration ist in Nicht-FA-Kontrollzellen nahezu effektivlos (Gregory et al. 2001). Als weitere Methode wird die zweidimensionale BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Durchflusszytometrie (Kubbies et al. 1985) (3.6.1) zur Untersuchung von G2-Phase-Arresten verwendet. Anders als nicht betroffene Zellen arretieren unter physiologischen Bedingungen bereits bis zu 45% der FA-Zellen vorübergehend oder dauerhaft in der G2-Phase. Dieser Anteil erhöht sich weiter nach Induktion von DNA-Schäden. Beide Methoden werden initial meist an Patientenlymphozyten durchgeführt und eignen sich ebenfalls zur Pränataldiagnostik. Bei grenzwertigen Lymphozyten-basierenden Diagnosen sowie der Vermutung einer Mosaikbildung im hämatopoetischen System (1.2.5), werden die Untersuchungen auf Fibroblasten ausgeweitet, da in diesen bisher noch keine Reversionen (1.2.5) beobachtet wurden.

1.2.5 Mutationen, Reversionen und Mosaik in FA

Wie unter 1.2.4 beschrieben, kann für manche Patienten die Diagnose FA nur über die Empfindlichkeit ihrer Zellen gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen bestimmt werden. Dies kann zu einem durch sogenannte milde Mutationen und zum anderen aber durch das Vorhandensein eines hämatopoetischen Mosaiks bedingt sein. Mosaik in Patientenzellen können durch monoallelische Reversionen einer der beiden krankheitsverursachenden Mutationen entstehen. Mögliche Mechanismen dieser spontanen, „natürlichen Gentherapie“, stellen Genkonversion, intragene Crossover, bzw. Rückmutationen und kompensatorische Mutationen (Insertion, Deletion, Missensemutationen) dar (Gross et al. 2002; Pasmooij et al. 2012; Youssoufian and Pyeritz 2002).

Genetische Patchworks von Patientenzellen wurden, außer für FA, für verschiedene andere Krankheiten beschrieben: Lesch-Nyhan Syndrom, Bloom Syndrom, Epidermolysis bullosa, Duchennsche Muskeldystrophie, Tyrosinemia Typ I, Wiskott-Aldrich Syndrom, Adenosine Deaminase (ADA) Defizienz und „Ichthyosis mit Konfetti“ (Ellis et al. 2001; Hirschhorn et al. 1996; Lai-Cheong et al. 2011; May 2011;

Pasmooij et al. 2012). Hierbei scheint die Häufigkeit der Entstehung von Mosaiken abhängig von der Krankheit und der Höhe des Selektionsdrucks im Gewebe zu sein (Youssofian and Pyeritz 2002). Dies erklärt auch die relativ hohe Reversionsrate (10-30%) im hämatopoetischen System von FA-Patienten (Oostra et al. 2012), wobei die beschriebene Mosaikfrequenz zwischen den verschiedenen FA-Komplementationsgruppen variiert. Am häufigsten wurden Mosaik in den Untergruppen FA-A und -D2 beobachtet (Schindler and Hoehn 2007). Obwohl Reversionen in Vorläuferzellen der Patienten entstehen, kann in den meisten Untersuchungen des peripheren Blutes die FA-typische Hypersensibilität gegenüber ICL-induzierenden Agentien noch nachgewiesen werden (Oostra et al. 2012). Jedoch vermindert sich die Sensitivität im Vergleich zu anderen, nicht revertierten Zellen, wie Fibroblasten. Durch die Reversion in einem Teil der Zellen, kommt es typischerweise bei Chromosomenbruchanalysen zu einer bimodalen Verteilung. Diese spiegelt die zwei vorhandenen Zellpopulationen (FA/Nicht-FA) wider, wobei sich die FA-Zellpopulation im Zuge fortschreitender Reversion verringert

1.2.6 Das Hämatopoetische System

Die Blutzellen werden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt, in Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Jede Gruppe erfüllt unterschiedliche Aufgaben: Erythrozyten dienen dem Gastransport zwischen Lunge und Gewebe, Leukozyten sind Zellen der spezifischen und unspezifischen Abwehr und Thrombozyten sind wichtig für die Blutgerinnung. Trotz unterschiedlicher Aufgaben und Morphologie, stammen alle Blutzellen aus dem hämatopoetischem Gewebe.

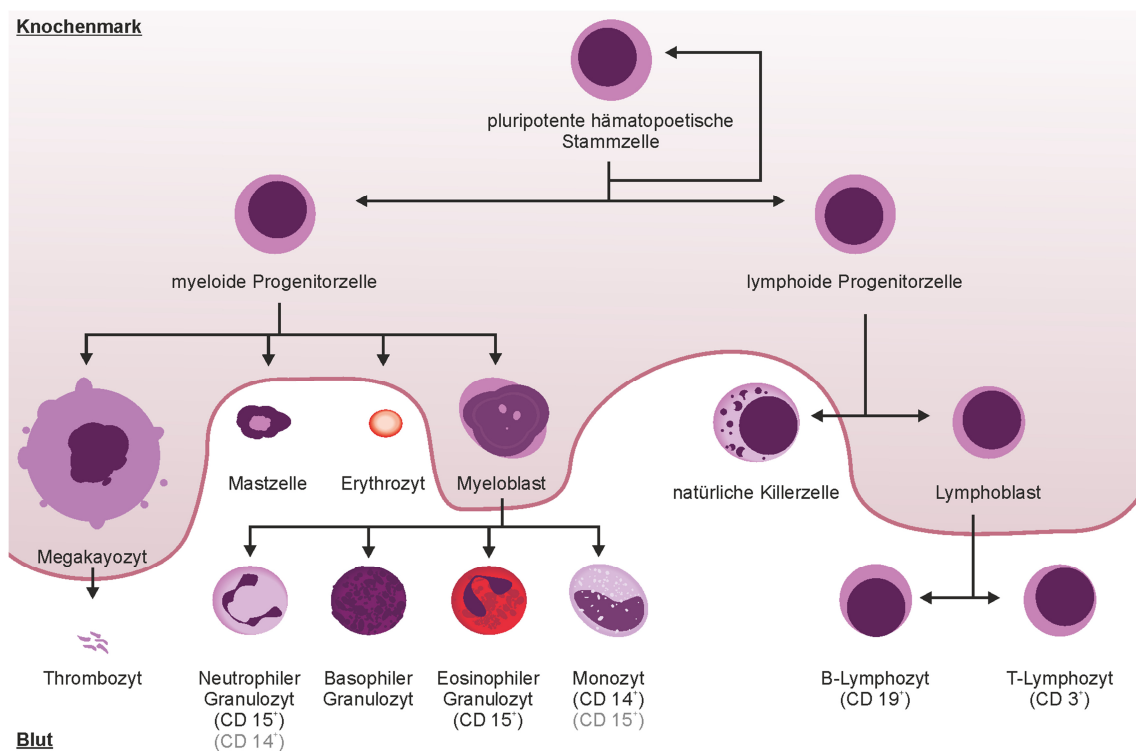


Abb. 6: Übersicht der Hämatopoese und Expression von CD3⁺/CD14⁺/CD15⁺/CD19⁺ Oberflächenmarkern (Grau: schwache Expression) (Modifiziert nach Mikael Häggström)

Die Hämatopoese findet beim Erwachsenen im roten Knochenmark (Medulla ossium) der flachen Knochen (Schädel, Becken, Rippen, Sternum) und zum Teil in den proximalen Bereichen der langen Röhrenknochen von Oberarm und -schenkel statt. Trotz ihrer unterschiedlichen Morphologie und den vielfältigen Aufgaben, stammen alle Blutzellen von gemeinsamen pluripotenten Stammzellen des blutbildenden Gewebes ab. Diese, in zwischen verschiedenen Zellen (Osteoblasten, Endothelzellen, Megakaryozyten, Stromazellen, Fettzellen und extrazellulären Matrixproteinen (z.B. CXCL12, Osteopontin) des Knochenmarks eingebetteten Zellen, haben die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und sich über mehrere Schritte in verschiedene Vorläuferzellen (myeloide/lymphoide Progenitorzellen) zu differenzieren. Aus ihnen entwickeln sich unter Einfluss von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (*colony stimulating factors* (CSF)) und Interleukinen (z.B. IL-3) die einzelnen Blutzelllinien. Außerdem beeinflussen die Hormone Erythropoetin und Thrombopoetin die Differenzierung von Erythrozyten bzw. Thrombozyten. Die Zellen der lymphoiden Linie werden zusätzlich im Thymus (T-Zellen) und im lymphoiden Gewebe des Knochenmarks (B-Zellen) geprägt (Klinke et al. 2003). Ein vereinfachtes Schema der Hämatopoese ist in Abb. 6 dargestellt. Nach Differenzierung zirkulieren die Blutzellen für unterschiedliche Zeitspannen im peripheren Blutkreislauf: Mono- und Granulozyten wenige Tage (Whitelaw 1966; Yousefi and Simon 2002), Erythrozyten 120 Tage (Klinke et al. 2003), B-Lymphozyten (mit Ausnahme der Gedächtniszellen) Tage bis Wochen (Fulcher and Basten 1997), T-Lymphozyten bis zu mehreren Jahren (Tough and Sprent 1995).

1.2.7 Untersuchungsmethoden für somatische Mosaik

Mit MMC oder DEB behandelte Lymphozytenkulturen von Mosaikpatienten zeigen in Chromosomenbruchanalysen ein typisches bimodales Erscheinungsbild der Bruchraten (Gross et al. 2002; Oostra et al. 2012) Abb. 7. Diese Auffälligkeit kann durch das Vorliegen von zwei verschiedenen Populationen (revertierte/ betroffene Zellen), welche unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber diesen Substanzen aufweisen, begründet werden (Oostra et al. 2012).

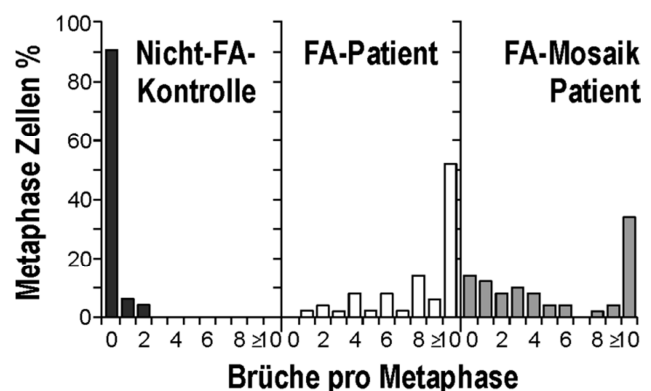


Abb. 7: Chromosomenbruchanalysen MMC (100 ng/ml) behandelter Vollblutkulturen. Schwarz: Nicht-FA-Kontrolle. Weiß: FA-Patient: vermehrt Metaphasen mit ≥ 10 Brüchen. Grau: Mosaikpatient: typische bimodale Verteilung

Auch mittels zweiparametrischer BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Durchflusszytometrie ist eine Mosaikbildung in PHA-stimulierten peripheren B-LCLs zu detektieren. Hierbei weisen Mosaikpatienten eine Verschiebung der G2-Phasearreste hin zu gesunden Kontrollen auf. Diese Verschiebung wird umso ausgeprägter, je stärker sich ein Mosaik durchsetzt. Dies bedeutet, dass mit steigendem Anteil an revertierter Zellen der durchschnittliche G2-Phase-Arrest der Gesamtpopulation sinkt. Dies führt zu einem immer kontrolltypähnlicheren Erscheinungsbild der Zellen in diesem Test. Auf diese Art kann das „sich Durch-

setzen“ von Reversionen im Patientenblut untersucht werden. Dies führt jedoch dazu, dass Patienten ab einem gewissen Anteil revertierter Blutzellen mit dieser Analyse nicht mehr von Gesundkontrollen unterschieden werden können.

Auf molekularer Basis ist die Detektion eines Mosaiks über DNA-Sequenzierung ebenfalls möglich. Unter der Annahme, dass bei heterozygoten Mutationen beide Peaks (Wildtyp (wt)/Mutation (mut)) dieselbe Höhe aufweisen, kann die Verminderung des mut-Peaks verglichen zu dem des wt-Peaks als Reversion gewertet werden. Ein genauerer Einblick in den Entwicklungsstand des Mosaiks in den einzelnen Blutzelllinien (Abb. 6) kann in Verbindung mit einer vorherigen Zellsortierung gewonnen werden. Zu diesem Zweck werden aus dem Vollblut des Patienten die jeweiligen Zellpopulationen sortiert. Dies kann durchflusszytometrisch, oder wie in unseren Studien, MACS-basierend (Verwendung von Magnetbeadgekoppelten Antikörpern) erfolgen. Liegt die Vermutung eines Mosaiks anhand von Chromosomenbruchanalysen und durchflusszytometrischen Tests vor, so kann diese sequenzbasierende Methode weitere Aufschlüsse geben.

Hämatopoetische Mosaik gehen mit einer besseren Prognose für die Patienten einher, denn sie scheinen vor einer Manifestation der Erkrankung im Blut zu schützen (Soulier et al. 2005). Außerdem fördern sie die Stabilität der Blutzellwerte bis hin zum Normalbereich (Alter et al. 2005). Jedoch bleibt das für FA-Patienten typische, stark erhöhte Tumorrisiko für die restlichen somatischen Zellen erhalten. Aus diesem Grund ist es wichtig, trotz fehlender hämatopoetischer Auffälligkeiten, FA-Patienten auch als solche zu erkennen. Für Mosaikpatienten wird außerdem ein engmaschiges Monitoring empfohlen, da sich Reversionen auch wieder zurückbilden können (Gross et al. 2002). Dieses „Mosaikprinzip“ wird auch bei der Behandlung von FA-Patienten angewendet. Um eine hämatologische Manifestation zu verhindern bzw. zu beheben, werden durch hämatopoetische Stammzelltransplantationen (HSZT) künstlich Chimären erzeugt, welche prinzipiell einem vollständig durchgesetzten, natürlich entstandenen Mosaik nahe kommen.

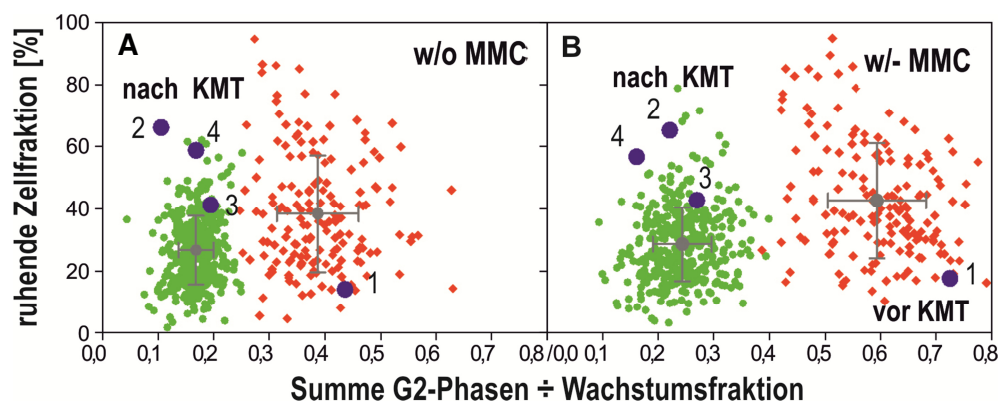


Abb. 8: A+B: Zweiparametrische BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Durchflusszytometrie von PHA-stimulierten Blutlymphozyten eines FA-Patienten vor und nach KMT. Aufgetragen: ruhende Zellfraktion gegen Ratio der Σ G2-Phasezellen /Wachstumsfraktion; Grün: gesunde Kontrollen, Rot: FA-Patienten; Blau: Patient vor (1) und nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) (2-4) Die G2-Phasearreste liegen vor HSZT im Bereich anderer FA-Patienten und nach HSZT auf dem Niveau gesunder Kontrollen **A:** spontane G2-Phasearreste; **B:** mit 10 μ g/ml MMC induzierte G2-Phasearreste

Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 8 dargestellt. Sie zeigt die Ergebnisse einer zweiparametrische BrdU/Hoechst-Zellzyklusanalyse eines Patienten vor und nach einer HSZT.

1.2.8 Behandlung hämatologischer Manifestationen

Eine nichtinvasive Art der Behandlung basiert auf der Gabe von Androgenderivaten (z.B. Oxymetholon, Oxandrolon, Danazol). Diese stimulieren die Produktion von Erythrozyten, häufig die von Thrombozyten, doch selten die Zellen der weißen Linie. Auf diese Behandlung sprechen allerdings nicht alle Patienten an. Bei einem Ansprechen auf die Therapie, können jedoch gute Erfolge über längere Zeiträume erzielt werden. Allerdings wurden in Abhängigkeit der verabreichten Derivate mehr oder weniger stark ausgeprägte Hepatotoxizitäten, Wachstumsretardierungen, Virilisierungen und Lebertumore beobachtet (Rose et al. 2014). Zusätzlich wirkt sich die Behandlung negativ auf eine eventuell später notwendige HSZT aus. Zum heutigen Zeitpunkt stellt die allogene HSZT die häufigste, sowie effektivste Möglichkeit dar, um die Manifestierung der Krankheit im hämatopoetischen System von FA-Patienten zu korrigieren (MacMillan and Wagner 2010). Die Überlebenschancen sind abhängig von der Donorverfügbarkeit, der im Vorfeld durchgeführten Konditionierung, sowie dem Transplantationsalter der Patienten (Rose et al. 2014). In den letzten beiden Jahrzehnten haben sich die Erfolge der Behandlung wesentlich verbessert, wobei die Immunsuppression mittels Fludarabin (Unterdrückung des Abstoßungs-Syndroms) sowie die T-Zell-Depletion (Verringerung der Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung (*Graft versus Host-Disease*/GvHD)) eine wichtige Rolle spielen (MacMillan and Wagner 2010). Lentivirus-basierende, gentherapeutische Ansätze zur Behandlung auf hämatopoetischer Ebene, verzeichnen erste Erfolge. Sie befinden sich jedoch noch im Versuchsstadium (Habi et al. 2010; Tolar et al. 2011; Zhang et al. 2010).

1.3 Die RAD51-Paraloge

Ebenso wie die FA-Proteine spielen RAD51 und seine Paraloge RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur. RAD51 als strukturelles und funktionales Ortholog der *E. coli* Rekombinase A (RecA) bindet wie oben beschrieben, an RPA-ummantelte 3' Einzelstrang-DNA (ssDNA). Dort begünstigt es durch die Ausbildung von langen Nukleofilamenten (präsynaptische Filamente) Schwesterchromatidaustausche (SCEs) innerhalb von RAD51-Foci, den Orten der DNA-Reparatur. Hierbei katalysiert das Protein die DNA-Stranginvasion sowie die Homologie-Suche innerhalb der Schwesterchromatiden (Chun et al. 2013; Compton et al. 2010; Haaf et al. 1995; Li and Heyer 2008; Sigurdsson et al. 2001). Im Menschen sind fünf Paraloge des Proteins bekannt, die in ihrer Aminosäuresequenz 20-30% Homologie zu RAD51, kürzlich ebenfalls als FA-Protein (FANCT) beschrieben, aufweisen. XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51D und das zu den FA-Proteinen gehörende RAD51C (FANCO). Neben FANCO scheint ein weiteres RAD51-Paralog mit FA in Verbindung zu stehen. Die Autoren der Studie weisen jedoch auf notwendige, zusätzliche Untersuchungen hin (Shamseldin et al. 2012). Weitere Bezeichnungen und der chromosomale Locus der Proteine sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab. 2: Übersicht der RAD51 Paraloge, weitere Bezeichnungen, sowie ihre Lokalisierung im Genom (nach HGNC (<http://www.genenames.org/>))

Gen (weitere Bezeichnung)	Chromosomaler Locus
<i>RAD51</i> (<i>FANCT</i>)	15q15.1
<i>RAD51B</i> (<i>RAD51L1, bREC2, R51H2</i>)	17q25.1
<i>RAD51C</i> (<i>RAD51L2, FANCO</i>)	14q23-q24.2
<i>RAD51D</i> (<i>RAD51L3/R51H3</i>)	17q11
<i>XRCC2</i>	7q36
<i>XRCC3</i>	14q32.3

Die Homologie konzentriert sich hauptsächlich um die in RAD51 und den fünf Paralogen vorhandenen Walker A- und Walker B- Motive (Gruver et al. 2005; Thompson and Schild 1999; Walker et al. 1982), welche für die Bindung und Hydrolyse von ATP wichtig sind (Park et al. 2008). Deshalb geht man davon aus, dass sie aus Genduplikationen evolvierten (Thompson and Schild 2002). Es ist bekannt, dass Mutationen in jedem einzelnen dieser Proteine zu einer hohen Sensibilität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen führen. Da dies in Vertebratenzellen zu spontanen Chromosomenaberrationen und in humanen (*XRCC2*, *XRCC3*), sowie Hühnchenzellen (*RAD51B*, -C, -D, *XRCC2*, *XRCC3*) zu einer verminderten RAD51-Foci-Bildung führt, wird den Paralogen eine Rolle in der HR angedacht (Bennett and Knight 2005; Compton et al. 2010; Godthelp et al. 2002; Yokoyama et al. 2004).

1.3.1 Komplexbildung und Aufgaben

Die Paraloge lagern sich *in vivo* zu zwei verschiedenen Komplexen zusammen: einem CX3-Heterodimer und einem RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2- (BCDX2)-Heterotetramer (Liu et al. 2002; Masson et al. 2001a; Wiese et al. 2002), wobei Letzteres aus den zwei Subkomplexen RAD51B-RAD51C (BC) und RAD51D-XRCC2 (DX2) besteht (Braybrooke et al. 2000; Dosanjh et al. 1998; Miller et al. 2002; Schild et al. 2000; Sigurdsson et al. 2001; Wiese et al. 2002) (Abb. 9). Obwohl für beide Komplexe, sowohl in An- als auch in

Abwesenheit von DNA, ringförmige Strukturen beobachtet werden konnten (Compton et al. 2010), werden RAD51B und XRCC2 nur über RAD51C bzw. über RAD51D in den BCDX2-Komplex eingebunden (Masson et al. 2001b; Miller et al. 2005; Schild et al. 2000). Eine indirekte, über RAD51C vermittelte Interaktion zwischen RAD51B und RAD51D, sowie RAD51B und XRCC2, wurde ebenfalls beobachtet (Liu et al. 2002; Masson et al. 2001b). Für beide Komplexe wird eine Beteiligung an der BRCA1-BRCA2-abhängigen HR vermutet. Dabei übernehmen sie Aufgaben in verschiedenen Phasen des Reparaturprozesses: BCDX2 *upstream* und CX3 *downstream* der RAD51-Rekrutierung an die Orte der DNA-Schadenstellen (Chun et al. 2013). Für die Subkomplexe BC und DX2 wurden Interaktionen mit ssDNA und ATPase-Aktivität beobachtet. Der stabile CX3-Komplex (Kurumizaka et al. 2001; Li and Heyer 2008; Wiese et al. 2002) katalysiert in Säugerzellen die Paarung von homologen Sequenzbereichen und wird mit der Auflösung von HJs assoziiert (Compton et al. 2010; Liu et al. 2004; Liu et al. 2007; Nagaraju et al. 2009). Dabei wird RAD51C als enzymatische Einheit für die homologe Paarung und X3 als DNA-bindende Untereinheit verstanden (Kurumizaka et al. 2001). Für X3 wurde in Y2H eine Interaktion mit RAD51 beobachtet (Liu et al. 1998), außerdem scheint das Protein *in vivo* die RAD51-Fociformierung als Schadensantwort zu fördern (Bishop et al. 1998).

1.3.2 RAD51C (FANCO)

Als Mitglied des FA/BRCA-Weges spielt RAD51C eine Rolle in der ICL-Entfernung. Während monoallelische Keimzell- (Meindl et al. 2010) oder Epimutationen (Hansmann et al. 2012) in diesem Tumorsuppressor-Gen zu einer erhöhten Frequenz von Brust- in Verbindung mit Ovarialtumoren führen, bilden Patienten mit biallelischen Defekten einen FA-ähnlichen Phänotyp (Meindl et al. 2010; Vaz et al. 2010) aus. RAD51C-defiziente Zellen sind sensitiv gegenüber MMC sowie dem Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin und zeigen eine mäßige Radiosensitivität (Vaz et al. 2010). Auf molekularer Ebene weisen sie verminderte SCEs und RAD51-Focibildung auf, was zu einer mangelnden ICL-Reparatur und somit zu erhöhten Chromosomenbruchraten führt. Beruhend auf solchen und weiteren Beobachtungen, wie die Involvierung des Proteins in die Auflösung von HJ gemeinsam mit X3 und anderen Faktoren (Liu et al.

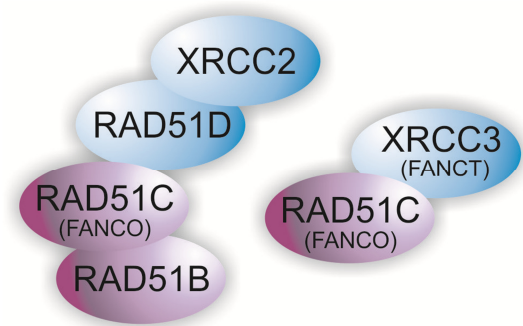


Abb. 9: Komplexbildung innerhalb der RAD51-Paraloge beruhend auf bisherigen Studien

2004), wird RAD51C eine wichtige Rolle in der RAD51-vermittelten HR zugeschrieben. Ein weiterer Hinweis Rolle stellt das Vorhandensein des Proteins an den DNA-Schadenstellen nach der Auflösung der RAD51-Nukleofilamente dar. Zusätzlich unterstützt RAD51C auch die, auf Phosphorylierung basierende Aktivierung, von CHK2 (Checkpoint-Kinase) und scheint somit an der Regulierung des Zellzyklus nach DNA-Schädigung beteiligt zu sein (Badie et al. 2009). Zum Verständnis der Bindung von RAD51C an die DNA und andere Proteine wäre eine Aufklärung der atomaren Struktur des Proteins von großem Nutzen. Zusätzlich könnten anhand dieser Auswirkungen von Mutationen auf das Protein besser verstanden werden. Zu Beginn der Studie konnte auf eine solche nicht zurückgegriffen werden, weshalb diesbezügliche Vorhersagen nur auf RAD51-basierenden Modellen getroffen werden konnten.

1.3.3 Proteininteraktionsstudien mit RAD51C (FANCO)

Die bisherigen Erkenntnisse zur Komplexbildung der RAD51-Paraloge beruhen auf Yeast Two-/Three-Hybridstudien (Y2-/3H), Immunopräzipitationen (IP), Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) oder Pull-down-Experimenten in Baculovirus-Systemen bzw. humanen Zelllinien. Mit all diesen etablierten Methoden zur Interaktionstestung, können, mit Ausnahme von Y2/3H-Studien, nur Aussagen über eine Interaktion, nicht aber über deren Intensität getroffen werden. Dies und die Möglichkeit, dass äußere Einflüsse und Modifikationen (z.B. untypische Methylierungen) in nichthumanen Systemen verändernd auf die Proteininteraktionen wirken können, veranlasste uns, weitere Studien in einem humanen Zellsystem durchzuführen. Ein weiterer Grund für diese Entscheidung lag in der Beobachtung, dass heterologe Expressionen das Interaktionsverhalten der Proteine beeinflussen können (Wiese et al. 2002). Die Methodenwahl fiel auf das Mammalian Two-/Three-Hybridsystem (M2/3H-System) gepaart mit einem Luziferase-Assay. Als Reportergene wurden die Gene der Firefly- und Renilla-Luziferase genutzt. Die bei Interaktion abgelesene Firefly-Luziferase setzte ihr Substrat unter Entstehung von Lumineszenz um. Die als Kontrolle mitgeführte Renilla-Luziferase hingegen benötigt keine durch Proteininteraktion bedingte Aktivierung. Die aus der Luziferase-Aktivität resultierende Lumineszenz wurde mit Hilfe eines Luminometers gemessen. Als ergänzende Methode und zur Validierung von detektierten Interaktionen, wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt.

1.4 Fragestellung

Die Arbeit ist in drei Projekte gegliedert, in deren Mittelpunkt die rezessiv, autosomal bzw. X-chromosomal vererbte Erkrankung Fanconi Anämie (FA) steht. Hierbei handelt es sich um eine DNA-Reparaturstörung mit Defekten im FA/BRCA-Weg, welcher eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Quervernetzungen, den sogenannten Interstrand-Crosslinks (ICLs) spielt. Zur Behebung dieser Schäden spielen die Transläsions-Synthese (TLS), die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und die Homologe Rekombination (HR) zusammen. Defekte im FA/BRCA-Weg führen auf zellulärer Ebene zu erhöhten Chromosomenbruchraten, -aberrationen sowie einer gesteigerten Apoptose, aus denen wiederum erhöhte Tumorrisiken resultieren.

Das erste Projekt soll einen Beitrag zur Aufklärung von somatischen Mosaiken in FA, als eine Art „natürliche Gentherapie“ leisten. Basierend auf Blutwerten, durchflusszytometrischen Zellzyklusuntersuchungen, Chromosomenbruchanalysen und DNA-Sequenzanalysen soll die Entstehung und Durchsetzung der spontanen Reversionen in einzelnen Blutzelllinien untersucht werden. Hierfür werden Daten, Zellen und Blut von fünf relativ mild betroffenen FA-A- und FA-D2-Patienten unterschiedlichen Alters, sowie unterschiedlichen Stadiums der Mosaikentwicklung herangezogen.

Das zweite Projekt gilt der qualitativen und quantitativen Untersuchung von Proteininteraktionen von FANCO (RAD51C) mit vier weiteren RAD51-Paralogen (RAD51B, RAD51D, XRCC2, XRCC3), RAD51 und dem kürzlich als Interaktionspartner identifizierten FANCN (Park et al. 2013). Bisherige Erkenntnisse zu Interaktionen basieren auf nichthumanen und *in vitro* Systemen, beziehungsweise auf Methoden, die keine Aussagen über die Intensitäten der Bindungen zulassen. Das Ziel besteht darin, die bisherigen Erkenntnisse über Interaktionen innerhalb der Paraloge in einem zellulären humanen System zu überprüfen. Zusätzlich sollen Auswirkungen dritter Interaktionspartner, die von MMC-induzierten DNA-Schäden auf die Interaktionsstärke, sowie die der Patientenmutation c.773G>A (p.R258H) untersucht und mögliche weitere Interaktionen aufgedeckt werden. Um ein möglichst reales Umfeld zu gewährleisten, werden Mammalian-Two und -Three-Hybrid-Analysen in Verbindung mit HeLa-Zellen herangezogen.

Das dritte Projekt soll zur Aufklärung der Proteinstruktur von FANCO (RAD51C) führen, um so die Auswirkung von Patientenmutationen besser beurteilen zu können. Zusätzlich sollen Einflüsse verschiedener Mutationen auf die Protein-DNA-Bindung untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Zellkultur

2.1.1 Chemo-kompetente Zellen

Bezeichnung	Hersteller
ArcticExpress Competent Cells	Agilent Technologies
BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL Competent Cells	Stratagene
BL21 Star™ (DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent	Life Technologies
MAX Efficiency® DH10Bac™ Competent Cells	Life Technologies
One Shot® TOP 10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Life Technologies
Rosetta™ 2 (DE3) Competent Cells	Merck Millipore
XL10 Gold® Ultracompetent Cells	Agilent Technologies

2.1.2 Human- / Insektenzelllinien

Bezeichnung	Organismus	Hersteller
HeLa (Zervixkarzinom-Epithelzellen)	<i>Homo Sapiens</i>	DSMZ
HEK 293 (Embryonale Nierenzellen)	<i>Homo Sapiens</i>	DSMZ
SF9	<i>Spodoptera frugiperda</i>	
IPLB-SF21 AE	<i>Spodoptera frugiperda</i>	
Tn5 (H5; High Five™ Insect Cells;	<i>Trichoplusia ni</i>	

2.1.3 Zellkulturmedien und Kulturplatten

Bezeichnung	Hersteller / Komponenten
MEM + GlutaMAX™-I	Gibco
RPMI1640 + GlutaMAX™-I	Gibco
TrypLE™ Express	Gibco
EX-Cell (TM) 420 w/L-glut	Sigma Aldrich
Einfriermedium (humane Zellkultur)	80 % RPMI-Medium; 10 % FCS; 10 % DMSO
Einfriermedium (Insektenzellkultur)	10 % DMSO; 45 % altes Medium (Überstand von Zentrifugation); 45 % frisches Medium
LB-Medium	25 g LB-Broth, ad 1 l dH ₂ O
Autoinduzierendes Medium (2 l) (Studier et al. 2005)	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt): 40 ml 50x 5052, 40 ml 50x M, 4 ml 1 M MgSO ₄ , 400 µl 1000x Metal-Mix
Selektionsplatten (1l)	20 g LB-Broth, 15 g Agar, je 1 ml Antibiotikum
Bacmid-Selektionsplatten (1l)	20 g LB-Broth, 15 g Agar, 200 µl IPTG (Stock 200 mg/ml), 5 ml X-Gal (Stock: 20 mg/ml), 1 ml Tetracyclin, 1 ml Gentamycin, 1 ml Kanamycin

2.1.4 Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin (Stocklösung: 10 mg/ml)	Carl Roth
Chloramphenicol (Stocklösung: 10 mg/ml)	Carl Roth
Gentamycin (Stocklösung: 7 mg/ml)	Carl Roth
Kanamycin (Stocklösung: 50 mg/ml)	Carl Roth
Tetracyclin (Stocklösung: 10 mg/ml)	Carl Roth

2.2 Enzyme

2.2.1 Polymerasen

Bezeichnung	Hersteller
Bio-X-ACT™	Biolines
PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase AD	Agilent Technologies
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher

2.2.2 Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Bam</i> HI	NEB
<i>Dpn</i> I	NEB
<i>Eco</i> RI	NEB
<i>Mlu</i> I	NEB
<i>Sa</i> I	NEB
<i>Sma</i> I	NEB

2.2.3 weitere Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics
DNase	Life Technologies
ExoSAP-IT	Affymetrix
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	Thermo Fisher
Superscript™ II RNase H-Reverse Transkriptase	Life Technologies
T4-Ligase	NEB

2.3 Nukleotide und Oligonukleotide

2.3.1 Oligonukleotidprimer für PCR, Sequenzierungen und Klonierungen:

Vor Verwendung der Primer wurde die in einer Konzentration von 100 pmol angesetzte Stammlösung mit dH₂O auf 10 pmol verdünnt. Die Sequenzen sind in Anhang 1, Primersequenzen, aufgeführt. Sie wurden mit Hilfe der GeneRunner- (Version 3.05) bzw. der Primer-Blast-Software designt.

2.3.2 Weitere Oligonukleotide

Bezeichnung	Hersteller
Desoxyribonukleotide (je 100 mM)	biomers.net
Oligo-(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5 µg/µl)	Life Technologies

2.3.3 *E. coli*-Codon-optimierte Sequenz des humanen RAD51C in pMA-T

Die humane RAD51C-Sequenz wurde für Expressionen in *E. coli* Codon-optimiert (GeneArt, Regensburg; Sequenz siehe Anhang)

2.4 Expressionsvektoren

2.4.1 Mammalian Two-Three-Hybrid Assay

Vektor	Größe	Funktion
<i>Matchmaker™ Mammalian Assay Kit 2 *</i>		
pM*	3,5 kb	Träger der Bindedomäne / zur Generierung und Expression von Fusionsproteinen
pVP16-Vektor*	3,3 kb	Träger der Aktivierungsdomäne / zur Generierung und Expression von Fusionsproteinen
<i>Weiterer Vektor</i>		
pCMV-Tag3b**	4,3 kb	Säuger-Expressionsvektor für natives Protein
<i>Luciferase Reporter-Vektoren ***</i>		
pRL-null	3,2 kb	Träger des Renilla Luciferase Reportergens (konstitutiv aktiv)
pGL4.31[luc2P/GAL4UAS/Hygro]	6,1 kb	Träger des Firefly Luciferase Reportergens

* Clontech Laboratories Inc. Mountain View, USA; ** Agilent, Santa Clara, USA; *** Promega Corp., Madison, USA

2.4.2 Mammalian Three-Hybrid Assay (Konstrukte von Alexandra Sobock)

Vektor	cDNA	Schnittstellen
pCMV-Tag3B_RAD51A	RAD51	SalI/SalI
pCMV-Tag3B_RAD51B	RAD51B	EcoRI/XhoI
pCMV-Tag3B_RAD51C	RAD51C	EcoRI/XhoI
pCMV-Tag3B_RAD51D	RAD51D	EcoRI/EcoRI
pCMV-Tag3B_XRCC2	XRCC2	EcoRI/EcoRI
pCMV-Tag3B_XRCC3	XRCC3	EcoRI/XhoI

2.4.3 Weitere Vektoren

Vektor	Größe (kb)	Verwendung
pBADM-11*	4,1	Expressionsvektor in <i>E. coli</i> (n-terminaler 6xHis –Tag)
pETM-11*	6,0	T7 Expressionsvektor in <i>E. coli</i> (n-terminaler 6xHis –Tag)
pET21-b(+)**	5,4	T7 Expressionsvektor in <i>E. coli</i> (n-terminaler 6xHis –Tag)
pET28-a(+)**	5,4	T7 Expressionsvektor in <i>E. coli</i> (c-terminaler 6xHis –Tag)
pFastBac™ HTa**	4,8	Expressionsvektor zu Bacmidgenerierung in Insektenzellen (n-termin. 6xHis –Tag)
pFastBac™ Dual**	5,2	Expressionsvektor zu Bacmidgenerierung in Insektenzellen (n-termin. 6xHis –Tag)
pCMV-Tag3b****	4,3	Expressionsvektor für Foci-Analysen (n-terminaler 6xHis –Tag)

* EMBL, Heidelberg, DE; ** Life Technologies, Carlsbad, USA; *** Merck KGaA, Darmstadt, DE; **** Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA

2.5 Chemikalien und Reagenzien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle üblichen Chemikalien bei den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Steinheim), Hampton Research (Laguna Hills, USA), Merck (Darmstadt), Life Technologies (Carlsbad, USA) oder Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK) in mindestens analytischem Reinheitsgrad bezogen.

Bezeichnung	Hersteller
Borsäure	Riedel-de-Haën
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
destilliertes Wasser	DeltaSelekt
DPBS	PAN-Biotech GmbH
Ficoll-Paque PLUS	Amersham Biosciences
GeneJuice® Transfection Reagent	Merck KGaA
HiDi™ Formamide	Applied Biosystems
PBS (x10)	PAA Laboratories

2.6 Gele, Puffer

2.6.1 SDS-PAGE: Gele und Puffer (kommerziell)

Bezeichnung	Hersteller
NuPAGE® Novex® 7 % Tris-Acetat Gel, 1,5 mm, 10 well	Life Technologies
Novex® Tris-Acetat SDS Running Buffer	Life Technologies
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	Life Technologies
NuPAGE® Transfer Puffer (20X)	Life Technologies

2.6.2 SDS-PAGE: Gele und Puffer

Bezeichnung	Komponenten
Sammelgel (5 %)	3,4 ml H ₂ O, 830 µl Rotiphorese® Gel 30, 630 µl 1 M Tris-HCL (pH 6.8), 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 5 µl TEMED
Trenngel (15 %)	3,4 ml H ₂ O, 7,5 ml Rotiphorese® Gel 30, 3,8 ml 1.5 M Tris-HCL (pH 8.8), 150 µl 10 % SDS, 150 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 6 µl TEMED
Laufpuffer	192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, 25 mM Tris

2.6.3 Native Gele

Bezeichnung	Komponenten
TBE-Gel	4-8 % AA:Bis (37,5:1; 30 %), 10 mM MgCl ₂ , 40 µl TEMED, 400 µl 10 % APS, ad 50 ml dH ₂ O
Tris-Glycin-Gel:	4-8% AA:Bis (37,5:1; 30 %), 40 µl TEMED, 400 µl 10 % APS, ad 50 ml Tris-Glycin MgCl ₂ -Puffer

2.6.4 Längenstandards

Bezeichnung	Hersteller
100 bp & 1 kb DNA Ladder,	NEB
FastRuler™ DNA Ladders, ready-to-use	Fermentas
Precision Plus Protein™ Standards, All Blue	BioRad

2.6.5 Gel-Ladepuffer

Bezeichnung	Hersteller / Komponenten
6x Gel-Ladepuffer Glycerin, Orange G	Carl Roth
6x Gel-Ladepuffer Glycerin, Orange G,	Carl Roth
Xylencyanol -/Bromphenol-blau	
Ladepuffer	50 mM Tris-HCL (pH 6,8), 100 mM DTT, 10 % Glycerin, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, Laufpuffer für denaturierende Gele: 192 mM Glyc- rin, 25 mM Tris (pH 6.8), 0,1 % SDS
2,5x HSE-Puffer:	4 M Harnstoff, 50 mM Na ₂ EDTA; 50 % (w/v), Saccharose, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol

2.6.6 Sonstige Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Komponenten
Erythrozyten-Lysispuffer (4°C)	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0.1 mM EDTA
MACS-Puffer (4°C):	495,5 ml 1xPBS; 2,0 ml EDTA 0,5 M (2 mM); 2,5 ml FCS (0,5 %)
Stripping-Puffer (pH2,2)	15 g Glycin; 1 g SDS; 10 ml Tween20; ad 1l dH ₂ O
PBS-T	1x PBS; 0,05 % (v/v) Tween®20
5 % Milch/PBS-T	100 ml PBS-T, 5 g Milchpulver
SE-Puffer (pH8,0)	75 mM NaCl ₂ ; 25 mM Na ₂ EDTA
TAE	20 ml Modifiziertes TAE Puffer Konzentrat (50x), 980 ml dH ₂ O
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 1 mM Na ₂ EDTA
TBE	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM Na ₂ EDTA
Tris-Glycin MgCl ₂ -Puffer	14 g Glycin, 3 g Tris, 10 ml 1M MgCl ₂
50x 5052	25 % Glycerin; 2,5 % Glucose; 10 % Lactose; 50x M: 1,25 M Na ₂ HPO ₄ ; 1,25 M KH ₂ PO ₄ , 2,5 M NH ₄ Cl, 0,25 M Na ₂ SO ₄
50x M:	1,25 M NaCl, 1,25 M KH ₂ PO ₄ , 1,25 M NH ₄ H ₂ PO ₄ , 0,25 M Na ₂ SO ₄
1000x Metal-Mix:	50 mM FeCl ₃ , 20 mM CaCl ₂ , 10 mM MnCl ₂ , 10 mM ZnSO ₄ , 2 mM CoCl ₂ , 2 mM CuCl ₂ , 2 mM NiCl ₂ , 2 mM Na ₂ MoO ₄ , 2 mM H ₃ BO ₄ , 60 mM HCl
Lysispuffer (Co-IP)	50 mM Tris HCL (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1 % X-100 Triton; Proteaseinhibitorcocktail-Tablette, EDTA-free und PhosSTOP-Tablette
<i>initiale Puffer</i>	
initialer Lysispuffer (pH 8,0)	50 mM Tris-HCL, 250 mM NaCl
initialer Waschpuffer (pH 8,0)	50 mM Tris-HCL, 1 M NaCl
initialer Elutionspuffer (pH 8,0)	50 mM Tris-HCL, 250 mM NaCl, 500 mM Imidazol
Äktapuffer	50 mM Tris-HCL, 250 mM NaCl
<i>alternative Puffer</i>	
Lysispuffer 1 (pH 8,0)	50 mM Tris-HCL, 1 M NaCl
Lysispuffer 2 (pH 8,0)	100 mM Tris-HCL , 250 mM NaCl, 1 M Guanidiniumhydrochlorid
Lysispuffer 3 (pH 8,0)	50 mM Tris-HCL), 250 mM NaCl, 0,1 % Tergitol-Typ NP40 Nonyl Phenoxy-polyetoxyethanol
Lysispuffer 4 (pH 8,0)	100 mM Tris-HCL , 1 M NaCl, 0,1 % NP-40, 1 M Guanidiniumhydrochlorid
<i>pH 9.0 Puffer</i>	
Lysispuffer (pH 9,0)	50 mM Tris-HCL , 100 mM NaCl, 0,1 % Tergitol-Typ NP40 Nonyl Phenoxy-polyetoxyethanol
Lysispuffer (pH 9,0) A	50 mM Tris-HCL 250 mM NaCl, 0,1 % Tergitol-Typ NP40 Nonyl Phenoxy-polyetoxyethanol
Waschpuffer (pH 9,0)	50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Waschpuffer A (pH 9,0)	50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Elutionspuffer (pH 9,0)	50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazol
Äktapuffer	20 mM TrisHCL, 150 mM NaCl

Bezeichnung	Komponenten
<i>Phosphatpuffer</i>	
Phosphat-Lysispuffer (pH 7,0), Phosphat-Waschpuffer (pH 7,0), Phosphat Elutionspuffer (pH 7,0), <i>Puffer nach Compton et al. 2010</i>	50 mM Natriumphosphatpuffer, 250 mM KCL, 0,1 % NP-40
Lysipuffer /Puffer A (pH 7,4)	50 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M KCL
Waschpuffer (pH 8,0)	50 mM Natriumphosphatpuffer, 250 mM KCL, 500 mM Imidazol;
Elutionspuffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCL, 400 mM NaCl, 8 mM BME, 0,5 % NP-40
Äktapuffer (pH 7,4)	Puffer A + 30 mM Imidazol, + 5 % Glycerol
	Puffer A + 250 mM Imidazol, + 10 % Glycerol;
	10 mM Tris-HCL, 400 mM NaCl, 8 mM BME, 5 % Glycerol;
<i>Variationen nach Compton et al. 2010</i>	
Lysipuffer/Waschpuffer (Puffer B) (pH 7,4)	50 mM Tris-HCL 500 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 0,5 NP-40 (Tergitol), 5 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 1 Tablette Proteinase Inhibitor, 2,5 µl DNase;
Elutionspuffer	Puffer B + 250 mM Imidazol;
Äktapuffer B (pH 7,4);	50 mM Tris-HCL, 400 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 10 % Glycerol
Gel-Shift-Assay-Puffer (pH 7,4)	50 mM Tris-HCL, 200 mM KCL, 5 mM MgCL2, 10 % (w/v) Glycerol

2.7 Pufferscreen: Thermal Shift Assay - alle Puffer [100 mM]

	1	2	3	4	5	6
A	citrate (pH 4,5)	Bis-Tris (pH 7,0)	Imidazole (pH 6,5)	Hepes (pH 8,0)	Tris (pH 8,5)	Elutionspuffer Protein
B	acetate (pH 4,6)	ADA (pH 6,5)	Imidazole (pH 8,0)	HEPES (pH 8,5)	Tris (pH 9,0)	Elutionspuffer Protein
C	MES (pH 5,5)	ADA (pH 7,0)	Na/K PO4 (pH 6,8)	BICINE (pH 8,0)	TAPS (pH 8,0)	Elutionspuffer Protein
D	MES (pH 6,5)	Bis-Tris propane (pH 6,0)	Na/K-PO4 (pH 7,5)	BICINE (pH 8,5)	TAPS (pH 9,0)	Elutionspuffer Protein
E	Cacodylate (pH 6,0)	Bis-Tris propane (pH 7)	MOPS (pH 7,0)	BICINE (pH 9,0)	Glycylglycine (pH 8,5)	Elutionspuffer Sypro®Orange
F	Cacodylate (pH 6,5)	PIPES (pH 6,5)	MOPS (pH 7,5)	Tris (pH 7,0)	CHES (pH 9,0)	Elutionspuffer Sypro®Orange
G	Bis-Tris (pH 5,5)	PIPES (pH 7,0)	HEPES (pH 7,0)	Tris (pH 7,5)	CHES (pH 9,5)	Elutionspuffer Sypro®Orange
H	Bis-Tris (pH 6,5)	PIPES (pH 7,5)	HEPES (pH 7,5)	Tris (pH 8,0)	CAPS (pH 9,8)	Elutionspuffer Sypro®Orange

2.8 Färbung

2.8.1 Farbstoffe

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
Coomassie Brilliant Blue R250	Coomassie-Färbung	Thermo Fischer
Ethidiumbromid	Durchflusszytometrie	Molecular probes
Ethidiumbromid	Agarosegele	AppliChem
Giemsa-Stammlösung	Chromosomenfärbung	Carl Roth
Hoechst 33258	Durchflusszytometrie	Sigma Aldrich
Hoechst 33342	Durchflusszytometrie	Sigma Aldrich
Trypanblau	Humane Zellkultur	Carl Roth
SYPRO® Orange	Thermal Shift Assay	Sigma Aldrich

2.8.2 Lösungen für Färbungen

Färbung	Lösung	Komponenten
<i>Coomassie</i>	Färbelösung	0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250; 20 % (v/v), 50 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure
	Entfärbelösung	Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure
<i>Silber</i>	Fixierlösung	50 % Ethanol, 10 % Essigsäure
	Sensitivierungslösung	0,02 % Na Thiosulfat: 10 mg / 50 ml H ₂ O
	Färbelösung	0,2 % AgNO ₃ : 100 mg / 50 ml + 37,5 µl Formaldehyd
	Entwicklerlösung:	6 % Na ₂ CO ₃ : 3 g / 50 ml + 25 µl Formaldehyd
<i>Giemsa</i>	Giemsa Lösung	5 ml Giemsa (gefiltriert), 85 ml dH ₂ O, 10 ml Sörensenpuffer

2.9 Antikörper

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
CD8-PE	Durchflusszytom.	Miltenyi Biotec
CD4-FITC	Durchflusszytom	Miltenyi Biotec
CD14-FITC	Durchflusszytom	Miltenyi Biotec
CD15-FITC	Durchflusszytom	Miltenyi Biotec
CD19-PE	Durchflusszytom	Miltenyi Biotec
CD45-APC	Durchflusszytom	Miltenyi Biotec
Anti-RAD51C Antibody (ab55728)	Western Blot	Abcam plc
Anti-Rad51D antibody (ab117942)	Western Blot	Abcam plc
RAD51D (PA116536)	Western Blot	Thermo Fisher
RAD51D (MA116542)	Western Blot	Thermo Fisher
Anti-RAD51L1 Antibody (ab168402)	Western Blot	Abcam plc
Anti-XRCC2 antibody (ab137373)	Western Blot	Abcam plc
Anti-XRCC2 antibody (GTX100113)	Western Blot	GeneTex
Anti-XRCC3 antibody (ab2368)	Western Blot	Abcam plc

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
Anti-XRCC3 antibody (ab58467)	Western Blot	Abcam plc
6-His [HHHHHHH] (Host Mouse) MMS 156P	Western Blot	Covance
Donkey Anti-Mouse IgG (HRP) (ab98665)	Western Blot	Abcam plc
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab97064)	Western Blot	Abcam plc
Goat Anti-mouse IgG-HRP (sc-2005)	Western Blot	Santa Cruz
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab97051)	Western Blot	Abcam plc
Anti-Nuclear Matrix Protein p84 antibody [5E10] -Nuclear Marker (ab487)	Western Blot	Abcam plc
Anti-GAPDH antibody - Loading Control (HRP) (ab9385)	Western Blot	Abcam plc
Whole Blood CD3 /CD14/CD15/CD19 MicroBeads	MACS	Miltenyi Biotec

2.10 „Kits“ und Untersuchungssysteme

Bezeichnung	Hersteller
ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit	PE Biosystems
Bac-to-Bac [®] Baculovirus Expression System	Life Technologies
BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
In-Fusion [™] Advantage PCR Cloning System	Clontech
DNA Clean & Concentrator [™] Kit	Zymo Research
Dual-Glo [™] Luciferase Assay System	Promega Corp
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics
Illustra [™] GFX PCR DNA und Gel Band Purification Kit	Amersham
Immobilon [™] Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Corp
Matchmaker [™] Mammalian Assay Kit2	Clontech
Miniprep Kit „Nucleospin [®] Plasmid“	MACHEREY-NAGEL
Micro-to-Midi Total RNA Purification System	Life Technologies
pecGOLD Total RNA Kit	PEQLAB
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (250)	QIAGEN
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit (25)	QIAGEN
TOPO TA Cloning [®] Kit	Life Technologies
Whole Blood Column Kit [®]	Miltenyi Biotec
ZR DNA Sequencing Clean-up Kit [™]	Zymo Research

2.11 Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Bottle-Top-Filtersystem (Polysulfone)	Thermo Fisher
Faltenfilter (270)	Laborbedarf Hartenstein
Reaktionsgefäße (8 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Filter Tips (10µl, 200µl, 1000µl)	StarLab
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	W. Schreck
Erlenmeyerkolben (DURAN®)	DURAN
Erlenmeyerkolben (Kunststoff)	Thermo Fisher,
Handschuhe (nitril, latex)	Carl Roth,
HiLoad™ 16/60 Superdex™200 pg	GE Healthcare
Kryoröhrchen	NUNC
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
MS-Säulchen	Miltenyi Biotec
Neubauer Zählkammer	W. Schreck
Nickel Beats: Protino®Ni IDA Resin	MACHEREY-NAGEL
OctoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
Pasteurpipetten	Brand
Parafilm	Pechiney
Petrischalen für LB-Platten	Greiner bio-one
Protein A/G plus Agarose (sc-2003)	Santa Cruz Biotechnology
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
Reaktionsgefäße (500 – 1500 µl)	Eppendorf
Serologische Pipetten (Glas, 1 - 20 ml)	Brand
Serologische Pipetten (Kunststoff, 1 - 20 ml)	Greiner Bio-One
Spritze	Brand
Stripes (0,2 ml 8-er PCR-Gefäße)	Brand
Zellkulturflaschen (50 ml, 200 ml)	Corning B.V
Zubehör für ABI PRISM 310 Genetic Analyser	PE Biosystems
6-Well Kulturschalen	Thermo Fisher
96-Well Messplatten (schwarz)	Thermo Fisher
96 PP-PCR-Platte	Greiner Bio-One
VIVASPIN2 10.000 MWCO PES	Sartorius AG
VIVASPIN2 30.000 MWCO PES	Sartorius AG

2.12 Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Autoklav	Autoclave Systec V-150	Systec GmbH
Blot-Modul	XCell II™ Blot Module	SERVA Electrophoresis
Blot-System	BlueBlot Wet 100 Tank	SERVA Electrophoresis
Brutschrank (humane Zellen)		Heraeus
Imaging-System	Fluor-Chem® HD2	Alpha Innotech
	MicroChemi	DNR Bio-Imaging Systems
	PharosFX™Plus Molecular Imager	Bio-Rad
Durchflusszytometer	BD LSRII	BD Biosciences
Eismaschine	94774	Ziegra Eismaschinen
Flüssigkulturinkubator	ISF-1-X	Kühner
Fluorometer	Qubit®Fluorometer	Life technologies
	ISF-1-W	Kühner
FPLC Systeme	ÄKTA Purifier 10	GE Healthcare
Gelelektrophoresekammer	SE260	AA Hoefer
	Gelelektrophorese-Apparatur (horizontal)	OWL
Heizblock	Rotilabo®-Block Heater 250	Carl Roth
Inkubator	Type B15	Thermo Fisher
	Schwenkinkubator	Beckmann
	Schüttelinkubator	Infors
	Schüttelinkubator	Janke & Kungel
		Yashica
Kamerasystem	DLK500 FRYKA	Kältetechnik Esslingen
Luminometer	Mitras LB 940	Berthold Technologies
Magnetrührer		Janke & Kungel
Netzgeräte		BioRad
Photometer	P-Class P300-30 NanoPhotometer	Implen
	NanoDrop ND 1000	Peqlab
Scanner	Scanjet G2710	Hewlett-Packard
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick
Pipettierhilfe	Mikropipetten	Gilson, Rainin
	Mehrkanalpipetten	Brand
	Pipetboy	Integra Biosciences
Real-Time PCR-System	Mx3005P	Stratagene
DNA-Sequenzierer	ABI PRISM 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems
Sterilbank	LaminAir®HB 2448	Heraeus
Sonifikator	Labsonic M Sonifikator	B. Braun Biotech, Satorius Group

Bezeichnung	Modell	Hersteller
	Labsonic®P	B. Braun Biotech, Satorius Group
Taumelschüttler	REAX 3	REAX 3
Thermocycler	TRIO	Biometra
	iCycler	BioRad
	S gradient	Eppendorf
Transilluminator	UV-Tisch	Bachofer
Vortexgerät	Vortex Genie 2™	Bender Hobein
Waage	Analysenwaage MC1	Sartorius
Wasserbad	TypB	Lauda
Zentrifuge	5415R	Eppendorf
	5810R	Eppendorf
	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
	Kühlzentrifuge	Hettich
	Megafuge 1.0	Hereaus
	Minifuge RF	Heraeus
	Picofuge™	Stratagene
	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth
	Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
	Tischzentrifuge	Hettich
Rotor für Avanti J-26 XP	JLA.8.1	Beckman Coulter
	Ja2550	Beckman Coulter

2.13 Software, Datenbanken

Bezeichnung	Anwendung	Quelle
Adobe Photoshop	Berechnung der Flächeninhalte unter den sequenzierten Peaks, Erstellen von Abbildungen	Adobe
CorelDraw Graphics Suite X6	Erstellen von Abbildungen	Corel
ExPASy - Compute pI/Mw tool	Kalkulation des isoelektrischen Punkts und Molekulargewicht von Proteinen	http://web.expasy.org/compute_pi/
ENSEMBL!	Quelle der Gensequenz und zur Intron-/Exonanalyse des Genes	www.ensembl.org
ExPASy Proteomics Server	Diverse Proteinanalysen	www.expasy.ch
FlyBase:	Quelle dmRAD51C-Sequenz	http://flybase.org
IBM SPSS Statistics 21.0	statistischen Auswertung der Mammalian Two- und Three-Hybrid Analysen	IBM
In-Fusion® Primer Design Tool	Konzipierung der Klonierungsprimer für das In-Fusion™ Advantage PCR Cloning System	http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcrPrimersInit.do
In-Fusion® Molar Ratio Calculator	Berechnung des Vektor-/Insertverhältnisses für die In-Fusion™ Advantage PCR Cloning System-Methode	http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do
GelCapture Acquisition Software	Detektion der Western Blots im DNR MicroChemie Imager	DNR Bio-Imaging Systems Ltd
GeneRunner Version 3.05	Definition von Mutationsposition, Kalkulation von Auswirkungen der Nukleinsäureveränderungen auf Proteinfunktion, Konzipierung von Primern, Analyse von Enzymschnittstellen	Softpedia
MicrosoftOffice 2010	Erstellen von Dokumenten, Tabellenkalkulationen, Präsentationen	Microsoft
MBCF Oligo Calculator	Charakterisierung von Primern (Schmelztemperatur, G-C-Gehalt, Länge)	http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html
MxPro QPCR Software	Software Steuerung und Detektion Thermal Shift Assay	Agilent
NCBI BLAST	Analyse von Nukleinsäure-Sequenzen und bestimmen der Position im humanen Genom	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Primer-Blast	Konzipierung von Oligonukleotidprimern	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
REBASE	Analyse von Enzymschnittstellen	http://rebase.neb.com/cgi-bin/reb_get.pl
SEQUENCHER™ Version 4.5	Analyse der Sequenzierungsergebnisse	Gene Codes Corporation
Quantity One	Software für PharosFX Scanner	Bio-Rad

3 Methoden

3.1 Nukleinsäure-basierende Methoden

3.1.1 Isolation von gDNA aus Vollblut

Das Blut wurde mit dem dreifachen des Volumens an Erythrozyten-Lysispuffer (4 °C) gemischt und bis zur vollständigen Lyse der Zellen, etwa 15 min, auf Eis inkubiert (ca. alle 5 min schwenken und überprüfen). Nach einer Zentrifugation (10 min, 700 g, RT) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5-10 ml Lysispuffer durch Vortexen resuspendiert und die Suspension erneut abzentrifugiert (10 min, 700 g, RT). Ein weiterer Waschschritt folgte. Nach Resuspendierung des Pellets in 5 ml SE-Puffer (Vortexer) wurden 130 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 250 µl 20 % SDS dazu pipettiert und der Ansatz gut gemischt. Der Verdau erfolgte wahlweise bei 55 °C (für 3 h) oder 37 °C (über Nacht). Im nächsten Schritt wurden 2,5 ml SE-Puffer und 2 ml 6 M NaCl zugegeben und der Ansatz für ca. 20 sec gevortext. Nach einer Zentrifugation (15 min, 2700 g, RT) wurde der Überstand in ein frisches Zentrifugationsröhrchen überführt und die DNA mit einem zweifachen Volumen an 100 % Ethanol gefällt. Sie wurde mit einer gebogenen Pasteurpipette aus der Lösung gezogen, kurz in 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 – 600 µl dH₂O am Drehrad über Nacht gelöst. Die DNA wurde wahlweise bei +4 °C oder -20 °C gelagert.

3.1.2 Isolation von gDNA aus Zellkulturen

Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 110 g (10 min, RT) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 850 µl SE-Puffer aufgenommen und mit 150 µl Proteinase K (10 mg/ml) sowie 25 µl 20 % SDS versetzt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C über Nacht. Nach Zugabe von 400 µl 6 M NaCl wurde der Ansatz gevortext. Alle weiteren Schritte erfolgten, wie unter *3.1.1 Isolation von gDNA aus Vollblut* beschrieben.

3.1.3 Isolation von gDNA aus MACS-separierten Zelllinien

Die Isolation aus geringen Mengen an Zellen, wie die durch MACS-Sortierung (3.6.2) gewonnenen CD3⁺-, CD14⁺-, CD15⁺- und CD19⁺-Zellen aus Vollblut, erfolgte mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* von Roche nach Herstellerangaben.

3.1.4 Isolation von RNA

Die Isolation von RNA zur cDNA-Synthese erfolgte mit dem *pecGOLD Total RNA Kit* (PEQLAB) bzw. mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben.

3.1.5 Allelstabilisierung mit Cyclohexamid

Auf Grund von Mutationen kann es zur Instabilität von RNA und somit von Allelen kommen. Die Stabilisierung von betroffenen Allelen wurde mittels Cyclohexamid forciert. Hierfür wurde die Kultur 4 Stunden vor der Zellernte für eine spätere RNA Isolation (3.1.4) mit 5 mg/ml Cyclohexamid (Roche, Mannheim) versetzt. Die Ernte erfolgte wie unter 3.3.1.1.3 *Kultivierung und Ernte von Zellen* beschrieben.

3.1.6 cDNA-Synthese

Die Reverse Transkriptase (hier SuperScript II) synthetisiert ausgehend von einem mRNA-Matrizenstrang einen komplementären DNA-Strang. Die Synthese geht von dem für die mRNA spezifischen Poly-A-Schwanz aus, an dem die Oligo(dT)-Primer binden. Am Ende der Reaktion lag ein DNA-RNA-Hybrid vor. Während der mRNA-Isolation wurden folgende Ansätze vorbereitet:

<u>mit 10µl mRNA:</u>	<u>mit 20µl mRNA:</u>
12 µl dH ₂ O	2 µl dH ₂ O
2 µl Oligo(dT)	2 µl Oligo(dT)

Die RNA wurde sofort nach ihrer Isolierung entsprechend zupipettiert und die Ansätze im Cycler inkubiert (10 min 70 °C). Anschließend wurde beiden Ansätzen (auf Eis) je 8 µl First Strand Puffer, 4 µl 0,1 M DTT und 2 µl 10 mM dNTP's zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation (2 min, 42 °C) wurden je 1,8 µl SuperScript II auf dem Heizblock zupipettiert. Weitere Inkubationsphasen von 50 min bei 42 °C und 10 min bei 70 °C sowie eine anschließende Abkühlung auf 4 °C schlossen die Synthese ab. Die Lagerung des Produktes erfolgt bei 4 °C.

3.1.7 Quantifizierung von DNA

Die Konzentrationen und Reinheiten von DNA-Lösungen wurden photometrisch mit einem P-Class P300-30 NanoPhotometer (Implen GmbH, München) bestimmt. Über den bei einer Extinktion von 260 nm gemessenen Wert wurde automatisch die entsprechende DNA-Konzentration bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde über das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt. Dieser Wert lag in der Regel bei 1,7 - 2,0, was einer reinen Isolierung entspricht. Für die Bestimmung niedriger DNA-Konzentrationen wurde ein Qubit® Fluorometer-System (Life technologies) verwendet.

3.1.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Reaktionsbedingungen der PCRs variierten je nach verwendeter Polymerase und wurden nach Empfehlung des Herstellers angepasst. Die entsprechenden Annealingtemperaturen der Primer wurden mit dem Oligo Calculator berechnet. Zur Amplifikation wurden die Polymerasen Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, Bio-X-ACT™, Platinum® Taq DNA Polymerase sowie eine im Haus hergestellte Taq-Polymerase verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen überprüft.

3.2 Mutagenese

Diese Methode eignet sich zur Einführung von Mutationen in ein in einem Vektor integrierten Gen. Mit Hilfe dieser Sequenzänderung auf Nukleinsäurebasis kann die Auswirkung einer Mutation auf die Funktionalität des resultierenden Proteins untersucht werden. Über spezifisch konzipierte Primer wurden mittels PCR (3.1.8) Veränderungen (Deletionen, Insertionen, Basensubstitutionen) in ein Gen eingeführt. Die hierfür verwendeten Primer sind unter Anhang I: *Primer für Mutagenesen der RAD51C und RAD51D Vektoren* gelistet.

3.2.1 Einschritt-Mutagenese (QuickChange Site-Directed Mutagenese: QCM)

Diese Methode ist limitiert für Primerpaare mit 25-45 Basen Länge und einer Schmelztemperatur (T_m) nicht unter 78 °C. Bei längeren Primern sinkt die Mutagenese-Effizienz durch die Ausbildung von Primer-Dimeren. Mutationen die mehr als fünf Basen umfassen, werden über mehrere PCRs eingefügt. Die Annealingtemperatur der Mutagenese-PCR ist ein fester, nicht oligospezifischer Parameter!

Pipettierschema:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge (µl)</u>	<u>Reaktionsbedingungen:</u>		<u>Zyklen</u>
		<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	
10× PfuUltra HF Reaction Buffer AD	5	95 °C	30 sek	16
50-200 ng Template (Plasmid)	1	55 °C	60 sek	
10 pmol Primer forward	1	68 °C	2-fache Plasmid-länge (kb) in min	
10 pmol Primer reverse	1	68 °C	7 min	1
dNTP-Mix (0,2 mM/dNTP)	1	4 °C	Pause	1
dH2O	ad 49			

(nach diesem Schritt wurde der DpnI Verdau abgeschlossen oder die Reaktion bei 4 °C aufbewahrt)

3.2.2 Zweischnitt-Mutagenese

Die Mutagenese erfolgte hier in zwei Schritten. Zunächst wurden zwei separate Extensions-Reaktionen in separaten Eppendorfgefäßen angesetzt, eine mit dem Forwardprimer und eine mit dem Reverseprimer (Schritt 1). Anschließend wurden beide Reaktionsansätze gemischt und eine Standard-QCM durchgeführt (Schritt 2).

Erster Schritt: Pipettierschema (pro Primer ein Ansatz):

<u>Reagent</u>	<u>Menge (µl)</u>	<u>Reaktionsbedingungen:</u>		<u>Zyklen</u>
		<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	
10× PfuUltra HF Reaction Buffer AD	5	95 °C	30 sek	4
50 -200 ng Template (Plasmid)	2	55 °C	60 sek	
10 pmol Primer	1	68 °C	2-fache Plasmid-länge (kb) in min	
dNTP-Mix (0,2 mM/dNTP)	1	4 °C	Pause	1
dH2O	ad 49			

(nach dem zweiten Schritt wurde der DpnI Verdau abgeschlossen oder die Reaktion bei 4 °C aufbewahrt)

3.2.3 Der DpnI-Verdau

Der Verdau diente zum Abbau des Ausgangsplasmids, das auf Grund seiner Generation in Bakterien eine spezifische Methylierung aufwies. Für den DpnI-Verdau wurden 10 U DpnI zu der Reaktion zugeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in OneShotTop10 (3.3.3.2) mit dem mutierten Plasmid.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analysen wurden 1-1,5%ige (w/v) TBE- bzw. TAE-Ethidiumbromidgele verwendet. Als Lade-puffer diente 2,5x HSE-Puffer (2 µl/5 µl Probe) und als Größenstandards 5 µl eines Markers von *NEB* bzw. *Fermentas*. Die Auftrennung erfolgte bei 150 V. Die DNA wurde auf einem Transilluminator detektiert und fotografiert

3.2.5 ExoSAP-Verdau – enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte

Das hydrolytische Enzymgemisch ExoSAP-IT (*Affymetrix*) beinhaltet eine Kombination aus Exonuclease I und Shrimp Alkaline Phosphatase, Recombinante (rSAP). Auf dieser Basis wurden dNTPs (rSAP) und Oligoprimer (Exonuclease I) aus dem PCR-Gemisch entfernt. Dies erfolgte nach Herstellerangaben. Die gesamten Ansätze wurden anschließend für die Sequenzierung eingesetzt (3.2.6).

Ansatz: 0,5 µl ExoSAP, 2 - 6,5 µl PCR Produkt, add 7,0 µl dH₂O

3.2.6 Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der durch den britischen Biochemiker Sanger entwickelten Dideoxy-Methode, die auch als Kettenabbruch-Methode bezeichnet wird (Sanger et al. 1977). Für die Sequenzierung der DNA wurde das *ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Biosystems, Langen, DE) verwendet. Als Template für die Reaktionen wurden die mit ExoSAP (3.2.) aufgereinigten PCR-Produkte verwendet. Des Weiteren wurden Vektoren nach der Plasmidpräparation (3.3.3.5) mit dieser Methode überprüft. Die Aufreinigung des Reaktionsgemisch erfolgte mit dem *ZR DNA Sequencing Cleanup Kit™* (Zymo Research Freiburg, DE) nach Herstellerangaben. Die Proben wurden mit 20 µl HiDi™ Formamid von der Säule gelöst und anschließend in einem Sequenziergerät (ABI Prism 310 Genetic Analyser) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Während der Auftrennung wurden die Fluorochrome mittels Laser angeregt. Das spezifisch emittierte Licht wurde detektiert und ein Chromatogramm erstellt, welches mit Hilfe des Programmes SEQUENCHER™ Version 4.5 (Demoversion) ausgewertet wurde.

Sequenzieransatz (*PCR Produkte*): Exo SAP-Verdau, 2 µl Sequenzierpuffer, 1 µl Primer, 1 µl BigDye™Mix;

Sequenzieransatz (*Plasmide*): 0,3 µg/µl Plasmid, 2 µl Sequenzier Puffer, 1 µl Primer, 1 µl BigDye™Mix, ad 10 µl dH₂O

3.2.7 Codon-Optimierung von RAD51C für die Expression in Bakterien

Um für die Expression des humanen RAD51C Proteins in *E. coli*-Stämmen günstige Voraussetzungen zu schaffen, wurde für das humane *RAD51C* Gen eine Codon-Optimierung (GENEArt, Regensburg) durchgeführt. Zur Erreichung einer hohen Stabilität während der Expression wurden im Rahmen der Synthese cis-regulatorische Sequenzmotive, wie interne TATA-Boxen, chi-Sites und ribosomale Entry Sites, AT- oder CG-reiche Sequenzen, RNA-Instabilitätsmotive, Repeat-Sequenzen und RNA Sekundärstrukturen sowie (kryptische) Spleißdonor- und -akzeptorstellen höherer Eukaryonten, vermieden. Die optimierte Nukleinsäuresequenz wurde im pMA-T-Vektor geliefert und für die weitere Nutzung über Infusion-Klonierung in die entsprechenden Vektoren umkloniert (Anhang I: Sequenz: *E. coli*-Codon-optimierte Sequenz des humanen RAD51C in pMA-T; Primer für Codon-optimiertes hRAD51C).

3.2.8 Hybridisierung von DNA-Strukturen

Um Ausgangsmaterial für die DNA-Bindungsstudien über das Electrophoretic Mobility Shift Assay (3.5.6.) zu generieren, wurden verschiedene DNA-Strukturen aus einzelnen Oligonukleotiden annealt. Hierfür wurde ein 25 µl Reaktionsansatz pipettiert (1,25 µl je Oligonukleotid Ausgangskonzentration 100 µM, auf 25 µl mit TE-Puffer pH 8,0 aufgefüllt). Durch Erhitzen des Ansatzes auf 85 °C (10 min) wurden alle möglicherweise vorliegenden Sekundärstrukturen der Oligonukleotide aufgeschmolzen. Das Annealen erfolgte während des langsamen Abkühlens auf Raumtemperatur (über Nacht im abgeschalteten Heizblock). Jeweils einer der verwendeten Oligonukleotide war mit CY3 markiert. Die für die verschiedenen DNA-Strukturen verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang I unter *Primer zur Generierung von DNA-Strukturen für DNA-Bindungsstudien* gelistet. Die Überprüfung der Reinheit der generierten DNA-Strukturen erfolgte auf einem 10-prozentigen nativen Gel (3.5.7.3) mittels Silberfärbung (3.5.7.4).

Zur Generierung der Strukturen wurden folgende Oligo-Kombinationen verwendet:

Struktur	Oligo
Einzelstrang	Hef_Top 3'-Cy3
3'-Überhang	Hef_bottom_5'-Cy3 + Hef_Top 5'-15
5'-Überhang	Hef_Top 3'-Cy3 + Hef_bot 3'-15
Open Fork	Hef_Top 3'-Cy3 + Hef_bot

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zellkultur-Eukaryonten

3.3.1.1 Kultur humaner Zellen

3.3.1.1.1 *Verwendete Zelllinien*

Im Rahmen der Studien wurden HeLa- (Wu et al. 2008) und HEK 293- (Thomas and Smart 2005) Zellen verwendet.

3.3.1.1.2 *Auftauen der Zellen*

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellaliquots in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt und in eine Zellkulturflasche mit 8 ml Zellkulturmedium überführt. Um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen, wurde bei Fibroblasten nach Anheftung der Zellen das Medium gewechselt.

3.3.1.1.3 *Kultivierung und Ernte von Zellen*

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in MEM-Medium (+ 16 % FCS). Der Mediumwechsel fand alle 3-4 Tage statt. Zum Teilen bzw. zum Überführen der Fibroblasten wurden diese kurz mit 6 ml 1x PBS gewaschen und mit ca. 5 ml 1x PBS + 10 % Trypsin/EDTA vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Nach Trypsinisierung (ca. 10 min, 37 °C) wurde die Reaktion mit 1 ml Medium gestoppt und die Zellen durch forciertes Auf- und Abpipettieren separiert. Je nach weiterer Verwendung wurde die Zellsuspension mit frischem Medium in neue Zellkulturflaschen überführt oder für die anschließende Weiterverarbeitung (3.1.4, 3.1.6, 3.3.1.1.4) pelletiert (10 min, 110 g, RT). Das Pellet wurde mit 5 ml 1x PBS gewaschen (10 min, 110 g, RT). Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Nichtadhärente Kulturen (B-LCL) wurden in RPMI-Medium (+ 16 % FCS) kultiviert und bis auf das Ablösen mit Trypsin ebenso behandelt.

3.3.1.1.4 *Einfrieren der Zellen*

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Zellen wurden diese wie unter 3.3.1.1.3 *Kultivierung und Ernte von Zellen* beschrieben geerntet und das Zellpellet in 3 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert, in Kryoröhrchen in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen langsam auf -80 °C temperiert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3.1.2 Kultur von Insektenzellen

Für die Expression von RAD51C im Insektenzellsystem wurden verschiedene Suspensions-Zelllinien verwendet (Sf9, Sf21, High Five™ (Tn5)). Die Sf9- und Sf21-Linien wurden aus IPLBSF-21 generiert, welche aus pupalen Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda* stammen (O'Reilly et al. 1992; Vaughn et al. 1977). Die aus den Ovarialzellen von *Trichoplusia ni* stammende High Five™ Zelllinie (H5) wurde von the Boyce Thompson am Institute for Plant Research, Ithaca, NY, USA entwickelt (Davis et al. 1992; Wickham et al. 1992). Eine virale Transfektion der Zellen erfolgte in ihrer logarithmischen Wachstumsphase (Verdopplungszeit der Zelllinien: Sf9: 72 h; Sf21: 24h, H5: 18 h).

3.3.1.2.1 Auftauen, Kultur und Ernte von Insektenzellen

Die Zellen wurden direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 27 °C Wasserbad überführt, aufgetaut, in 10 ml EX-Cell (TM) 420 w/L-glut-Medium (RT) aufgenommen und pelletiert (4 min, 250 g, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet in 10 ml frischem Medium in einem neuen Reaktionsgefäß resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (4 min, 250 g, 4 °C). Die pelletierten Zellen wurden in 15 ml frischem Medium (27 °C) resuspendiert und in einen Kunststoff-Erlenmeyerkolben mit luftdurchlässigen Filterdeckeln in einem Inkubator kultiviert (27 °C, schüttelnd (112 rpm)). Zuvor wurde die Zellzahl auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Dichte der Zellen wurde täglich bestimmt (Neubauer Zählkammer) und die Kulturen in entsprechenden Abständen geteilt. Die Ernte der Zellen erfolgte in ihrer Log-Phase durch Zentrifugation (4 min, 250 g).

3.3.1.2.2 Einfrieren von Insektenzellen

Zum Einfrieren der Zellen lag die Zellsuspensionsdichte in der oberen Log-Phasengrenze ($2-2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die aus 100 ml Suspension pelletierten Zellen (4 min, 250 g, RT) wurden in Einfrieremedium resuspendiert und aliquotiert ($\hat{=}$ 1ml), bei - 80 °C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag zur Langzeitkonservierung in Stickstoff überführt.

3.3.2 Gentransfer in Eukaryonten

3.3.2.1 Transfektion von humanen Zelllinien

Die Transfektion wurde für die Mammalian-Two-/Three-Hybrid-Versuche an HeLa-Zellen und für die Co-Immunopräzipitationen an HEK 293 Zellen durchgeführt. Die eingesetzten Plasmidkonzentrationen sind in Tabelle 3 a/b aufgelistet.

3.3.2.2 Transfektion mit GeneJuice Transfection Reagent®

Für die Mammalian Two-/Three-Hybrid Versuche wurden 24 h vor der Transfektion 1×10^5 HeLa Zellen in 6-well-Platten eingesät und in je 3 ml MEM + 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden die zu 40-80 % konfluenten Zellpopulationen transfiziert. Die pro Versuch mindestens dreimal durchgeführten Transfektionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von je 100 µl als Dreifachansatz. Zu

temperiertem (RT) MEM-Medium (-FCS) wurden 1,95 μ l (für M2H-Analysen) bzw. 2,7 μ l (für M3H-Analysen) Gene Juice Transfection Reagent[®] gegeben und die Transfektion nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach einer Inkubation von 3-5 h (37 °C, 5 % CO₂) wurde das Medium durch 3 ml frisches MEM + 10 % FCS ersetzt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte für 48 h im Brutschrank. Für die Co-Immunopräzipitationen von Proteinen aus HEK 293 Zellen (3.5.1) wurden 3,5 x10⁶ Zellen in 75 cm² Flaschen eingesät. Die Mengen von Plasmid-DNA, sowie Medium für die Transfektionen wurden entsprechend, 3 μ l GeneJuice Transfection Reagent[®] zu 1 μ g DNA, hochskaliert.

Tab. 3a/b: Mengen der transfizierten Plasmid-DNA für Mammalian Two-/Three-Hybrid und Co-Immunopräzipitationen.

a) *Mammalian Two-/Three-Hybrid Analysen:*

Plasmid	[μ g]
pM*	0,25
pVP16*	0,25
pMFANCA**	0,25
pMFANCG**	0,25
pM-/pVP16RAD51B	0,25
pM-/pVP16RAD51C	0,25
pM-/pVP16RAD51D	0,25
pM-/pVP16XRCC2	0,25

b) *Co-Immunopräzipitationen:*

Plasmid	[μ g]	Plasmid	[μ g]	Plasmid	[μ g]
pM-/pVP16XRCC2	0,25	pCMV-Tag3B RAD51***	0,25	pCMV-Tag3B RAD51***	1,1
pCMV-Tag3B RAD51***	0,25	pCMV-Tag3B RAD51B***	0,25	pCMV-Tag3B RAD51B***	1,1
pCMV-Tag3B RAD51B***	0,25	pCMV-Tag3B RAD51C***	0,25	pCMV-Tag3B RAD51C***	1,1
pCMV-Tag3B RAD51C***	0,25	pCMV-Tag3B XRCC2***	0,25	pCMV-Tag3B XRCC2***	1,1
pCMV-Tag3B XRCC2***	0,25	pCMV-Tag3B XRCC3***	0,25	pCMV-Tag3B XRCC3***	1,1
pCMV-Tag3B XRCC3***	0,25	pRL-null****	0,10		
pRL-null****	0,10	pGL4.31****	0,05		
pGL4.31****	0,05				

* Clontech Laboratories INC, Mountain View, USA; ** bereitgestellt von J.de Winter, Niederlande; *** generiert von A. Sobock;

**** Promega Corp.; Madison, USA

3.3.2.3 Virale Transfektion von Insektenzelllinien als Grundlage zur Herstellung von Proteinen für die DNA-Bindungsstudien

Zur Generierung von rekombinanten Viren und zur Infektion von Insektenzellen wurde das *Bac-to-Bac*[®] *Baculovirus Expression System* (Life Technologies) verwendet. Bei den verwendeten Transfektions-Vektoren handelte es sich um pFASTBac HTa (Einzelexpression hRAD51C, Co-Expression RAD51C und XRCC3 auf separaten Vektoren) und um den pFASTBac[™]Dual-Vektor (Co-Expression von RAD15C und XRCC3). Für die Klonierung der Gene in die Vektoren wurden folgende Schnittstellen verwendet:

Vektor	Gen	Schnittstelle
pFASTBac HTa	RAD51C	NcoI/XhoI
pFASTBac HTa	XRCC3	NcoI/XhoI
pFASTBac [™] Dual	RAD51C	EcoRI/HindIII
pFASTBac [™] Dual	XRCC3	XhoI/KpnI

Die für die Infusion-Klonierung (3.4.) verwendeten Primer sind unter *Anhang 1: Primer für die Infusion Klonierung hRAD51C - virale Infektion, Primer für die Infusion Klonierung XRCC3 - virale Infektion und Primer für Infusion-Umklonierung hRAD51C (aus pFastBacHTa-mit inkl. His-Tag downstream of PH Promotor) und hXRCC3 (downstream p10 Promotor) in pFastBac-Dual* verzeichnet. Die Virusgenerierung in Sf9 Zellen, sowie die virale Transfektion der Insektenzellen (Sf9/Sf21/H5) erfolgten nach Herstellerangaben. Die Virusmengen variierten zwischen 1-4 %. Für die Versuche wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet (3.3.1.2.1). Alternativ wurden Virusgenerierung und Transfektion für die Co-Expressionen von RAD51C und XRCC3 auch außer Haus gegeben (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH,

Braunschweig). Dafür wurden die Vektoren pFastBac HTa-RAD51C, pFastBac HTa-XRCC3 und pFASTBac™Dual-RAD51C-XRCC3 von uns generiert. Die Zellpellets wurden auf Trockeneis geliefert und im Haus aufgearbeitet (3.5.3.7).

3.3.3 Zellkultur –Prokaryonten

3.3.3.1 Transformation, Bakterienkultur und Plasmidpräparation für Mutagenesen und für im Mammalian Two-/Three-Hybrid verwendete Plasmide

Die Generierung von Plasmid-DNA für die Transfektionen eukaryotischer Zellen erfolgte in verschiedenen chemo-kompetenten *E. coli*-Stämmen (2.1.1). Ihre Kultivierung erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Agaroseplatten bei 37 °C mit entsprechendem Antibiotikazusatz.

3.3.3.2 Transformation von *E. coli* zur Plasmid-DNA-Gewinnung

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die *E. coli*-Stämme One Shot® TOP 10 Chemically Competent *E. coli* (Life Technologies, Carlsbad, USA) und XL10 Gold® Ultracompetent Cells (Agilent Technologies, Inc.Santa Clara, USA) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Herstellerangaben. LB-Agar-Selektionsplatten (37 °C) dienten zur Selektion.

3.3.3.3 Transformation von *E. coli* zur Protein- und Bacmidgewinnung

Zur Gewinnung von Protein wurden verschiedene *E. coli*-Stämme verwendet (ArcticExpress Competent Cells, BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL Competent Cells, BL21 Star™ (DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent, Rosetta™ (DE3) Competent Cells und MAX Efficiency® DH10Bac™ Competent Cells). Für die Generierung der Bacmide zur Herstellung von Viren für die Insektenzelltransfektionen wurden MAX Efficiency® DH10Bac™ Competent Cells verwendet. Die Transformation erfolgte hierbei für alle *E. coli*-Stämme auf die gleiche Art und Weise. Jeweils 50 µl der Bakterienkultur wurden mit 5 µl des Plasmides (ca. 1µg/µl) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (60 s, 42 °C) und einer erneuten Inkubation (2 min auf Eis) wurden die Ansätze schüttelnd inkubiert (1 h, 38 °C). Nach dieser Zeit erfolgte das Ausplattieren auf LB-Agar-Selektionsplatten, die mit entsprechenden Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin, Chloramphenicol, Gentamycin, Tetracyclin) versetzt waren.

3.3.3.4 Einsatz von Antibiotika zur Selektion

Antibiotika wurden für die Selektion von Bakterien in Suspension oder auf Agaroseplatten verwendet. Für die Selektionsplatten zur Bacmidgenerierung wurde zusätzlich noch IPTG und X-Gal in die Ansätze gegeben. Die auf den Selektionsagarplatten überlebenden Klone wurden zum Animpfen von Kulturen zur Proteingewinnung in Bakterien bzw. für die Bacmidgewinnung zur späteren viralen Transfektion (3.3.2.3) verwendet.

3.3.3.5 Analytische Plasmidisolation

Die Plasmidpräparation basierte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Präparation von kleineren Mengen Plasmid wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) von QIAGEN verwendet. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Probe wurde mit 50 µl dH₂O der Säule eluiert. Über Sangersequenzierung (3.2.6) wurde das extrahierte Plasmid mit Hilfe spezifischer Primer auf seine Richtigkeit überprüft.

3.3.3.6 Präparative Plasmidisolation

Zum Erreichen einer höheren Plasmidausbeute wurde eine Präparation mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit von QIAGEN durchgeführt. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Trocknung des Pellets wurde dieses in dH₂O gelöst und das Plasmid auf eine Konzentration von ca. 1 µg/µl eingestellt. Eine Überprüfung der Plasmidsequenz erfolgte via Sangersequenzierung (3.2.6).

3.3.3.7 Bacmidpräparation

Die Präparation erfolgte mit Puffern des Plasmid Miniprep Kit „Nucleospin®Plasmid“ (Macherey - Nagel, Düren, DE). Am Vortag wurden 5 ml LB-Medium mit den weißen Kolonien der Transformation von pFastBac™ TOPO® in DH10Bac™ E. coli angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zusätzlich wurden den Kulturen Selektionsantibiotika (Kanamycin: 50 µg/ml, Tetracyclin: 10 µg/ml, Gentamycin: 7 µg/ml) zugefügt. Am nächsten Tag erfolgte die Ernte der Bakterien (10 min, 4.000 rpm, RT). Das Pellet wurde in 250 µl Puffer A1 aufgenommen und in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zugabe von 250 µl Puffer A2 (6-8-mal invertieren) erfolgte ein Inkubationsschritt (5 min). Anschließend wurden 300 µl Puffer A3 zugegeben, der Ansatz 6-8-mal invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die festen Bestandteile wurden pelletiert (15.000 g, 10 min, 4 °C), der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und vorsichtig mit 800 µl vorgelegtem Isopropanol vermischt. Nach einer weiteren Inkubation (10 min auf Eis) wurden die Proben zentrifugiert (15.000 g, 15 min, 4 °C) und das Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen (Zentrifugation: 15.000 g, 5 min, 4 °C). Das Bacmid wurde nach Abnahme des Überstandes im Heizblock bei 32 °C getrocknet und in 30-50 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

→ Kontroll PCR (50 µl Ansatz):

Programm:

Reagenz	1 Ansatz µl	Endkonzentration	Temperatur	Zeit	Zyklen
10x Tag Puffer (+KCL, -MgCl ₂)	5,0	1x	93 °C	3 min	
MgCl ₂ (25 mM)	6,0	3 mM	91 °C	45 sek	
dNTP-Mix (10 mM)	1,0	200 µM (je dNTP)	53 °C	45 sek	35
PUC18 for (20 mM)	1,0	0,4 µM	72 °C	5 min	1
PUC18 rev (20 mM)	1,0	0,4 µM	72 °C	7 min	1
Taq	0,5	2,5 Units	4 °C	Pause	
Template	0,5				
dH ₂ O	35,0				

3.4 Klonierungen

Die Klonierung stellt eine weit verbreitete molekularbiologische Methode dar, bei der ein bestimmtes DNA-Fragment in einen Vektor eingebracht wird, um den entstandenen Vektor später in einem geeigneten Wirtssystem zu vermehren.

3.4.1 Herkömmliche Klonierung für das *Mammalian Two-/Three-Hybridsystem*

(Klonierung über Restriktions-Schnittstellen)

Die Klonierung über enzymatischen Verdau von Plasmiden (*Backbone*) und Insert und deren anschließende Ligation stellt eine vielbewährte Klonierungsmethode dar. Sie wurde zur Generierung der pM-/und pVP16-Vektoren für die Mammalian Two-/Three-Hybrid-Analysen verwendet. Als Basisvektoren dienten Vektoren des Matchmaker™ Mammalian Assay Kit 2 von Clontech (Clontech Laboratories Inc. Mountain View, USA).

Um die spätere korrekte Entstehung eines Fusionsproteins zu gewährleisten, war bei der Klonierung zu beachten, dass das Gen im Leseraster der Proteinbindungs- bzw. Aktivierungsdomäne (BD/AD) integriert wurde. An die in den Vektor zu inserierende Template-DNA wurden über Primer entsprechende Schnittstellen angefügt und das Startcodon des Genes (ATG) durch Leucin (CTG) ersetzt. Zusätzliche Nukleotide vor den Enzymschnittstellensequenzen erleichterten den Enzymen das Anlagern und Schneiden. (Primer für Klonierung in die Vektoren pM und pVP16 / Anhang I: Primer für herkömmliche Klonierung) Die PCRs, zur Amplifizierung der zu integrierenden Gene, erfolgten zum einen an cDNA (pM-/pVP16RAD51C-mut Vektoren) und zum anderen an vorhandenen Vektoren (restliche pM/pVP16-Vektoren / *Anhang I*).

3.4.1.1 Restriktionsverdau

Um die amplifizierten Gene mit den entsprechenden Vektoren ligieren zu können, mussten diese zuvor – wie auch die Vektoren (pM, pVP16) – mit den entsprechenden Restriktionsenzymen bei 37 °C für 1 h verdaut werden (jeweilige Enzyme, und Puffer siehe Tab. 4). Des Weiteren wurde dem Restriktionsansatz des Vektors zusätzlich 1 µl CIP zugesetzt, um die entstehenden Enden zu dephosphorylieren. Dies verhinderte die Bildung von Religanden während der Ligation (*3.4.1.2*).

(Ansatz für Verdau (20 µl): 6 µl aufgereinigtes PCR-Produkt; 2,0 µl Puffer; 2,0 µl 10x BSA; sowie je 0,5 µl Restriktionsenzym; ad 20 µl dH₂O)

Der Erfolg des Restriktionsverdaus der Plasmide wurde mittels Gelelektrophorese überprüft und die verdauten PCR-Produkte mit Hilfe des DNA Clean & Concentrator™ Kit (Zymo Research) entsalzt sowie ankonzentriert.

Tab. 4: verwendete Restriktionsenzyme und Bedingungen für den Verdau

Gen	Vektor	Enzym 1	Enzym 2	Puffer/BSA	Temp. °C
RAD51B	pM/pVP16	EcoRI	HindIII	3/ja	37
RAD51C	pM/pVP16	EcoRI	PstI	3/ja	37
RAD51C	pETM-11	EcoRI	XhoI	1/ja	37
RAD51C	pBADM-11	KpnI	SacI	1/ja	37
RAD51D	pM/pVP16	EcoRI	EcoRI	3/ja	37
XRCC2	pM/pVP16	EcoRI	SalI	3/ja	37
XRCC3	pM/pVP16	EcoRI	HindIII	3/ja	37
FANCN	pM/pVP16	EcoRI	BamHI	2/ja	37

3.4.1.2 Ligation

Nach erfolgtem Verdau durch die entsprechenden Enzyme wurden Gen (Insert) und Backbone (Vektor) mit Hilfe der T4 DNA-Ligase ligiert. Die aus dem T4 Phagen stammende Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5' Phosphat und 3' Hydroxyenden in Doppelstrang-DNA/RNA. Das Enzym kann mit Hilfe des Ko-Faktors ATP sowohl glatte (blunt-end) als auch kohesive DNA-Enden in duplex DNA/RNA verbinden. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

(Grundansatz: 2 µl dH₂O, 2 µl T4-DNA Ligase Puffer, 2 µl Insert (Gen), 1 µl Backbone (Vektor) und 1 µl T4 DNA-Ligase)

3.4.2 In-Fusion-Klonierung (Klonierung über Homologe Rekombination)

Das In-Fusion™ Advantage PCR Cloning System (Clontech, Mountain View, USA) ermöglicht es, PCR-Produkte über Homologe Rekombination in einen linearisierten Vektor einzubringen. Die homologen Bereiche, die für diese Art von Klonierung notwendig waren, wurden über spezifische Primer während einer PCR an das 3'- und 5'-Ende des zu inserierenden DNA-Fragments angehängt. Die Primer wurden so konzipiert, dass sie auf einer Seite 15 bp des linearisierten Vektors enthalten. Diesem schließt sich die, für die Linearisierung verwendete, Restriktionsschnittstelle und dann die Sequenz des Inserts an. Wenn während der Reaktion der Vektor mit dem Insert kombiniert wurde, konvertierte das In-Fusion® Enzym die doppelsträngigen Überhänge der DNA zu einzelsträngiger DNA und fusionierte die korrespondierenden Enden mit denen des linearisierten Vektors. Die Ligationen mit diesem System wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Konzipierung der Primer stellt Clontech ein Onlinetool zur Verfügung (In-Fusion® Primer Design Tool). Die verwendeten Primer sind unter *Anhang I: Primer für die Infusion Klonierung* gelistet. Die für die Reaktion benötigten, größenabhängigen Vektor- und Insertmengen wurden mit dem In-Fusion® Molar Ratio Calculator berechnet.

(<http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do>)

3.5 Proteinmethoden

3.5.1 Proteininteraktionen: Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Zur Untersuchung von Proteininteraktionen via Co-IP in Verbindung mit Western Blotanalysen (3.5.8) wurden die Proteine von Interesse transient überexprimiert (3.3.2.2). Als Expressionsvektoren dienten verschiedene Kombinationen der cDNA-enhaltenden (RAD51B/-C/-D/XRCC2/XRCC3) pCMV-Tag-3B-Vektoren. Für die Versuche wurden HEK 293 Zellen in 75 cm² Flaschen kultiviert und geerntet (3.3.1.1.3). Das Pellet wurde anschließend in 500 µl Lysispuffer aufgenommen und rotierend inkubiert (10 min, 4 °C). Nach Abzentrifugation des Ansatzes (13200 rpm, 10 min) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfggefäß überführt (20 µl abnehmen, Input-Kontrolle: Ausgangsmaterial vor der Immunopräzipitation). Zu dem verbleibenden Überstand wurden 10 µl des proteinspezifischen Antikörpers (AK) gegeben und der Ansatz rotierend inkubiert (2 h, 4 °C). Nach Zugabe von 20 µl Protein A/G plus Agarose-Beads erfolgte die Kopplung der Antikörper an die Beads (30 min, 4 °C). Anschließend wurden die Beads pelletiert (13200 rpm, 1 min) und dreimal mit 200 µl Lysispuffer gewaschen. Die Abnahme des Überstandes erfolgte mit speziellen Gellade-Spitzen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand gründlich abgenommen und die verbleibenden Beads in 20 µl 2x NuPAGE® LDS Probenpuffer (Life technologies, Carlsbad, USA) zur Lösung des Proteins von den Beads inkubiert (10 min, RT). Der 2x LDS Probenpuffer, welcher nun die Proteine enthielt, wurde mit den Spezialspitzen in ein 8-er Stripe überführt und mit 3 µl DTT gemischt. Die Input-Proben wurden ebenfalls mit Probenpuffer und DTT versetzt und alle Proteine denaturiert (70 °C, 10 min). Anschließend wurden die Proben auf ein denaturierendes NuPAGE® Novex® 7% Tris-Acetat Gel (Life technologies, Carlsbad, USA) geladen. Als Größenstandard diente der Protein Standard Precision Plus Protein™ All Blue Marker (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE). Die Elektrophorese erfolgte für ca. 1 h bei 150 V in der Gelelektrophoresekammer SE260 (AA Hoefer, Holliston, USA) in 1x Novex® Tris-Acetat SDS Running Buffer (Life technologies, Carlsbad, USA). Hierbei wurde die Kammer mittels Kühlsystem DLK500 FRYKA gekühlt. Der Transfer des Proteins auf die Membran (Blotten) und die Detektion erfolgten wie unter 3.5.8 beschrieben. Co-Immunopräzipitationen wurden mit RAD51B-, RAD51C-, XRCC2- und XRCC3-Antikörpern (2.9 Antikörper) durchgeführt.

3.5.2 Proteininteraktionen: Mammalian Two- und Three-Hybrid Analysen

In dieser Arbeit wurden unter Verwendung des Matchmaker™ Mammalian Assay Kit2 (Clontech Laboratories Inc. Mountain, USA) Fusionsproteine aus den zu untersuchenden Genen mit der pM GAL4-BD und der pVP16 AD hergestellt. Die Aktivierungsdomäne (AD) basiert auf dem Herpes Simplex Virus, während die genutzte DNA-Bindedomäne (DNA-BD) der Hefe entstammt. Die auf diese Weise entstandenen Fusionsproteine bewirken, im Falle einer Interaktion der Gene X und Y, die Bindung der DNA-BD an die UAS („Upstream Activating Sequence“) des Reportergens und somit dessen Transkription. Als Reportervektor diente der Firefly-Luziferase kodierende pGL4.31-Vektor (Promega Corp., Madison,

USA). Das Luziferasegen steht unter der Kontrolle eines GAL4-responsive-Element und einem SV40-Minimal-Promoter. Um die Transfektionseffizienz zu überprüfen und so die Ergebnisse einzelner Messungen besser vergleichen zu können, wurde ein weiterer Luciferase-Vektor pRLnull (Promega Corp., Madison, USA) co-transfiziert. Die Klonierungen erfolgten nach der herkömmlichen Methode (3.4.1). Die Transfektionen für die M2/3H-Analysen wurden mit dem GenJuice Transfektionsreagenz durchgeführt. (3.3.2.2). Die getesteten Kombinationen sind in Abb. 10 aufgeführt. Alle Versuche wurden mindestens zu drei verschiedenen Zeitpunkten als Triplet-Ansatz durchgeführt.

pM	pVP16	FANCN	RAD51	RAD51B	RAD51C	RAD51D	XRCC2	XRCC3
FANCN					x			
RAD51			x	x	x	x	x	x
RAD51B			x	x	x	x	x	x
RAD51C		x	x	x	x	x	x	x
RAD51D			x	x	x	x	x	x
XRCC2			x	x	x	x	x	x
XRCC3			x	x	x	x	x	x

Abb. 10: Kombinationen der im M2/3H-Analysen getesteten Proteine, wobei in der Tabelle die Fusionsproteine in den pM-/pVP16-Vektoren angegeben sind. Die zusätzlichen für die M3H-Assay im pCMV-Tag3b exprimierten Proteine sind mit Strichen hinter bzw. unter der Tabelle angegeben.

3.5.2.1 Luciferase-Reporter-Analysen

Die evolutionär von Oxygenasen abstammenden Luziferasen setzen in Verbindung mit Sauerstoff unter Freisetzung von Photonen Luziferine um. Das in dieser Arbeit verwendete Dual-Luciferase® Reporter Assay System basiert auf der Messung der freigesetzten Biolumineszenz zweier verschiedener Luziferasen, der Firefly- und der Renilla-Luziferase. Bei der aus *Photinus pyralis* stammenden Firefly-Luciferase handelt es sich um ein 62 kDa großes monomerisches Protein, das für seine enzymatische Aktivität keine weitere posttranslationale Prozession benötigt (Tebbs et al. 1995; Thompson and Schild 1999). Die 32 kDa große, aus *Renilla reniformis* stammende Renilla-Luciferase setzt unter Verbrauch von Sauerstoff Colenterazin zu Colenteramid um (Gruver et al. 2005). Beide Luziferasen besitzen aufgrund ihres unterschiedlichen evolutionären Ursprungs verschiedene Strukturen und Substrate. Dieser Unterschied ermöglicht es, die erzeugte Biolumineszenz nacheinander in ein- und demselben Ansatz zu detektieren (1. Firefly, 2. Renilla). Dabei war die erzeugte Lumineszenz direkt proportional zur Luziferase-Enzymaktivität. Für die Analysen wurde das Mitras LB 940 Luminometer verwendet.

3.5.2.2 Zelllyse

Die Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (GeneJuice Transfection Reagent®) und nach einer Inkubationszeit von 24-48 h lysiert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach dem Waschen (1 ml PBS/Well) mit 500 µl des im Kit enthaltenen „Passive Lysis Buffer“ für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch.

3.5.2.3 Luciferase-Analyse

Nach erfolgter Lyse wurden je 20 µl des Zellysates in ein Well der schwarzen 96-Well Messplatte überführt. Anschließend wurden im ersten Schritt (Messung der Firefly-Aktivität) 50 µl LARII Puffer dem Lysat zugefügt und die entstehende Lumineszenz, nach einer Inkubation von 2 s, für 10 s gemessen. In einem zweiten Schritt wurden diesem Ansatz 50 µl Stop&Glow Puffer mit 0,5 µl Stop&Glow-Reagenz zugegeben. Der Puffer stoppte die Aktivität der Firefly-Luciferase und enthielt gleichzeitig das Substrat der Renilla-Luciferase. Nach einer Inkubation von 2 s erfolgte die Messung der entstandenen Lumineszenz für 10 s. Hierfür wurde das Dual-Glo™ Luciferase Assay System verwendet.

3.5.2.4 Auswertung der Mammalian Two- und Three-Hybrid Assays

Um mögliche Unterschiede der lysierten Zellzahlen auszugleichen, wurde der Gesamtproteingehalt im Lysat mit Hilfe des P-Class P300-30 NanoPhotometer (Implen GmbH, München, DE) bestimmt und mit den Einzelwerten der Firefly- und Renilla-Luziferasen multipliziert. Anschließend wurde der Mittelwert der einzelnen Triplet-Messungen für die jeweilige Luziferase gebildet und die Ratio beider Luziferasen zueinander berechnet (Firefly/Renilla). In einem letzten Schritt wurden die Werte der Kontrollen (pMX + pVP16; pM+pVP16X; pMY+pVP16; pM+pVP16Y), die der eigentlichen Messung (pMX+pVP16Y; pMY+pVP16X) und der Positivkontrolle (pMFANCA+pVP16FANCG) ins Verhältnis zum Hintergrund (pM+pVP16) gesetzt und so die Stärke der Interaktion bestimmt. Um die Werte der einzelnen Messungen untereinander vergleichen zu können wurden die Werte der Positivkontrolle (pMFANCA+pVP16FANCG) gleich 100 Prozent gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der IBM SPSS 21.0-Software. Es wurde der zweiseitige Students-T-Test angewendet. Hierbei galten Unterschiede von $p < 0.05$ als signifikant.

3.5.3 Gewinnung und Aufreinigung von Proteinen

Die His6-gekoppelten (His6-Tag) Proteine wurden in verschiedenen E. coli-Stämmen und in Insektenzelllinien exprimiert. Der für die Isolation verwendete Hexahistidin (His6-Tag) besitzt eine starke Affinität zu Ni²⁺-Ionen. Er bildet mit den zur Isolation verwendeten Protino® Ni-IDA Resin-Beats Chelate, wodurch die Proteine an die Säule gebunden werden. Die His6-gekoppelten Proteine können unter Zugabe von Imidazol, welches um die Bindung konkurriert, von der Säule eluiert werden. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte in einem ersten Schritt über eine Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie

(IMAC). Zur weiteren Aufreinigung wurde die Größenausschluss Chromatographie (Gelfiltration) verwendet.

3.5.3.1 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Der geklärte Überstand wurde auf die mit Lysispuffer vorbereitete Siliko-Matrix (Protino[®] Ni-IDA Resin) gegeben und bei 4°C schwenkend inkubiert. Anschließend wurde das matrixgekoppelte Protein mit doppeltem Säulenvolumen gewaschen (3x). Die Elution der Proteine von der Säule erfolgte mit imidazolhaltigem Elutionspuffer (250-500 mM Imidazol).

3.5.3.2 Größenausschluss-Chromatographie

Diese Methode wurde zur finalen Aufreinigung des Proteins verwendet. Sie basiert auf dem größenabhängigen Elutionsverhalten der Proteine über eine HiLoad[™] 16/60 Superdex[™]200 pg Säule (CV = 124 ml). Sie enthält eine stark vernetzte Agarose-Dextran-Matrix. Dieses Substrat ermöglicht eine größenbedingte Separation von Molekülen zwischen 10 und 600 kDa. Hierbei eluieren große Proteine bzw. Proteinkomplexe schneller als kleine. Zusätzlich ist so die Trennung von monomerem und oligomerem Protein möglich. Die Chromatographie erfolgte mit dem ÄKTA Purifier 10 unter Anlegen von isostatischem Druck. Vor dem Auftragen des Proteins auf die Säule wurde es mit Hilfe eines VIVASPIN2 10.000 MWCO PES Zentrifugalkonzentrators konzentriert und anschließend zentrifugiert (20 min, 16.100 g, 4°C). Der eingesetzte Puffer wurde vor seiner Verwendung entgast und temperiert (4 °C). Er glich in seiner Zusammensetzung dem Elutionspuffer, enthielt jedoch weder Detergenzien noch Imidazol. Die eluierten Proteinfraktionen wurden mittels SDS-Page überprüft und anschließend sofort weiter verwendet (3.11.4 *Thermal Shift Assay*, 3.2.1 *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)*) oder in Aliquots zu 20 µl in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

3.5.3.3 Isolation von Proteinen aus *E. coli* – Expressionsanalyse (kleine Mengen)

Die Expressionen wurden bei 25 °C und 37 °C und in verschiedenen *E. coli*-Stämmen (ArcticExpress Competent Cells; BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RIL Competent Cells; BL21 Star[™](DE3)pLysS One Shot[®] Chemically Competent; Rosetta[™] (DE3) Competent Cells) durchgeführt. Als Medien wurden LB-Medium und Autoinduzierendes Medium nach Studier et al. 2005 verwendet. (Die Ansätze mit autoinduzierendem Medium wurden bis zur Autoinduktion OD₆₀₀ = 0,8-0,9 bei 37 °C kultiviert und erst danach auf eine gewünschte, niedrigere Temperatur herabgekühlt.). Am Abend wurden 4 ml LB-Medium mit einzelnen, am Vortag transfizierten (3.3.3.3) Kolonien angeimpft und mit entsprechenden Antibiotika versetzt und über Nacht (37 °C) schüttelnd inkubiert. Am Folgetag erfolgte das Animpfen der 37 °C- und der 25 °C-Kulturen. Die 37 °C-Kulturen wurden am Morgen angesetzt (4 ml frisches Nährmedium, 1 ml Vorkultur, Antibiotikum). Nach dem Erreichen von einer OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Expression induziert (pETM11: 1mM IPTG, pBADM11: L(+) Arabinose 0,02 %). Die Bakterienkulturen wurden nach 4 Stunden geerntet (13 min, Eppendorfzentrifuge 5810R: 4.000 rpm, 4 °C) und die Pellets bei -20 °C gefroren.

Vor der Ernte der Kultur wurden 15 µl als Expressionskontrolle für eine SDS-Page-Analyse (SDS-Page) abgenommen. Das Animpfen der 25 °C Kulturen erfolgte am frühen Nachmittag. Bei einer OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Proteinexpression induziert und der Ansatz über Nacht (25 °C) schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die 25 °C Kulturen, nach Probenentnahme, geerntet (13 min, Eppendorffzentrifuge 5810R: 4.000 rpm, 4 °C). Die Pellets der 37 °C- und der 25 °C-Kulturen wurden mit je 500 µl Lysispuffer versetzt und mit dem Labsonic M Sonifikator aufgeschlossen (2x10 Zyklen (Cycle 0,8; 80 %)). Es wurde eine 15 µl-Probe entnommen und das Sonifikat 20 min (4 °C) bei voller Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge pelletiert. Dem abgenommenen Überstand wurden 100 µl equilibrierte Siliko-Matrix (Protino® Ni-IDA Resin) zugegeben und der Ansatz inkubiert (mind. 1 h, schwenkend, 4 °C). Danach wurden die matrixgekoppelten Proteine durch invertieren in 500 µl Lysispuffer gewaschen. Nach Absetzen der Matrix wurde der Überstand verworfen, dem Pellet sowie der vorher abgenommenen Probe 50 µl 5x Ladepuffer zugegeben und die Proteine denaturiert (5 min, 95 °C). Die denaturierten Proben wurden auf einem 15% SDS-Gel via SDS-PAGE (3.5.7.2) aufgetrennt (150 V, RT) und nach anschließender Coomassie-Färbung beurteilt.

3.5.3.4 Isolation von Proteinen aus *E. coli* - Expressionsanalysen (2 l)

Diese Expressionsanalysen erfolgten Großteils nach unter Absatz 3.5.3.3. beschriebenem Prinzip. Die Bakterien wurden bei der gewünschten Temperatur kultiviert. Hierfür wurden 2 l Medium mit 5 ml Vor- kultur angeimpft und die Expression bei einer OD₆₀₀ = 0,6 induziert. Die Kulturen wuchsen über Nacht rüttelnd im Inkubator und wurden durch Zentrifugation im JLA.8.1 Rotor) geerntet (10 min, 9.000 rcf, 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in ein 50 ml Falcon überführt, zentrifugiert (10 min, Eppendorffzentrifuge 5810R: 4.000 rpm, 4 °C) und bis zur Lyse in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Aufschließen der Bakterien erfolgte durch Sonifizieren mit dem Labsonic P in 40 ml Lysispuffer (3x 2 min (Cycle05, 80 %)). Anschließend wurden 15 µl für die SDS-Page abgenommen und das Lysat in kleinen Fugenbechern zentrifugiert (Avanti J-26 XP, Rotor: Ja2550, 1h, 18.000 rpm, 4 °C). Mit dem restlichen Überstand wurde mit 2 ml vorbereiteter Siliko-Matrix (Protino® Ni-IDA Resin) eine IMAC (3.7.3.1) durchgeführt (mind. 1 h, schwenkend, 4 °C). Nach Absetzen der proteingekoppelten Matrix wurde diese mit 20 ml Waschpuffer gewaschen (3x). Das Protein wurde mit 2 ml Elutionspuffer von der Siliko-Matrix eluiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Von allen Wasch- und Elutionslösungen wurden je 15 µl Proben für eine SDS-Page abgenommen. Das verbleibende Protein wurde anschließend mit Hilfe eines VIVASPIN2 10.000 MWCO PES Zentrifugalkonzentrators konzentriert (4.000 g, 4 °C) und zur weiteren Reinigung auf eine HiLoad™ 16/60 Superdex™200 pg aufgetragen (3.7.3.2). Für die Aufreinigung wurden verschiedene Puffer getestet, die sich in pH-Wert (8,0; 9,0), Gehalt an Tris, NaCl und verwendeten Zusatzstoffen (Guanidiniumhydrochlorid, NP-40), unterschieden. Zusätzlich wurden TCEP zum Reduzieren von Disulfidbrücken, Proteinase-Inhibitor (1 Tablette) und DNase beigemischt.

3.5.3.5 Isolation von Proteinen aus Insektenzellen - Initiale Expressionen

Für initiale Expressionstests wurden 24, 48 und 72 h nach der Infektion Proben aus der Insektenzellkultur (Sf9/Sf21, H5) entnommen und die Zellen pelletiert (4 min, 250 g, 4 °C). Für die Isolation der Proteine wurden initial dieselben Puffer wie in den *E. coli* Expressionstests verwendet. Das Aufschließen der Zellen erfolgte in 200 µl Lysispuffer mit dem Labsonic M Sonifikator (2x 20 Zyklen: Cycle 0,8; 80 %). Anschließend wurde eine 15 µl Probe (SDS-Page) abgenommen, das restliche Sonifikat zentrifugiert (15 min, ppendorfzentrifuge 5810R: 4.000 rpm, 4 °C) und der Überstand in frische Eppendorfgläser überführt. Mit den Überständen und den Pellets wurden Western Blot-Analysen durchgeführt.

3.5.3.6 Isolation von Proteinen aus Insektenzellen- Expressionen in 10 ml

Für diese Tests wurden 10 ml der Sf9- / 21-Kulturen 24/48/ und 72 h, nach der viralen Infektion mit 1-4% Virusüberstand, geerntet. Die Aufreinigung erfolgte wie unter 3.5.3.3 beschrieben.

3.5.3.7 Isolation von Proteinen aus Insektenzellpellets der externen Expressionen (2 l)

Zur weiteren Forcierung der RAD51C- und XRCC3-Proteingewinnung wurde die Expression außer Haus gegeben (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig, DE). Dort wurden 1-2 l Kulturen Sf21- und H5- Zellen mit Virus angeimpft und die Zellen pelletiert. Die Co-Expressionen erfolgten mit zwei verschiedenen Viren (Ausgangsvektor für Bacmidgenerierung: pFastBac™ HTa_RAD51C und pFastBac™ HTa_XRCC3) bzw. mit einem Virus (Ausgangsvektor für Bacmidgenerierung: pFastBac™ Dual_RAD51C-XRCC3). Der Aufschluss der Zellen erfolgte nach demselben Prinzip wie unter 3.5.3.4 *Isolation von Proteinen aus E. coli - Expressionsanalyse (2 Liter)* beschrieben, mit einer Modifikation, betreffend der Aufreinigung des Proteins über die Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie. Das Binden des Proteins an die Silikomatrix (Protino® Ni-IDA Resin-Beats) und das Waschen wurde hier in Säulen durchgeführt. Das Waschen und Eluieren erfolgte unter Anwendung von leichtem Druck. Die Waschlösungen und Elutionsfraktionen wurden für jeden Schritt separat aufgefangen, wie oben beschrieben denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das verbleibende Protein wurde entweder über einen VIVASPIN2 10.000 MWCO PES Zentrifugalkonzentrator (Sartorius AG, Goettingen, DE) konzentriert (4.000 g, 4 °C) oder direkt per Gelfiltration über die Äkta weiter gereinigt (3.5.3.2). Für die Reinigung der Proteine wurden, ausgehend von denen zur Reinigung aus *E. coli* verwendeten, zusätzliche Puffer getestet: Phosphatpuffer, Puffer nach Compton et al 2010 [12], Puffervariation nach Compton et al 2010.

3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden über eine Absorptionsmessung im NanoDrop ND 1000 (Peqlab) bestimmt. Der Kalkulation lag das Lambert-Beer-Gesetz zu Grunde. In sie flossen der spezifische Extinktionskoeffizient des Proteins (ϵ) bei der gemessenen Absorption, die Stärke der Küvette und die relative Absorption im Vergleich zum pufferbedingten Hintergrund ein (Pfeiffer and Liebhaufsky 1951). Der Extinktionskoeffizient wurde auf dem ExpASy Proteomics Server kalkuliert.

3.5.5 Thermal Shift Assay

Über diesen Assay sollte ein geeigneter Puffer für die Reeinigung- und Weiterverarbeitung des Proteins ermittelt werden. Dies geschieht durch die Stabilitätsmessung des Proteins in verschiedenen Puffern anhand seiner thermischen Entfaltung. Die Möglichkeit, die Auffaltung des Proteins zu analysieren, beruht auf der Eigenschaft des Fluorophors Sypro®Orange (Sigma Aldrich). Dieses wird von dem Wasser seiner Umgebung gequench und kann erst detektiert werden, wenn es in den hydrophoben Taschen des sich entfaltenden Proteins gebunden wird. Die daraus resultierende Erhöhung der Fluoreszenz λ Ex 492 nm und Emission λ Em 610 nm kann somit zur Bestimmung der relativ entfalteten Proteinmenge in der Lösung angesehen werden (Matulis et al. 2005). Für diesen Test werden 5 μ l des Proteins (0,1-0,2 μ l in Elutionspuffer) mit 5 μ l Sypro®Orange (25x in Elutionspuffer) versetzt und in je 15 μ l verschiedene Pufferlösungen mit einer Endkonzentration von 100 mM (2.7 Pufferscreen: Thermal Shift Assay) gegeben (96 PP-PCR-Platte (Greiner Bio-One). Die Ansätze wurden über 70 Schritte von 25 °C auf 95 °C erhitzt (1 °C/Zyklus). Das bei steigenden Temperaturen emittierte Licht wurde mit dem Real-Time PCR System Stratagene Mx3005P unter Verwendung der MXPRO-Software detektiert und so die Stabilität des Proteins in verschiedenen Puffern bestimmt. Die Daten wurden, unter Zuhilfenahme einer von Structural Genomics Consortium (SGC) in Oxford zur Verfügung gestellten Excel-Kalkulationstabelle, ausgewertet.

3.5.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Diese Methode eignet sich zur *in vitro* Untersuchung des Bindungsverhaltens von Proteinen an verschiedene DNA-Strukturen. Sie beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten von Protein, DNA und proteingebundener DNA, wobei an DNA-gebundenes Protein aufgrund der erhöhten Größe langsamer läuft, als die DNA-Struktur bzw. das Protein allein. Trug man die Protein-DNA-Ansätze auf ein natives Gel auf, konnte man so im Falle einer Proteinbindung an die DNA ein Verschieben der Bande nach oben beobachten, das als Nachweis für die Bindung galt. Für unsere Versuche wurden zuerst die verschiedenen DNA-Strukturen aus DNA-Einzelsträngen generiert (3.2.8), hierbei wurden die CY3 markierten Oligonukleotid-Kombinationen verwendet. Um das ideale Verhältnis von Protein und DNA-Substrat zu ermitteln, wurden je 100 nM DNA und verschiedene Proteinkonzentrationen (4-0,5 μ M) getestet. Die Reaktionen erfolgten in je 20 μ l Ansätzen im Gel-Shift-Assay-Puffer (30 min, 4 °C oder 25 °C). Zur Überprüfung der Bindung wurden Protein (0,75 μ M), die DNA-Substrate (0,1 μ M) und jeweils 5 μ l der Ansätze auf native Tris-Glycin-Gele (6-10%) aufgetragen. Die Proben wurden zuvor mit Glycerin versetzt, welches als Ladepuffer diente. Die Trennung erfolgte bei 4 °C (ca. 1 h, 120 V). Um das Fortschreiten der Trennung zu verfolgen, wurde eine der DNA-Proben mit 6x Gelladepuffer Glycerin, Orange G, statt Glycerin versetzt. Aufgrund der CY3-Markierung konnten die Gele anschließend im PharosFX™Plus Molecular Imager ausgelesen werden, was eine erste Beurteilung einer DNA-Bindung ermöglichte. Für die genauere Analyse wurde anschließend eine Silberfärbung durchgeführt (3.5.7.4).

3.5.7 Nachweis von Proteinen

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteingemische erfolgte auf denaturierenden und auch nativen Gelen.

3.5.7.1 Denaturierende Gele - SDS Gele (SDS-PAGE)

Zur größenabhängigen Auftrennung der Proteine wurde eine Gel-Elektrophorese auf denaturierenden SDS-Gelen durchgeführt. Sie bestanden aus einem 5 % Sammel- und einem 15 % Trenngel aus Acrylamid. Hierfür wurden 15 µl Probe mit 5 µl 5x Ladepuffer vermischt und denaturiert (5 min, 95 °C). Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und eine Elektrophorese bei 200 V durchgeführt. Anschließend erfolgten entweder Western Blotanalysen (Western Blotanalyse) oder Coomassie- bzw. Silberfärbungen (3.5.7.4). Des Weiteren wurden für Co- Immunopräzipitationen (3.5.1) kommerzielle 10 well-NuPAGE® Novex® 7% Tris-Acetat Gel (Life Technologies, Carlsbad, USA) zur Auftrennung von Proteinen verwendet.

3.5.7.2 Native Gele

Diese Art von Gelen wurde für den Electrophoretic Mobility Shift Assay (3.5.6) und zur Überprüfung der für die Bindungsstudien annealten Oligonukleotide (3.2.8) eingesetzt. Bei den für diese Arbeit verwendeten Gelen handelte es sich um TBE- und Tris-Glycin-Gele. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in dem zum Gel passenden Laufpuffern bei 120 V bis zur gewünschten Auftrennung.

3.5.7.3 Färbungen

Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte entweder über die Coomassiefärbung (Proteinnachweisgrenze bei ca. 100 ng) oder über die sensitivere Silberfärbung (DNA; RNA, Proteinnachweisgrenze ca. Proteine 0,1 bis 1 ng).

3.5.8 Proteintransfer (Western-Blot)

Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Äquilibrierung der SDS-Polyacrylamidgele in Transferpuffer (5 min). Die zum Aufbau des Blots verwendeten Schwämme und Whatman-Papiere wurden in Transferpuffer eingeweicht und die verwendete PVDF-Membran (Hybond-P Amersham Biosciences) in 100% Ethanol aktiviert. Das Blotten wurde in einem XCell II™ Blot Module“ in Verbindung mit dem BlueBlot Wet 100 Tank durchgeführt. Dieser war während des Transfers (75 V für ca. 1,25 h) an ein DLK500 FRYKA Kühlsystem angeschlossen

3.5.8.1 Immunologische Detektion von Proteinen

Im Anschluss an den Western Blot wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in 5% Milch/PBS-T abgesättigt (1 h bei RT oder über Nacht 4 °C). Nach kurzem Waschen der Membran in 1xPBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (AK I) in 5% Milch/PBS-T. Die Inkubationsdauer betrug je nach Antikörper 1-2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Zur vollständigen Ent-

fernung des ungebundenen Antikörpers folgten drei Waschschriffe (1xPBS-T, 15 min, RT). Daran schloss sich eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (AK II) in 5% Milch/PBS-T an (mindestens 1h, RT, schwenkend). Nach Entfernung des überschüssigen, ungebunden AK II (4x 15 min, 1x PBS-T) erfolgte die Detektion des Proteins. Auf Basis der an den AKII gekoppelten Meerrettich-Peroxidase in Verbindung mit dem Detektionsreagenz „Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate“ (Millipore Corp., Billerica, USA) wurden die auf der Membran immobilisierten Proteine detektiert, dies erfolgte mit dem MicroChemi-Detektor (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel). Für eine Weiterverwendung der Membranen wurden Antikörper mit Medium Stripping Buffer von der Membran entfernt.

3.6 Mosaikanalysen

3.6.1 Zweiparametrischen BrdU-Hoechst Zellzyklus-Analyse zur Bestimmung des G2-Phase-Arrests

Fanconi Anämie-Patienten fallen auf Zellebene durch einen verzögerten G2-Phase Arrest nach Induktion von Doppelstrangbrüchen auf. Diese wurden in unseren Experimenten mittels MMC, einem DNA-quervernetzenden Reagenz, induziert. Um die Verzögerung der G2-Phase durchflusszytometrisch nachweisen zu können, wurden zu PHA-stimulierten Lymphozyten verschiedene Konzentrationen MMC (5/10/50 ng/ml) und das Thymidinbasenalog Bromdesoxyuridin (BrdU) hinzugegeben und diese für 72 h inkubiert. Die stimulierten Zellen wurden anschließend geerntet und nach Färbung mit Hoechst 33258 und Ethidiumbromid mittels zweiparametrischer BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Durchflusszytometrie gemessen. Dies erfolgte nach der in Kubbies et al. 1985 beschriebenen Methode. Die Isolation der Patientenzellen für diese Versuche erfolgte aus heparinisiertem Vollblut über eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation. Des Weiteren wurden biopsierte Fibroblastenkulturen, unter Verwendung von Hoechst 33342, mit derselben Methode untersucht. Zur Abschätzung des Mosaikstatus im Blut wurden mit dieser Methode Blutmischungsstudien durchgeführt. Hierzu wurde heparinisiertes Patientenblut mit dem von gesunden Kontrollpersonen in 10-Prozentschritten gemischt (100% Patient:0% Kontrolle, 90% Patient:10% Kontrolle, ... 10 % Patient:90% Kontrolle, 0% Patient:100% Kontrolle).

3.6.2 Separation der Blutzellreihen CD3⁺, CD14⁺, CD15⁺ und CD19⁺ aus Vollblut (MACS)

Für diese Methode wurden das Whole Blood Column Kit in Verbindung mit MS-Säulen, Whole Blood MicroBeads, dem MACS MultiStand sowie QuadroMACS™ bzw. dem OctoMACS™ Separator verwendet (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

Aufgrund der zu erwartenden geringen Zellzahl der Patienten wurden die Blutproben gesplittet und aus jedem Aliquot zwei Zelllinien isoliert. Da die Zelltypen in unterschiedlicher Menge im Blut vorliegen, war hierbei auch die Reihenfolge der Separationen wichtig (Probe A: 1.) CD19⁺, 2.) CD14⁺; Probe B: 1.) CD3⁺, 2.) CD15⁺). Als Ausgangsmaterial diente je 10 ml heparinisiertes Vollblut. Dieses wurde mit 500 µl Mikrobeads versetzt und schwenkend inkubiert (15 min, 4 °C). Anschließend wurde der Ansatz mit 30 ml gekühltem MACS-Puffer versetzt und abzentrifugiert (10 min, RT, 450 g, ohne Bremse). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen und das verbleibende Pellet mit MACS-Puffer (1x Volumen) vermischt. Das Gemisch wurde auf die mit MACS-Puffer equilibrierte Whole Blood Column im QuadroMACS™ aufgetragen und der Durchfluss bis zur Isolation der zweiten Zellpopulation gelagert (4 °C). Die Säulen wurden anschließend mit MACS-Puffer (3x, 3 ml, 4 °C) gewaschen und der Durchfluss ebenfalls für die Weiterverwendung aufgefangen. Danach wurden die Zellen, außerhalb des Magnetes, mit 5 ml Elutionspuffer (RT) eluiert. Zur Steigerung des Reinheitsgrades wurde das Eluat in einem zusätzlichen Schritt über MS-Säulchen aufgereinigt. Dies erfolgte durch Waschen der Zellen über, in den OctoMACS™ eingespannte, equilibrierte MS-Säulen (3x 0,5 ml MACS-Puffer, 4 °C). Anschließend wurden sie mit 0,5 – 1 ml MACS-Puffer (4°C) eluiert. Vor der Isolation der zweiten Zellpopulation wurden die bei 4 °C aufbewahrten Durchflüsse abzentrifugiert (5 min, 400 g, RT) und das Pellet mit MACS-Puffer gewaschen (5 min, 400 g, RT). Der Überstand wurde verworfen, das verbliebene Gemisch mit MACS-Puffer auf das Ausgangsblutvolumen aufgefüllt und die Prozedur von vorn begonnen. (*Aus Reinheitsgründen sollten maximal 2 Zelltypen pro Blut separiert werden*). Anschließend wurde aus einem Aliquot der Zellen gDNA isoliert (3.1.3) und über ein weiteres die Reinheit der Isolation bestimmt (3.6.3).

3.6.3 Durchflusszytometrische Analysen zur Bestimmung von Zelltypen und Reinheitsgrad der MACS-Sortierungen

3.6.3.1 Zellstatus im Vollblut

Vor der anteiligen Bestimmung der einzelnen Zellkompartimente (CD3⁺, CD14⁺, CD14⁺ und CD19⁺ Zellen) im Vollblut wurden die Erythrozyten mittels Erythrozyten-Lysispuffer eliminiert. Hierfür wurden 100 µl Vollblut mit 2 ml Lysispuffer inkubiert (10 min, RT). Nach einer Pelletierung (400g, 5 min, RT) wurden die verbliebenen Zellen in 2 ml MACS-Puffer (4 °C) gewaschen und erneut abzentrifugiert (400g, 5 min, RT). Anschließend wurden die Zellen (ca. 1x10⁶) in 100 µl MACS-Puffer resuspendiert und, wie im Anschluss beschrieben, gefärbt.

Der Zugabe von 8 µl Fluorophor (FITC/APC/PE)-markiertem Antikörper (Mischungen siehe Tabelle 5) zu 100 µl Zellsuspension (in MACS-Puffer) folgte eine Inkubation (20 min, auf Eis, unter Lichtausschluss). Anschließend wurde die Suspension mit 2 ml MACS versetzt, abzentrifugiert (400 g, 5 min, RT) und die Zellen erneut in 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Für die nachfolgende Messung am Durchflusszytometer BD LSRII (BD, Biosciences, Heidelberg) wurden die Zellen in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Über die Bestimmung der Granularität gegenüber der CD45-Markierung konnten die Zellen in ihre verschiedenen Untergruppen (Mono-/Lympho-/Granulozyten) aufgeteilt und so der Zellstatus im Vollblut bestimmt werden.

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Fluorophorkombinationen für die Reinheitsprüfung.

Nummer	AK	Zellspezifität	Fluorophor
1	CD45	Leukozyten	APC
2	CD45 + CD3	T-Zellen	APC-FITC
3	CD45 + CD19	B-Zellen	APC-PE
4	CD45 + CD3 + CD19	T- und B-Zellen	APC-FITC-PE
5	CD45 + CD14	Monozyten	APC-FITC
6	CD45 + CD15	Granulozyten	APC-FITC
7	CD45 + CD20	B-Zellen	APC-PE

3.6.3.2 Reinheitsbestimmung der separierten Zellreihen via Immuno-Phänotypisierung

Zur Überprüfung der Reinheit, der über MACS-Sortierung (3.6.2) gewonnen Blutzellreihen erfolgte eine auf Immuno-Phänotypisierung basierende durchflusszytometrische Analyse. Hierfür wurden je ca. 1×10^6 der sortierten Zellfraktionen mittels CD-Rezeptor-spezifischer, antikörpergekoppelter Farbstoffe markiert und durchflusszytometrisch im BD LSRII gemessen. Die Färbung erfolgte wie unter 3.6.2 beschrieben. Durch Doppelfärbung der Zellen mit CD-45-APC und dem jeweiligen zelltypspezifischen CD3/CD14/CD15 bzw. CD19 Antikörper, konnte die Reinheit der MACS-sortierten Separationen bestimmt werden. Durch das Setzen von entsprechenden Gates wurde zusätzlich der Anteil der positiven Zellen der entsprechenden Untergruppe definiert.

3.6.4 Mosaikgradeinstufung heterozygoter Patienten via Sequenzanalyse

Als Grundlage zur Ermittlung des Mosaikstatus der Patientenzellen wurden DNA-Mischungsreihen durchgeführt. Hierfür erfolgte die Mischung genomischer Fibroblasten-DNA einer nicht FA-Kontrolle (Kon) und eines heterozygoten Patienten (Pat) in verschiedenen Verhältnissen : 100% Pat + 0% Kon; 99% Pat + 1% Kon; Pat 98% + Kon 2%; Pat 97% + Kon 3%; Pat 95% + Kon 5%; Pat 90% + Kon 10%; Pat 80% + Kon 20%; Pat 70% + Kon 30%; Pat 60% + Kon 40%; Pat 50% + Kon 50%; 0 % Pat + 100% Kon. Diese Gemische wurden als Template für PCRs (3.1.8) eingesetzt und anschließend sequenziert (3.2.6).

Die Flächeninhalte unter den Peaks der entsprechenden Position, wurden mit Hilfe des Photoshop-Auswahltools bestimmt. Beide Flächen wurden summiert und der jeweilige Anteil des wildtypischen Peaks

und des mutierten Peaks an der Gesamtfläche bestimmt. Diese Bestimmung wurde mehrmals wiederholt (G>A: 4x, C>T: 5x) und ein Mittelwert aus den Messungen gebildet. Über die so erhaltenen Mittelwerte der Mutationspeaks und deren Zuordnung zum Anteil der eingesetzten DNA wurde der Grad der Reversion bestimmt und eine Kurve zur Eingruppierung erstellt. Hierfür wurde auf der X-Achse der Anteil des detektierten, mutierten Allels und auf der Y-Achse der tatsächlich eingesetzte Anteil der mutierten DNA aufgetragen. Auf diese Weise konnte über den prozentualen, detektierten Anteil des Mutationspeaks am Gesamtpeak auf das Wildtyp/Mutationsverhältnis in der Patienten-DNA geschlossen werden. Zusätzlich wurden die beobachteten Reversionsgrade der verschiedenen Mischungsansätze im Bezug zu 100% Mutation bestimmt. Hierzu erfolgte die prozentuale Berechnung der Mutationspeakfläche der Mischungsansätze bezogen auf die Fläche des 100 % heterozygoten Peaks. Für die Patienten erfolgte eine Mutationsanalyse der betreffenden Positionen ebenfalls via Sangersequenzierung. Die prozentualen Anteile der Mutationspeaks wurden, wie oben beschrieben, bestimmt. Die Zuordnung des Reversionsgrades erfolgte über die erstellte Kurve. Eine weitere Variante der Eingruppierung der Reversionen in den Patientenzelllinien erfolgte über die Bestimmung der prozentualen Anteile des Mutationspeaks der einzelnen Patientenzelllinien im Vergleich zum Mutationspeak der Fibroblasten-DNA-Sequenz des jeweiligen Patienten.

Hierfür wurden ebenfalls die Flächen der mutationsbedingten Peaks der einzelnen Zellliniensequenzen herangezogen und ihr prozentualer Anteil an der Mutationspeakfläche der Fibroblastensequenz berechnet. Die DNA-Sequenz der Fibroblasten konnte als 100% Mutation herangezogen werden, da bisher für Fibroblasten keine Reversionen bekannt sind und sie somit die Ausgangssituation im Patienten am besten darstellen. Als dritte Variante wurde bei der Eingruppierung der Reversion ein theoretisches Peakverhältnis von noch 50 % zugrunde gelegt. Bei allen Varianten war zu beachten, dass die Peaks in der Ausgangssituation (100% heterozygoter Patient) möglichst den gleichen Flächeninhalt (ca. 50%) besaßen. Da sich die Peakhöhen der Sequenzen von Vorwärts- und Rückwärtsprimer unterscheiden, wurde der Berechnung aller Ansätze eine der beiden Sequenzen zugrunde gelegt. Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit der Peakhöhe von den verwendeten Primerpaaren beobachtet, weshalb für die Patientenanalysen teilweise verschiedene Primerpaare ausgetestet wurden.

3.6.5 Chromosomenbruchanalysen aus Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierter Vollblutkultur

Zur Analyse wurde heparinisiertes Vollblut eingesetzt. Pro Patient wurden je zwei Kontrollen und zwei Ansätze mit je 50 ng/ml und 100 ng/ml MMC angesetzt. Der Ansatz erfolgte steril in 10 ml RPMI-Komplettmedium (+ 16 %FCS), er enthielt: 0,2 ml Phytohämagglutinin (PHA), entsprechend MMC und 0,8 ml Vollblut. Zum Schaffen eines günstigen Kulturmilieus, geschah die Inkubation in den fest verschlossenen Zellkulturflaschen (72 h, 37 °C). Die Präparationen erfolgten nach der früher beschriebenen Standardmethode für Chromosomenbruchanalysen (Berger et al. 1993). Die Proben wurden anschließend mit 5% Giemsa-Lösung gefärbt. Die Auswertung erfolgte nach dem Protokoll der „Freien Universität

Amsterdam“, 1997. Hierbei wurden die Bruchraten in mindestens 50 Metaphasen ausgezählt, wobei Ringchromosomen, dizentrische Chromosomen sowie Tri- und Quadriradialfiguren als zwei Brüche und trizentrische Chromosomen als drei Brüche gezählt wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Studien zu Mosaiken bei FA-Patienten

Im blutbildenden System von Fanconi-Anämie-Patienten treten durch Reversionen häufiger Mosaik auf. Anzeichen dafür stellen die Stabilisierung der Blutwerte und die Normalisierung spontaner, als auch durch MMC-induzierter, G2-Phase-Arreste dar. Als ein weiterer Hinweis, kann die Reversion einer Mutation in einer *in vitro* immortalisierten Patientenzelllinie gewertet werden.

Um einen möglichst umfangreichen Einblick in den Mosaikstatus im Patientenblut zu erhalten, wurde dieses mittels verschiedener Methoden analysiert. Die Empfindlichkeit der T-Lymphozyten gegenüber MMC wurde durchflusszytometrisch und mittels Chromosomenbruchanalyse untersucht. Um Erkenntnisse über einen möglichen Mosaikstatus in T-Lymphozyten und weiteren Zelllinien (B-Lympho-, Mono- und Granulozyten) zu erhalten, wurden antikörperbasierende MACS-Separationen (3.6.2) an Vollblut durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Sanger-Sequenzierung, zur Analyse der genomischen DNA, der einzelnen Separationen, des Vollbluts, der Fibroblasten und der etablierten Blutlymphozytenzelllinien. Außerdem wurden die Blutwerte der Patienten über längere Zeiträume beobachtet, um Aufschlüsse über einen möglichen Zeitpunkt der Reversion zu erhalten, sowie die Thrombozyten und Erythrozyten in die Studie mit einzubinden. Die vorliegende Studie umfasst fünf compound-heterozygote FA-Patienten der Untergruppen FA-A (3) und FA-D2 (2).

4.1.1 Durchflusszytometrische Analysen

Aufgrund von DNA-Reparatur-Defekten zeigen PHA-stimulierte FA-Patienten-Lymphozyten typischerweise einen im Vergleich zu Nicht-FA-Kontrollen erhöhten spontanen und MMC-induzierten G2-Phasearrest. Dieser wird routinemäßig, wie bei Kubbies et al. 1985 beschrieben, mittels zweiparametrischer BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Durchflusszytometrie gemessen. Die Schwellenwerte für die Diagnose FA liegen für einen spontanen Arrest bei einer Ratio (Summe von G2-Phasen/Summe der Wachstumsfraktion ($\sum G2/GF$)) von 0,25 und für einen induzierten Arrest bei $\sum G2/GF = 0,4$. Diese Schwellenwerte basieren auf langjährigen Messungen eines großen Kollektives (FA: n=216, nicht FA: n=507).

4.1.1.1 Blutmischungsreihen

Um für nachfolgende Untersuchungen eine Richtlinie zur Einschätzung eines möglichen Mosaikes in Patientenblut zu erhalten, wurden Blutmischungsreihen mit Patientenblut und dem von Nicht-FA-Kontrollpersonen in Abstufungen von 10 %-Schritten durchgeführt (3.6.1). Für die aus diesen Ansätzen isolierten und PHA-stimulierten (72 h) lymphoblastoiden Zellen wurde der G2-Phase-Arrest mittels zwei-parametrischer durchflusszytometrischer BrdU/Hoechst-Zellzyklusanalyse bestimmt (3.6.1). Die Ansätze erfolgten zu drei unabhängigen Zeitpunkten mit Blutmischungen von drei verschiedenen Kontrollpersonen, sowie drei verschiedenen Patienten. Die Analysen zeigten eine Korrelation zwischen linearem Anstieg von G2-Phase-Arresten mit steigendem FA-Zellanteil. Diese Beobachtung trifft sowohl auf den spontanen als auch auf den MMC-induzierten (10 µg/ml) Arrest zu. Die Werte für den spontanen Arrest liegen zwischen $\sum G2/GF = 0,136$ (100 % Kontrolle: 0 % FA) und $\sum G2/GF = 0,497$ (0 % Kontrolle: 100 % FA), die für den induzierten Arrest zwischen $\sum G2/GF = 0,197$ (100 % Kontrolle: 0 % FA) und $\sum G2/GF = 0,663$ (0 % Kontrolle: 100 % FA). Außerdem zeigt sich diese Methode im Mittel als sensitiv bis zu einer Reversion von circa 70 % der Blutzellen, was bedeutet, dass Probanden über diese Methode bis zu einem Anteil von etwa 30 % FA-Zellen im Blut noch als Patienten eingestuft werden. Dies gilt sowohl für den spontanen als auch den induzierten Arrest. Die genauen Werte sind in Abbildung 11 dargestellt, nach der auch die Einstufung der Patienten erfolgte.

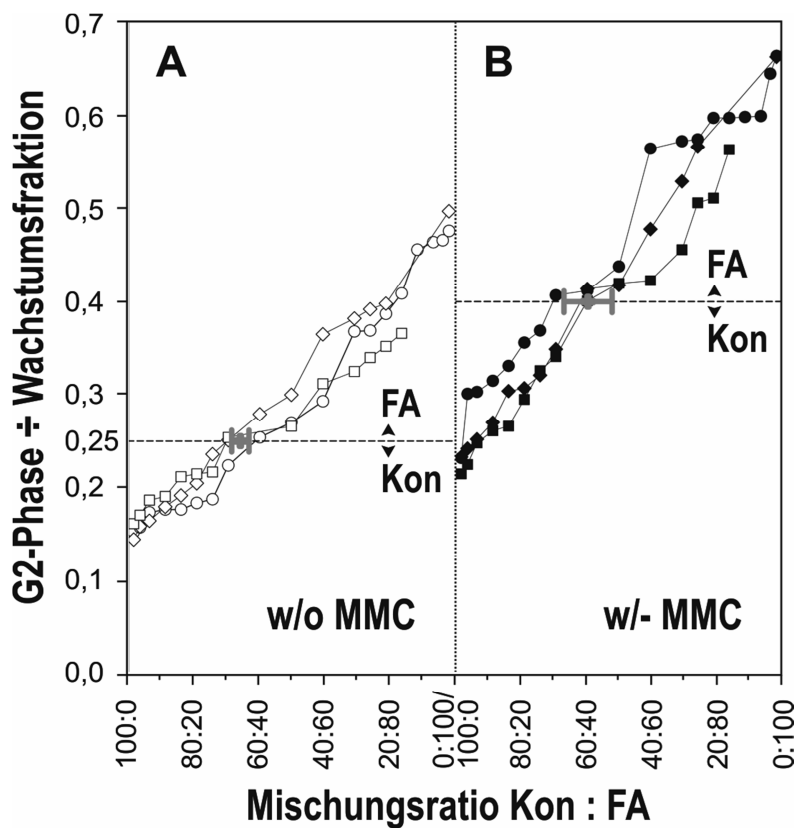


Abb. 11: Ergebnisse der auf BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Durchflusszytometrie basierenden Blutmischungsstudien: Blutmischungsverhältnisse (x-Achse) aufgetragen gegen $\sum G2/GF$ (Y-Achse) Kreise: Ansatz 1, Quadrate: Ansatz 2, Rauten: Ansatz 3, gestrichelte Linie: Schwelle für die FA-Diagnose, grauer Punkt mit Standardabweichung: Schwelle für den Reversionsgrad, der noch als FA-typisch eingestuft wird. Kontrolle = nicht FA-Patient; **A:** spontaner G2-Phase-Arrest. Bis zu einer Reversion von 75% erfolgt die Einstufung als FA-Patient ($\sum G2/GF = 0,25$), **B:** MMC-induzierter G2-Phase-Arrest. Der Schwellenwert zur FA-Klassifikation ($\sum G2/GF = 0,4$) wird ab einer Reversion von ca. 59% unterschritten.

4.1.2 MACS-Analysen

Zur Untersuchung von Mosaikstatus und -entwicklung *in vivo* erfolgte die Sortierung einzelner Patientenzelllinien aus Vollblut. Zur Isolation wurde auf das „*Magnetic Activated Cell Sorting*“ (MACS) System zurückgegriffen, welches auf Magnetbead-gekoppelten Antikörpern, in Verbindung mit starken Magneten, beruht. Die Epitope der Antikörper richten sich dabei gegen spezifische Oberflächenmarker der Zielzelllinien, den sogenannten „*cluster of differentiation*“ (CD). Auf diese Weise erfolgte die positive Selektion für T-Lymphozyten (CD3⁺), B-Lymphozyten (CD19⁺), Monozyten (CD14⁺) und Granulozyten (CD15⁺) aus Vollblut (3.6.2). Die Isolate wurden durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit geprüft und die isolierte genomische DNA (gDNA) einer Sequenzanalyse via Sangersequenzierung (3.2.6) unterzogen. Die Isolierung der gDNA erfolgte wie unter 3.1.3 *Isolation von gDNA aus MACS-separierten Zelllinien* beschrieben.

4.1.3 Reinheitsbestimmung via Durchflusszytometrie

Um bei späteren gDNA Analysen falsch positive bzw. falsch negative Schlüsse über den Reversionsgrad der einzelnen Zelllinien zu vermeiden, erfolgte eine Reinheitsanalyse der Separationen (6.6.3). Sie wird am nachfolgenden Beispiel erklärt. Die Zellen wurden mit spezifischen fluorochromgekoppelten Antikörpern gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Das Prinzip wird an Beispiel von CD15⁺ Granulozyten dargestellt (Abb. 12). Die Abbildungen C und D zeigen die Verhältnisse der Populationen nach der MACS-Separation. Hierbei ist zu erkennen, dass die Isolierung nicht zu 100 % Granulozyten, sondern auch einen Rest Lymphozyten enthält. Durch setzen des Gates auf die gesamte Granulozytenpopulation konnte der Anteil der Granulozyten in der Isolation dargestellt werden, er entspricht der Reinheit. Da jedoch nicht alle Granulozyten positiv auf CD15 gefärbt wurden, wird zusätzlich ein weiterer Wert angegeben, der sich nur auf die in Gate D dargestellten positiven Granulozyten bezieht. Diese Analyse verdeutlicht, dass die den Separationen neben den erwünschten Zellen immer noch Reste der anderen Zell-

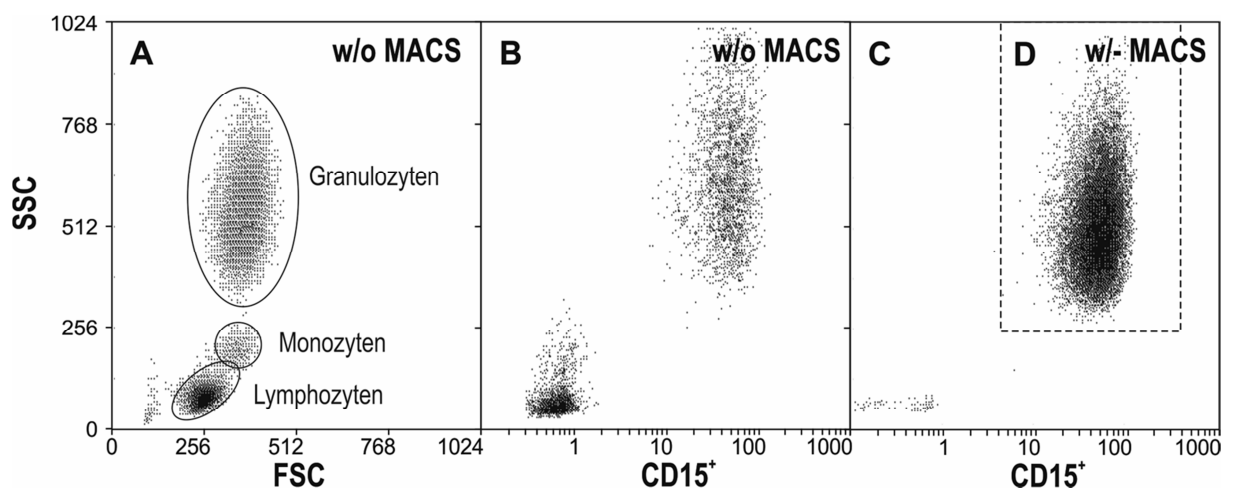


Abb. 12: Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheitsgrade am Beispiel von Granulozyten. Auf Basis von Granularität und fluorochromgekoppelten spezifischen Antikörpern. A: Die einzelnen Zellpopulationen im Vollblut sind auf Grund ihrer unterschiedlichen Granularität und Größe über die Kombination von Seitwärtsscatter (SSC) und Vorwärtsscatter (FSC) deutlich voneinander abgrenzbar. B: nach Färbung der Vollblutkultur mit FITC gekoppelten Antikörpern ist in der Darstellung SSC gegen FITC eine deutliche Rechtsverlagerung der CD15 positiven Granulozyten zu erkennen. C: Nach MACS Sortierung besteht der Großteil der Population aus Granulozyten. Aus dem entsprechenden Gate kann die Reinheit abgelesen werden. D: Setzt man ein weiteres Gate speziell auf die positiven Granulozyten (innerhalb D) kann zusätzlich der Anteil CD15-positiver Granulozyten bestimmt werden.

populationen enthalten. Diese Anteile sind in der Einordnung des Mosaikstatus zu berücksichtigen.

4.1.3.1 Erzielte Reinheiten der Patientenzellsortierungen

Mit oben beschriebener Methode erfolgte die Reinheitsprüfung der MACS-Separationen vier verschiedener Patienten (1-4). Für die einzelnen Zelllinien konnten unterschiedliche Reinheitsgrade erzielt werden. Die saubersten Isolationen erreichten wir im Mittel für Granulozyten (CD15⁺: 97,2 - 99,5 %), gefolgt von T-Lymphozyten (CD3⁺: 75,5 - 99,3 %) und B-Lymphozyten (CD19⁺: 54,5 - 93,9 %). Die schlechtesten Reinheiten wiesen Monozyten (CD14⁺: 37,6 - 91,2 %) auf. Hierbei zeigte sich eine starke Abhängigkeit der erzielten Reinheiten von Transportweg, der verstrichenen Zeit zwischen Blutentnahme und Isolation, sowie den Transporttemperaturen. Der direkte Einfluss der Bedingungen wurde über Isolationen aus Kontrollblut bestätigt (Versand per Kurier im Hochsommer versus direkt nach Entnahme). Die Aufarbeitung erfolgte hierbei parallel. Genaue Daten bezüglich erzielter Reinheiten der einzelnen Isolate, sowie der Zeitpunkt der Verarbeitung, sowie der Versand sind in Tabelle 6 aufgeführt. Erfolgten von einem Patienten mehrere Separationen, so wurden für die anschließende sequenzbasierende Auswertung des Mosaikstaus in den verschiedenen Patientenzelllinien, die Isolationen mit den höchsten Reinheitsgraden verwendet.

Tab. 6: Auflistung der erzielten Reinheiten der einzelnen MACS-Separationen aus Patienten- und Kontrollblut. Die jeweils zweiten Werte beziehen sich auf den positiven Anteil der Untergruppen der Isolate, die per spezifischen FITC-markierten Antikörper detektiert wurden. Beste Reinheiten wurden für Granulozyten erzielt, die schlechtesten für Monozyten. Die jeweils reinsten Isolate wurden zur Isolation von gDNA und Sequenzanalyse verwendet. 1: Hochsommer; 2: Winter; 3: Isolation im Labor von H. Hanenberg (Düsseldorf), keine Angaben über Reinheiten, Transportweg, -bedingungen

Patient	Isolation	Lymphozyten [%]	Monozyten [%]	Granulozyten [%]	Transport
1	CD3	99,3/99,7	0,4	0,2	nein
	CD14	2,0	91,2 / 85,0	3,5	nein
	CD15	1,2	0,2	98,6/99,4	nein
	CD19	93,9/98,7	4,5	2,1	nein
2	CD3	75,5/95,8	7,1	15,4	Kurier (1 d) ¹
	CD14	5,0	37,6/97,5	57,2	Kurier (1 d) ¹
	CD15	0,3	0,2	99,5 / 99,0	Kurier (1 d) ¹
	CD19	54,5/97,0	28,5	16,0	Kurier (1 d) ¹
4	CD3	90,0/97,5	3,0	7,0	Kurier (1 d) ¹
		94,1/99,8	3,8	2,1	nein
	CD14	2,0	43,0/84,0	55,0	Kurier (1 d) ¹
		1,7	83,5/88,0	14,8	Kurier (1 d) ²
	CD15	0,7	2,1	97,2/96,9	Kurier (1 d) ¹
		0,8	0,4	98,5/99,8	nein
	CD19	88,3/ (10 grün, 90 rot)	6,7	5,0	Kurier (1 d) ²
		76,5/- (0,6% T-Lymphozyten)	7,0	16,1	nein
5	CD3	k. A. ³	k. A. ³	k. A. ³	k. A. ³
	CD14	k. A. ³	k. A. ³	k. A. ³	k. A. ³
	CD15	k. A. ³	k. A. ³	k. A. ³	k. A. ³
	CD19	k. A. ³	k. A. ³	k. A. ³	k. A. ³
3	CD3	98,2/99,7	0,8	0,9	Auto (1 h)
	CD14	4,8	67,8/98,0	25,6	Auto (1 h)
	CD15	0,4	0,3	98,8/99,6	Auto (1 h)
	CD19	78,2/99,0	6,0	7,0	Auto (1 h)

4.1.4 DNA-sequenzbasierte Mosaikstatusbestimmung und Entwicklung von Mosaiken bei FA-Patienten

Die DNA für diese Analysen wurde wie unter 3.1.1 *Isolation von gDNA aus Vollblut*, 3.1.2 *Isolation von gDNA aus Zellkulturen* und 3.1.3 *Isolation von gDNA aus MACS-separierten Zelllinien* beschrieben gewonnen. Eine sequenzbasierte Beurteilung des Mosaikstatus in den MACS-separierten Patientenzelllinien, des Vollblutes und der lymphoblastoiden Zelllinien erfolgte durch die Bestimmung der anteiligen Mutationspeakfläche (in %) an der Fläche des Gesamtpeakes (Summe der Flächen Wildtyppeak und Mutationspeak). Hierbei wurde davon ausgegangen, dass in einem heterozygoten Individuum beide Allele in gleichen Anteilen vorhanden sind. Nach dieser Definition entsprechen die anteiligen Flächen unter den Peaks im Patienten ohne Reversion je 50 % der Gesamtpeakhöhe. Da sich Stärke der Reversion im Blut sich nicht zwangsläufig eins zu eins in der Sequenz widerspiegelt (theoretisch entsprechen 50 % revertierte Zellen 25 % mutiertem (mut) Allel und 75 % wildtypischen (wt) Allel) wurde eine DNA-Mischungsreihe etabliert. Anhand dieser wurde anschließend die Einstufung des Mosaiks auf Zellbasis abgeschätzt (4.1.3.1).

4.1.4.1 DNA-Mischungsreihe

Zur Etablierung der Mischungsreihe wurde eine tatsächlich revertierte Mutation des später beschriebenen heterozygoten Patienten CETP, herangezogen. Es handelt sich hierbei um eine Mutation der intronischen Sequenz zwischen Exon 34 und 35 (IVS34) des *FANCD2* Gens (c.3467-2A>G, (p.A1156VfsX10)). Die aus Fibroblasten isolierte gDNA des Patienten (Pat) und einer Nicht-FA-Kontrolle (Kon) wurden

in Abstufungen gemischt (100 % Pat + 0 % Kon; 99 % Pat + 1 % Kon; Pat 98 % + Kon 2 %; Pat 97 % + Kon 3 %; Pat 95 % + Kon 5 %; Pat 90 % + Kon 10 %; Pat 80 % + Kon 20 %; Pat 70 % + Kon 30 %; Pat 60 % + Kon 40 %; Pat 50 % + Kon 50 %; 0 % Pat + 100 % Kon).

Nach PCR und Sangersequenzierung der Produkte wurden die Peakhöhenverhältnisse analysiert. Hierbei zeigte sich ein Unterschied zwischen den theoretischen Allelverhältnissen und den in den Elektropherogrammen detektierten Sequenzverhältnissen, welcher in Abbildung 13 beispielhaft für das gDNA-Verhältnis von 50 % Patienten-DNA zu 50 % Kontroll-DNA dargestellt wird. Wie sich die Peakverhältnisse innerhalb einer Mischungsreihe verändern, ist zusätzlich in Abbildung 14 dargestellt.

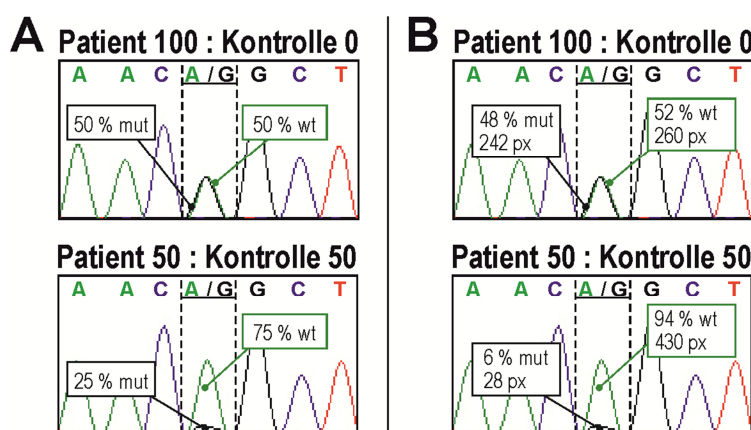
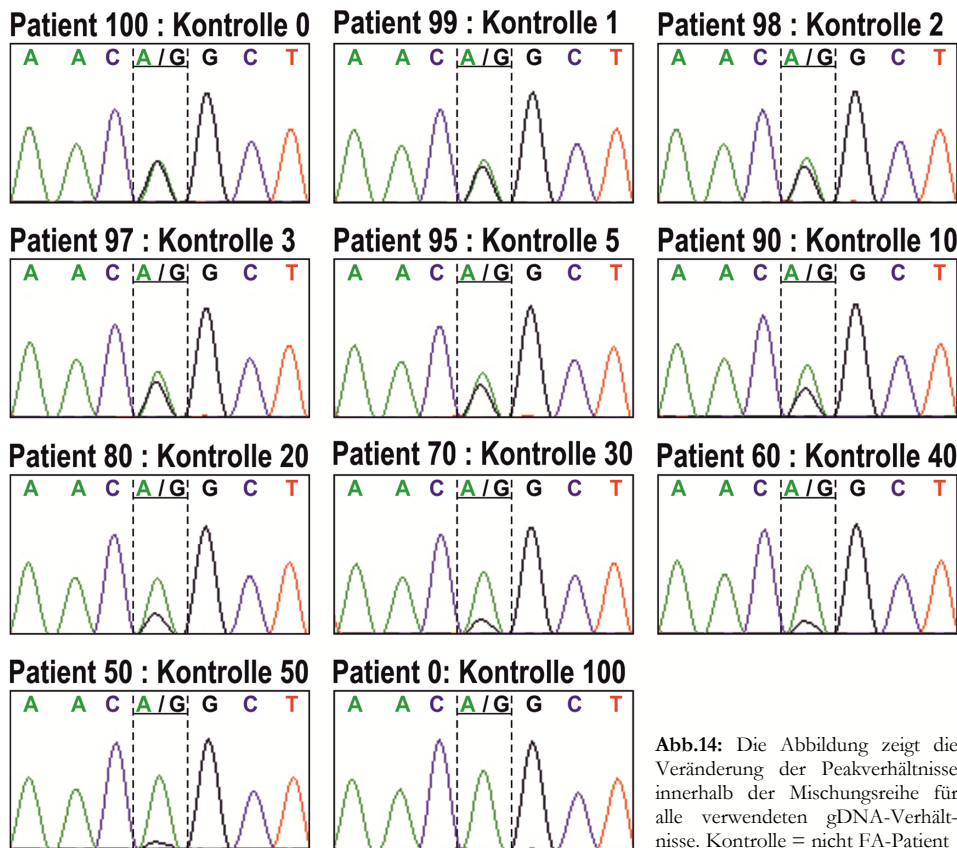


Abb. 13: Dargestellt sind die Unterschiede zwischen erwarteten theoretischen Allelverhältnissen und den tatsächlich beobachteten Verhältnissen. Verglichen werden 100% Mutation zu 50% Reversion in den Zellen. Die Angaben beziehen sich auf die Fläche des Gesamtpeakes (Peak mut + Peak wt) Kontrolle = nicht FA-Patient **A:** Werte geben die theoretischen Werte an. **B:** Werte geben die tatsächlich gemessenen Flächenverhältnisse an. Px: ermittelte Pixel.



Auf vierfacher Analyse dieser gemischten DNA-Konzentrationen erfolgte die Anfertigung einer „Mischungskurve“ (Abb. 15), die zur Einstufung des Mosaikstatus im Patientenblut diente. Auf diese Weise wurden, aus dem Anteil des Mutationspeaks am Gesamtpeak, Rückschlüsse auf den Anteil mutierter DNA geschlossen. Dieser Anteil entspricht dem, der für die Mischungsreihe verwendeten Patienten-DNA. Er stellt somit den verbleibenden Anteil an mutierten Zellen im Blut des eingruppierten Patienten dar. Subtrahiert man diesen Wert von 100 %, so erhält man den Reversionsgrad in den Patientenzelllinien.

Je nach Verwendung von Vorwärts- oder Rückwärtsprimern wurden Unterschiede in den Peakhöhenverhältnissen beobachtet. Deshalb ist es von Bedeutung, dass zur Einstufung des Mosaikstatus in den verschiedenen Patientenzellreihen, des Vollblutes bzw. der lymphoblastoiden Zelllinien der Patienten, immer die auf gleicher Primerbasis beruhende Sequenz zur Berechnung herangezogen wird. Dies ist auch wichtig, um die Ergebnisse der einzelnen Separationen bzw. Zelltypen vergleichen zu können.

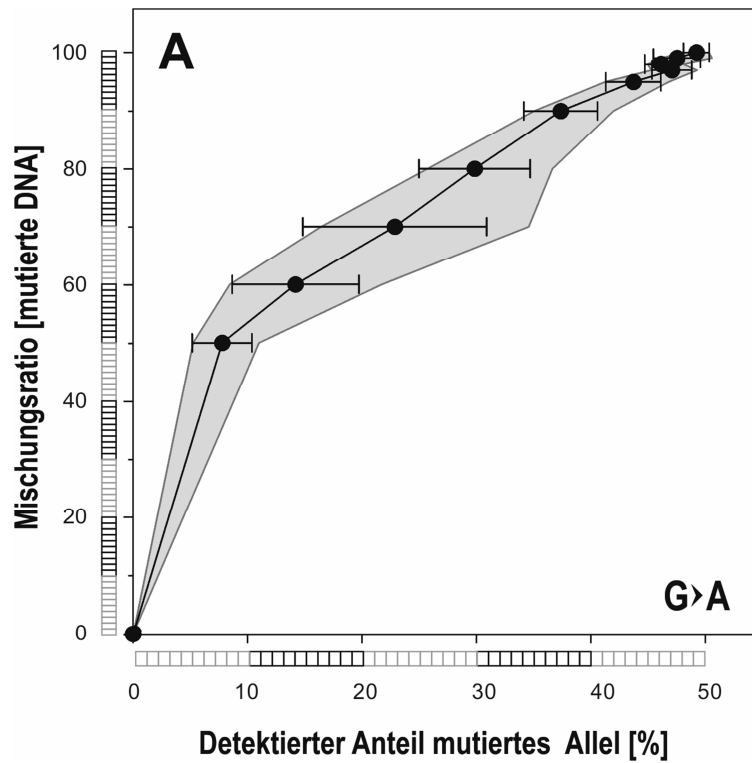


Abb. 15: Diagramm zur Einstufung des Mosaikstatus in den verschiedenen Patientenzelllinien. Aufgetragen sind Anteil des mutierten Allels an der Summe von Mutations- und Wildtyppeak (X-Achse) zu dem Anteil an Fibroblasten-DNA, der in den Mischungsreihen enthaltenen heterozygoten betroffenen Patienten-DNA (Y-Achse). Über den Anteil der Fläche unter dem Mutationspeak im Elektropherogramm können so Rückschlüsse über den Anteil der Mutationsverhältnisse im Patienten getroffen werden. Der Reversionsgrad in den Patientenzelllinien (%) entspricht der abgelesenen Mischungsratio [mutierte DNA].

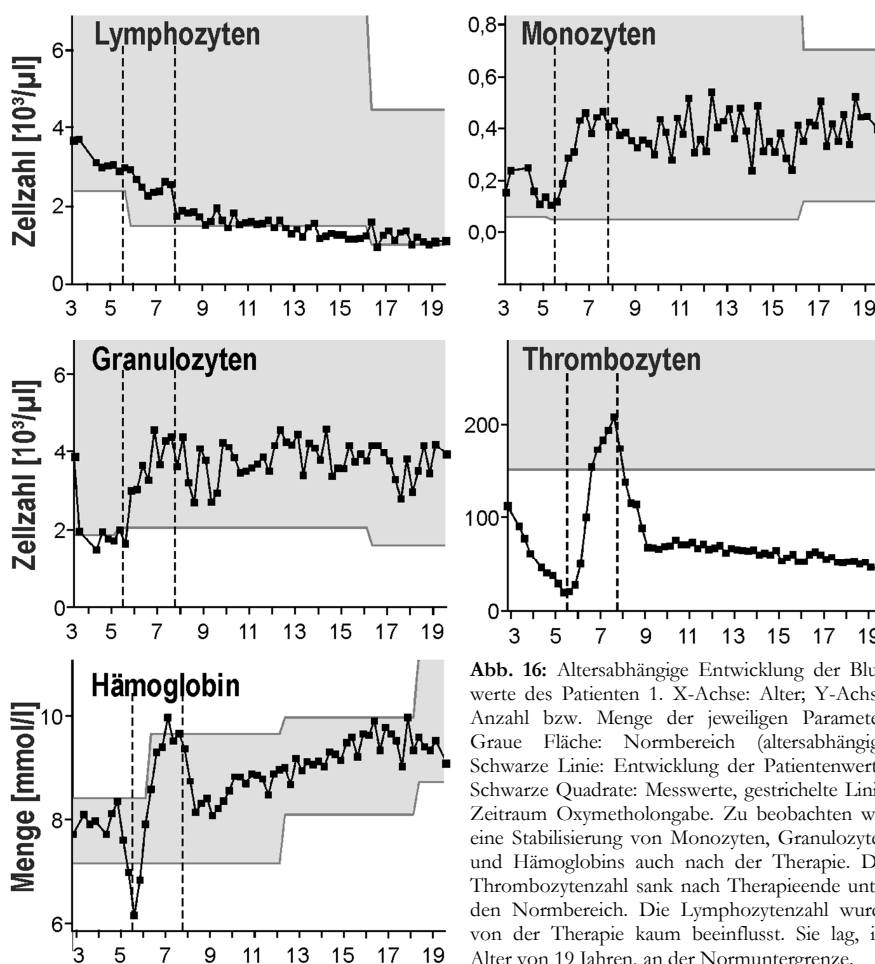
Deshalb beziehen sich die Analysen immer auf Sequenzen, deren Peaks (wt/ mut) in den Fibroblasten möglichst gleich hoch ausgeprägt waren und somit der theoretischen 50 zu 50-Prozentrade entsprachen. War dies nicht der Fall, wurden neue Primer für die PCR sowie die Sequenzierung designt. Ein Bezug auf die Fibroblastensequenz war möglich, da bisher keine Reversionen in Fibroblasten von FA-Patienten bekannt sind und sie somit immer als 100 % mutiert angesehen werden können.

4.1.5 Patient: 1 (FA-A)

Bereits 2002 erfolgte die Beschreibung des Patienten als Mosaikpatient durch unsere Arbeitsgruppe (Gross et al. 2002). Die beiden krankheitsauslösenden Mutationen in *FANCA*, c.827-1 G>T (Spleißmutation -> Deletion der ersten 32 bp des Exon 10) und c.971 T>G (p.L324R, Exon 11), wurden per Sanger-Sequenzierung identifiziert. Wobei für letztere eine komplette Reversion in einer etablierten lymphoblastoiden Patientenzelllinie beobachtet wurde. Die Erholung der Blutwerte (absolute Leukozyten, Granulozyten und Hämoglobin), über einen beobachteten Zeitraum von drei Jahren, ließ bereits damals eine *in vivo* Reversion vermuten (Gross et al. 2002). Allerdings ist zu beachten, dass während dieser Zeit eine Oxymetholontherapie (im Alter von 5,5 bis etwa 8 Jahren) erfolgte.

4.1.5.1 Entwicklung der Blutwerte

Die Dokumentation der Blutwerte umfasst einen Zeitraum von 17 Jahren (3.-19. Lebensjahr). Rückblickend lässt sich auch nach Beendigung der Oxymetholontherapie eine Stabilisierung der meisten Werte



beobachten (Abb. 16). Sie lagen zum letzten beobachteten Zeitpunkt, mit Ausnahme der Thrombozytenzahl ($44 \times 10^3/\mu\text{l}$), alle im altersabhängigen Normbereich (Diagramm: graue Fläche), (Lymphozyten $1,09 \times 10^3/\mu\text{l}$, Monozyten $0,39 \times 10^3/\mu\text{l}$, Granulozyten $3,92 \times 10^3/\mu\text{l}$, Hämoglobin $9,1 \text{ mmol/L}$). Dabei scheinen die Lymphozyten, welche sich an der Untergrenze des Normbereiches stabilisierten, von der Therapie weniger stark beeinflusst worden zu sein.

4.1.5.2 Analysen zum G2-Phase-Arrest

Durchflusszytometrische BrdU/Hoechst-Zellzyklusanalysen von PHA-stimulierten, mononukleären, lymphoblastoiden Zellen des Patienten zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum (hier exemplarisch dargestellt im Alter von 6, 11 und 18 Jahren) einen erhöhten spontanen G2-Phasearrest (w/o MMC), auf einem für FA-Patienten typischen Level ($\sum G2/GF > 0,25$). Der durch MMC induzierte Arrest (w/- MMC) lag ebenfalls auf dem Niveau anderer FA Patienten ($\sum G2/GF = 0,4$), mit leichter Tendenz in Richtung der Normalkontrollen (Abb. 17). Die letzte Analyse im Alter von 18 Jahren ergab hierbei eine Ratio von $\sum G2/GF = 0,375$ (spontan) bzw. $\sum G2/GF = 0,466$ (induziert). Vergleicht man die gemessenen Arreststratien ($\sum G2/GF$) mit diesen der Blutmischungsstudien, so liegt in den untersuchten lymphoblastoiden Zellen des Patienten eine Reversion von ca. 20-35 % (gemessen am spontanen Arrest) bzw. 35-45 % (gemessen am induzierten Arrest) vor.

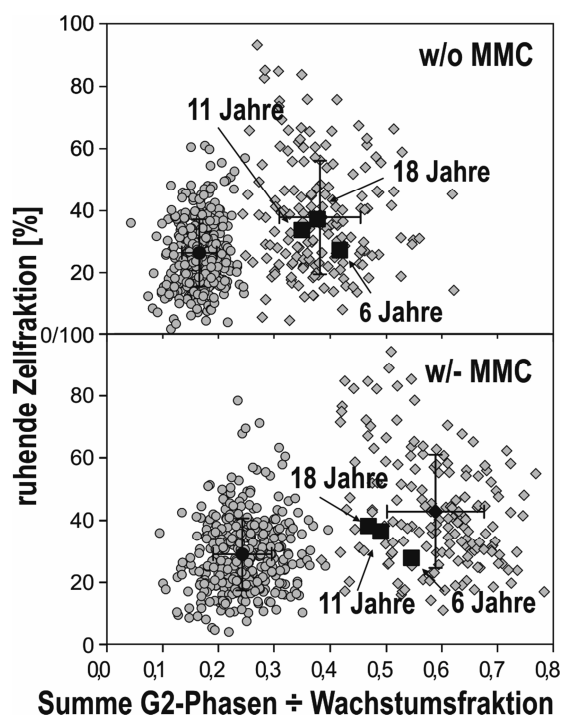


Abb. 17: BrdU/Hoechst-Zellzyklusanalysen Ficoll-isolierter, PHA-stimulierter (72h) Lymphozytenkulturen (exemplarisch im Alter von 6, 11, 18 Jahren). Aufgetragen $\sum G2/GF$ im Verhältnis zum Anteil der ruhenden Zellfraktion. Graue Kreise: FA-Patienten, Graue Rauten: Nicht-FA-Kontrollen. Der spontane G2-Phasearrest in den Zellen des Patienten lag auf dem Level von FA-Patienten ($\sum G2/GF > 0,25$) ebenso der MMC-induzierte (10 $\mu\text{g/ml}$; $\sum G2/GF > 0,4$).

4.1.5.3 Chromosomenbruchanalysen

Chromosomenbruchanalysen von PHA-stimulierten Vollblutkulturen des Patienten zeigten eine Normalisierung der Bruchraten hin zu denen von Nicht-FA-Kontrollpersonen. Die spontanen Bruchraten in den 62 ausgewerteten Patientenmetaphasen lagen für ein Bruchereignis bei 3 % und für zwei Bruchereignisse bei 2 %. Eine für Mosaikpatienten typische bimodale Verteilung der Bruchraten war, nach einer Behandlung mit 50 ng/ml MMC, ansatzweise zu beobachten (51 ausgewertete Metaphasen; 1 Bruch: 14 %; 4 Brüche: 2 %; ≥ 10 Brüche: 2 %). In den mit 100 ng/ml MMC behandelten Proben lag eine maximale Anzahl von 6 Bruchereignissen in 2 % von 59 bewerteten vor. Die weiteren Bruchraten lagen bei: 1 Bruch: 12 %; 2 Brüche 10 %, 3 Brüche: 8 %, 4 Brüche 3 %; 5 Brüche: 2 % (Abb. 18).

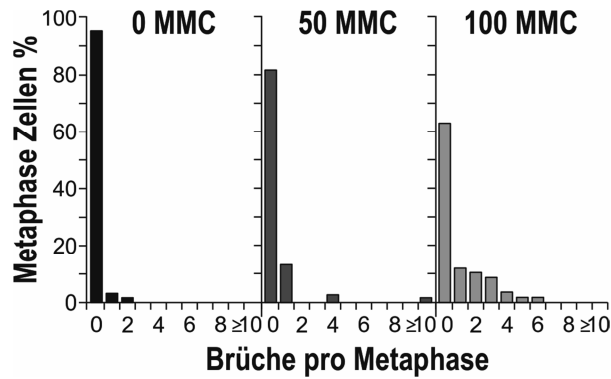


Abb. 18: Auswertung der Chromosomenbruchanalyse des Patienten 1. Dargestellt ist die Anzahl der Brüche pro Metaphase anteilig an der Gesamtzahl der bewerteten Metaphasen in %. Ausgewertet wurden: 0 MMC: 62; 50 ng/ml MMC: 62; 100 ng/ml MMC: 59 Metaphasen. Der Patient zeigte im Vergleich zu Normalkontrollen nur eine leicht erhöhte spontane Bruchrate. MMC induzierte DNA-Schäden führten ansatzweise zu der mosaikpatiententypischen bimodalen Ausprägung bei mittleren MMC-Konzentrationen und zu erhöhten Raten nach Behandlung mit 100 ng/ml MMC.

4.1.5.4 DNA-Sequenz basierende Mosaikanalysen

Die Blutentnahme erfolgte bei diesem Patienten (Alter 18 Jahre) direkt vor Ort, so dass die MACS-Separation sofort angeschlossen werden konnte. Die Zelllinien des Patienten wurden, wie oben beschrieben, auf ihre Reinheit überprüft. Ihre Reinheitsgrade lagen bei 99,3 % (T-Lymphozyten, davon 99,7 % positiv), 93,9 % (B-Lymphozyten, davon 98,7 % positiv), 91,2 % (Monozyten, 85 %) und 98,6 % (Granulozyten, davon 99,4 % positiv). Die jeweiligen Anteile der anderen Zelllinien in den Isolaten sind in der Tabelle 6 (4.1.2.2) dargestellt. Basierend auf Sanger-Sequenzierung der isolierten DNA des Patienten 1, konnte die bereits bekannte Reversion der Punktmutation c.971 T>G (p.L324R) im Exon 11 des *FANCA* Genes in allen untersuchten Zelltypen nachgewiesen werden (Abb. 19).

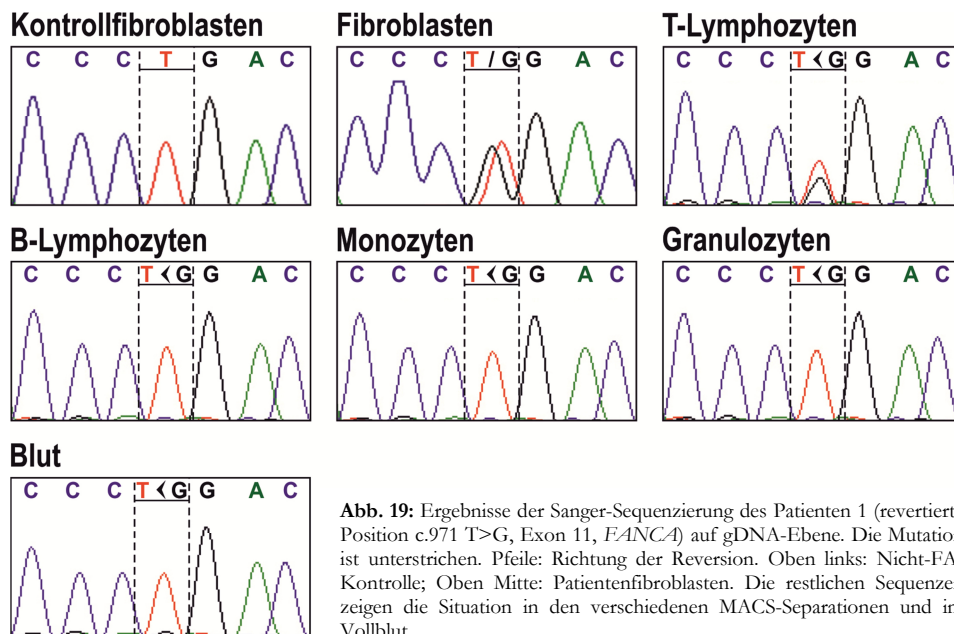
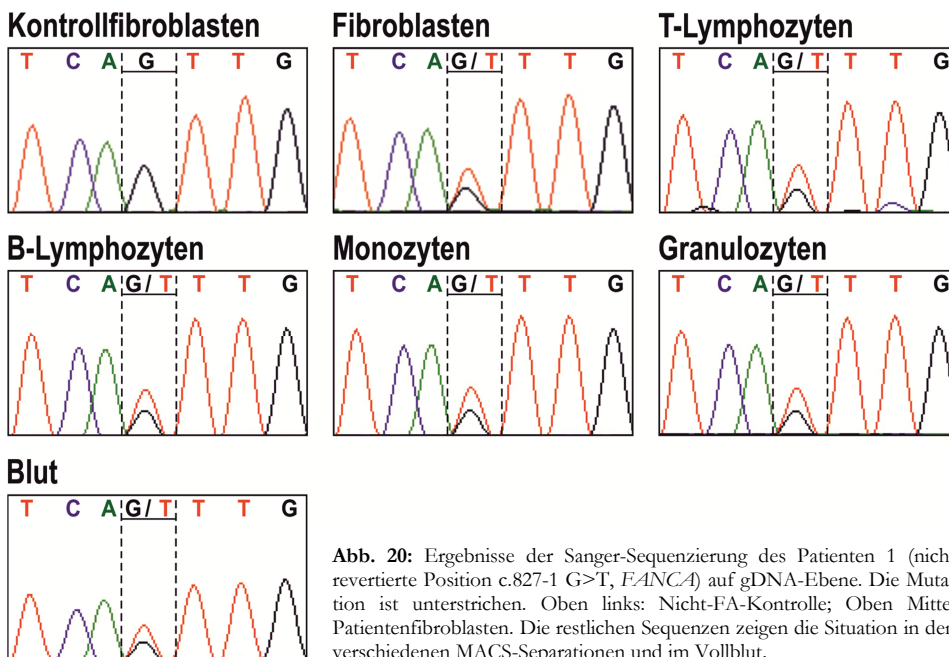
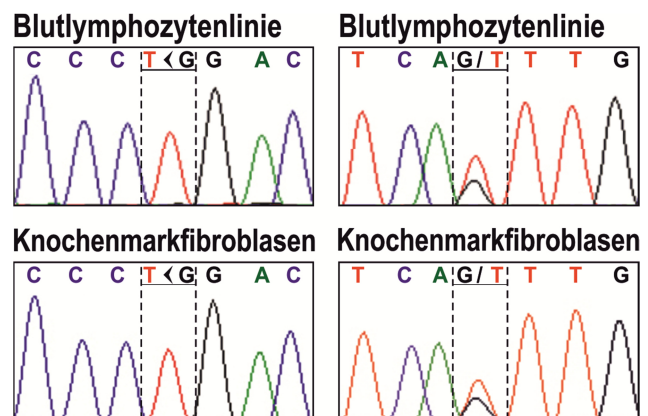


Abb. 19: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Patienten 1 (revertierte Position c.971 T>G, Exon 11, *FANCA*) auf gDNA-Ebene. Die Mutation ist unterstrichen. Pfeile: Richtung der Reversion. Oben links: Nicht-FA-Kontrolle; Oben Mitte: Patientenfibroblasten. Die restlichen Sequenzen zeigen die Situation in den verschiedenen MACS-Separationen und im Vollblut.

Da die Anteile des mutationsbedingten und wildtypischen Peak am Gesamtpeak annähernd gleich waren (Peak_{mut.}: 47,4 %; Peak_{wt.}: 52,6 %), konnte die unter 4.1.3.1 DNA-Mischungsreihe beschriebene Kurve zur Eingruppierung der Reversion verwendet werden. Die stärkste Reversion (je 100 %) zeigte sich in Isolaten von B-Lymphozyten, Monozyten, und Granulozyten. Der geringste Grad an Reversion (etwa 14 %) konnte in der DNA der T-Lymphozyten-Separationen nachgewiesen werden. Im Vollblut betrug die Reversion ca. 76 %. Für die zweite Mutation (c.827-1 G>T) des Patienten wurde keine Reversion beobachtet. Die entsprechenden Sequenzen der einzelnen Separationen sind gemeinsam mit der gDNA-Sequenz aus Fibroblasten, Vollblut und einer Nicht-FA-Kontrolle, aufgeführt (Abb. 20).



Des Weiteren wurde erstmalig eine Reversion in primären Knochenmarkfibroblasten nachgewiesen. Hierbei scheint es sich ebenfalls um eine hundertprozentige Reversion zu handeln, da der Mutationspeak nicht mehr detektiert werden konnte. Die Sequenzen sind gemeinsam mit denen der etablierten lymphoblastoiden Zelllinie in Abbildung 21 dargestellt.



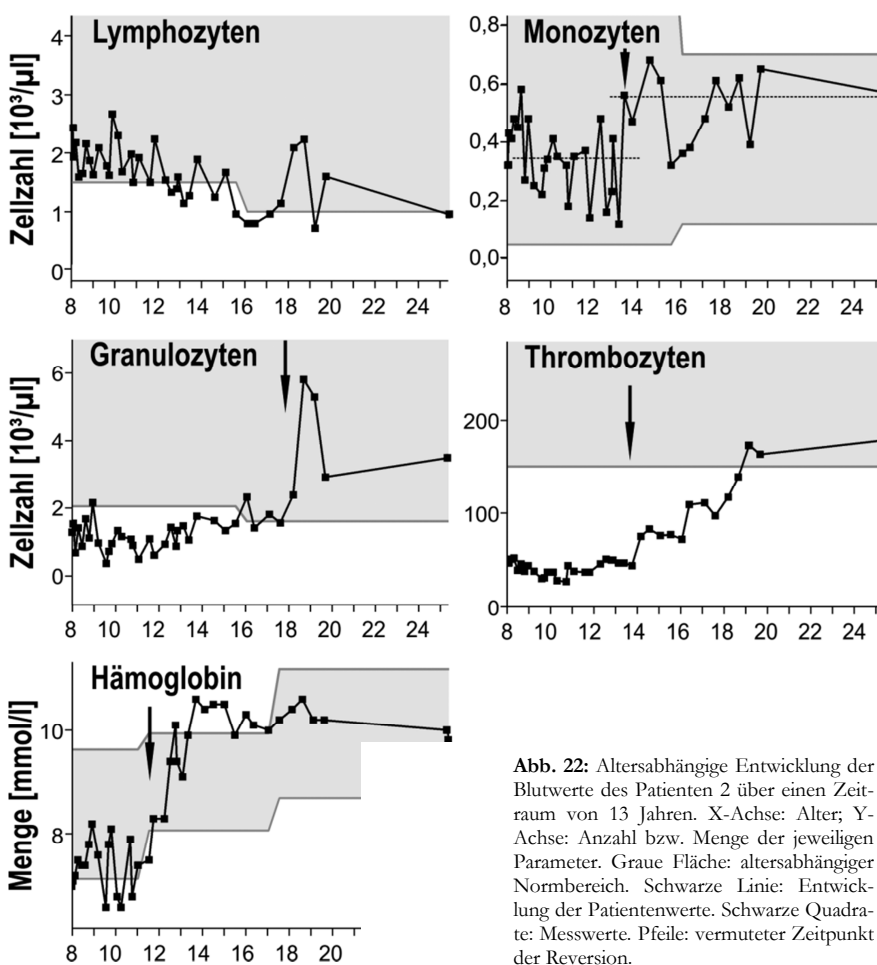
4.1.6 Patient: 2 (FA-A)

Wie auch für den vorherigen Patienten wurde für FA-A Patient 2 bereits 2002 eine Reversion der Mutation beschrieben (Gross et al. 2002). Die beiden *compound* heterozygoten *nonsense* Mutationen c.856 C>T (p.Q256X, Exon 10) und c.3976 C>T (p. Q1326X, Exon 40) in *FANCA* wurden per Sangersequenzierung in genomischer Fibroblasten-DNA detektiert (Gross et al. 2002). Die DNA-Analysen einer MMC-resistenten, lymphoblastoiden Zelllinie und die von mononukleären Zellen aus Vollblut des Patienten zeigten eine Reversion der Mutation in Exon 10. Diese Reversion spiegelte sich in normalisierenden Chromosomenbruchraten und Zellzyklusanalysen auch nach Behandlung mit MMC wieder (Gross et al. 2002).

4.1.6.1 Entwicklung der Blutwerte

Die Blutwerte des Patienten wurden über einen Zeitraum von 13 Jahren dokumentiert, beginnend im Alter von 8 Jahren bis zur Gegenwart (Abb. 22).

Die Anzahl der Lymphozyten bewegt sich über diesen Zeitraum immer an der Untergrenze des definierten Normbereiches, wobei sich der aktuellste Wert auf $0,95 \times 10^3$ Zellen pro μl beläuft. Der auf Grund steigender und sich stabilisierender Blutwerte vermutete Reversionszeitpunkt liegt zwischen 11 Jahren



(Hämoglobin) und 17 Jahren (Granulozyten). Die aktuellen Werte liegen bei: Monozyten = $0,57 \times 10^3/\mu\text{l}$; Granulozyten = $3,49 \times 10^3/\mu\text{l}$; Thrombozyten = $218 \times 10^3/\mu\text{l}$; Hämoglobin = $9,8 \text{ mmol/l}$. Die Entwicklung der Blutwerte bestätigt die Durchsetzung der Reversion *in vivo*.

Abb. 22: Altersabhängige Entwicklung der Blutwerte des Patienten 2 über einen Zeitraum von 13 Jahren. X-Achse: Alter; Y-Achse: Anzahl bzw. Menge der jeweiligen Parameter. Graue Fläche: altersabhängiger Normbereich. Schwarze Linie: Entwicklung der Patientenwerte. Schwarze Quadrate: Messwerte. Pfeile: vermuteter Zeitpunkt der Reversion.

4.1.6.2 Analysen zum G2-Phase-Arrest

Zur Untersuchung des G2-Phase-Arrestes wurden durchflusszytometrische BrdU/Hoechst-Zellzyklusanalysen durchgeführt. Hierbei zeigten Ficoll-isolierte, PHA-stimulierte mononukleäre Zellen des Patienten nach 72 stündiger Inkubation spontane Arreste im intermediären Bereich zwischen Nicht-FA- und Patienten-Kontrollen. Nach MMC-induziertem DNA-Schaden befanden sich die Werte auf dem Niveau von Nicht-FA-Kontrollen. Diese Beobachtungen galten für den gesamten Zeitraum, in dem diese Analysen durchgeführt wurden. In Abbildung 23 sind exemplarisch die Ergebnisse im Alter von 11 (früheste Messung), 18 und 26 Jahren (gegenwärtige Messung) dargestellt. Für die aktuellste Analyse ergab sich ein Verhältnis der $\Sigma G2/GF$ von 0,283 bei spontanem Arrest (Obergrenze Nicht-FA-Kontrollen) und von 0,258 bei induziertem Arrest (Nicht-FA-Kontrollniveau). Vergleicht man diese Messungen mit denen der etablierten Blutmischungsreihen (4.1.1.1), so lässt sich für die untersuchten Zellen ein Reversionsgrad von 50-60 % (nach spontanem Arrest) beziehungsweise 90-95 % (induzierter Arrest) annehmen.

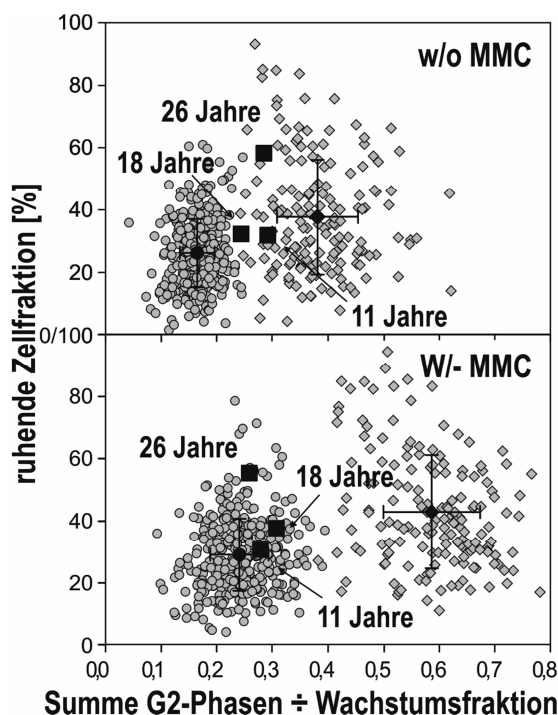


Abb. 23: BrdU/Hoechst-Zellzyklusanalysen Ficoll-isolierter, PHA-stimulierter (72h) Lymphozytenkulturen (exemplarisch im Alter von 11, 18, 26 Jahren). Aufgetragen $\Sigma G2/GF$ im Verhältnis zum Anteil der ruhenden Zellfraktion. Graue Kreise: FA-Patienten. Graue Rauten: Nicht-FA-Kontrollen.

4.1.6.3 DNA-sequenzbasierende Mosaikanalysen

Das Blut des Patienten erreichte uns auf postalischem Weg. Der eintägige Versand erfolgte bei sommerlichen Außentemperaturen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der einzelnen Separationen zeigten sehr variierende Reinheitsgrade. Die höchste Reinheit, 99,5 % (99 % positiv), wurde für Granulozyten erzielt. Für die $CD3^+$ T-Lymphozyten belief sie sich auf 75,5 % (95,8 % positiv). B-Lymphozyten konnten mit einer Reinheit von 54,5 % (97 % positiv) isoliert werden. Die schlechteste Reinheit, 37,6 % (97,5 % positiv), wurde für die Separation von Monozyten erreicht. Auffällig waren in allen Separationen die erhöhten Anteile von Granulozyten: 15,4 % in der T-Lymphozyten-, 16 % in der B-Lymphozyten- und 57,2 % in der Monozytenisolation. Des Weiteren wurden 28,5 % Monozyten in der B-Lymphozyten-Separation detektiert. Die weiteren Verteilungen der anteiligen, ungewünschten Zellenlinien können Tabelle 6 entnommen werden. Wie bereits unter 4.1.2.2 *erzielte Reinheiten der Patientenzellsortierungen* beschrieben, wurden die verringerten Reinheiten der Separationen vermutlich durch auf dem Transportweg beschädigte Granulozyten hervorgerufen.

Sanger-Sequenzierungen von *FANCA* der genomischen DNA aus den Separationen bestätigten die bereits beschriebene Reversion in Exon 10 (c.856 C>T). Die höchsten Grade der wildtypischen Sequenz wurden in B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten beobachtet (Abb. 24).

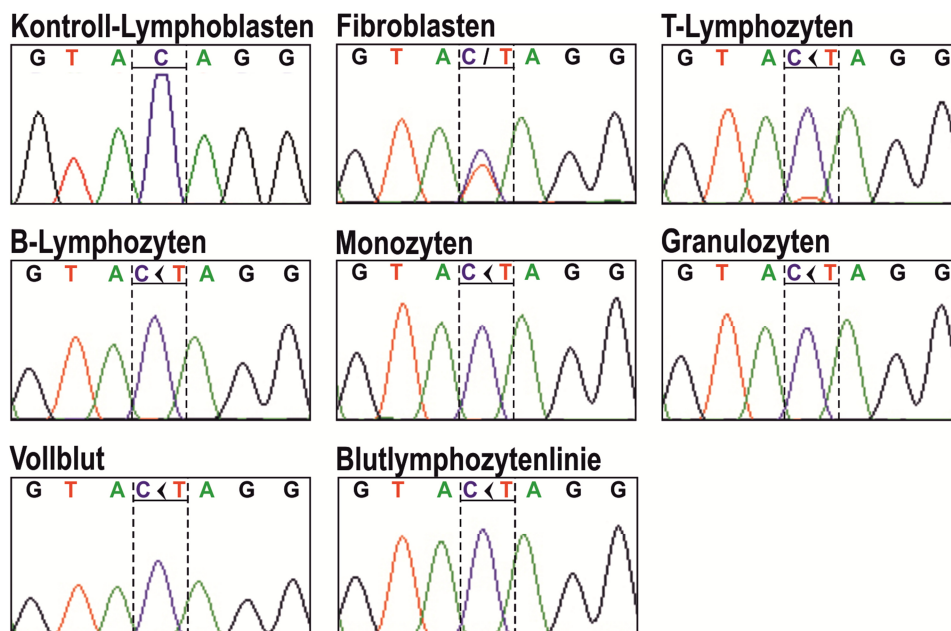


Abb. 24: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Patienten 2 (revertierte Position c.856 C>T, Exon 10, *FANCA*) auf gDNA-Ebene. Die Mutation ist unterstrichen. Pfeile: Richtung der Reversion, hin zum wt. Oben links: Nicht-FA-Kontrolle; Oben Mitte: Patientenfibroblasten. Die restlichen Sequenzen zeigen die Situation in den verschiedenen MACS-Separationen, im Vollblut und in einer etablierten lymphoblastoden Zelllinie.

Da bei diesem Patienten die prozentualen Anteile des mutationsbedingten und wildtypischen Peaks am Gesamtpeak stark voneinander abwichen (Peak_{mut}: 41,6 %; Peak_{wild}: 58,4 %), wurde für die Eingruppierung eine separate DNA-Mischungsreihe angefertigt (Abb. 25). Auffällig war, dass der von dem Mutationspeak stammende Peak nur bis zu einem Anteil von ca. 80 % wildtypischer DNA detektiert werden kann. Aus diesem Grunde kann die Reversion dieses Patienten nur bis ca. 20 % bestimmt werden. Legt man diese Kurve für die Eingruppierung des Mosaikstatus zu Grunde, können für diesen Patienten folgende Reversionen abgeschätzt werden: T-Lymphozyten: mehr ca. 15 %, B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten: mehr als 30 %, Vollblut: ca. 20 %.

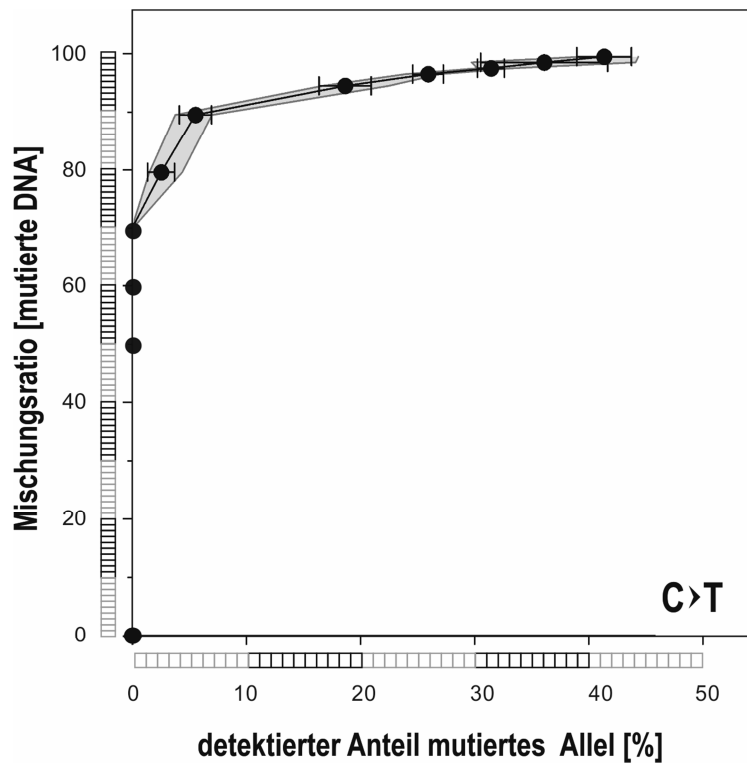


Abb. 25: Diagramm zur Einstufung des Mosaikstatus in den verschiedenen Patientenzelllinien des Patienten 1. Aufgetragen sind der Anteil des mutierten Allels an der Summe von Mutations- und Wildtyppeak (X-Achse) zu dem Anteil an Fibroblasten-DNA der in den Mischungsreihen zugesetzten heterozygoten Patienten-DNA (Y-Achse). Über den Anteil der Fläche unter dem Mutationspeak im Elektropherogramm können so Rückschlüsse über den Anteil der Mutationsverhältnisse im Patienten getroffen werden. Der Reversionsgrad in den Patientenzelllinien (%) entspricht der abgelesenen Mischungsverhältnis [mutierte DNA].

Für die zweite Mutation in Exon 40 von *FANCA* (c.3976 C>T) des Patienten wurde in keiner der Separationen eine Reversion im Vergleich zu der Fibroblastensequenz beobachtet. Auch in einer etablierten Blutlymphozytenlinie zeigte sich kein Anhaltspunkt für einen Rückgang des mutierten Allels. Die Elektropherogramme der isolierten genomischen DNAs sind in Abbildung 26 dargestellt.

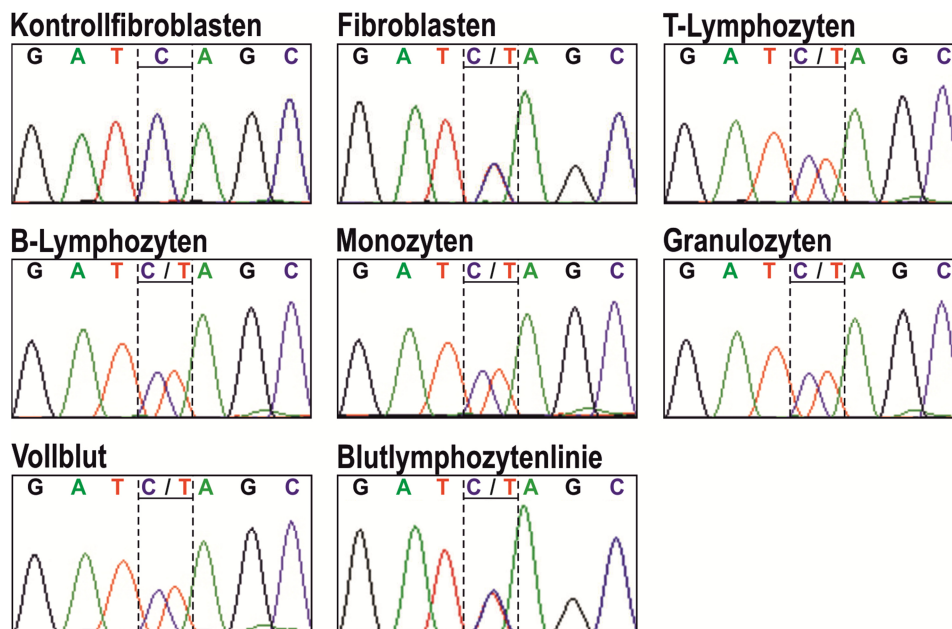


Abb. 26: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Patienten 2 (nicht revertierte Position c.3976 C>T, Exon 40, *FANCA*) auf gDNA-Ebene. Die Mutation ist unterstrichen. Oben links: Nicht-FA-Kontrolle. Oben Mitte: Patientenfibroblasten. Die restlichen Sequenzen zeigen die Situation in den verschiedenen MACS-Separationen, im Vollblut so wie der etablierten lymphoblastoiden Zelllinie.

4.1.7 Patient: 3 (FA-A)

Für diesen Patienten wurden zwei compound-heterozygote Mutationen im *FANCA*-Gen nachgewiesen.

Die bisher nicht beschriebene Dreibasenpaardeletion c.2316+1_2316+3delGTG betrifft den Spleißdonor nach Exon 25. Sie führt auf cDNA-Ebene zu einer Exonisierung der IVS25 (Abb. 27) sowie einem frühzeitigen Stopp (p.Q772*13). Das betroffene Allel konnte nur nach Stabilisierung, durch Zugabe von Cycloheximid, (3.1.5) nachgewiesen werden. Bei der zweiten maternal ererbten Mutation handelt es sich um eine bereits mehrfach beschriebene (Ameziane et al. 2008; Levrán et al. 2005)) Missense-Mutation in Exon 34 von *FANCA* c.3391A>G (p.T1131A). Die Aufnahme dieses Patienten in die vorliegende Studie basierte auf einer beobachteten Peakhöhenveränderung genomischer Patienten-DNA im Vergleich zur maternalen Sequenz.

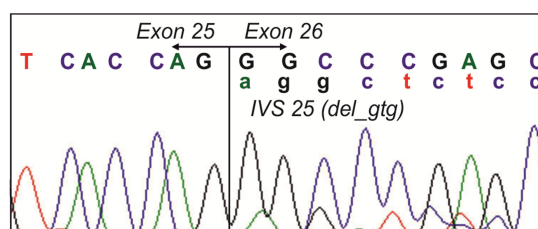


Abb. 27: Auswirkung der Dreibasenpaardeletion c.2316+1_2316+3delGTG (IVS 25, *FANCA*) auf cDNA-Ebene in einer etablierten Blutlymphoblastenzelllinie des Patienten.

4.1.7.1 Entwicklung der Blutwerte

Für diesen Patienten liegen Blutwerte über einen Zeitraum von 15 Jahren vor (Patientenalter: 14-29). Die Entwicklung der in den MACS-Analysen untersuchten Zellreihen inklusive der von Thrombozyten und von Hämoglobin sind in Abbildung 28 zusammengestellt. Alle Blutwerte des Patienten befinden sich über den gesamten Beobachtungszeitraum knapp unterhalb oder an der Untergrenze des altersabhängigen, definierten Normbereiches. Für Mono- und Thrombozyten sowie Hä-

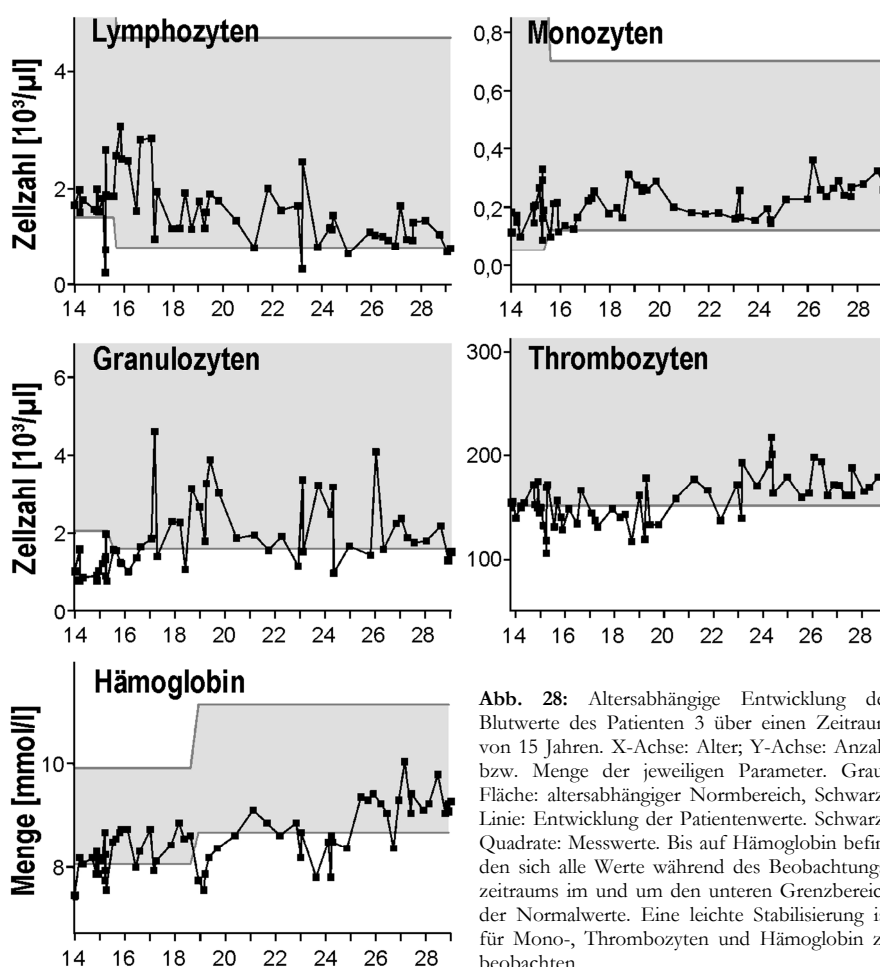


Abb. 28: Altersabhängige Entwicklung der Blutwerte des Patienten 3 über einen Zeitraum von 15 Jahren. X-Achse: Alter; Y-Achse: Anzahl bzw. Menge der jeweiligen Parameter. Graue Fläche: altersabhängiger Normbereich, Schwarze Linie: Entwicklung der Patientenwerte. Schwarze Quadrate: Messwerte. Bis auf Hämoglobin befinden sich alle Werte während des Beobachtungszeitraums im und um den unteren Grenzbereich der Normalwerte. Eine leichte Stabilisierung ist für Mono-, Thrombozyten und Hämoglobin zu beobachten.

moglobin wurde ein leichter Anstieg der Werte zu unterschiedlichen Zeitpunkten beobachtet (Monozyten: 17 Jahre; Thrombozyten: 23 Jahre; Hämoglobin: 25 Jahre). Die beiden anderen Untergruppen der weißen Reihe, Lympho- und Granulozyten, blieben auf ihrem niedrigen Niveau. Zum aktuellen Zeitpunkt wurden folgende Daten erhoben: Lymphozyten: $0,89 \times 10^3/\mu\text{l}$, Monozyten: $0,29 \times 10^3/\mu\text{l}$, Granulozyten: $1,35 \times 10^3/\mu\text{l}$, Thrombozyten: $174 \times 10^3/\mu\text{l}$, Hämoglobin: $9,3 \text{ mmol/l}$.

4.1.7.2 Analysen zum G2-Phase-Arrest

Der G2-Phase-Arrest in Ficoll-isolierten und PHA-stimulierten mononukleären Zellen aus Patientenblut wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung der BrdU/Hoechst- Zellzyklusanalyse zu drei bzw. zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die Auswertung zeigte sowohl im Alter von 15, von 25 als auch von 28 Jahren erhöhte spontane und MMC-induzierte Arreste auf dem Level von betroffenen FA-Kontrollpersonen (Abb. 29). Hierbei lag die zuletzt ermittelte Ratio $\Sigma\text{G2}/\text{GF}$ für den spontanen Arrest bei 0,449 und die für den induzierten Arrest bei 0,566. Anhand dieser Ergebnisse könnte entsprechend der spontanen Arreste auf einen maximalen Anteil von 10 % und bezogen auf den induzierten auf maximal 10-50 % Nicht-FA-Zellen im Blut des Patienten geschlossen werden.

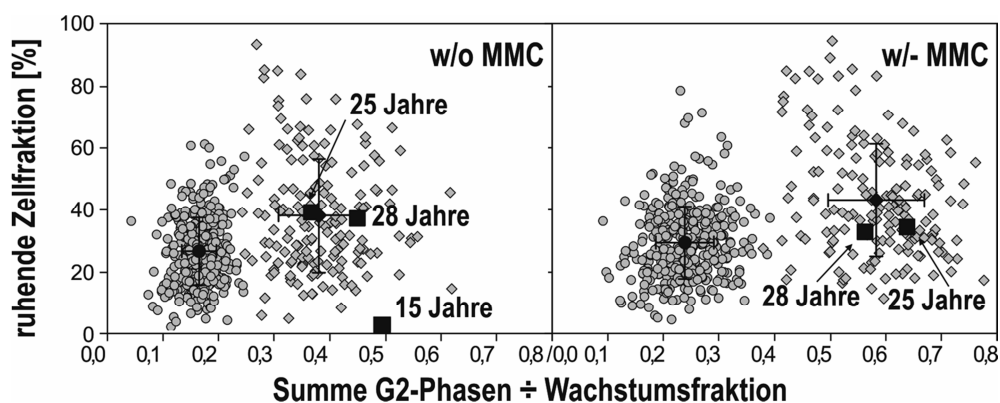


Abb. 29: BrdU/Hoechst-Zellzyklusanalysen Ficoll-isolierter, PHA-stimulierter (72h) Lymphozytenkulturen (im Alter von 15, 25 und 26 Jahren). Aufgetragen $\Sigma\text{G2}/\text{GF}$ im Verhältnis zum Anteil der ruhenden Zellfraktion. Graue Kreise: FA-Patienten, Graue Rauten: Nicht-FA-Kontrollen. Der spontane als auch der MMC-induzierte G2-Phasearrest in den Zellen des Patienten lag für alle Analysen im Bereich von FA-Kontrollen.

4.1.7.3 Chromosomenbruchanalysen

Untersuchungen von Metaphasen aus PHA-stimulierten Blutzellkulturen zeigten erhöhte spontane als auch induzierte Chromosomenbruchraten, in einem für FA-Patienten typischen Bereich. So traten in 3 % von 58 untersuchten Metaphasen zwei spontane Bruchereignisse und in 9 % ein spontanes Ereignis auf. Nach Behandlung mit 50 ng/ml MMC erhöhten sich die Bruchraten bereits auffällig. Während 17 % der 52 gewerteten Metaphasen unversehrt blieben, verteilten sich auf 58 % ein bis vier Brüche. In 12 % der Metaphasen traten zehn oder mehr Brüche auf. Ein ausgeprägter FA-Phänotyp zeigte sich nach einer Inkubation der Kulturen mit 100 ng/ml MMC. In jeder der 50 ausgezählten Metaphasen wurde mindestens ein Bruchereignis beobachtet. 52 % der Metaphasen wiesen zehn oder mehr Brüche auf, weitere 40 %

entfielen auf Bruchraten von 4-6 je Metaphase. Die genauen Werte sind dem Diagramm (Abb. 30) zu entnehmen. Die Ergebnisse dieser Analyse lassen nicht auf eine Mosaikbildung im Blut des Patienten schließen.

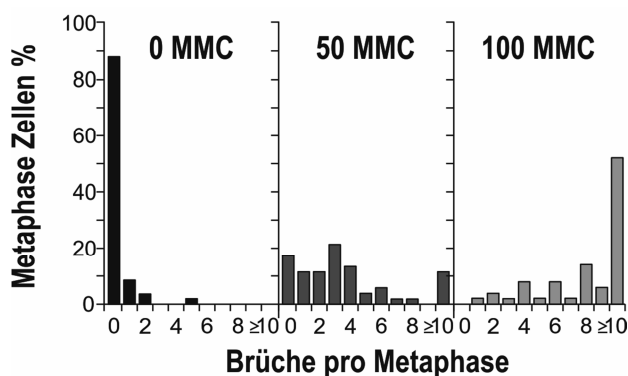


Abb. 30: Auswertung der Chromosomenbruchanalyse für den Patienten 3. Dargestellt ist die Anzahl der Brüche pro Metaphase anteilig an der Gesamtzahl der bewerteten Metaphasen in %. Ausgewertet wurden: 0 MMC: 58; 50 ng/ml MMC: 52; 100 ng/ml MMC: 50 Metaphasen. Der Patient zeigte bei Behandlung mit 100 ng/ml MMC FA-typische Chromosomenbruchraten. Es gibt keine Hinweise für eine Mosaikbildung im Patientenblut.

4.1.7.4 DNA-sequenzbasierende Mosaikanalysen

Die Aufarbeitung des Patientenblutes erfolgte ca. eine Stunde nach Entnahme (persönliche Abholung). Die erzielten Reinheiten lagen bei 98,2 %/positiv 99,7 % (T-Lymphozyten), 78,2 %/positiv 99,0 % (B-Lymphozyten), 67,8 %/positiv 98,0 % (Monozyten) sowie 98,8 %/positiv 99,6 % (Granulozyten). Auch bei diesem Patienten wurde die schlechteste Reinheit in der Monozytenseparation erzielt, der Granulozytenanteil betrug hier 25,6 %. Die genauen Anteile der einzelnen Zellpopulationen in den einzelnen Separationen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Eine Begutachtung der sanger-sequenzierten relevanten Bereiche des *FANCA*-Genes auf genomischer Ebene ließ für keine der beiden Mutationen auf eine Reversion schließen. Weder die Alleldestabilisierende Dreibasendeletion c.2316+1_2316+3delGTG im Anschluss an Exon 25 (Abb. 31) noch die Basensubstitution c.3391 A>G in Exon 34 (Abb. 32) zeigten eine Verringerung des mutierten Alleles.

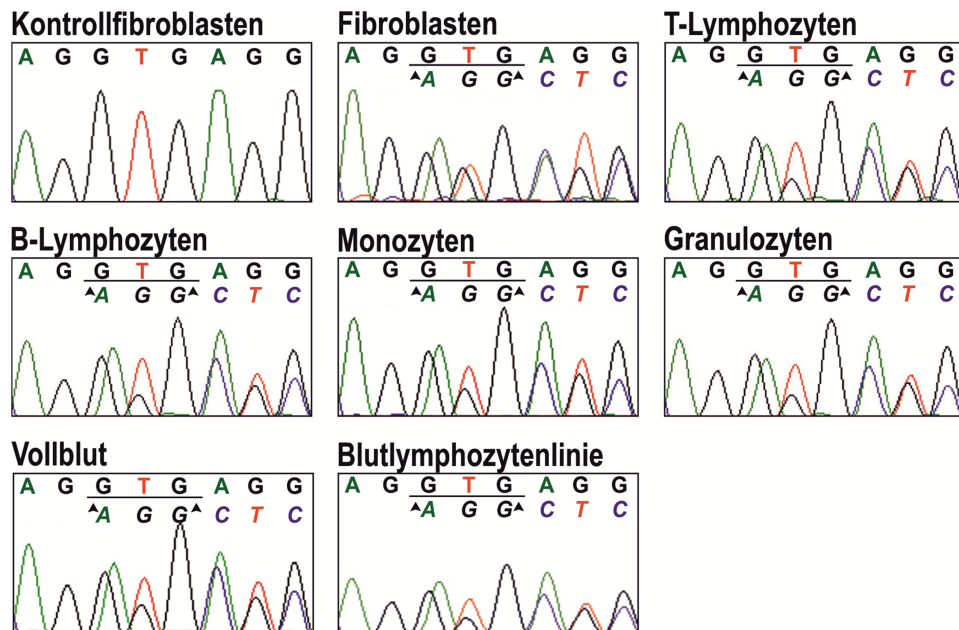


Abb. 31: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Patienten 3 (c.2316+1_2316+3delGTG, IVS25, *FANCA*) auf gDNA-Ebene. Die deletierten Basen sind unterstrichen, die wt-Sequenz ist in der oberen, die mutierte in der unteren Zeile angegeben. Oben links: Nicht-FA-Kontrolle. Oben Mitte: Patientenfibroblasten. Die restlichen Sequenzen zeigen die Situation in den verschiedenen MACS-Separationen, im Vollblut sowie einer etablierten lymphoblastoiden Zelllinie.

Um diese Beobachtung zu untermauern, wurde eine aus Patientenblut etablierte lymphoblastoide Zelllinie ebenfalls auf eine mögliche Reversion einer der beiden Mutationen untersucht. Auch hier konnte, bezogen auf die Fibroblasten, keine Verminderung der mutierten Sequenz nachgewiesen werden (Abb. 31, Abb. 32). Da sich in solchen Zelllinien, auf Grund von hohem Selektionsdruck, Reversionen häufiger und schneller durchsetzen, kann davon ausgegangen werden, dass es nicht zu einem solchen Ereignis kam.

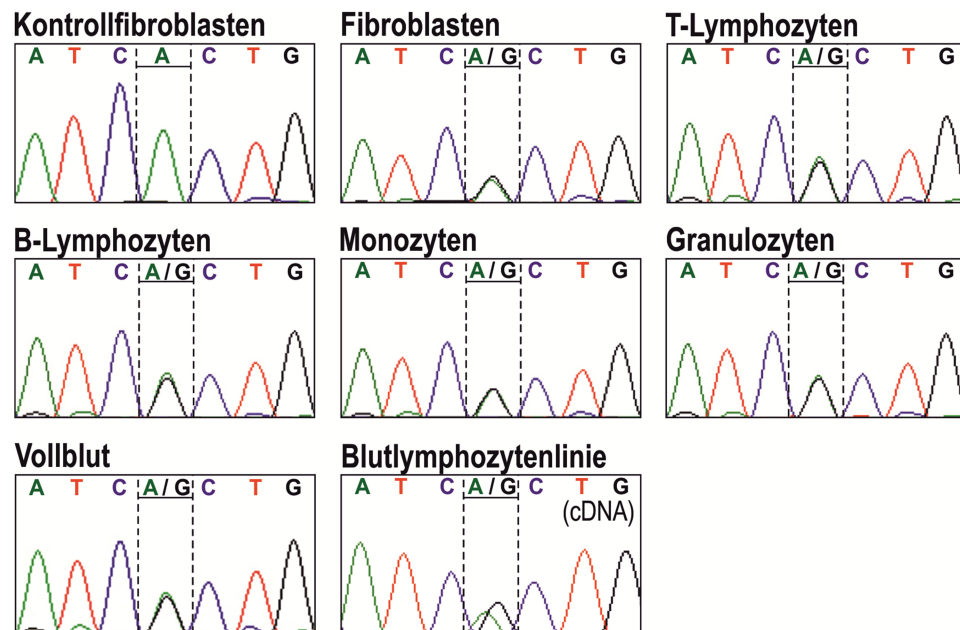


Abb. 32: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Patienten 3 (c.3391 A>G, Ex 34, *FANCA*) auf gDNA-Ebene. Die Mutation ist unterstrichen. Oben links: Nicht-FA-Kontrolle. Oben Mitte: Patientenfibroblasten. Die restlichen Sequenzen zeigen die Situation in den verschiedenen MACS-Separationen, im Vollblut sowie einer etablierten Blutlymphozytenlinie.

4.1.8 Patient: 4 (FA-D2)

Dieser Patient wurde im Alter von 33 Jahren durch ein Plattenepithelkarzinom der oberen Mundhöhle und seiner Infertilität auffällig. Des Weiteren zeigte er für FA typische Malformationen wie rechtsseitige Aplasie von Radius und Daumen, linksseitige Radiushypoplasie in Verbindung mit Pollicization des Zeigefingers und weitere Fehlbildungen. Das Blut des Patienten zeigte innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 2,5 Monaten normale Werte: Lymphozyten: $2,3 \times 10^3/\mu\text{l}$, Monozyten: $0,35 \times 10^3/\mu\text{l}$, Granulozyten: $2,6 \times 10^3/\mu\text{l}$, Thrombozyten: $238-267 \times 10^3/\mu\text{l}$ und Hämoglobin: $9,0-9,5 \text{ mmol/l}$. Die Diagnose FA basiert auf Zellzyklusanalysen primärer Fibroblastenkulturen sowie Blutlymphozyten. Die Zuordnung des Patienten zur Untergruppe FA-D2 erfolgte über Western Blot-Analysen. In diesen konnte nach Überbelichtung ein Restprotein detektiert werden. Eine Sequenzanalyse des korrespondierenden Gens, *FANCD2*, offenbarte zwei *compound* heterozygote Mutationen und einen SNP. Die maternal ererbte Missens-Mutation c.2444 G>A (p.R815Q) in Exon 26 wurde bereits als milde Mutation für andere Patienten beschrieben (Kalb et al. 2007). Sie wird, wie auch bei diesem Patienten, häufig mit dem SNP c.2702 G>T, (p.G901V, rs35495399) in Exon 28 beobachtet (Kalb et al. 2007). Die paternal ererbte Mutation c.3467-2A>G betrifft den 3'-gelegenen Spleißakzeptor. Sie führt zum Skipping von Exon 35 in maturer RNA (Abb. 33) und somit zu einer frühzeitigen Trunkierung des Proteins (p.A1156Vfs*10). Die auf Grund fehlender hämatologischer Auffälligkeiten naheliegende Vermutung einer Mosaikbildung im Blut des Patienten, konnte durch eine gDNA-Sequenzanalyse einer etablierten lymphoblastoiden Zelllinie untermauert werden. So zeigte sich in der Sequenz ein Rückgang der Mutation.

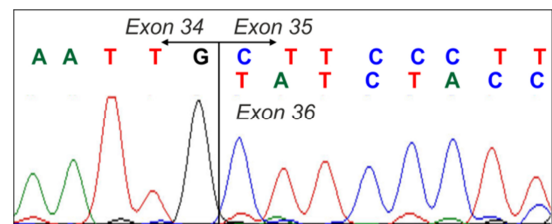


Abb. 33: Auswirkung der paternalen Basensubstitution c.3467-2A>G (Exon 34, *FANCD2*) im Spleißakzeptor auf cDNA-Ebene in Patientenfibroblasten.

4.1.8.1 Analysen zum G2-Phase-Arrest

Der G2-Phase-Arrest in primären Fibroblasten wurde mit Hilfe einer Zellzyklusanalyse in Verbindung mit DAPI (Vitalfärbung) untersucht. Nach Behandlung mit MMC (48 h, 10 ng/ml) zeigten DAPI-gefärbte

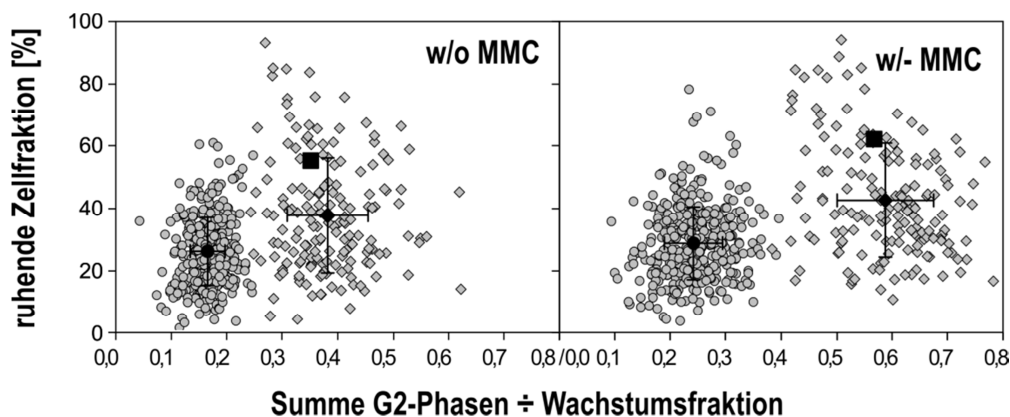


Abb. 34: BrdU/Hoechst-Zellzyklusanalysen Ficoll-isolierter, PHA-stimulierter (72h) Lymphozytenkulturen des Patienten 4 im Alter von 33 Jahren. Aufgetragen $\sum G2/GF$ im Verhältnis zum Anteil der ruhenden Zellfraktion. Graue Kreise: FA-Patienten, Graue Rauten: Nicht-FA-Kontrollen. Der spontane G2-Phase-Arrest in den Zellen des Patienten lag auf dem Level von FA-Patienten ($\sum G2/GF > 0,25$) ebenso der MMC-induzierte ($10 \mu\text{g/ml}$; $\sum G2/GF > 0,4$).

Zellen einen FA-typischen Anstieg der G2-Phasezellen von 8 % (spontan) auf 58,3 % (induziert). Die Untersuchung von Ficoll-isolierten, PHA-stimulierten Kulturen von Blutlymphozyten mittels BrdU/Hoechts-Methode zeigte nach 72-stündiger Kulturzeit erhöhte G2-Phase-Arreste auf dem Level anderer FA-Patienten (spontan: $\sum G2/GF$: 0,349; induziert: $\sum G2/GF$: 0,566; Abb. 34). Verglichen mit den durchgeführten Blutmischungsstudien entspricht dies einer Reversion von 22-42 % bezogen auf den spontanen, beziehungsweise von 10-50 %, bezogen auf den induzierten Arrest.

4.1.8.2 Chromosomenbruchanalysen

Analysen der Metaphasen von PHA-stimulierten Blutkulturen zeigten nach 72-stündiger Inkubation erhöhte Bruchraten. So wurde in 12 % der 51 gewerteten Metaphasen ein Bruchereignis beobachtet. Eine Behandlung mit 50 ng/ml MMC führte nach diesem Zeitraum bereits zu einer für FA-Mosaikpatienten typischen bimodalen Verteilung. Hierbei verteilten sich 75 % der Brüche auf Metaphasen (n=53) mit 1-4 Bruchereignissen. In 2 % der Metaphasen wurden 10 oder mehr Brüche gezählt. Am deutlichsten trat diese typische Verteilung der Bruchraten in den 60 begutachteten Metaphasen nach einer Inkubation mit 100 ng/ml MMC zutage. Während in 30 % keine Brüche zu beobachten waren, traten in 12 % FA-typische Metaphasen (Bruchrate ≥ 10) auf. Weitere 51 % verteilten sich auf 1-3 Bruchereignisse. Die genaue Aufteilung ist der Abbildung 35 zu entnehmen.

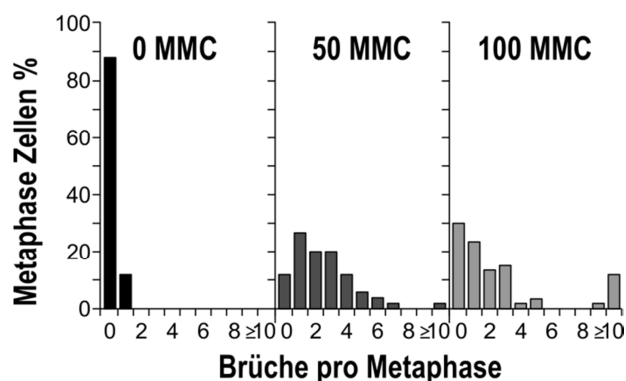


Abb. 35: Auswertung der Chromosomenbruchanalyse für den Patienten 4. Dargestellt ist die Anzahl der Brüche pro Metaphase anteilig an der Gesamtzahl der bewerteten Metaphasen in %. Ausgewertet wurden: 0 MMC: 51; 50 ng/ml MMC: 53; 100 ng/ml MMC: 60 Metaphasen. Der Patient zeigte im Vergleich zu Normalkontrollen nur eine leicht erhöhte spontane Bruchrate. Durch MMC (50, 100 ng/ml) induzierte DNA-Schäden führten zu einer für FA-Mosaikpatienten typischen bimodalen Verteilung der Bruchraten.

4.1.8.3 DNA-sequenzbasierende Mosaikanalysen

Die verschiedenen Zellseparationen aus dem Blut dieses Patienten wurden uns von Hr. Prof. Hanenberg zur Verfügung gestellt. Über ihre Reinheiten kann daher keine Auskunft gegeben werden. Die Sangersequenzierung der isolierten gDNA des Patienten zeigte eine Reversion der den Spleißakzeptor betreffenden Mutation c.3467-2 A>G (Abb. 36). Die Anteile der beiden Peaks am Gesamtpeak lagen annähernd auf einer Höhe, (Peak_{mut}: 49,4 %/ Peak_{wt}: 51,6 %), weshalb die allgemeine Kurve (Abb. 15) zur Einschätzung des Reversionsgrades verwendet werden konnte. Die stärkste Ausprägung trat hierbei in der B-Lymphozyten- und der Monozyten-Separation zutage, für die beiden anderen Zellreihen zeigten sich schwächere (Granulozyten) bis keine Reversionen (T-Lymphozyten). Eine Eingruppierung entsprechend der DNA-Mischungsreihe lässt auf eine zelluläre Reversion von 16 % in B-Lymphozyten, 10 % in Monozyten, 0 % in T-Lymphozyten, 7 % in Granulozyten und 4 % im Vollblut schließen. Auch in der aus Patientenblut angelegten B-LCL-Linie ließ sich eine hohe Reversionsrate dieser Mutation beobachten: im Vergleich zu Fibroblasten: 80 %; nach theoretischen 50 %: 81 %; nach DNA-Mischungsreihe: 47 %. Für

die zweite krankheitsverursachende Basensubstitution in Exon 26 (c.2444 G>A) wurde keine Reversion beobachtet. Die Sequenzen sind in Abbildung 37 dargestellt.

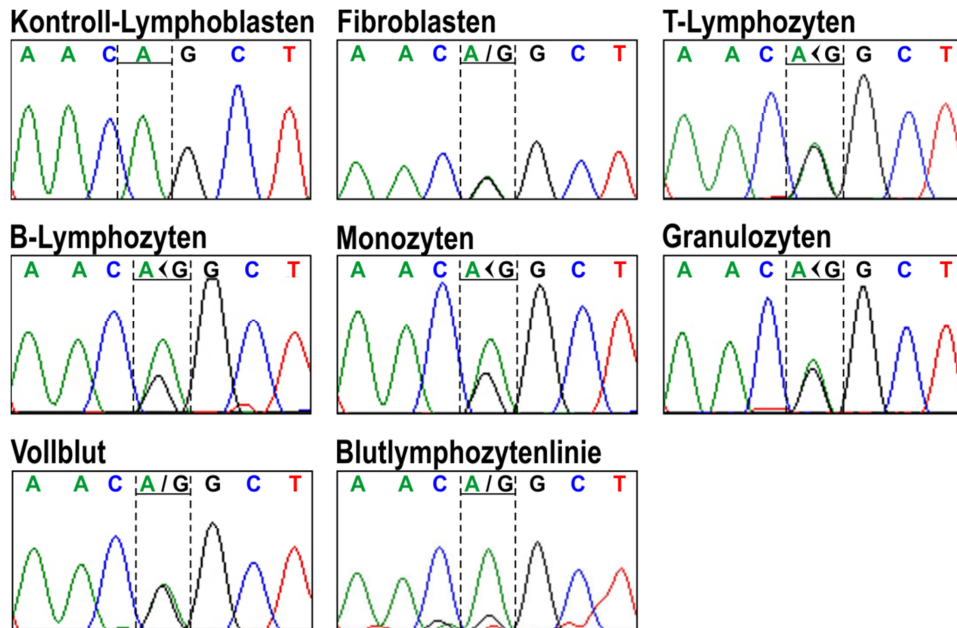


Abb. 36: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der revertierten Position c.3467-2A>G (IVS34, *FANCD2*) auf gDNA-Ebene. Die Mutation ist unterstrichen. Oben links: Nicht-FA-Kontrolle. Oben Mitte: Patientenfibroblasten. Die restlichen Sequenzen zeigen die Situation in den verschiedenen MACS-Separationen und im Vollblut sowie in einer etablierten lymphoblastoiden Zelllinie.

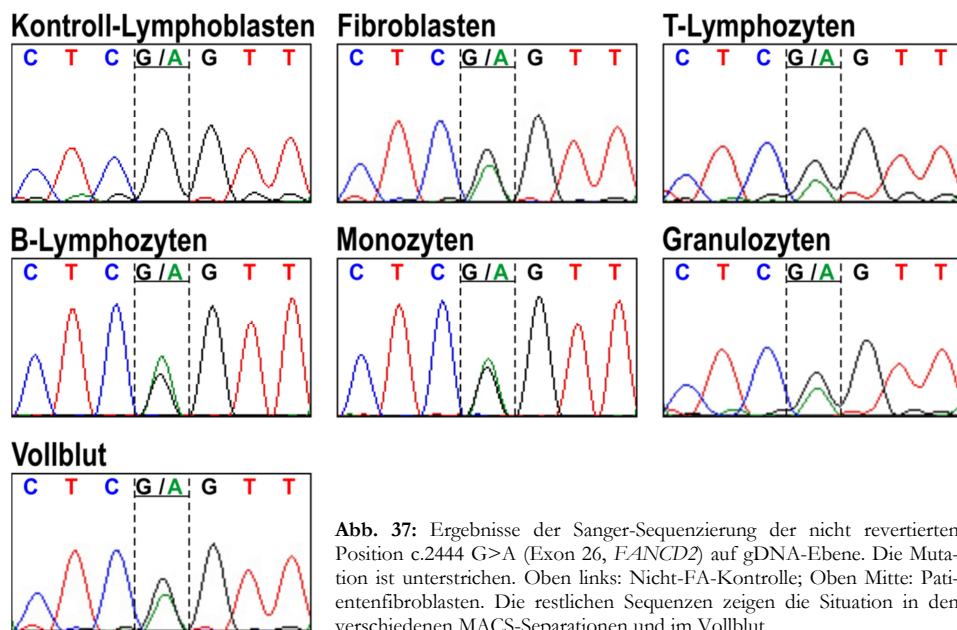


Abb. 37: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der nicht revertierten Position c.2444 G>A (Exon 26, *FANCD2*) auf gDNA-Ebene. Die Mutation ist unterstrichen. Oben links: Nicht-FA-Kontrolle; Oben Mitte: Patientenfibroblasten. Die restlichen Sequenzen zeigen die Situation in den verschiedenen MACS-Separationen und im Vollblut.

4.1.9 Patient: 5 (FA-D2)

Für diesen Patienten, welcher eine Radialstranganomalie aufweist, wurde der Verdacht auf FA über G2-Phase-Arrestanalysen bestätigt. Sie konnte im Rahmen einer NGS-Studie der Untergruppe FA-D2 zugeordnet werden (Isabell Rost, unveröffentlichte Daten). Hierbei wurden zwei krankheitsverursachende Mutationen aufgedeckt. Beide, die maternal ererbte Nonsense-Mutation c.982C>T (p.328 R>X, Exon 12) und die vom Vater stammende Mutation c.3707G>A (p.H1229EfsX7, r.3684_3727del44, Exon 37), konnten über Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Letztere, bereits beschriebene Mutation (Kalb et al. 2007; Timmers et al. 2001), führte durch das Skippen von 43 bp zu einer Leserasterverschiebung in Exon 37 und somit zu einer Trunkierung des Proteins. Die Analyse genomischer Vollblut-DNA ließ einen Rückgang des c.3707G>A tragenden Allels vermuten, dies stellte einen Hinweis auf eine Mosaikbildung dar (Abb. 41). Des Weiteren konnte die Mutation in der aus Patientenblut etablierten lymphoblastoiden Zelllinie nicht mehr detektiert werden (Abb. 41). Zellzyklusanalysen der Zelllinie zeigten normale G2-Phasearreste.

4.1.9.1 Entwicklung der Blutwerte

Die Blutwerte des Patienten wurden über einen Zeitraum von circa dreieinhalb Jahren (Alter 7-11 Jahre) analysiert. Während die Anzahl der Lymphozyten und der Monozyten meist im unteren Bereich der Referenzwerte lagen, wurden reduzierte Zahlen für Granulozyten und besonders für Thrombozyten beobachtet. Die Werte für Hämoglobin fielen zunächst ab, stabilisierten und erholten sich während der Behandlung mit dem Androgentherapeutikum Danazol. Auch für die anderen Werte konnte ein leichter Anstieg nach Therapiebeginn, in einem Alter von 10,5 Jahren, beobachtet werden. Zum aktuellsten Zeitpunkt lag die Anzahl der Lymphozyten bei $2,46 \times 10^3/\mu\text{l}$, die

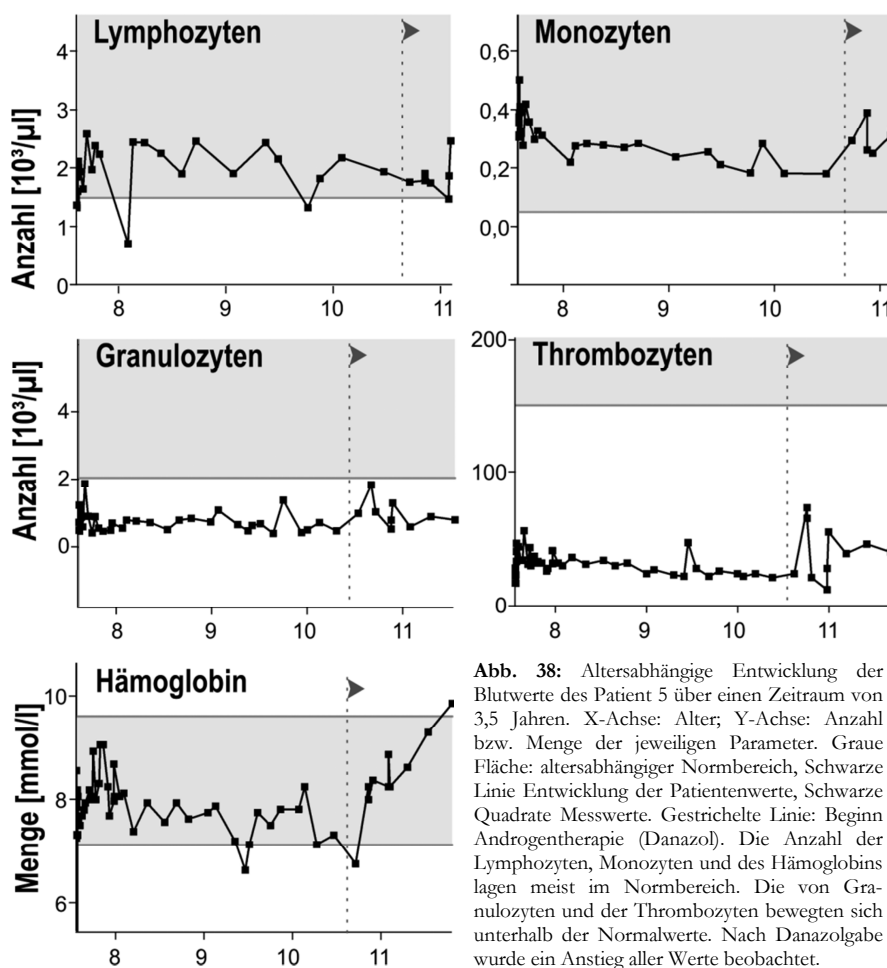


Abb. 38: Altersabhängige Entwicklung der Blutwerte des Patient 5 über einen Zeitraum von 3,5 Jahren. X-Achse: Alter; Y-Achse: Anzahl bzw. Menge der jeweiligen Parameter. Graue Fläche: altersabhängiger Normbereich, Schwarze Linie Entwicklung der Patientenwerte, Schwarze Quadrate Messwerte. Gestrichelte Linie: Beginn Androgentherapie (Danazol). Die Anzahl der Lymphozyten, Monozyten und des Hämoglobins lagen meist im Normbereich. Die von Granulozyten und der Thrombozyten bewegten sich unterhalb der Normalwerte. Nach Danazolgabe wurde ein Anstieg aller Werte beobachtet.

der Monozyten bei $0,24 \times 10^3/\mu\text{l}$, die der Granulozyten bei $0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ und die der Thrombozyten bei $40 \times 10^3/\mu\text{l}$. Das Hämoglobin stieg auf $9,9 \text{ mmol/l}$ an. Die Entwicklung ist in Abbildung 38 dargestellt. Ein Zeitpunkt für eine mögliche Reversion konnte anhand der Blutwerte nicht ermittelt werden.

4.1.9.2 Analysen zum G2-Phase-Arrest

Die Bewertung der G2-Phasearreste in Fibroblasten des Patienten erfolgte über eine Zellzyklusanalyse in Verbindung mit einer DAPI-Färbung (Vitalfärbung). Hierbei ergaben sich Werte im Bereich von anderen FA-Patienten (spontan: G2/M-Phase: 9 %; induziert mit 12 ng/ml MMC: G2/M-Phase: 49,5 %). Auch die Zellzyklusanalysen von Ficoll-isolierten, PHA-stimulierten 72 h mononukleären Blutlymphozyten zeigten einen FA-typisch Phänotyp. Für die im Alter von 7 und 11 Jahren durchgeführten Messungen PHA-stimulierter lymphoblastoider Zellen ergaben sich folgende Ratio: spontan: 7 Jahre: 0,404, 11 Jahre: 0,546; induziert (10 ng/ml): 7 Jahre: 0,574, 11 Jahre: 0,648). Verglichen mit den erstellten Blutmischungsreihen ergab sich kein Anhaltspunkt für eine Mosaikbildung im Blut des Patienten (Abb. 39).

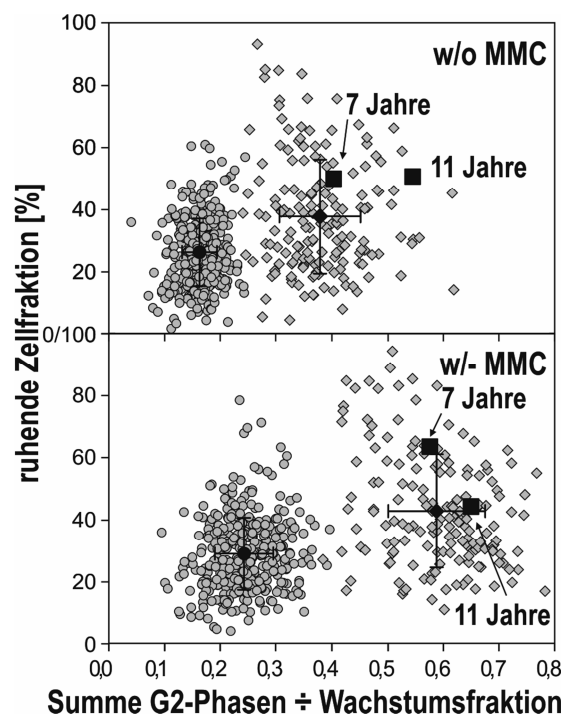


Abb. 39: BrdU/Hoechst Zellzyklusanalysen Ficoll-isolierter, PHA-stimulierter (72 h) Lymphozytenkulturen im Alter von 7 und 11 Jahren. Aufgetragen $\sum G2/GF$ im Verhältnis zum Anteil der ruhenden Zellfraktion. Graue Kreise: FA-Patienten, Graue Rauten: Nicht-FA-Kontrollen. ZU beiden Zeitpunkten lag der spontane G2-Phasearrest in den Zellen der Patientin auf dem Level von FA-Patienten ($\sum G2/GF > 0,25$) ebenso der MMC-Induzierte ($10 \mu\text{g/ml}$; $\sum G2/GF > 0,4$).

4.1.9.3 Chromosomenbruchanalysen

Um den Verdacht auf Mosaikbildung weiter zu verfolgen, wurden Chromosomenbruchanalysen von Metaphasen aus PHA-stimulierten Vollblutkulturen durchgeführt. Nach der Inkubation (72h) zeigte sich eine leichte Erhöhung der spontanen Bruchraten. Während in 94 % der untersuchten 53 Metaphasen keine Brüche entstanden, wurden für 4 % ein Bruchereignis und für 2 % zwei Bruchereignisse beobachtet. Nach einer Behandlung mit 50 ng/ml MMC wiesen bereits 13 % der gewerteten Metaphasen ($n=53$) FA-typische Merkmale (10 oder mehr Brüche) auf, während in 30 % keine Brüche auftraten. Für weitere 45 % der Metaphasen wurden ein bis sechs Brüche verzeichnet. Eine Inkubation der Kulturen mit 100 ng/ml MMC führte zu einer noch stärker ausgeprägten mosaiktypischen bimodalen Verteilung. Während in 14 % aller Metaphasen ($n=50$) keine Bruchereignisse beobachtet wurden, zeigten 34 % eine FA-typische Ausprägung mit zehn oder mehr Brüchen. Zusätzlich wiesen 46 % der Metaphasen ein bis sechs Brüche auf.

Die genaue Verteilung der Bruchereignisse ist der Abbildung 40 zu entnehmen. Laut dieser Analyse entwickelte sich in den T-Lymphozyten des Patienten ein Mosaik.

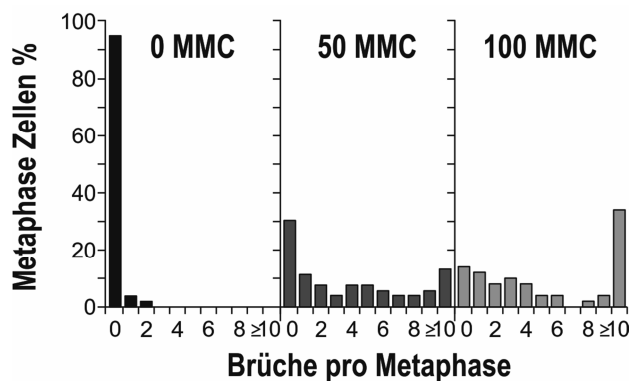


Abb. 40: Auswertung der Chromosomenbruchanalyse für den Patienten 5. Dargestellt ist die Anzahl der Brüche pro Metaphase anteilig an der Gesamtzahl der bewerteten Metaphasen in %. Ausgewertet wurden: 0 MMC: 50; 50 ng/ml MMC: 53; 100 ng/ml MMC: 50 Metaphasen. Die spontane Chromosomenbruchrate in den Metaphasen der Patientin zeigte sich leicht erhöht. Ein induzierter G2-Phasearrest (50/100 ng/ml MMC) führte zu der für mosaiktypischen bimodalen Bruchratenverteilung.

4.1.9.4 DNA-sequenzbasierende Mosaikanalysen

Für das Blut dieses Patienten wurde die MACS-Sortierung mehrmals durchgeführt und die Separationen mit den höchsten Reinheitsgraden zur Mutationsanalyse herangezogen. Eine durchflusszytometrische Analyse zeigte sehr hohe Reinheitsgrade für die Granulozyten- (98,5 %) und T-Lymphozyten-Isolationen (94,1 %). Die Reinheiten der Monozyten- (83,5 %) und B-Lymphozyten-Separationen (76,5 %) fielen geringer aus. Die genauen Anteile der Zellen in den einzelnen Separationen ist der Tabelle 6 zu entnehmen. Eine Sang-ersequenzierung der aus den einzelnen Separationen isolierten genomischen DNA bestätigte die Ausbildung eines Mosaiks im Blut der Patientin. Während die T-Lymphozyten weiterhin einen sehr hohen Anteil der paternalen, proteintrunkierenden Mutation c.3707 G>A in Exon 37 aufwiesen, konnte für B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten eine Verminderung des entsprechenden Mutationspeaks (A) beobachtet werden (Abb. 41), während dieser bei T-Lymphozyten relativ gering ausfiel. Die isolierte Granulozytenfraktion wies hierbei den höchsten Reversionsgrad auf (Tabelle 6).

Auf Grund des Verhältnisses von Mutationspeak und wildtypischen Peaks an der Gesamtfläche (Peak_{mut}: 44,7; Peak_{wi}: 55,3) konnte für diesen Patienten ebenfalls die allgemeine Kurve (Abb. 15) zur Eingruppierung angenommen werden. Sie lässt auf Reversionsgrade von 6 % (T-Lymphozyten), 11 % (B-Lymphozyten), 12 % (Monozyten), 21 % (Granulozyten) sowie 8 % (Vollblut) schließen.

Für die zweite Mutation, im Exon 12 des *FANCD2* Genes (c.982C>T, p.R328X), konnte im Vergleich zu den Fibroblasten keine Reversion beobachtet werden. Die einzelnen Sequenzen sind in Abb. 42 dargestellt.

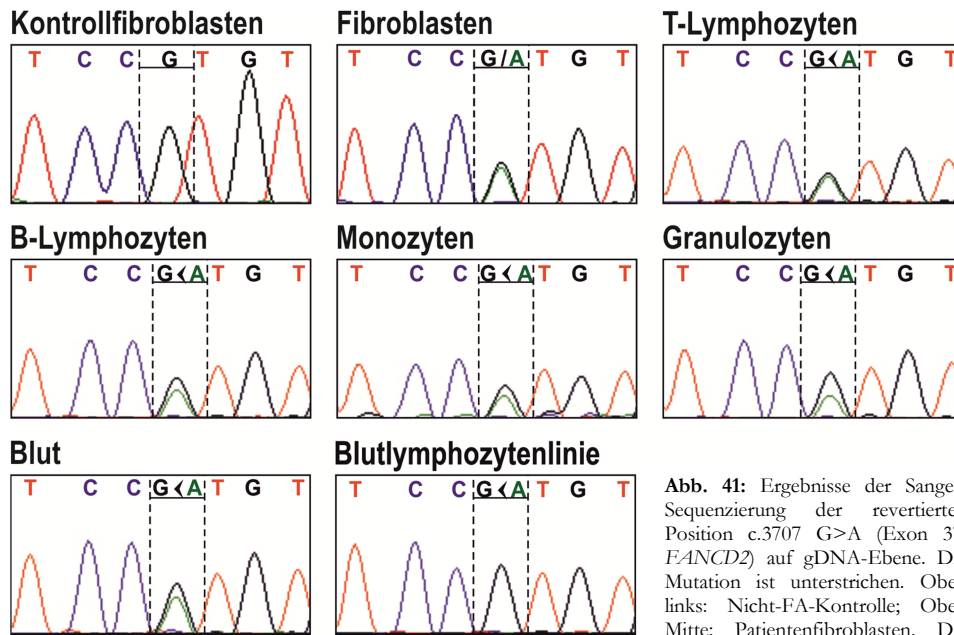


Abb. 41: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der revertierten Position c.3707 G>A (Exon 37, *FANCD2*) auf gDNA-Ebene. Die Mutation ist unterstrichen. Oben links: Nicht-FA-Kontrolle; Oben Mitte: Patientenfibroblasten. Die

restlichen Sequenzen zeigen die Situation in den verschiedenen MACS-Separationen, im Vollblut und in einer etablierten lymphoplastoiden Zelllinie.

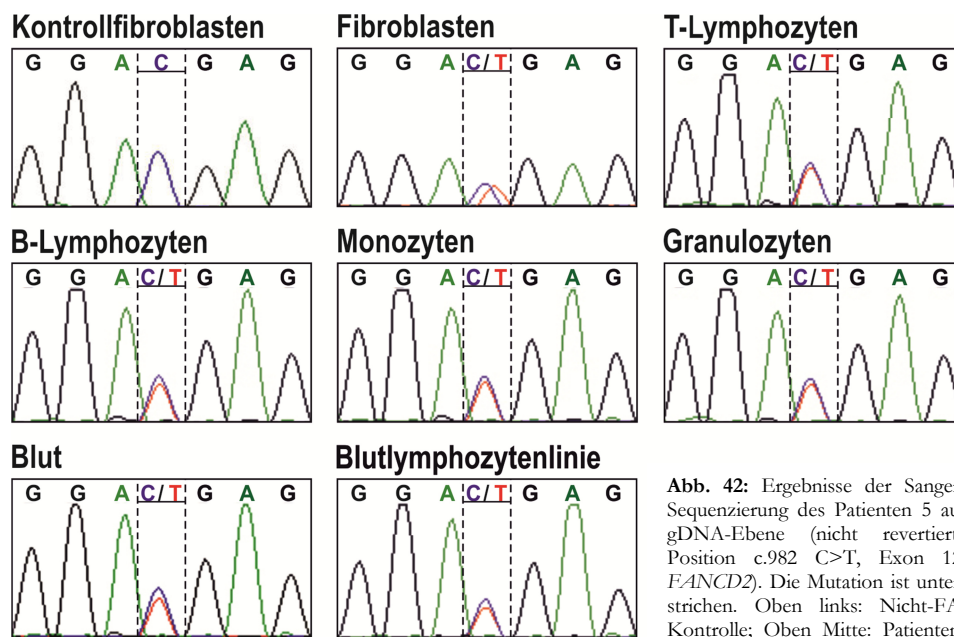


Abb. 42: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Patienten 5 auf gDNA-Ebene (nicht revertierte Position c.982 C>T, Exon 12, *FANCD2*). Die Mutation ist unterstrichen. Oben links: Nicht-FA-Kontrolle; Oben Mitte: Patienten-

fibroblasten. Die restlichen Sequenzen zeigen die Situation in den verschiedenen MACS-Separationen, im Vollblut sowie der etablierten lymphoplastoiden Zelllinie.

4.1.10 Mutationen und Reversionen im Überblick

Mit Ausnahme der Deletion c.2316+1_2316+3delGTG des Patienten 3 handelte es sich bei allen beobachteten Mutationen um einfache Substitutionen mit unterschiedlichen Auswirkungen. Alle detektierten Mutationen inklusive Position und Auswirkung sind in Tabelle 7 gelistet.

Tab. 7: Auflistung aller detektierten Mutationen in den untersuchten Patienten inklusive ihrer Auswirkungen auf Proteinebene sowie Effekte und vorheriger Beschreibungen. Revertierte Mutationen sind kursiv dargestellt.

Patient <i>Gen</i>	Mutation	Position	Auswirkung auf Proteinebene	Referenz
1 <i>FANCA</i>	c.827-1 G>T	IVS9	Spleißmutation, Deletion der ersten 32 bp des Exon 10, Proteintrunkierung (9 AS downstream), compound heterozygot	Gross et al., 2002
	<i>c.971 T>G (p.L324R)</i>	Ex 11	konservative AS-Substitution	Gross et al., 2002
2 <i>FANCA</i>	<i>c.856 C->T (p.Q256X)</i>	Ex 10	Nonsens- Mutation	Gross et al., 2002
	c.3976 C->T (p.Q1326X)	Ex 40	Nonsens- Mutation	Wijker et al., 1999 Gross et al., 2002
3 <i>FANCA</i>	c.2316+1_2316+3delGTG (p.Q772*13)	IVS25	Spleißmutation, 13 AS zusätzlich aus IVS25, Proteintrunkierung, Allelinstabilität	Adachi et al., 2002 Ameziane et al., 2007 Levrán, et al., 1997 Levrán, et al., 2005
	c.3391 A>G (p.T1131A)	Ex 34	Missens-Mutation	
4 <i>FANCD2</i>	<i>c.3467-2 A>G (p.A1156VfsX10)</i>	IVS34	Spleißmutation, Exon 35 Skipping, Leserasterverschiebung, Proteinkrinkierung, Allelinstabilität	Kalb et al., 2007
	c.2444 G>A (p.R815Q) SNP: c.2702 G>T (p.G901V, rs35495399)	Ex 26 Ex 28	Missens-Mutation Missens-Variante	
5 <i>FANCD2</i>	<i>c.3707 G>A, (p.H1229EfsX7)</i>	Ex 37	Leserasterverschiebung durch Skip von 43 bp	Kalb et al., 2007 Timmers et al., 2001
	c.982 C>T / p.R328X	Ex 12	Nonsens-Mutation, Proteintrunkierung	

Zusätzlich zu der Eingruppierung der Reversionen anhand der erstellten Kurven (Patient 1, 4, 5: Abb. 15; Patient 2: Abb. 25) sind in der nachfolgenden Tabelle 8 die prozentualen Reversionen im Vergleich zur Fibroblastensequenz bzw. zum theoretischen Anteil der Mutation/Wildtyp-Sequenz von 50 % am Gesamtpeak dargestellt. Diese prozentualen Anteile weichen jedoch stark von denen anhand der Kurve abgelesenen Reversionen ab, da sich die Sequenz nicht proportional zum eingesetzten Mischungsverhältnis verhält. Die letzteren beiden Methoden sind somit als unvorteilhaft zu werten.

Tab. 8: Überblick der Reversionsgrade [%] nach den verschiedenen Varianten: im Vergleich zu Fibroblasten, laut generierter DNA-Mischungskurven, im Vergleich zur theoretischen Allelfrequenz von 50% (wt/mut) einer heterozygoten Mutation.

Patient/ rev. Mutation	Zelllinie	im Vergleich zu Fibroblasten [%]	nach Kurve Mischungsreihe [%]	im Vergleich zu theoret. 50% Allelfrequenz [%]
1 / c.971 T>G	T-Lymphozyten	27	14	31
	B-Lymphozyten	100	100	100
	Monozyten	100	100	100
	Granulozyten	100	100	100
	KM-Fibroblasten	100	100	100
	Vollblut	93	76	93
	B-LCL	100	100	100
2/ c.856 C>T	T-Lymphozyten	93	> 15	94
	B-Lymphozyten	100	> 30	100
	Monozyten	100	> 30	100
	Granulozyten	100	> 30	100
	Vollblut	96	> 20	97
	B-LCL	100	100	100
	4/c.3467-2A>G	T-Lymphozyten	0	0
B-Lymphozyten		34	16	35
Monozyten		20	10	26
Granulozyten		14	7	16
Vollblut		6	4	7
B-LCL		80	47	81
5/c.3707 G>A		T-Lymphozyten	4	6
	B-Lymphozyten	14	11	25
	Monozyten	19	12	27
	Granulozyten	33	21	40
	Vollblut	12	8	21
	B-LCL	100	100	100

Eine Analyse der angrenzenden Sequenz ergab, dass sich innerhalb von +/-25 bp um die Mutationen zahlreiche bekannte Mutationsmotive (CIT, TGGA, CAGG, CCTG, CpG-Insel, THEMIS-Motiv [|WKVnRRRnVWK|: W= A/T, K= G/T, V= G/A/C, R= Purin (A/G) und n= jedes Nukleotid]), Basenwiederholungen sowie ein Palindrom (Patienten 2, 5) befinden. Eine Übersicht der Motive und deren Verteilung sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Übersicht der Mutationsmotive, und Basenwiederholungen +/- 25 bp um die Mutation herum.

Eckige Klammer: Deletion; runde Klammer: Motive, die durch Mutation neu entstehen; doppelte runde Klammer: Mutationsmotive die durch Mutation verloren gehen; Rot: mutierte Position wt/mut, Grün: CpG-Insel (häufige Mutationsstelle (Coulondre et al. 1978; Levran et al. 1997)), Pink: TGGA = Deletions-Hotspot Konsensussequenz, ähnlich der putativen Arrest-Site der DNA-Polymerase α (Krawczak and Cooper 1991), Gelb/Blau: CAGG/CCTG = Mutations-Hotspot (Huff et al. 1995; Levran et al. 1997), rot unterstrichen: CTT= Topoisomerase 1 Schnittstellenkonsensussequenz, schwarz unterstrichen: Palindrom, zwischen vertikalen Strichen: THEMIS-Motiv (WKVnRRRnVWK: (W= A/T, K= G/T, V= G/A/C, R= Purin (A/G) und n= C/A/T/G, ein Mismatch erlaubt (Makridakis et al. 2009))

Patient (Gen)	Pos.	Sequenz wt/mut	Mutationsmotive (+/-25 bp)	direkte Wiederholungen (+/-25 bp)
<i>revertierende Sequenzen (wt)</i>				
1 (FANCA)	Ex 11	CTGAAGAGGTTCTTCAGTCATAC- CCT/CGACTCAGATACTCACTCACAGCCCT	((CCTG)), (CpG), CTT	2x CCC, GAAG, TTCTTC, ACTCACTC
2 (FANCA)	Ex 10	AGA <u>CG</u> CTTTGGCTGC <u>TG</u> ; GAG TAC/TAGGAGGAG TCCTCCACTCACAAGAT	TGGA, ((CAGG)), CpG, CTT, ((THEMIS-Motiv)), Palindrom	TTT, AGGAGG, TCCTCC,
4 (FANCD2)	IVS34	agattccttgtcttctttt- ctaac <u>a</u> /gCTTCCCTTGCCAGACAATTCTCT	5x CTT, (CpG)	2x TTT, CCC, TTCCTTT, TCTTCTTC, TTCCCTT
5 (FANCD2)	Ex 37	agGCATACIITTTGTTGTT- TTC IIC <u>CG</u> /ATGTGAT GATGG CTGAACTAGAGAAG	((CpG)), THEMIS-Motiv, 2x CTT	2x TTTT, GATGATG
<i>nicht-revertierende Sequenzen (wt)</i>				
1 (FANCA)	Ex 10	ttttctgtccttgctctgtcttcag/tTTGCACTTGA <u>CG</u> CTTTGGCTG CT GG	CCTG, CpG, 3x CTT	TTTT, 2x TTT, TCCT, CTCT, CTTC, CTGCTG, , GCTGCT,(TTT)
2 (FANCA)	Ex 40	GCTCCTCCTC <u>CG</u> TGTGGCCC <u>CG</u> - GATC/TAGCACAC <u>CAGG</u> CTGCTG <u>CG</u> ctacctc	CAGG, 3x CpG	CCTCCTCC, GTGTG, GGCCCCGG, CACAC, GCTGCT
3 (FANCA)	IVS25	GCTCTGCCAGCTGCTC <u>CG</u> TCACC AG <u>gtg</u> /[- gtg]aggctc tccttc atgggggccac cc	((CAGG)), CpG, CTT 2x THEMIS-Motiv*	CTC, GCTGCT, GGGGG, CTCCCTT
	Ex 34	<u>CG</u> GAGGTGC <u>CCTG</u> ACAC <u>CAGG</u> ACAT- C <u>AG</u> CTGCCCACTTCTT <u>CAGG</u> gtgagatgc	2x CAGG, CCTG, CpG, CTT	GGAGG, 2x CCC, ACACA, TCACT, ACAGGACA, ACTTCTTCA, GGG,
4 (FANCD2)	Ex 26	<u>CCTG</u> GAGATGAAGGGGAAGGTGCTCA- CT <u>CG</u> /AGTTAAAGCACATTGTAGAATTGCAA	CCTG, ((CpG))	GAAGGGAAG, AAA,
5 (FANCD2)	Ex 12	CCAAGTAAAGTT- GAAAAG TAAAGGA <u>CTG</u> AG CAAGgtaaagagctcatcctca	(CpG), THEMIS-Motiv	4x AAA, AAAA, AAAGTTGAAA, TGAAAAGT,

* das erste THEMIS-Motiv entfällt durch die Deletion

4.2 FANCO (RAD51C) Interaktionen mit den RAD51-Paralogen, RAD51 (FANCR) und FANCN: Wirkungen und Einflüsse der Mutation R285H und von MMC-Exposition der Zellen

Die RAD51-Paraloge bilden zwei distinkte Komplexe, welche jeweils RAD51C enthalten: der RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2 (BCDX2) und der RAD51C-XRCC3-Komplex (CX3). Des Weiteren sind Interaktionen für RAD51C, RAD51D und XRCC3 mit RAD51 beschrieben. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit (Park et al. 2013) zeigt zusätzlich die Interaktion von RAD51C mit einem weiteren FA-Protein, FANCN. Zur Verifizierung dieser Interaktionen in einem humanen Umfeld, zur Abschätzung der Quantität und Qualität dieser Interaktionen und um mögliche weitere Interaktionen zwischen diesen Proteinen offenzulegen, wurde eine Vielzahl von Interaktionsstudien durchgeführt. In zusätzlichen Analysen wurden Veränderungen der Interaktionsprofile nach MMC-induzierten DNA-Schäden und der Einfluss einer Patientenmutation (RAD51C, R258H) untersucht.

4.2.1 Interaktionsanalysen via Mammalian Two- und Three-Hybrid System

Zur Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen Proteinen wurde das Mammalian Two-Hybrid (M2H)-System verwendet. Hierfür galt es, die Gene im passenden Leseraster in die Vektoren des Matchmaker™ Mammalian Assay Kit 2 zu klonieren, welche je für die DNA-Bindedomäne (DNA-BD, pM-Vektor) bzw. eine DNA-Aktivierungsdomäne (DNA-AD, pVP16-Vektor) kodieren. Ablauf und Auswertung sind detailliert im Methodenteil beschrieben (3.5.2.4). Als Positivkontrolle in diesen Analysen wurde die als stark bekannte Interaktion zwischen FANCA und FANCG verwendet. Um die beobachteten Interaktionen besser einschätzen zu können, beziehen sich alle folgenden prozentualen Angaben auf die Interaktionsstärke zwischen diesen Proteinen, welche als 100 % gesetzt wurde. Da die fusionierten DNA-BD- und -AD-Bindungsstellen blockieren könnten, war es wichtig, die Interaktionen in beiden Richtungen (pMX+pVP16V/ pMY+pVP16X) zu testen. Auf diese Weise sollten mögliche falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Eine überbrückende Wirkung eines weiteren nativen Proteins (Expression im pCMV-Tag3b-Vektor) wurde in M3H-Analysen getestet. Die Klonierungen der cDNAs in die entsprechenden Vektoren (pM /pVP16) erfolgte über herkömmliche oder In-Fusion-Klonierung (3.4). Die als dritter Partner exprimierte Gene, lagen in pCMV-Tag3B-Vektoren (Anhang I) vor, die aus einer früheren Arbeit von Alexandra Sobeck stammen (2.4.2).

4.2.1.1 Ausschluss von Selbstaktivierung und Homodimerbildung

Um eine mögliche Aktivierung des Systems durch die einzelnen Fusionsproteine oder die Leervektoren auszuschließen, wurden in jedem Versuch zusätzliche Kontrollen mitgeführt, die einen Fusionsprotein exprimierenden Vektor und einen pM- bzw. pVP16-Vektor ohne zusätzliche Protein exprimierende Sequenz enthielten. In diesen Ansätzen lagen die Werte stets auf dem des Hintergrundlevels (pM+pVP16), was eine Selbstaktivierung ausschloss. Eine Homodimerbildung der Proteine RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Auch hier lagen die Werte auf dem des Hintergrundes.

4.2.1.2 Interaktion zwischen RAD51 und seinen Paralogen

M2H-Analysen von RAD51 mit jedem der Paralogen lieferten keine Hinweise auf eine Interaktion zwischen ihm und RAD51B oder XRCC2. Richtungsabhängige, sehr schwache Interaktionen wurden mit RAD51C, RAD51D und XRCC3 mit pVP16RAD51 detektiert. In der pMRAD51-Richtung konnte keine Systemaktivität beobachtet werden. Die Daten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Zusammenstellung der detektierten Interaktionen mit RAD51.

M2H mit pM/pVP16RAD51	RAD51C		RAD51D		XRCC3	
	pM	pVP16	pM	pVP16	pM	pVP16
Interaktionsrate +	3.2*	0.8	1.7**	0.3	2.6*	0.4
STABWN	0.1	0.2	0.2	0.0	0.6	0.1

+ Interaktionsrate relativ zur Hintergrundaktivität (pM+pVP16) in % verglichen zur Interaktion von pMFANCA mit pVP16FANCG; * / ** / *** Grad der Signifikanz verglichen mit den Kontrollen

4.2.1.3 Interaktion im CX3-Komplex

Um die bekannte RAD51C-XRCC3-Interaktion zu untersuchen, weitere mögliche Interaktionspartner von XRCC3 aufzuspüren und mögliche Einflüsse von XRCC3 auf den BCDX2-Komplex bzw. die der anderen Paraloge und RAD51 auf den CX3-Komplex zu testen, wurden zahlreiche M2H- und M3H-Analysen in allen möglichen Kombinationen durchgeführt. In M2H-Tests konnten nur die Interaktionen zwischen XRCC3 und RAD51C, sowie die oben beschriebene mit RAD51 beobachtet werden. Co-Transfektionen der anderen Paraloge führten zu gegensätzlichen Veränderungen der Interaktionsintensität der beiden Komplexproteine. Während RAD51 und XRCC2 diese in der pMRAD51C-Richtung signifikanterweise ca. verdoppelten, verminderte die RAD51B-Co-Expression die Interaktion. Außerdem führte RAD51D zu einer signifikanten Verminderung der Interaktionsstärke in pVP16XRCC3-Richtung. Die Tabelle 11 zeigt eine Zusammenstellung der getesteten Interaktionen.

Tab. 11: CX3-Komplex-Interaktionen und Vergleich von Interaktionsstärken in M2H und M3H-Analysen.

M2H/M3H mit pM/pVP16 XRCC3	MMC	zusätzlich pCMV-Tag3B	RAD51C		RAD51D	
			pM	pVP16	pM	pVP16
Interaktionsrate +	-	/	13.9**a	9.3*a	1.2	0.8
STABWN			1.4	3.2	0.5	0.3
Interaktionsrate +	+	/	19.6*b	8.5	/	/
STABWN			3.1	2.1	/	/
Interaktionsrate +	-	RAD51	26.7*c	6.0	1.4	0.9
STABWN			8.8	1.6	0.2	0.1
Interaktionsrate +	-	RAD51B	7.1**c	9.5	0.9	0.5
STABWN			1.1	0.5	0.1	0.1
Interaktionsrate +	-	RAD51C	/	/	3.4**c	1.1
STABWN			/	/	0.4	0.2
Interaktionsrate +	-	RAD51D	17.5	2.3*c	/	/
STABWN			0.1	0.3	/	/
Interaktionsrate +	-	XRCC2	29.7*c	13.1	1,2	0.8
STABWN			4.0	1.8	0.1	0.0

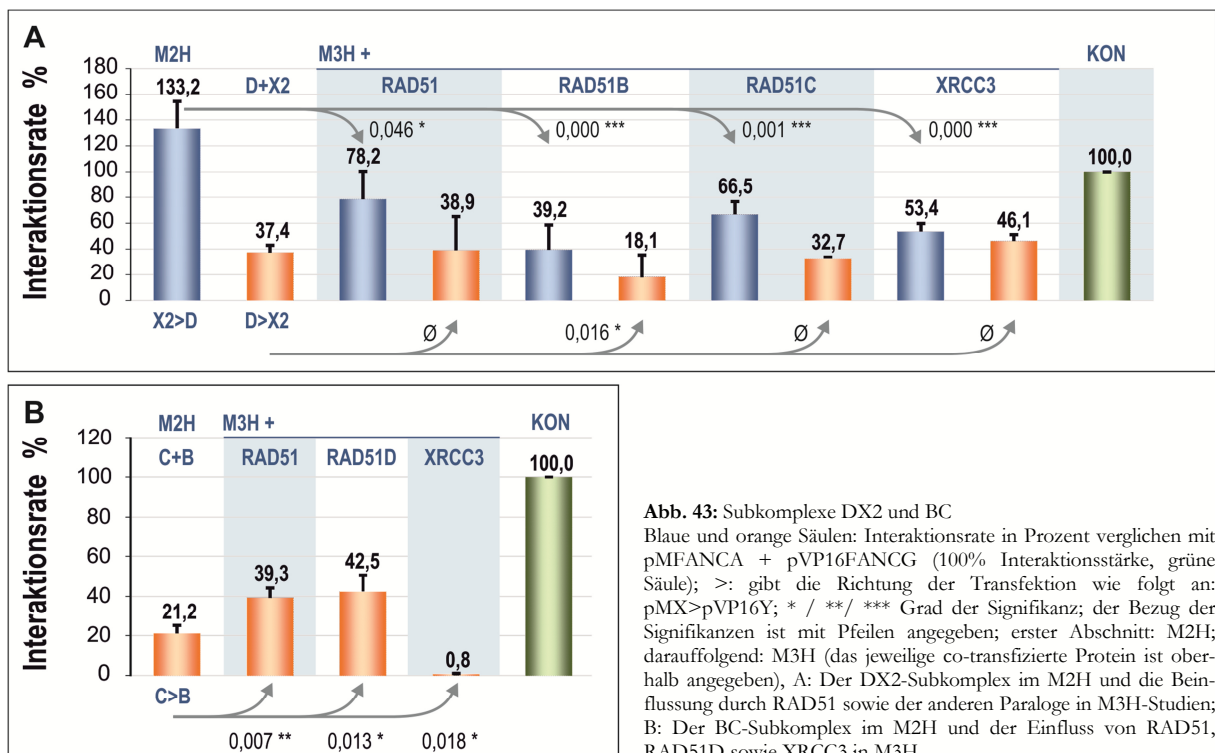
+ Interaktionsrate relativ zur Hintergrundaktivität (pM+pVP16) in % verglichen zur Interaktion von pMFANCA mit pVP16FANCG; MMC: 15 ng/ml; * / ** / *** Grad der Signifikanz verglichen mit den Kontrollen; a: M2H im Vergleich zu Selbstaktivierungskontrollen; b: Vergleich zwischen M2H ohne MMC zu M2H mit MMC; c: M2H im Vergleich zu M3H

4.2.1.4 Interaktionen im BCDX2-Komplex

Die Proteine RAD51B, -C, -D und XRCC2 bilden, laut vorherigen Studien (siehe Einleitung) einen gemeinsamen Komplex, der aus zwei Subkomplexen (BC, DX2) besteht. Laut dieses Modells kommt es innerhalb des Komplexes zu direkten (B-C, C-D, D-X2) und indirekten (B-D, C-X2) Bindungen zwischen den Proteinen. Diese wurden in M2H und M3H-Analysen genauer untersucht.

4.2.1.4.1 Die Subkomplexe BC und DX2

Interaktionsstudien zwischen RAD51D und XRCC2 zeigten richtungsabhängige Systemaktivierungen. Wir beobachteten eine starke Aktivierung in der pMX2>pVP16D Richtung (133.2 %) und moderate in der Gegenrichtung (37.4 %). In M3H-Tests wurde für alle RAD51-Paraloge und für RAD51 selbst eine inhibierende Wirkung auf die pMX2-pVP16D-Bindung beobachtet. In der anderen Richtung konnte eine Reduzierung nur für RAD51B detektiert werden (Abb. 43 A). M2H-Analysen des BC-Komplexes zeigten in beiden Richtungen moderate Interaktionen (pMRAD51B+pVPRAD51C: 53.8 %; pMRAD51C + pVP16RAD51B: 21.2 %; Abb. 43 B). Die Co-Expression aller anderen Paraloge und von RAD51 führten zu keinen Systemaktivierungen in der pMB>pVP16X-Richtung. In der anderen Richtung scheinen RAD51 und RAD51D die Verbindung der Proteine zu stärken bzw. den Komplex zu stabilisieren. Zusätzliches XRCC3 hingegen führt nahezu zu einem kompletten Interaktionsverlust zwischen RAD51B und RAD51C.



4.2.1.4.2 Interaktion zwischen den Subkomplexen

Anders als erwartet konnte in M2H-Analysen mit RAD51C und RAD51D in keiner der beiden Richtungen eine Interaktion zwischen den Proteinen detektiert werden. Auch die Co-Transfektion von RAD51 und XRCC3 führte zu keiner Systemaktivierung. In Expression mit RAD51B sowie XRCC2 als drittes Protein wurden richtungsabhängig (pMC>pVP16D) schwache bzw. sehr schwache aber signifikante Interaktionen (B: 5,7 %/X2: 1,6 %) detektiert (Abb. 44 A). Zusätzlich zu den bekannten Interaktionen von RAD51B mit RAD51C, RAD51C mit RAD51D sowie RAD51D mit XRCC2 wurden auch alle weiteren Kombinationen getestet. Eine leichte Systemaktivierung konnte im M2H Assay mit den Proteinen RAD51B und XRCC2 in der pMRAD51B-Richtung beobachtet werden (3,5 %). Durchgeführte M3H-Analysen zeigten bei Co-Expression von RAD51D in beiden Richtungen eine signifikante Intensivierung der Interaktion (pMB>pVP16X2: 131,9 %; pMX2>pVP16B: 30,3 %) (Abb. 44 B). Ein zusätzliches RAD51C-Protein hingegen führte in M3H zu keiner signifikanten Veränderung.

Wir fanden keine direkte Interaktion zwischen RAD51B und RAD51D. Die zusätzliche Expression von RAD51C führte in beiden Richtungen zu einem Anstieg der Luziferaseaktivität, welche sich aufgrund der Standardabweichung im Student-T-Test jedoch nur als grenzwertig bzw. nicht signifikant darstellte (Abb. 44 C). Eine Co-Expression von XRCC2 zeigte einen richtungsabhängige Aktivierung des Systems (pMB>pVP16D: 10,9 %) (Abb. 44 C). Im M2H-Assay konnte kein Hinweis für eine Interaktion von RAD51C und XRCC2 gefunden werden. M3H-Assays mit zusätzlichem, nativen RAD51B- und RAD51D-Protein führten zu keiner Systemaktivierung (Daten nicht dargestellt). Die Co-Expression von

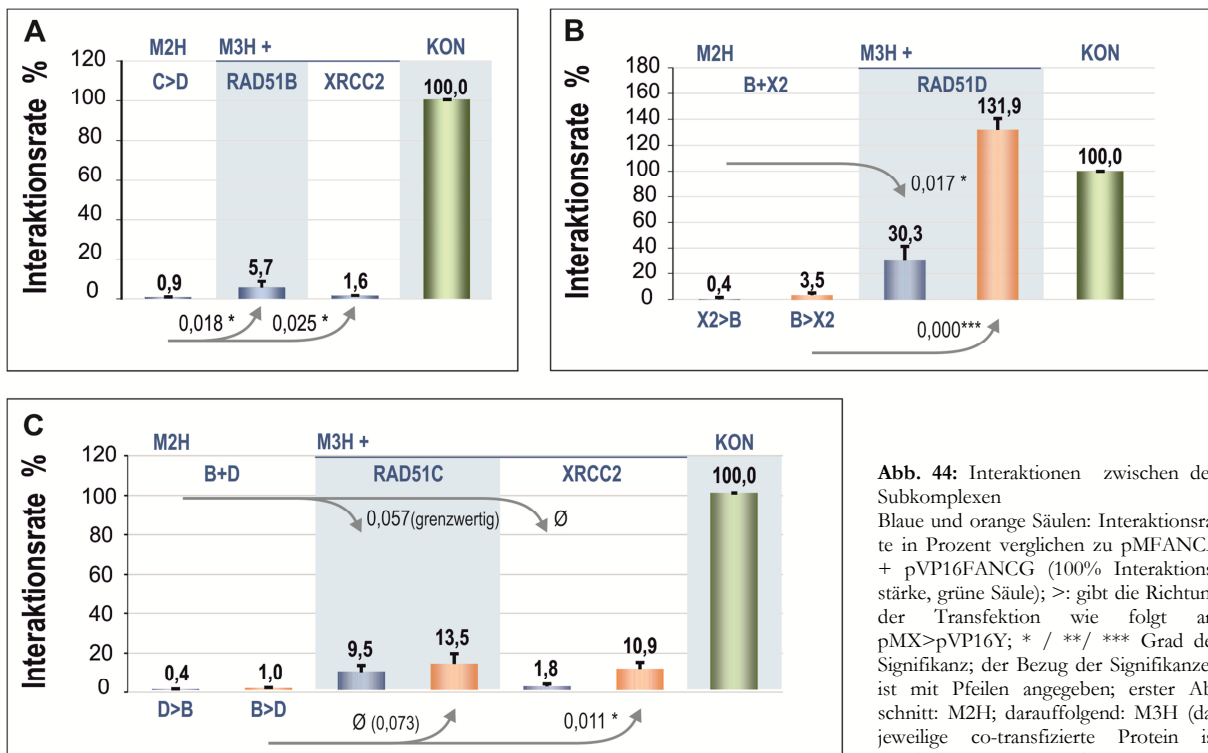


Abb. 44: Interaktionen zwischen den Subkomplexen

Blaue und orange Säulen: Interaktionsrate in Prozent verglichen zu pMFANCA + pVP16FANCG (100% Interaktionsstärke, grüne Säule); >: gibt die Richtung der Transfektion wie folgt an: pMX>pVP16Y; * / ** / *** Grad der Signifikanz; der Bezug der Signifikanzen ist mit Pfeilen angegeben; erster Abschnitt: M2H; darauffolgend: M3H (das jeweilige co-transfizierte Protein ist oberhalb angegeben), **A:** Interaktionen

zwischen RAD51C und RAD51D kommt nur in Anwesenheit von RAD51B oder XRCC2 zu Stande; **B:** die Interaktion zwischen B und X2 wird durch Co-Expression von RAD51D stark gefördert. **C:** Eine indirekte Interaktion von RAD51B und RAD51D wird durch XRCC2 ermöglicht. RAD51C kann die Proteine auch überbrücken, jedoch nur grenzwertig oder nicht signifikant.

XRCC3 und RAD51 führte weder zwischen RAD51D und RAD51B noch zwischen RAD51C und XRCC2 einer Systemaktivierung. Die beobachtete Beeinflussung aller co-transfizierten Proteine ist in Abbildung 45 zusammengefasst.

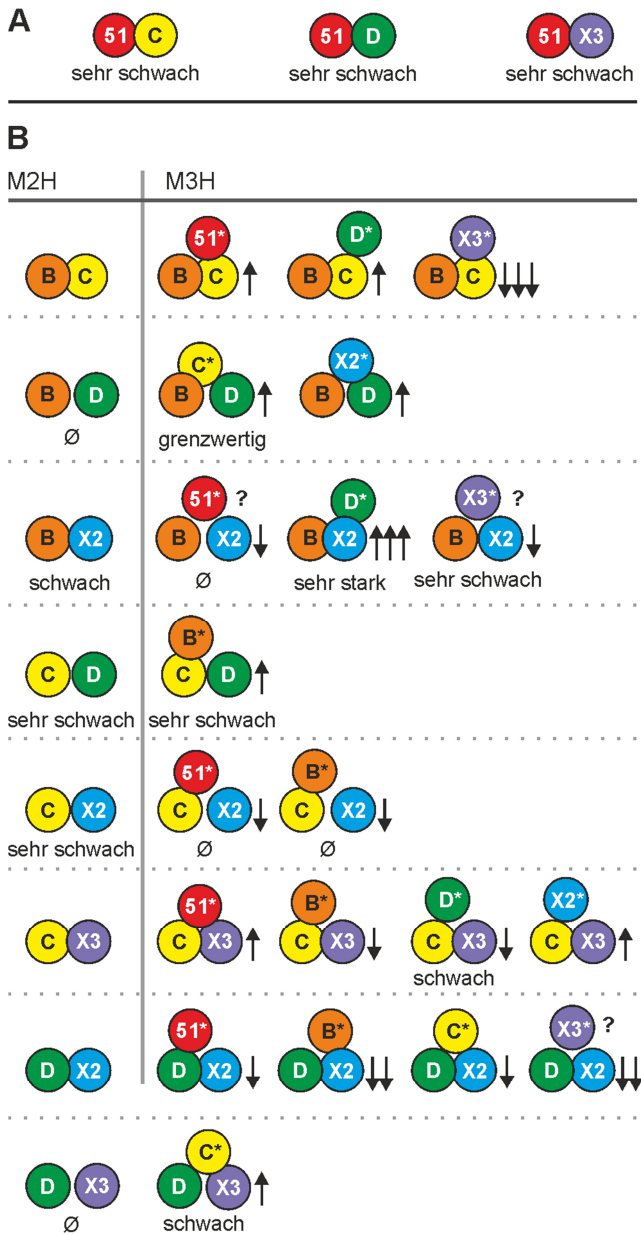


Abb. 45: Zusammenstellung aller Änderungen der Interaktionsstärken inklusive der vermuteten Interaktionen. Verglichen werden die Ergebnisse des M2H und M3H. Pfeile geben die Art der Interaktionsstärkenänderung an, wobei die Anzahl die Stärke widerspiegelt. Ø entspricht keiner Interaktion zwischen den getesteten Proteinen. *: dieses Protein wurde co-transfiziert. ?: Es besteht Unklarheit, über welches Protein das co-transfizierte Protein die Interaktion beeinflusst.

A: M2H-Analysen mit RAD51; **B:** Vergleich zwischen M2H- und M3H-Analysen der RAD51-Paraloge. Die als grenzwertig bezeichnete Interaktion zwischen RAD51B und RAD51D unter RAD51C Co-Transfektion erwies sich laut Student-T-Test als grenzwertig signifikant (0,057).

4.2.1.5 Einflüsse von Mitomycin C (MMC)

Zur Untersuchung möglicher Veränderungen der Proteininteraktionen in Zuge einer Schadensantwort wurden mittels MMC ICLs induziert. Diese führen zu Doppelstrangbrüchen und somit zum Anschalten der HR.

4.2.1.5.1 MMC-Wirkung auf den CX3-Komplex

MMC-bedingt beobachteten wir eine richtungsabhängige, signifikante Minimierung der RAD51C-XRCC3-Bindung in der pMC-Richtung. (Abb. 46, Tabelle 11). In M3H-Analysen mit zusätzlichem

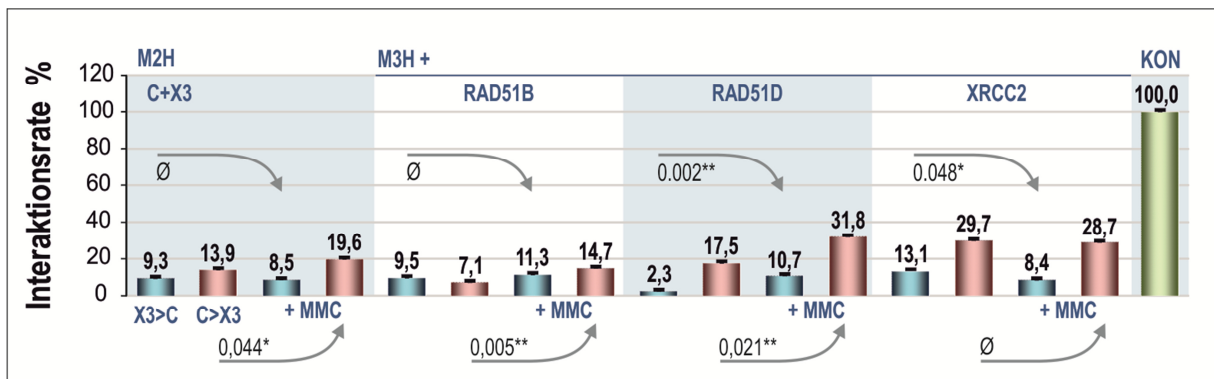


Abb. 46: MMC-Effekte auf den CX3-Komplex

Blaue und rote Säulen: Interaktionsrate in Prozent verglichen zu pMFANCA + pVP16FANCG (100% Interaktionsstärke, grüne Säule); >: gibt die Richtung der Transfektion wie folgt an: pMX>pVP16Y; die Behandlung mit MMC (15 ng/ml) ist unterhalb angegeben; * / **/ *** Grad der Signifikanz; der Bezug der Signifikanz ist mit Pfeilen angegeben; erster Abschnitt: M2H; darauffolgend: M3H (das jeweilige co-transfizierte Protein ist oberhalb angegeben)

RAD51 wurde keine Beeinflussung durch die quervernetzende Substanz beobachtet. Weiterführende M3H-Untersuchungen mit RAD51B, RAD51D und XRCC2 zeigten unterschiedliche, im Falle von RAD51D und XRCC2 richtungsabhängige MMC-bedingte Effekte (Abb. 46). So konnte in M3H-Assays mit RAD51B und RAD51D durch die Substanz eine zusätzliche Aktivierung im Vergleich zu Tests ohne MMC beobachtet werden. In Analysen mit XRCC2 hingegen kam es zu einer Reduzierung der Interaktion in pMX3-Richtung (Abb. 46). Da dies jedoch in pMX3-Richtung zu beobachten war, die sich im Vergleich zwischen M2H und M3H in Tests ohne MMC als nicht signifikant erwies (Tabelle 11), könnte es sich hier um einen Artefakt handeln.

4.2.1.5.2 MMC-Wirkung auf den BCDX2-Komplex

In M2H-Analysen der beiden Subkomplexe fanden wir nach Induktion von DSBs gegensätzliche Auswirkungen auf die Interaktionsstärke zwischen den Subkomplexproteinen. Während sich die Interaktion im DX2-Komplex in der pMX2-Richtung signifikant verringerte (-MMC: 133,2 %; +MMC: 96,8 %), kam es zwischen RAD51B und RAD51D zu einem Anstieg der Interaktion in pMC-Richtung (-MMC: 53,8 %; +MMC: 104,2 %) (Abb. 47). Ein Einfluss von MMC in die andere Richtung wurde für keine der beiden Komplexe beobachtet. Hierbei war auffällig, dass es sich bei den Richtungen, in denen MMC einen Ein-

fluss zeigte, um diejenigen handelte, in denen die Interaktionen zwischen beiden Proteinen in M2H-Analysen ohne MMC am prominentesten zeigten.

Eine Initiierung der in der Literatur beschriebenen Interaktion von RAD51C und RAD51D konnte auch unter Verwendung von MMC nicht erzielt werden. Ebenso wie in den Tests ohne die Substanz wurde RAD51B für eine Systemaktivierung benötigt. Im Vergleich zu Analysen ohne MMC steigerte sich die Intensität der RAD51C-RAD51D Interaktion um das 2,3- bzw. um das 4,4-fache (pMD>pVP16C: -MMC: 2,1 %, +MMC: 10,3 %; pMC>pVP16D: -MMC: 5,7 %, +MMC: 13,5 %) (Abb. 47). Auch die Interaktion von RAD51B mit XRCC2 wurde

nicht durch MMC allein aktiviert. Für sie wurde, wie in den Analysen ohne die *Cross-Linker*-Substanz, RAD51D-Protein benötigt. Die Systemaktivierung durch RAD51D verringerte sich in Folge der MMC-Behandlung in der pMB-Richtung um das 0,7-fache (-MMC: 133,9 %, +MMC: 88,5 %). In der pMX2-Richtung wurde keine signifikante Veränderung beobachtet. Auffällig bei diesen Untersuchungen war die Abhängigkeit der Interaktionsveränderung der M3H-Analysen von denen der M2H-Tests. Verringerte sich die Intensität im Subkomplex, so verringerte sich auch jene zwischen den Subkomplexen in den entsprechenden M3H mit den interaktionsaktivierenden Proteinen und umgekehrt (Abb. 47). Durchgeführte M3H-Analysen, die als überbrückendes Protein ein natives Protein enthielten (RAD51D + RAD51B mit XRCC2; RAD51B + RAD51D mit RAD51C), führten nicht zu einer Systemaktivierung.

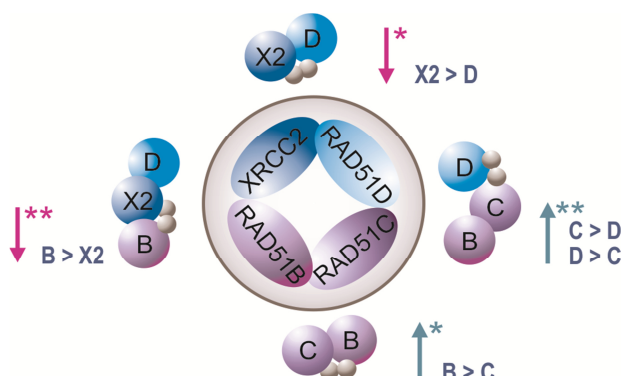


Abb. 47: Effekte vom MMC auf den BCDX2-Komplex
Braune Kreise: Fusionsdomänen DNA-BD (pM-Vektor) bzw. AD (pVP16-Vektor); Blaue Kreise: DX2-Subkomplexproteine; Lila Kreise: BC-Subkomplexproteine; */** Grad der Signifikanz; Richtung angeben pMX>pVP16Y; Pfeile geben Art der Interaktionsveränderung (stärker/schwächer) an; MMC (15 µg/ml) wirkt gegensätzlich auf die Interaktionsstärken.

4.2.1.6 Einflüsse der RAD51C-Mutante R258H auf die Paraloginteraktionen

Die Interaktionen des mutierten RAD51C-Patientenproteins wurden in M2H-Analysen mit RAD51B und XRCC3 getestet. Es konnten weder signifikante, mutationsbedingte Veränderungen auf die CB-Subkomplex- noch auf die CX3-Komplexbildung beobachtet werden. Der einzig nachweisbare Einfluss wurde im M3H-Assay zwischen pMC und pMD mit co-transfiziertem RAD51B-Protein nach Behandlung mit MMC festgestellt. Hier kam es im Vergleich zu der Interaktion mit dem wildtypischen RAD51C-Protein zu einer Verringerung der Interaktion zwischen RAD51C und RAD51D von 13,5 % auf 6,9 % (Abb. 48).

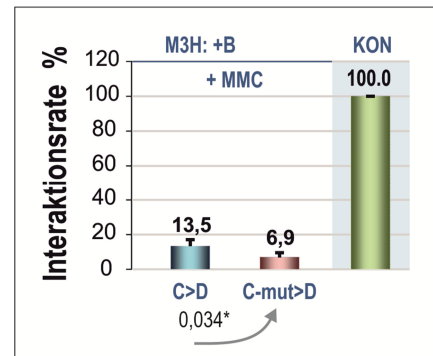


Abb. 48: Effekt von R258H in RAD51C
Blaue und rote Säulen: Interaktionsrate in Prozent verglichen zu pMFANCA + pVP16FANCG (100% Interaktionsstärke, grüne Säule); M3H Assay pMC>pVP16D-Richtung mit B und MMC (15 ng/ml); * Grad der Signifikanz

4.2.1.7 RAD51C im FA/BRCA-Weg: Interaktion mit FANCN

Auf Grund veröffentlichten Arbeit von Park et al. 2013, die RAD51C als Interaktionspartner von FANCN beschreibt, wurde ein M2H-Assay durchgeführt. In verknüpften System konnte diese Interaktion nicht detektiert werden (Abb. 49). Weitere Analysen wurden aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

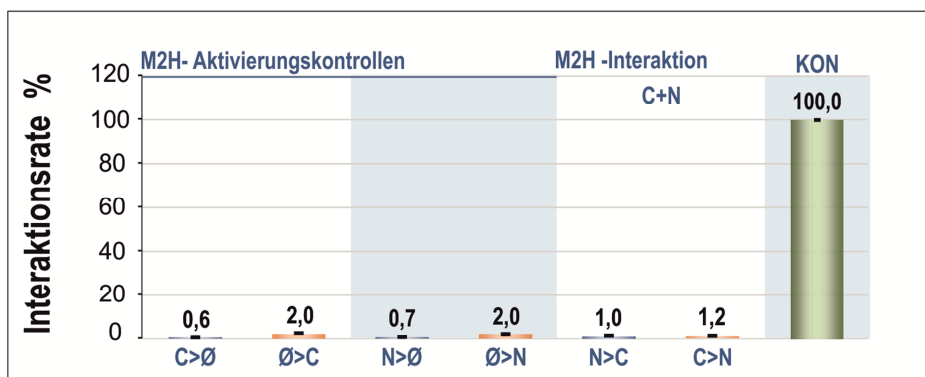


Abb. 49: M2-Analyse von RAD51C und FANCN

Blaue und orange Säulen: Interaktionsrate in Prozent verglichen mit pMFANCA + pVP16FANCG (100% Interaktionsstärke, grüne Säule); >: gibt die Richtung der Transfektion wie folgt an: pMX>pVP16Y; Abschnitte 1 und 2: Systemaktivierung durch die einzelnen Fusionsproteine (Selbstaktivierung), Abschnitt 3: Aktivitäten liegen unter denen der Selbstaktivierung-> keine Interaktion

4.2.2 Interaktionsanalysen via Western Blot

Zur Validierung der über die M2/3H-Analysen detektierten Interaktionen wurden Co-IPs in HEK293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden über verschiedene Antikörper (α -RAD51B, α -RAD51C, α -XRCC2, α -XRCC3) Komplexpartner aus Gesamtproteinextrakten extrahiert und über Western Blot-Analysen detektiert. Die interessanten Proteine wurden für diese Analysen mittels pCMV-Tag3B-Vektor überexprimiert, welcher auch zur Expression nativer Proteine in M3H verwendet wurde. Durch die Expression entstanden myc-getaggte Proteine. Der Tag und die zwischen ihm so wie dem Start des Proteins integrierten Aminosäuren bedingten die erhöhte detektierte Proteingröße (Tab. 12).

Tab. 12: Größen der Paraloge, des myc-Tag und der zusätzlichen durch die Klonierung inserierten AS in kDa

Protein	ENST	CCD	nativ (kDa)	myc-Tag (kDa)	zusätzliche AS (kDa)
RAD51	00000267868	CCDS10062.1	36,966	1,2	3,03
RAD51B	00000487861	CCDS9789.1	42,195	1,2	1,10
RAD51C	00000337432	CCDS11611.1	42,190	1,2	1,10
RAD51D	00000345365	CCDS45646.1	35,049	1,2	1,10
XRCC2	00000359321	CCDS5933.1	31,956	1,2	1,10
XRCC3	00000445556	CCDS9984.1	37,850	1,2	1,10

4.2.2.1 RAD51C-Co-IP: Interaktionen mit RAD51B und XRCC3

Die Interaktionen zwischen RAD51C und RAD51B sowie XRCC3 wurde mittels zwei verschiedener Co-IPs mit α -RAD51C untersucht. Hierfür wurden zwei Proteinkombinationen in zwei verschiedenen Kombinationen überexprimiert: 1: C, XRCC3; 2: RAD51C, RAD51B. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 zusammengefasst. In der Ladungskontrolle konnte über α -p84 deutlich Protein in der Gesamtproteinfraktion (Input) detektiert werden (Spuren 1, 3). In dem Extrakt mit überexprimiertem XRCC3 war sowohl in der Inputfraktion als auch in der IP-Fraktion natives und myc-getaggtes XRCC3 nachweisbar (Spuren 1, 2), was eine Interaktion von RAD51C mit XRCC3 verdeutlicht. Die Detektion des RAD51B-Proteins war nur schwach in der IP-Fraktion möglich. Ein Nachweis im Input konnte nicht erbracht werden (Spuren 1, 2). In der Überexpression von RAD51C und RAD51B war ein Nachweis des nativen XRCC3-Proteins ebenfalls in beiden Fraktionen (Input/IP) möglich (Spuren 3, 4). Durch die Überexpression von RAD51B konnte in der IP-Fraktion deutlich mehr angereichertes Protein detektiert werden.

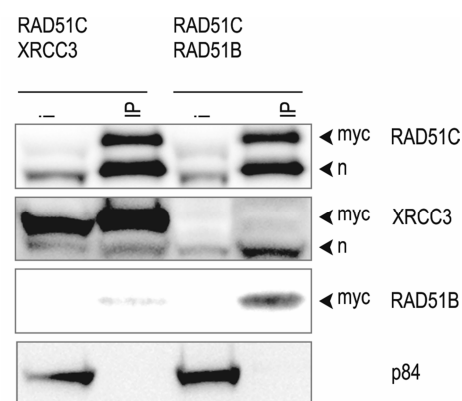


Abb. 50: RAD51C Co-IP
Oben: überexprimierte Proteine; Rechts: zur Detektion verwendeter Antikörper, mit Pfeilen gekennzeichnet: myc: Protein mit myc-Tag; n: natives Protein; i (Spuren 1, 3): eingesetztes Gesamtprotein vor der IP (Input); IP (Spuren 2, 4): Proteinextrakt der Co-IP

4.2.2.2 XRCC3-Co-IP: Interaktionen mit RAD51, RAD51B und RAD51C

Auch die α -XRCC3-Co-IPs wurden in Extrakten verschiedener Co-Expressionen durchgeführt: Expression 1: XRCC3, RAD51C; Expression 2: XRCC3, RAD51C, RAD51B; Expression 3: XRCC3, RAD51C, RAD51 (Abb. 51). Die Ladungskontrolle zeigte für alle Expressionen gleichmäßig schwaches Protein in der Inputfraktion (Spuren 1, 3, 5). In der α -XRCC3-Detektion zeigte sich schwaches natives und überexprimiertes XRCC3-Protein in den Inputfraktionen. Dieses konnte nur begrenzt in der eigentlichen IP (Spuren 2, 4, 6) nachgewiesen werden. Die schwachen Proteinbanden deuten auf eine geringe Menge des Proteins oder ein schwaches Antikörpersignal hin. Dass es dennoch vorhanden ist, lässt sich aus der nachfolgenden α -RAD51C Detektion schließen. Trotz der geringen Menge an XRCC3, welche als *Bait* (Köder) für die IP- eingesetzt wurde, konnte präzipitiertes C-Protein in der IP-Fraktion nachgewiesen werden (Spuren 2, 4, 6). In den Inputfraktionen (Spuren 1, 3, 5) wurde ein starkes Signal detektiert. Über den RAD51B-Antikörper war in allen Inputfraktionen schwaches natives Protein (Spuren 1, 3, 5) und in Expression 2 zusätzlich das myc-getaggte Protein nachweisbar (Spur 3). In allen drei Expressionen konnte keine Interaktion von RAD51B mit XRCC3 nachgewiesen werden (Spuren 2, 4, 6). Eine Detektion von RAD51 war ebenfalls nur in den Input-Fraktionen (Spuren 1, 3, 5), nicht aber in den IP-Fraktionen (Spuren 2, 4, 6), möglich.

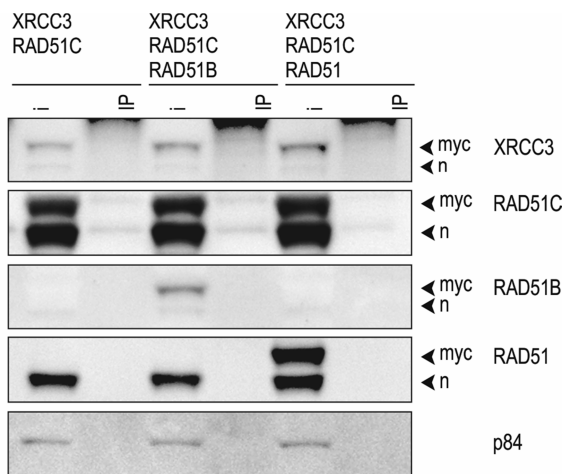


Abb. 51: XRCC3 Co-IP

Oben: über exprimierte Proteine; Rechts: zur Detektion verwendeter Antikörper, mit Pfeilen gekennzeichnet: myc: Protein mit myc-Tag, n: natives Protein; i (Spuren 1, 3): eingesetztes Gesamtprotein vor der IP (Input); IP (Spuren 2, 4): Proteinextrakt der Co-IP

4.2.2.3 Interaktionen von RAD51B und XRCC2

Um die Interaktionen zwischen RAD51B und XRCC2 zu verifizieren, wurden Co-IPs mit α -RAD51B und α -XRCC2 durchgeführt. Hierfür wurden Proteine in verschiedenen Kombinationen überexprimiert (Expression 1: RAD51B, XRCC2 Abb. 52 A; Expression 2: RAD51B, RAD51D, XRCC2, Abb. 52 B). Für beide Ansätze wurde als Ladungskontrolle α -XPF verwendet. Über α -XPF konnten in den Inputfraktionen aller Expressionen gleichmäßige Proteinmengen nachgewiesen werden.

Die Detektion von XRCC2 zeigte für beide Expressionen der α -XRCC2-Co-IP (Abb. 52 A), sowohl in der Input- (Spuren 1, 3) als auch der IP-Fraktion (Spuren 2, 4) myc-getaggtetes Protein. RAD51B hingegen konnte nur in den Inputfraktionen beider Expressionen nachgewiesen werden (Spuren 1, 3). Dies spricht gegen eine Interaktion der Proteine, die auch durch RAD51D nicht zu initiieren war. Das RAD51D-Protein konnte in der Inputfraktion (Spur 1, 3) als starkes Signal und in der IP-Fraktion (Spuren 2, 4) als schwaches Signal detektiert werden, was die DX2-Komplexbildung bestätigt. Western Blot-Analysen der α -RAD51B-Co-IP (Abb. 52 B) zeigten ein eindeutiges Signal von RAD51B (nativ/myc-tag) sowohl im Input (Spuren 1, 3) als auch in der IP-Fraktion (Spuren 2, 4). Mit α -RAD51D und α -XRCC2 konnten die Proteine in der Inputfraktion (Spuren 1, 2), nicht aber in der IP-Fraktion (Spuren 2, 4) detektiert werden. Auch hier spricht das Fehlen des XRCC2-Proteins gegen eine Interaktion mit RAD51B.

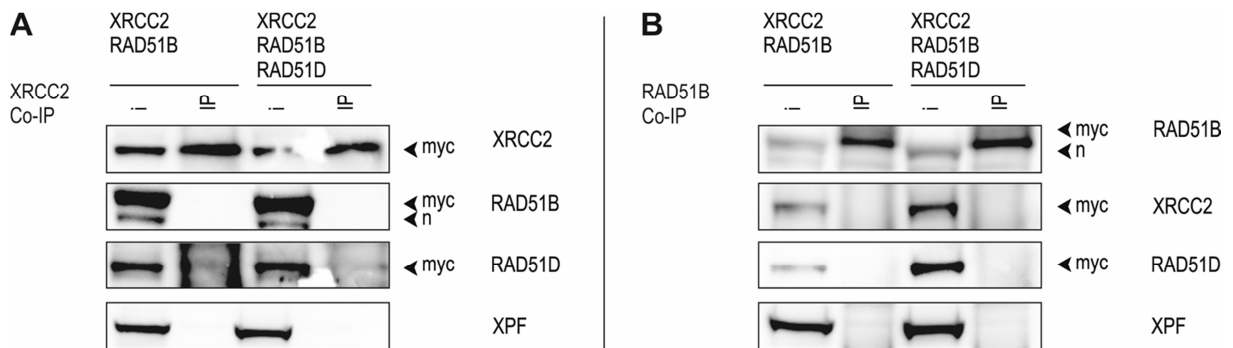


Abb. 52: XRCC2 Co-IP (A) und RAD51B Co-IP (B)

Oben: überexprimierte Proteine; Rechts: zur Detektion verwendeter Antikörper, mit Pfeilen gekennzeichnet: myc: Protein mit myc-Tag, n: natives Protein; i (Spuren 1, 3): eingesetztes Gesamtprotein vor der IP (Input); IP (Spuren 2, 4): Proteinextrakt der Co-IP, XPF diente als Ladungskontrolle

4.3 Expressions- und DNA-Interaktionsstudien mit RAD51C

Zur Aufklärung der Struktur des humanen RAD51C galt es, das Protein in genügender Menge, Reinheit und Qualität zu exprimieren, aufzureinigen und nach seiner Kristallisation per Röntgenbeugungsanalyse zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Strategien verfolgt. Zum Beispiel erfolgte die Klonierung des Proteins einzeln oder in Kombination mit XRCC3, seinem Partner im CX3-Komplex. Die Einzel- und Co-Expressionen wurden teilweise mit der Originalsequenz, aber auch mit einer für die Expression in *E.coli* optimierten DNA-Sequenz durchgeführt. Mit den oben genannten Ansätzen wurden Expressionen in verschiedenen *E. coli*-Stämmen (ArcticExpress, BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL, BL21 Star™ (DE3) pLysS, Rosetta™ 2 (DE3)) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Einzel- und Co-Expressionen auf ein Insektenzellexpressionssystem übertragen. Hierfür wurde RAD51C einzeln oder in Kombination mit XRCC3 in die Vektoren pFastBac™ HTa bzw. pFastBac™ Dual kloniert. Die Virusgenerierung erfolgte mit dem Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (3.3.2.3) Das Protein wurde in Sf21-, und High Five™-Zelllinien exprimiert und unter Anwendung verschiedener Puffer und Strategien aufgereinigt (3.5.3).

4.3.1 Expression in *E. Coli*

4.3.1.1 Expression des RAD51C-Proteins

4.3.1.1.1 Expression von humanem RAD51C

Initial erfolgten Expressionen des RAD51C-Proteins in verschiedenen *E. coli*-Stämmen über die Expressionsvektoren pETM11, pET21b und pBADM11. Die Expressionen wurden unter verschiedenen Bedingungen (14/20/25/37°C) in LB-Medium oder Autoinduzierendem Medium nach Studier et al 2005 (2005) durchgeführt. Erste Testexpressionen erfolgten in 5 ml Kulturen (3.5.3.3) weiterführende in 2 l-Kulturen (3.5.3.4). Zur Isolation des Proteins aus den Bakterien wurden die initialen Puffer (2.6.6) verwendet. Abgesehen von Expressionen bei 14°C in Bakterien des ArcticExpress-Stammes, unter Verwendung des pETM11-Vektors und Autoinduzierendem Medium, konnte keine Expression des Proteins in der löslichen Fraktion detektiert werden (Abb. 53 A/B). Die Analyse des über Protino® Ni-IDA- Matrix gereinigten Proteins via SDS-Gelelektrophorese zeigte zusätzlich einen hohen Anteil des Cpn60 Proteins (60 kDa), der großen Untereinheit des Chaperoninsystems Cpn60/10. Eine mögliche Assoziation des RAD51C-Proteins mit den für diesen Stamm typischen Chaperoninsystem aus *O. antarctica* (Joseph and Andreotti 2008) und daraus bedingter, möglicher Schwierigkeiten bei der Proteinfaltung, gab, trotz einer Expression in diesem Stamm, Anlass zur Änderung der Strategie (4.3.1.1.2).

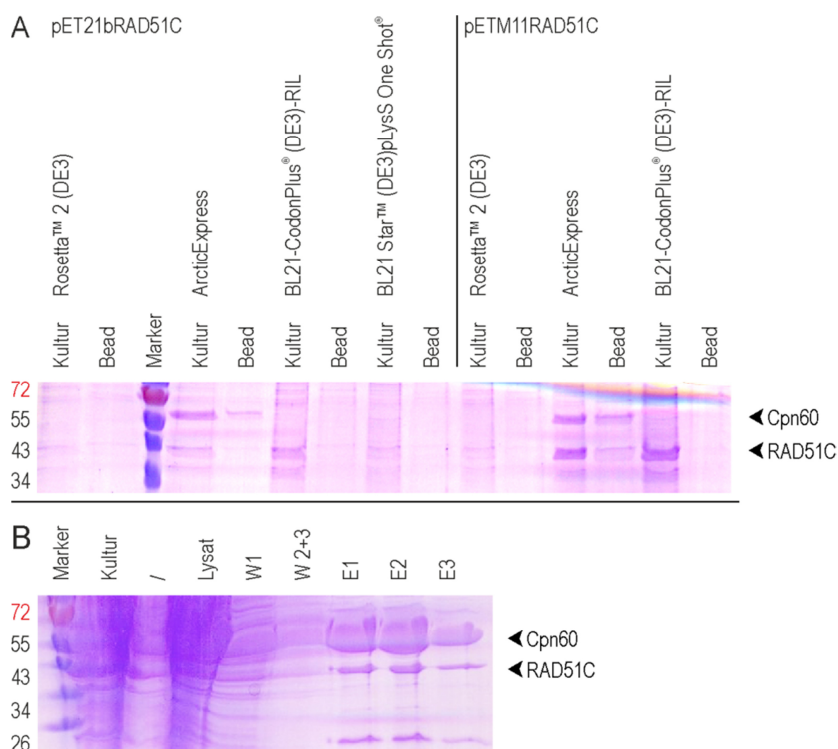


Abb 53: SDS-Gele der RAD51C- (42 kDa) Expressionsanalysen

Kultur: Bakterienkultur ohne Proteinauflschluss (unlösliche Fraktion), *Bead*: aus aufgeschlossener Kultur über Protino® Ni-IDA-Bead-Matrix isoliertes Protein (lösliche Fraktion), *Lysat*: über Sonifikation und Lysispuffer aufgeschlossene Kultur, *W*: Waschfraktion, *E*: Elutionsfraktion; **A**: Expression in den Vektoren pET21b und pETM11 in verschiedenen *E. coli*-Stämmen bei 14°C (5 ml-Kultur). Eine Expression des Proteins in der löslichen Fraktion ist nur in ArcticExpress kompetenten Zellen möglich. Die Expression über den pET21b-Vektor in anderen *E. coli*-Stämmen führt zu unlöslicher Expression des Proteins (Kultur) **B**: Reinigung der 2 l-Expressionskulturen von RAD51C im pETM11-Vektor im ArcticExpress-Stamm. RAD51C ist sehr gut in der löslichen Proteinfraktion zu detektieren (Elutionen E1-3). Ebenfalls detektierbar: ein hoher Anteil Cpn60 (60 kDa).

4.3.1.1.2 Expression von humanem Codon-optimierten RAD51C

Die Grundlage des genetischen Codes allen terrestrischen Lebens beruht auf den Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin/Uracil (T/U). Durch ihre Abfolge codieren jeweils drei Basen (Triplet/ Codon) eine bestimmte Aminosäure. Bei der Codierung herrscht jedoch eine gewisse Redundanz, dies bedeutet, dass verschiedene Basenfolgen für eine Aminosäure codieren können. Für die Codierung bevorzugen bestimmte Organismen verschiedene Codons. Diese unterschiedliche Präferenz wird als *Codonusage* bezeichnet. Um die Expression des humanen RAD51C in *E. coli* für weitere Expressionen zu fördern, wurde eine für die Bakterien optimierte Gensequenz (GeneArt, Regensburg) in verschiedene Expressionsvektoren (pETM11, pET28a(+)) kloniert und mit diesen unterschiedliche Stämme (ArcticExpress Competent Cells, BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL Competent Cells, BL21 Star™ (DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent Cells) transformiert. Initiale Expressionstests von ArcticExpress, BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL und BL21 Star™ (DE3)pLysS One Shot® *E. coli*-Stämmen zeigte lediglich eine schwache Expression des codonoptimierten hRAD51C bei 37°C und eine lösliche Expression über den pETM11-Vektor. Die Analyse der Expressionsversuche über den pET28a-Vektor zeigten nach Aufarbeitung mit den initialen Puffern (pH 8.0), sowohl bei 15°C als auch bei 37°C unlösliches Protein. Die Expression des

Proteins in größerem Umfang (2 l, BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL, pETM11RAD51Copt, 15°C) führte nur zu einer minimalen Bindung von löslichem Protein an die Affinitätsmatrix. Dies ließ ein mögliches „nach innen Falten“ und einer damit verbundenen schlechten Zugänglichkeit des an das Protein fusionierten 6xHis-Tags vermuten, welcher zur Aufreinigung über eine Protino® Ni-IDA- Matrix benötigt wird.

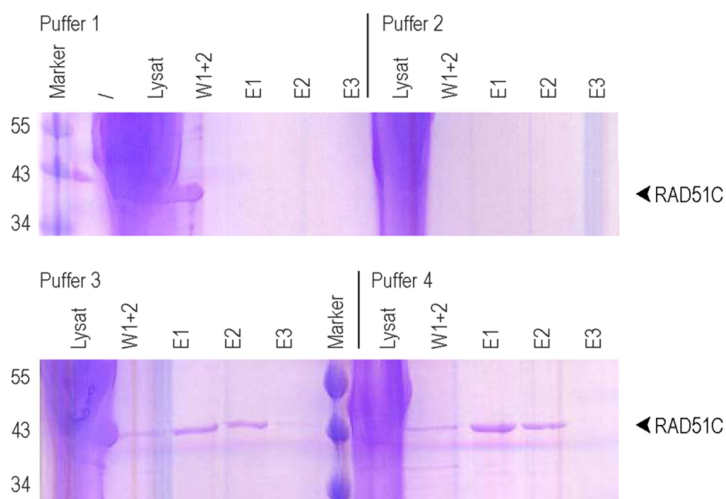


Abb. 54: SDS-Gele (15%) Aufschluss der RAD51C (42 kDa) codonoptimierten Expressionen (BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL, pETM11RAD51Copt, 15°C) mit verschiedenen Lysispuffern. Puffer 1: 50 mM Tris-HCL (pH 8,0), 1 M NaCl; Puffer 2: 100 mM Tris-HCL (pH 8,0), 250 mM NaCl, 1 M Guanidiniumhydrochlorid; Puffer 3: 50 mM Tris-HCL (pH 8,0), 250 mM NaCl, 0,1% NP-40; Puffer 4: 100 mM Tris-HCL (pH 8,0), 1 mM NaCl, 1 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1% NP-40; Lysat: über Sonifikation und Lysispuffer aufgeschlossene Kultur, W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktion; Eine Expression von codonoptimierten RAD51C in der löslichen Fraktion (E1-2) konnte durch Puffer 3 und 4 erzielt werden (E1-2).

In einem weiteren Versuch (BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL, pETM11-RAD51Copt, 15°C) wurden die, im Schikanekolben besser belüfteten, Kulturen mit alternativen Lysispuffern (2.6.6; Lysispuffer 1-4) abgeschlossen. Die Puffer unterschieden sich in NaCl- und Tris-Konzentration, sowie weiteren Zusätzen (Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 % NP-40). Eine Expression des Proteins in der löslichen Fraktion konnte mit den Puffern 3 und 4 erzielt werden (Abb. 54). Nach dem Konzentrieren des Proteins (VIVASPIN2 10.000 MWCO PES Zentrifugalkonzentrator) und dessen Lagerung über Nacht aggregierte es, was zum Ausfallen des Selben aus der Lösung führte. Für eine weitere Reinigung des Proteins, aus pETM11RAD51Copt transformierten und in autoinduziertem Medium kultivierten BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL *E. coli* (15°C), wurden auf Tris-HCL (pH 9,0) basierende Lysis-/Wasch- sowie Elutionspuffer verwendet (2.6.6; pH 9,0-Puffer). Das Protein aus den Elutionsfraktionen 1-3 (Abb. 55 A) wurde vereinigt und mittels Dialyse über Nacht in Äktapuffer (pH 9,0) umgepuffert. Das konzentrierte Protein (1,8 mg/ml) wurde größenchromatographisch gereinigt (ÄKTA Purifier 10, HiLoad™ 16/60 Superdex™200 pg). Eine Analyse der Elutionsfraktionen (10 % SDS-Gel, Silberfärbung) zeigte, dass das codonoptimierte RAD51C hauptsächlich in dem zuerst eluierenden Aggregatmaximum (hier Fraktionen A1-A7) vorlag. Gemäß der Größenfraktionierung werden in diesem Maximum verschiedene, undefinierbare Proteinkomplexe bzw. aggregierte Proteine eluiert. In der danach eluierten Fraktion, in dem das erwünschte überexprimierte Protein vermutet wurde (Proteinmaximum), konnte nur ein geringer Anteil des Proteins detektiert werden. Diese Fraktion enthielt ein weiteres Protein mit einer Masse von ca. 25 kDa. Das so gewonnene unsaubere Protein (Abb. 55 B) konnte somit nicht weiter verwendet werden.

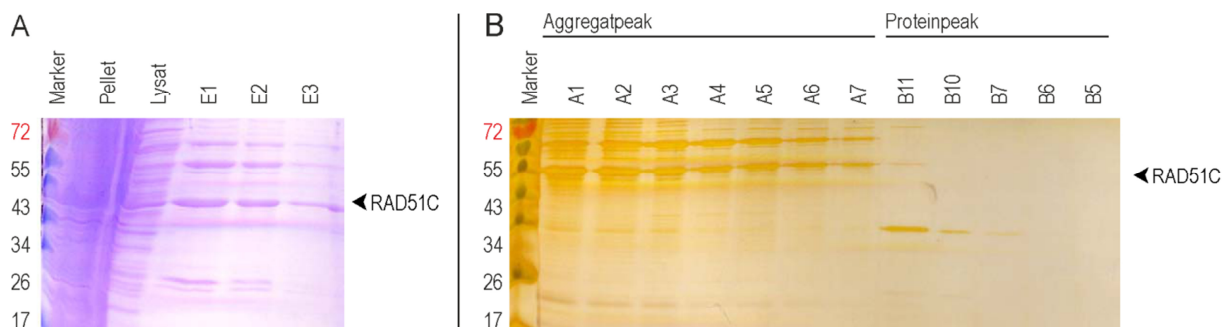


Abb 55: SDS-Gele (15%) Reinigung des codonoptimierten RAD51C (42 kDa) aus BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL (pETM11RAD51Copt., 15°C) mit pH 9,0 Puffern

Pellet: Protein in pelletierten Bakterien, Lysat: Protein in aufgeschlossenen Bakterien, E: Elutionsfraktion, A/B: Elutionsfraktionen der Größenausschluss Chromatographie, A: Comassiefärbung der Proteinisolation. Codonoptimiertes RAD51C ist in den löslichen Fraktionen E1-3 nach der Aufreinigung vorhanden. Die Isolation enthält zusätzlich unspezifisches Protein. B: Silberfärbung relevanter Fraktionen nach einer größenabhängigen Chromatographie. Das codonoptimierte RAD51C befindet sich in der Aggregatfraktion A1-A7. Während ein geringer Anteil des Proteins in der Proteinfraktion B11 detektiert werden konnte, war in allen weiteren Proteinfraktionen nur unspezifisches Protein detektierbar (B10/7/6/5)

4.3.1.2 Co-Expression von Codon-optimierten RAD51C und XRCC3

Da RAD51C-Einzelexpressionen nicht zur Gewinnung ausreichender Proteinmengen für Interaktionsstudien oder Kristallisation führten, wurde das Protein in weiteren Versuchen mit XRCC3 co-exprimiert. Bei XRCC3 handelt es sich um einen bekannten RAD51C-Interaktions-partner in der DNA-Reparatur.

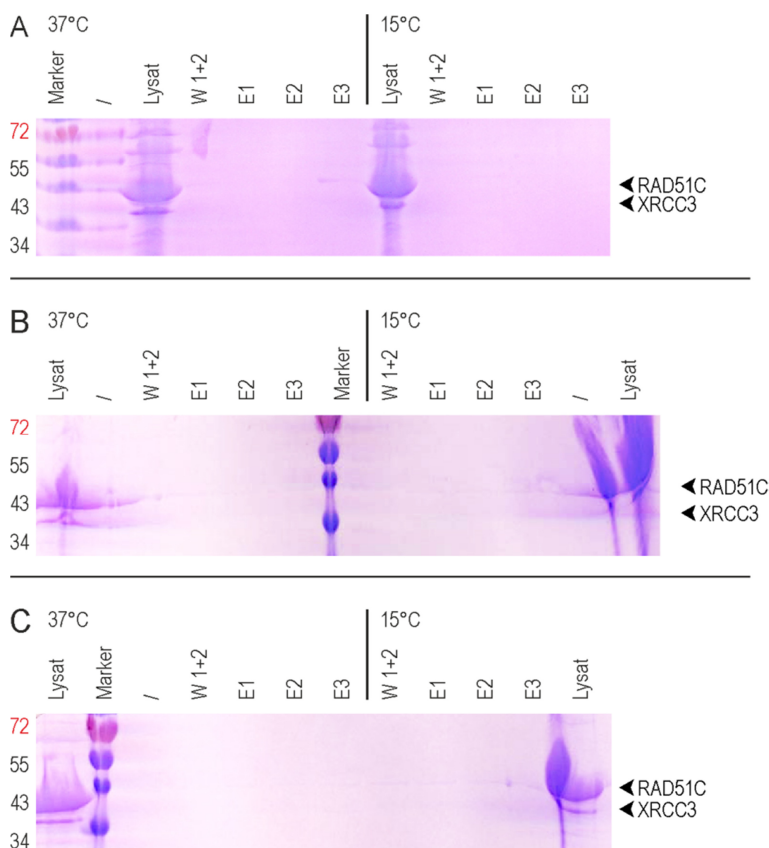


Abb. 56: SDS-Gele (15%) zur Überprüfung der Co-Expression von RAD51Copt (42 kDa) und XRCC3 (38 kDa) (pETM11RAD51Copt, pBADM11XRCC3) bei 15/37°C mit pH 9,0-Puffern aus A: ArcticExpress, B: BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL, C: Rosetta™ 2 (DE3). Die Proteine konnten in allen Expressionen nur in der unlöslichen Fraktion (Lysat vor Aufreinigung) detektiert werden

Auf diese Weise sollte das exprimierte Protein stabilisiert werden. Eine Expression beider Proteine über pETM11-RAD51Copt und pBADM11-XRCC3 in den *E. coli*-Stämmen ArcticExpress, BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL und Rosetta™ 2 (DE3), bei 15 bzw. 37°C führte nach Aufreinigung mit Lysispuffer A (pH 9,0), Waschpuffer A (pH 9,0) und Elutionspuffer (pH 9,0) (2.6.6) erneut zu einer unlöslichen Expression (Abb. 56 A-C). Aus diesem Grunde wurde das Expressionssystem geändert und weitere Versuche in Insektenzellen durchgeführt (4.3.2).

4.3.2 Expression in Insektenzellen

Da die Expressionen von RAD51C in *E. coli*-Systemen zu unzureichenden Expressionen in der löslichen Fraktion führten, wurde ein weiteres Expressionssystem zur Proteingewinnung heran gezogen. Die von *S. frugiperda* (Sf21) und *T. ni* (H5) abstammenden Zelllinien wurden, wie unter 3.3.2.3 *Virale Transfektion von Insektenzelllinien als Grundlage zur Herstellung von Proteinen für die DNA-Bindungsstudien* beschrieben, mit rekombinanten Viren infiziert. Hierbei wurden sowohl Einzel- als auch Co-Expressionen mit XRCC3 durchgeführt. Die Aufreinigung des exprimierten Proteins erfolgte mittels verschiedener Puffer.

4.3.2.1 Einzelexpression von RAD51C

Initial wurden Einzelexpressionen des His-markierten RAD51C in IPBL-Sf21 AE-Zellen (10 ml) durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte mit den initialen für *E. coli* verwendeten Lysispuffer (pH 8,0) (2.6.6). Eine Ponceaufärbung der Western blotmembran zeigte eine deutliche Expression des Proteins in der Gesamtproteinfraktion während das Protein in den löslichen Fraktionen nur schwach zu erkennen war. Die antikörperbasierende Analyse (AK1: Mouse anti His, AK2: goat anti Mouse-

HRP) ließ 48 h und 72 h nach der Infektion der Zellen deutlich exprimiertes Protein in der Gesamtproteinfraktion (unlösliche Fraktion), nicht aber in der löslichen Fraktion erkennen (Abb. 57). In weiteren Testexpressionen des RAD51C-Proteins in IPBL-Sf21 AE-Kulturen (10 ml) konnten nach Infektion mit 2 % Virus und einer Inkubation von 24 h bzw. 72 h Proteine in den löslichen Fraktionen beobachtet werden. (Abb. 58). Die Pellets wurden mit initialen Puffern (pH 8,0) (2.6.6) behandelt.

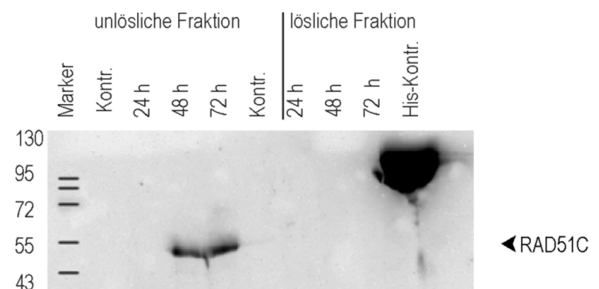


Abb 57: Western Blot-Analyse der ersten Testexpressionen von RAD51C (42 kDa) in IPBL-Sf21 AE

Das exprimierte Protein konnte deutlich in der Gesamtproteinfraktion nach 48 h und 72 h detektiert werden. In der isolierten, löslichen Fraktion wurde eine minimale Proteinexpression beobachtet.

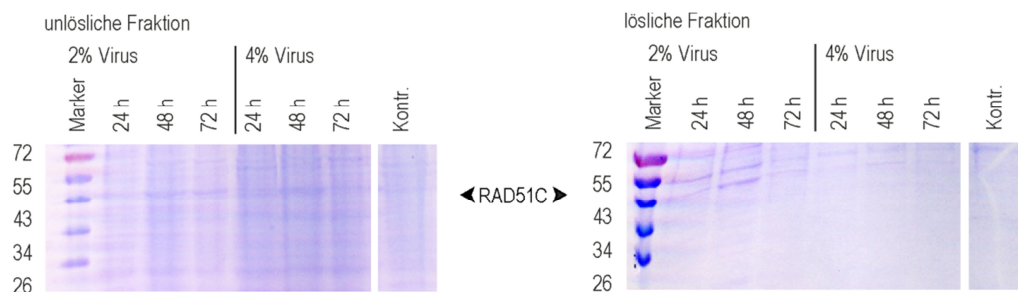


Abb. 58: Coomassiefärbung 15 % SDS Gele zur Analyse der Testexpressionen von RAD51C (42 kDa) in IPBL-Sf21 AE-Kulturen (10 ml) mit 2%/4% rekombinanten Virus (RAD51C) in IPBL-Sf21 AE. In den mit 2% Virus infizierten Zellen konnte nach 24 h und 72 h das RAD51C-Protein sowohl in der unlöslichen, als auch in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Mit 4% Virus konnte keine lösliche Expression erzielt werden. (Kontr.: Aufreinigung ohne virale Infektion)

4.3.2.2 Co-Expression von RAD51C und XRCC3

Um eine schnellere Proteingenerierung in einem größeren Maßstab zu erzielen, wurden alle weiteren Versuche in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH (HZI, Braunschweig) durchgeführt. Die für die Virusgenerierung verwendeten Vektoren (pFastBac HTa-RAD51C, pFastBac HTa-XRCC3 und pFASTBacTMDual-RAD51C-XRCC3) und auch der Virus, zur Expression von RAD51C (ausgehend von pFastBac HTa-RAD51C) wurden von uns generiert. Die Expressionen erfolgten zum einen über separate Viren für RAD51C und XRCC3 (pFastBac HTa-Vektoren) und zum anderen mit einem Virus (basierend auf pFASTBacTMDual-RAD51C-XRCC3). Die Co-Expressionen wurden in verschiedenen Zelllinien (Sf21/H5) durchgeführt. Das Zellpellet wurde auf Trockeneis geliefert und das Protein von uns mit unterschiedlichen Puffern isoliert.

4.3.2.2.1 Puffertest: initiale Puffer

Eine erste Expression wurde in H5-Zellen (1 l-Kultur) mit separaten Viren für RAD51C und XRCC3 durchgeführt (20°C /27°C, 48 h Inkubation). Der Aufschluss des Pellet erfolgte mit den initialen, auch für die Aufreinigung der *E. coli*-Expressionen verwendeten Puffer (basierend auf Tris-HCL, pH 8,0) und dem Lysispuffer 3 (pH 8,0) (2.6.6). Nach Reinigung über eine Protino[®] Ni-IDA- Matrix konnte für beide Proteine eine Expression in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Das beste Ergebnis wurde ausgehend von der 20°C-Kultivierung erzielt (Abb. 59 A). Für eine analytische, größenchromatographische Auftrennung wurden die Eluate beider Ansätze zusammengefasst (20°C E1-E3/27°C E1-E2) und konzentriert (VIVASPIN2 10.000 MWCO PES). Die anschließende Analyse der Fraktionen A8 - A12 (Aggregatmaximum) und B9-7 und B3-1- C3 (Proteinmaximum) (Abb. 59 B) SDS-Gel (15 %) zeigte nach Coomassiefärbung, dass beide Proteine (RAD51C, XRCC3) hauptsächlich in aggregierter Form vorlagen (Abb. 59 C). Deshalb konnten sie nicht für weitere Experimente verwendet werden.

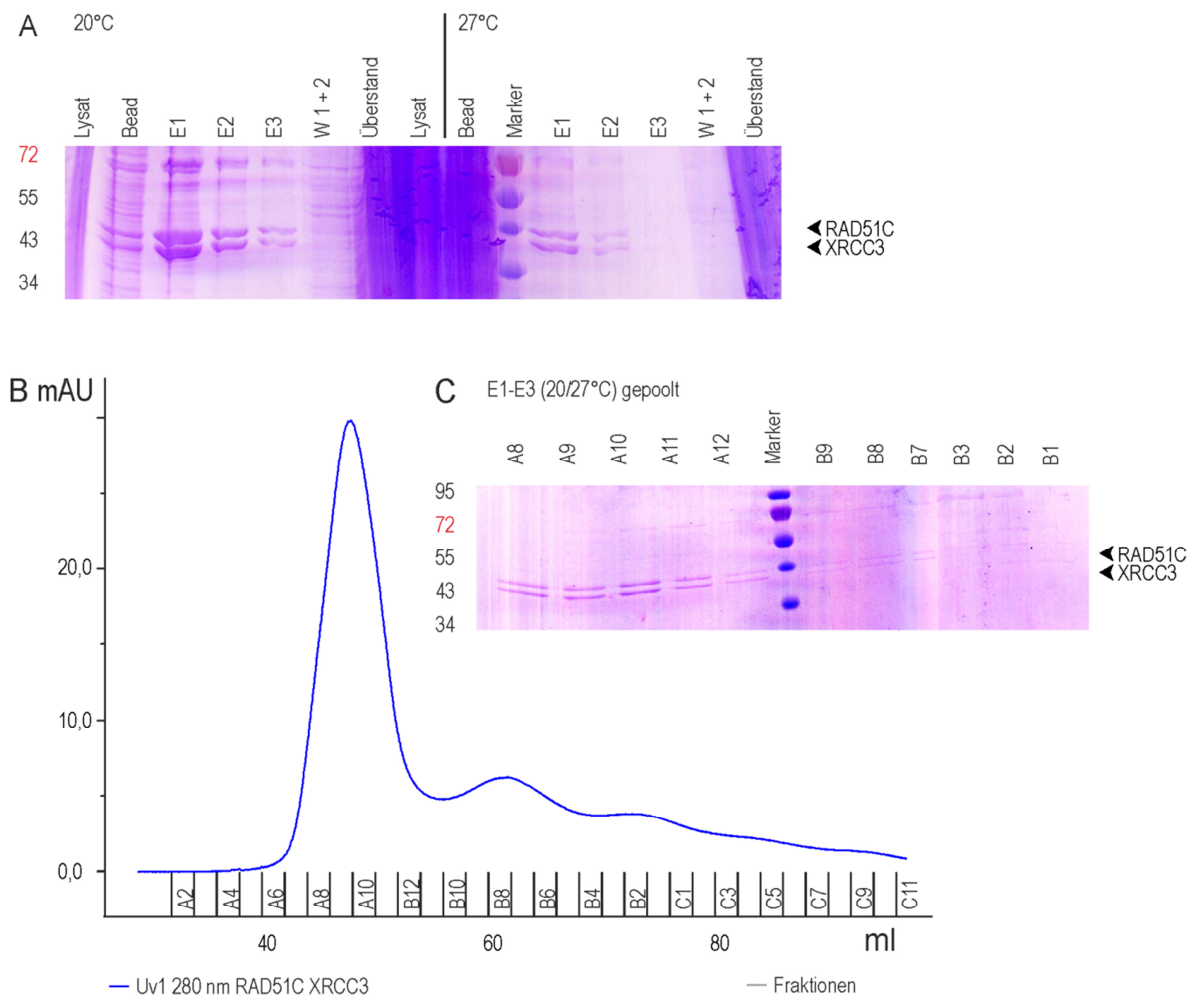


Abb. 59: Aufschluss der co-exprimierten Komplexproteine RAD51C (42 kDa)/XRCC3 (38 kDa) (separate Viren) aus H5- Kulturen (1 l, 48 h, 20/27°C, am HKI)

A: Coomassiefärbung SDS-Gel (15%). Aufgetragen sind die Proben vor und nach Reinigung (Protino® Ni-IDA-Bead-Matrix). Bei beiden Expressionen (20°C/27°C) liegen die Proteine in der löslichen Fraktion (Eluate E1-E3) vor. Ein geringer Anteil ist in den Waschfraktionen (W1+2) detektiert. Im Lysat, Überstand und den aufgetragenen Beads sind beide Proteine nicht detektiert. B: analytische, größenchromatographische Auftrennung der gepoolten Eluate aus beiden Isolationen (20°C E1-E3/27°C E1-E2). Es liegt nur sehr wenig Protein vor. C: Coomassiefärbung SDS-Gel (15%) der Fraktionen der größenchromatographischen Trennung. Die größte Proteinmenge liegt in aggregierter Form vor (A8 - A12: Aggregatpeak). Ein relativ geringer Anteil entfällt auf die Fraktionen B9-7 und B3-1 (Proteinpeak).

4.3.2.2 Puffertest: Phosphatpuffer

Für diesen Test wurde ein Pellet aus einer H5-Kultur (2 l, 20°C, 48 h) verwendet. Die Co-Expression von RAD51C und XRCC3 erfolgte über einen Virus, welcher ausgehend vom pFastBac™ Dual-Vektor generiert wurde. Hierbei stand das His-markierte RAD51C unter Kontrolle des PH-Promotors und XRCC3 unter der des p10-Promotors. Die Aufarbeitung wurde mit Phosphatpuffern (2.6.6) durchgeführt. Eine erste Analyse über 15 % SDS-Gele zeigte eine unsaubere Isolation mit geringem Anteil von RAD51C und XRCC3 (Abb. 60 B). Trotz der Verunreinigung wurde das Protein der ersten Elution (E1) größenchromatographisch gereinigt (ÄKTA Purifier 10). Da für eine Größenausschlusschromatographie kleine Volumina mit hoher Proteinkonzentration zur bestmöglichen Trennung führen, wurde das Volumen der Proteinlösung vor der Größenausschlusschromatographie mit Hilfe eines Konzentratorröhrchens VIVASPIN2

10.000 MWCO PES) von 1 ml auf 500 µl reduziert. Die höchste Absorption bei 280 nm wurde im Aggregatmaximum gemessen (E1) (Abb. 60 A). Dieser wurde gemeinsam mit den Fraktionen des Proteinmaximums mit Hilfe eines 15 % SDS-Gel analysiert. Die Auswertung zeigte, dass der Großteil der RAD51C und XRCC3 Proteine im Aggregatmaximum und nur ein geringer Anteil im Proteinmaximum, Fraktionen E11-F9 (Abb. 60 C), vorlag. Mit dieser geringen Ausbeute konnte nicht weiter gearbeitet werden.

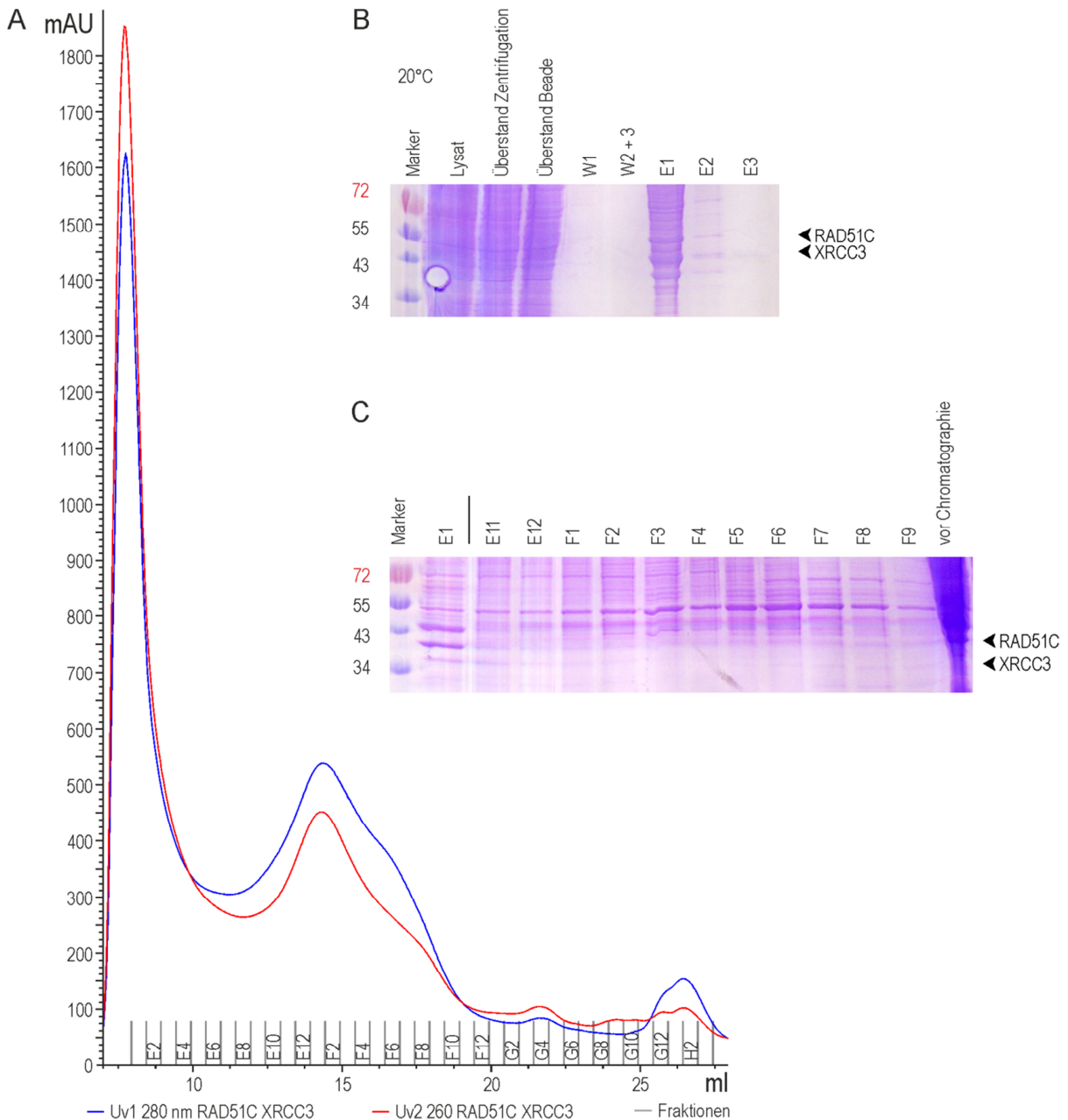


Abb. 60: Reinigung des co-exprimierten RAD51C (42 kDa)/XRCC3 (38 kDa) Komplexes aus H5- Kulturen (2 l, 48 h, 20°C, am HKI)

A: analytische, größenchromatographische Trennung des konzentrierten Eluats (E1, Abb. B). Im Proteinpeak (Fraktion E11-F9) liegen nur sehr geringe Mengen der Proteine RAD51C und XRCC3 vor, die größten Anteile befinden sich im Aggregatpeak (Fraktion E1).

B: Coomassiefärbung des 15% SDS-Gels. Aufgetragen sind die Proben vor und nach der Reinigung über eine Protino® Ni-IDA-Bead-Matrix. Im Eluat (E1) liegt viel, aber unsauberes RAD51C- und XRCC3-Protein vor. Die Elution 2 enthält nur wenige und die Waschfraktionen keine Proteine.

C: Coomassiefärbung des SDS-Gels der größenchromatographisch aufgetrennten Fraktionen. Das meiste Protein liegt in aggregierter Form vor (A8 - A12: Aggregatpeak) ein relativ geringer Anteil entfällt auf die Fraktionen E11 – F9 (Proteinpeak).

4.3.2.2.3 Puffertest: Variation nach Compton et al.

Für eine weitere Proteinisolation aus einer Sf21-Kultur (2 l, 20°C, 48 h) wurden Puffervariationen, basierend auf denen in Compton et al. 2010 beschriebenen, herangezogen (2.6.6). Der zusätzlich mit TCEP, Proteinaseinhibitor und DNase versetzte Puffer B wurde gleichzeitig als Lysis- und Waschpuffer verwendet. Die Infektion erfolgte mit Viren, welche sowohl die Sequenzen von RAD51C als auch von XRCC3 enthielten. Die Analyse der Aufreinigung via SDS-Gel (15 %) zeigte eine deutliche und relativ saubere Isolation der beiden co-exprimierten Proteine (Abb. 61 A). Die Analyse der größenchromatischen Auftrennung (ÄKTA Purifier 10) ergab eine deutliche Präsenz der beiden Proteine (RAD51C, XRCC3) in der Proteinfraktion (A12-B3). Ein geringer Anteil wurde auch im Aggregationspeak detektiert (A2-A3) (Abb. 61 A/B).

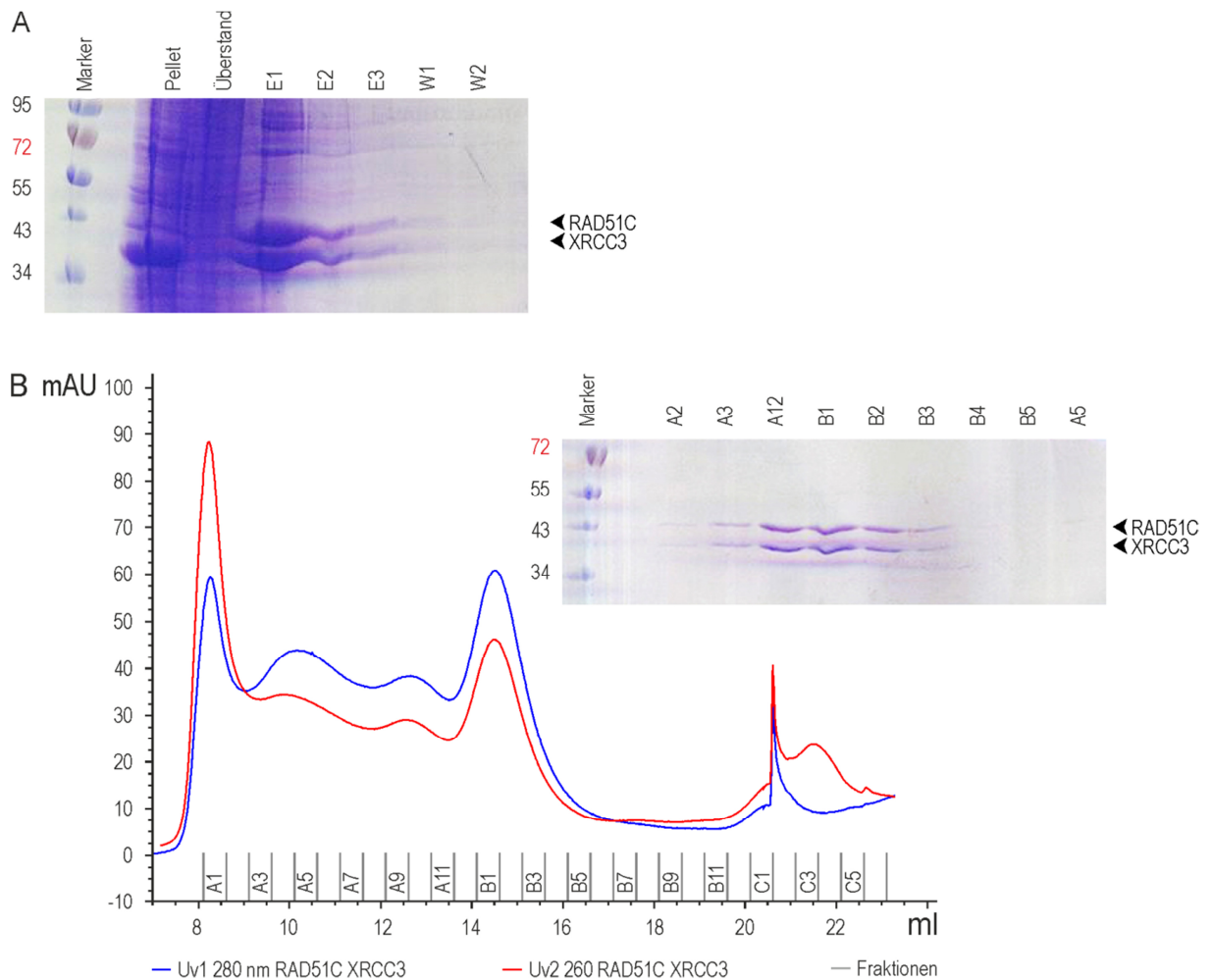


Abb. 61: Aufschluss des co-exprimierten RAD51C (42 kDa)/XRCC3 (38 kDa) Komplexes aus Sf21- Kulturen (2 l, 48 h, 20°C, am HKI)
 A: Coomassiefärbung eines 15% SDS-Gels. Aufgetragen sind die Proben vor (Pellet, Überstand) und nach der Reinigung über eine Protino® Ni-IDA-Bead-Matrix (E1-3, W1-2). Im Eluat (E1) kann deutlich ein hoher Anteil von RAD51 und XRCC3 nachgewiesen werden. Geringere Mengen sind in den Eluaten 2 und 3 (E2-3) detektiert. Die Waschfraktionen W1/W2 enthielten fast kein Protein. B: Graph der analytischen, größenchromatographischen Auftrennung des konzentrierten Eluats (E1) und Trennung der Fraktionen A2-3 (Aggregationspeak) und A12-B5 (Proteinpeak), sowie der Fraktion A5 über ein 15%-SDS-Gel (Coomassiefärbung). Beide Proteine liegen hauptsächlich im Proteinpeak vor.

Im Anschluss an die Trennung wurden die Fraktionen A12-B3 vereinigt und über einen VIVASPIN2 10.000 MWCO PES Zentrifugalkonzentrator; von 1 mg/ml auf 3,7 mg/ml konzentriert. Dieses Protein wurde erneut *via* ÄKTA Purifier 10 gereinigt. Die anschließende Analyse zeigte, dass beide Proteine (RAD51C, XRCC3) in allen aufgetragenen Fraktionen vorhanden waren. Ein Teil des Proteins lag weiterhin im Proteinmaximum vor (A12-B4), war aber auch im Aggregatmaximum (A1-A3) detektierbar (Abb. 62). Dies verdeutlicht erneut, dass das Protein bei erhöhter Konzentration zur Aggregatbildung neigt. Für weitere Analysen der Proteine bzw. weiterführende Versuche wurden diese mit den an Compton et al. 2010 (Compton et al. 2010) angelehnten Puffern gereinigt. Eine weitere Pufferoptimierung könnte die Protein-Ausbeute evtl. noch erhöhen.

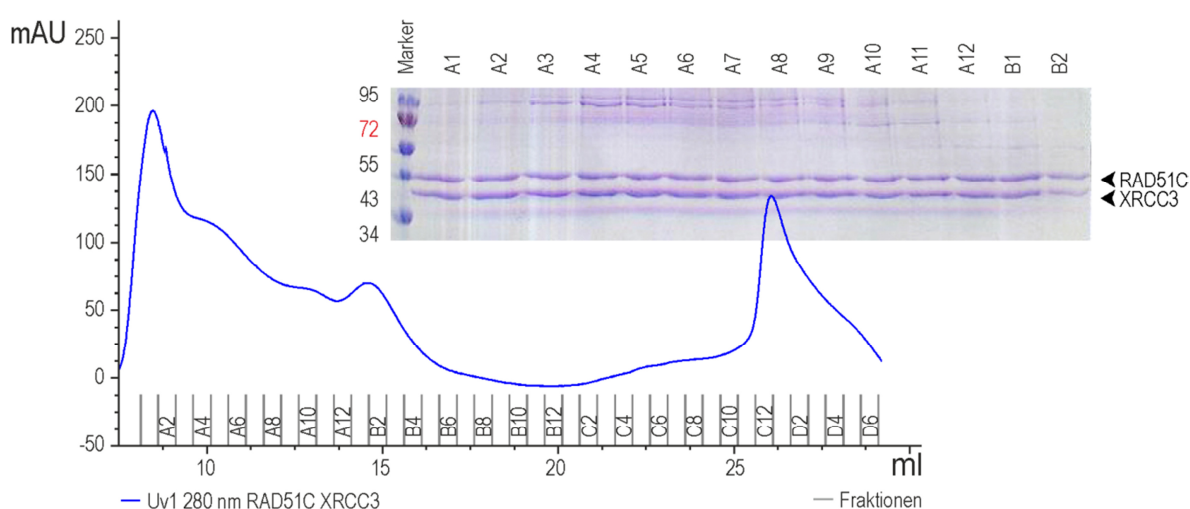


Abb. 62: Kurve der größenchromatographischen Auftrennung der konzentrierten Proteine inkl. einer 15%-SDS-Gelanalyse (Coomassiefärbung). Deutlich erkennbar, beide Proteine liegen in allen Fraktionen vor (Aggregatmaximum: A1-A3; Proteinmaximum: A12-B4, dazwischen: A4-A11).

4.3.3 Proteininstabilität im Thermal Shift Assay

Um die Pufferbedingungen für die Isolation und die Weiterverwendung des Proteins zu optimieren, wurde ein *Thermal Shift Assay* (3.5.5) durchgeführt. Hierbei wurde die Stabilität des Proteins in verschiedenen Puffern (2.7) gemessen. Die Schmelzkurven konnten in Verbindung mit dem Fluorophor Sypro®Orange detektiert werden (3.5.5). Eine Analyse der Schmelzkurven zeigte die höchste Stabilität der Proteinkomplexe in HEPES-Puffer (pH 7,0, 100 μ M) (Abb. 63). In diesem Puffer entfalteten sich die Proteine sehr spät. Das Optimum der Auffaltung lag bei ca. 65°C. Aus diesem Grund sollten in einer weiteren Reinigung auf HEPES basierende Puffer getestet werden. Auf Grund fehlenden Materials konnte dies jedoch nicht mehr erfolgen. Weiterhin scheinen Puffer auf Basis von Bis-Tris (pH 5,5) und CHES (pH 9,5) günstig für die Aufarbeitung der Proteine.

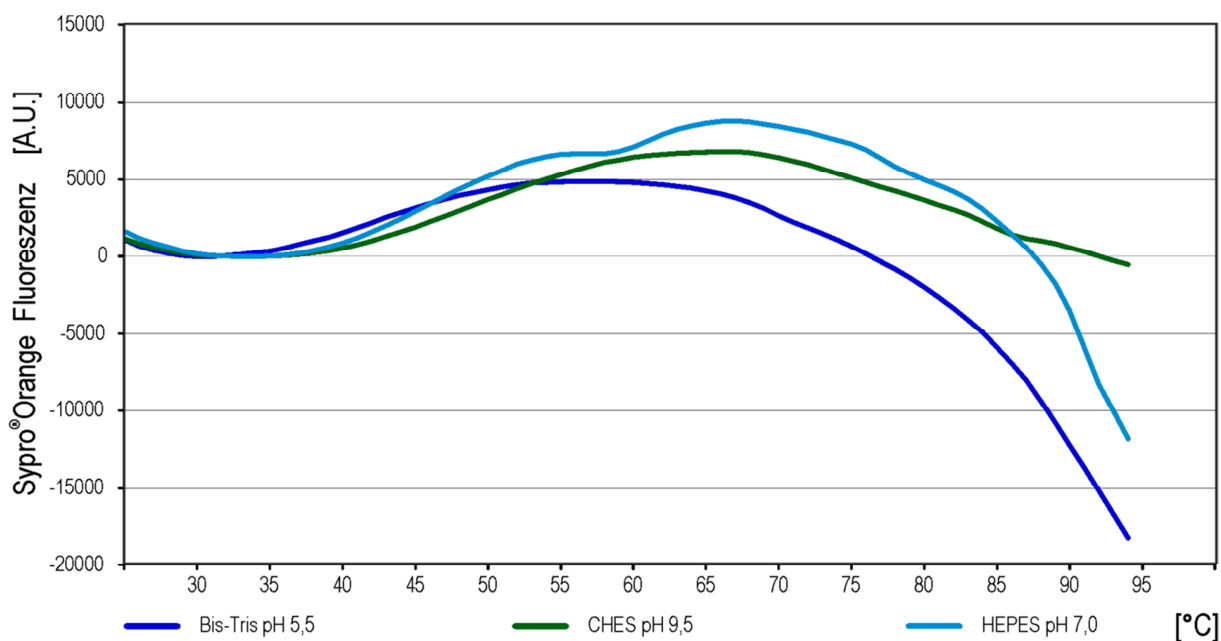


Abb. 63: Thermal Shift Assay

Die Schmelzkurvenbestimmung erfolgte in Verbindung mit dem Fluorophor Sypro® Orange. Die Proteine RAD51C und XRCC3 zeigten in diesem Assay die höchste Stabilität in 100 μ M HEPES-Puffer (pH 7,0). Ebenfalls eine relativ hohe Stabilität wurde in Bis-Tris (pH 5,5) und CHES (pH 9,5) beobachtet.

4.3.4 DNA-Interaktion via Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die Bindung von RAD51C und XRCC3 an verschiedene DNA-Strukturen (Einzelstrang, 3'-Überhang, 5'-Überhang, Open Fork) wurde mit dem EMSA-Assay (3.5.6) untersucht. Hierfür wurden im Vorfeld die entsprechenden DNA-Strukturen generiert (3.5.5). Die DNA-Doppelstrang-Strukturen bzw. der Einzelstrang wurden auf einem nativen 10 %-TBE-Gel überprüft ein beispielhaftes Ergebnis ist in Abb. 64 dargestellt.

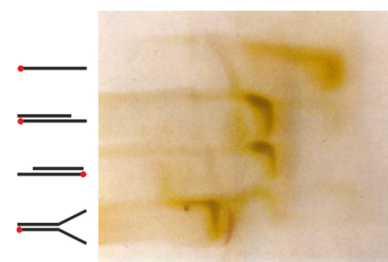


Abb. 64: Annealte DNA-Strukturen auf nativem 10% TBE-Gel nach Silberfärbung

Die verwendeten Proteine wurden mit den oben beschriebenen, nach Compton et al. 2010 optimierten Puffern isoliert und über den Äkta Purifier 10 gereinigt. Für die Interaktionsstudien wurden Proteine aus dem Proteinmaximum verwendet. Hierbei variierte die Menge des eingesetzten Proteins von 0,5 bis 4 μ M, die der verwendeten DNA-Strukturen betrug 100 nM. Die Gele wurden, nach der Auftrennung der Proben, über einen sehr sensitiven Cy3-Scan mit dem PharosFX-Scanner sowie über Silberfärbung analysiert.

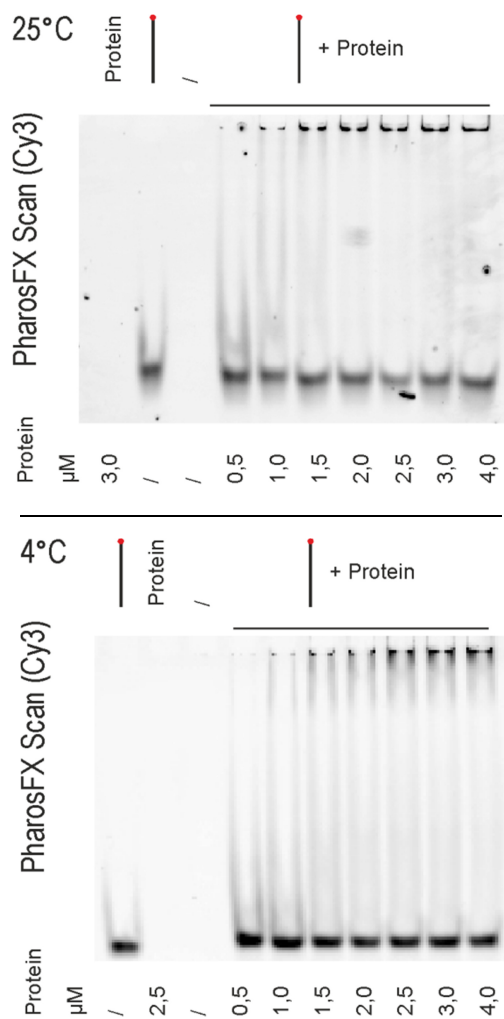


Abb. 65: Nachweis von C3-markierter DNA über einen sehr sensitiven Cy3-Scan (PharosFX Scan) der EMSAs mit Einzelstrang DNA (Detektion mit dem PharosFX-Scanner), Roter Punkt: Cy3-Markierung, Oben: Experiment bei 25°C, 30 min, natives 6% Tris-Glycin-Gel, Unten: Experiment bei 4°C, 30 min, natives 8% Tris-Glycin-Gel

Die Interaktionsstudien der Proteine mit Cy3-markierter Einzelstrang-DNA wurden sowohl bei 25°C (Abb. 65, oben) als auch bei 4°C (Abb. 65, unten) durchgeführt. Es zeigten sich keine deutlich abgegrenzten, nach oben verschobenen Banden. Allerdings wurde mit zunehmender Konzentration, ab 1 μM Protein, ein Anstieg der Cy3-markierten DNA in den Taschen detektiert (Abb. 65). Dieser Anstieg wurde sowohl im Experiment bei 25°C als auch bei 4°C beobachtet. Die Menge des nach oben verschobenen Proteins erreichte bei 25°C bereits bei einer Konzentration von 1,5 μM sein Maximum, während dies bei 4°C erst ab einer Proteinmenge von ca. 2,5 μM zutraf (Abb. 65). Im Vergleich zu der DNA-Kontrolle (Abb. 65, Spur 2) konnte, bei 25°C, in der Einzelstrang-DNA-Bande, ein leicht sinkender Anteil der Cy3-markierten DNA mit steigender Proteinkonzentration beobachtet werden. Bei 4°C konnte keine Abnahme beobachtet werden. Eine Silberfärbung der beiden Gele zeigte, dass die Proteine weder auf dem 8 % Tris-Glycin-Gel (4°C) noch auf dem 6 %-Tris-Glycin-Gel (25°C) sauber aufgetrennt wurden. Auf beiden Gelen war nur ein Proteinschmier zu erkennen (ohne Abbildung). Diese Beobachtung begründet die fehlende Detektion klarer, nach oben verschobener Banden, wie sie sowohl im CY3-Scan als auch in der Silberfärbung zu erwarten gewesen wären.

Eine weitere Interaktionsstudie wurde mit einem 3'-Überhang-DNA-Konstrukt bei 4°C für 30 min durchgeführt. Auch in diesem Experiment konnte mit steigender Proteinmenge ein Anstieg des gebundenen Konstruktes in den Taschen beobachtet werden. Der Cy3-markierte DNA-Anteil stieg ab einer Proteinkonzentration von 1 µM bis zu ihrem Maximum bei ca. 2,25 µM an. Gleichzeitig war eine Abnahme der Cy3-markierten DNA im Vergleich zur reinen DNA-Kontrolle (Abb. 66, Spur 2) zu beobachten. Dies spricht für eine Bindung von mindestens einem der Proteine (RAD51C, XRCC3) an 3'-Überhang-DNA. Das Maximum der gebundenen DNA wurde bei 2,25 µM Protein erreicht. In den Silberfärbungen (ohne Abbildung) war, ausgehend von den Taschen, ein Proteinschmier zu beobachten. Dieser weist auf eine sehr heterogene Trennung der Proteine hin.

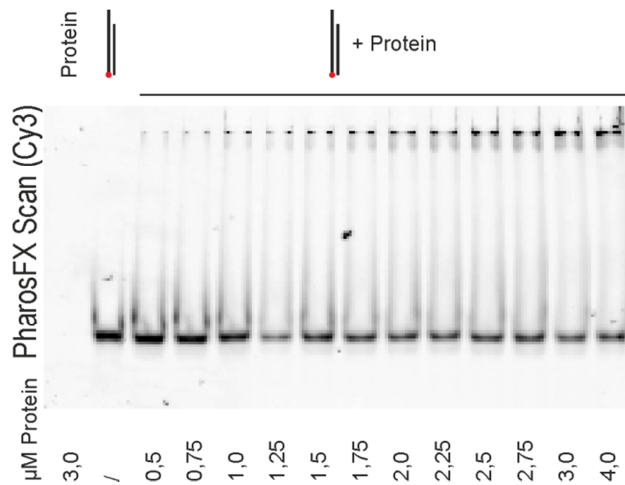


Abb. 66: EMSA mit 3'-Überhang-DNA-Konstrukt (30 min, 4°C, natives 8% Tris-Glycin-Gel)
Roter Punkt: Cy3-Markierung, Der sehr sensitive Cy3-Scan (mit PharosFX-Scanner) bildet die CY3-markierte DNA ab

Das Maximum der gebundenen DNA wurde bei 2,25 µM Protein erreicht. In den Silberfärbungen (ohne Abbildung) war, ausgehend von den Taschen, ein Proteinschmier zu beobachten. Dieser weist auf eine sehr heterogene Trennung der Proteine hin.

Des Weiteren wurden Interaktionen der Proteine mit Open Fork- und 5'-Überhang-Strukturen untersucht. Für beide DNA-Konstrukte konnten Interaktionen beobachtet werden. Die Abbildung 67 zeigt

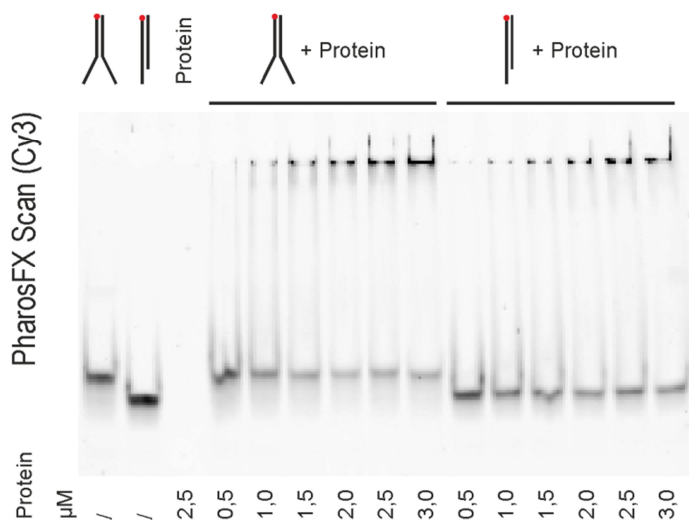


Abb. 67: EMSA Open Fork und 5'-Überhang-DNA-Konstrukt (30 min, 4°C, natives 8% Tris-Glycin-Gel)
Roter Punkt: Cy3-Markierung, Links: Der sehr sensitive Cy3-Scan (mit PharosFX-Scanner) bildet die CY3-markierte DNA ab

eine zunehmende Konzentration der Cy3-markierten DNA im Bereich der Gel-taschen, ab einer Proteinkonzentration von 1 µM Protein. Sie erreicht für beide Konstrukte ihr Maximum bei ca. 2,5 µM Protein. Die Abnahme der markierten DNA gegenüber den Kontrollen (Open-fork: Spur 1; 5'-Überhang: Spur 2) ist ebenso deutlich zu beobachten. Auch hier zeigte die Silberfärbung des Gels keine klaren Proteinbanden, sondern einen Proteinschmier, ausgehend von den Taschen (ohne Abbildung).

5 Diskussion

5.1 Mosaik bei Fanconi Anämie

Auch wenn Schäden im FA/BRCA Weg die Ursache für FA darstellen, so sind sie für manchen Patienten in gewisser Weise auch von Vorteil. Denn ebenso wie durch fehlerhafte DNA-Reparatur gehäuft Schäden im Genom entstehen, die zu Tumoren und Anämien führen, so steigert sich durch diese Reparaturfehler auch die Chance auf eine „natürliche Gentherapie“. Das Phänomen der Mosaikentstehung wurde bereits in zahlreichen Erkrankungen (*siehe 1.2.5*), sowohl in hämatopoetischen, als auch in anderen somatischen Zellen, beobachtet. Solche Reversionen treten viel häufiger auf als anfangs vermutet und wurden für FA sowie das Bloom Syndrom bereits 1977 beschrieben (German et al. 1977; Schroeder et al. 1977). Bedingt durch eine schnelle Zellproliferation und somit einem hohen Selektionsdruck im hämatopoetischen System entstehen im Blut häufiger Reversionen als in somatischen Zellen. Als Folge der für FA bisher nur im Blut beschriebenen Reversionen kann anfangs das Auftreten zweier verschiedener Zellpopulationen (Nicht-FA/FA) beobachtet werden, welche sich in Chromosomenbruchanalysen als sog. Bimodalität widerspiegeln (Auerbach 2009; Gross et al. 2002; Oostra et al. 2012). Der Wachstumsvorteil der revertierten Zellen kann im Laufe der Zeit zu einer immer stärkeren Normalisierung der Chromosomenbruchraten bzw. der G2-Phasearreste führen, so dass in beiden Analysen die Untergrenze des Detektionslevels erreicht wird und die Gefahr falsch negativer Ergebnisse besteht. Die möglichen Grundlagen für Reversionen bilden verschiedene Mechanismen wie Genkonversion, intragene Crossover beziehungsweise Rückmutationen und kompensatorische Mutationen (Insertion, Deletion, Missense-Mutationen) (Gross et al. 2002; Pasmooij et al. 2012; Youssoufian and Pyeritz 2002).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei bereits publizierten (Patient 1, 2) (Gross et al. 2002) und drei potentiellen, bisher noch nicht veröffentlichten Mosaikpatienten (Patient 3, 4, 5). Sie gehören den Untergruppen FA-A (Patient 1, 2, 3) und FA-D2 (Patient 4, 5) an, für die die höchsten Mosaikfrequenzen in FA beschrieben wurden (Schindler and Hoehn 2007). Dabei bleibt zu bedenken, dass die beobachtete, höhere Anzahl an Reversionen der Untergruppe FA-A vermutlich auch auf ihren großen Anteil (FA-A: 60-70 % (Alter and Kupfer 1993)) am Gesamtpatientenkollektiv zurückgeführt werden. Reversionen im hämatopoetischen System gehen mit einer besseren Prognose, sowie einem mildereren Krankheitsverlauf einher. Sie schließen eine hämatopoetische Manifestation der FA in Form von Knochenmarksversagen jedoch nicht aus (MacMillan et al. 2000), da weiterhin FA-Zellen im Blut vorhanden sind. Dies konnte auch bei einem, nicht in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, Patienten unseres Patientenkollektivs beobachtet werden. Zusätzlich ist zu bedenken, dass Mosaik in Abhängigkeit ihres Entstehungsorts auch wieder verloren gehen können (Gross et al. 2002). Das für die Erkrankung typische erhöhte Tumorrisiko bleibt im restlichen Gewebe weiterhin bestehen, deshalb ein engmaschiges Screening eingehalten werden.

Um die Entstehung und Entwicklung bzw. das Durchsetzen von Mosaiken sowie den vorliegenden Mosaikstatus in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden verschiedene Analysen angewandt. Neben der Beobachtung der Blutwerte über einen längeren Zeitraum erfolgte die Analyse von PHA-stimulierten peripheren Blutlymphozyten mittels Chromosomenbruch- (3.6.5) und zweiparametrische BrdU-Hoechst-Zellzyklusanalyse (3.6.1), mit welcher G2-Phase-Arreste untersucht wurden. Zusätzlich wurde die gDNA unterschiedlicher, MACS-sortierter Zelllinien (T-/B-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Fibroblasten, Knochenmarkfibroblasten) untersucht. Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Analysen in unterschiedlichen Stadien der Mosaikentwicklung, was einen Einblick in dessen Entstehung ermöglicht. In einem Kollektiv (n=67) der letzten drei Jahre, fanden wir, in nur einem Patienten und einer etablierten lymphoblastoide Linie, Reversionen. Die durchflusszytometrischen Analysen des Blutes weiterer Patienten weisen jedoch auf weitere Reversionen hin. Sie konnten aufgrund fehlenden Materials bzw. fehlender Patienteneinverständnisse nicht näher untersucht werden. Somit könnte auch in unserem Patientenkollektiv, die in der Literatur beschriebenen 10-30 % Reversion (Oostrá et al. 2012) vorliegen.

Fibroblasten in der Diagnostik

Wie einleitend unter 1.2.4 *Diagnostik* beschrieben, können stark durchgesetzte Reversionen im hämatopoetischen System zu falsch negativen Resultaten in Chromosomenbruch- und Zellzyklusarrestanalysen, mit Werten auf dem Level von Nicht-FA-Kontrollen, führen. Da für FA, anders als für andere Erkrankungen wie Ichthyosis mit Konfetti oder Epidermolysis Bullosa Simplex (Lai-Cheong et al. 2011), bisher keine Reversionen in Fibroblasten beschrieben wurden (Hoehn et al. 2007; Pinto et al. 2009), können diese bei grenzwertigen Diagnosen als patienteninterne Kontrolle herangezogen werden. Die gDNA-Sequenz der Fibroblasten spielte auch bei der Eingruppierung des Mosaikstatus in einzelnen Patienten eine wichtige Rolle. Aufgrund der beobachteten somatischen Reversionen in anderen Erkrankungen kann eine Reversion jedoch nicht zu 100 % Prozent ausgeschlossen werden. Geht man davon aus, dass die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von Reversionen in Zellpopulationen mit kurzer Generationszeit höher und das dort der Selektionsdruck (Yousoufian and Pyeritz 2002) größer ist, entstehen Reversionen häufiger im schnell proliferierenden hämatopoetischen System als in Fibroblasten. Unter der Voraussetzung, dass es in den Fibroblasten eines FA-Patienten zu einer Reversion kam, bestünde zusätzlich auf Grund ihrer Immobilität und somit der geringen Durchmischung mit dem umliegenden Gewebe eine relativ geringe Wahrscheinlichkeit genau diesen Bereich zu biopsieren. Aus diesem Grund können Mutationen und das Verhalten der Patientenfibroblasten, gegenüber quervernetzenden Substanzen wie MMC als „grundlegende Situation“ ohne Reversionen angenommen werden.

B-LCLs in der Diagnostik

In der Laborroutine werden zur Konservierung der Patientenzellen für weiterführende Versuche, wie z.B. Mutations- oder Komplementationsanalysen, immortalisierte B-LCL-Kulturen angelegt. In Versuchen, in denen diese Zelllinien verwendet werden, wurden in der Vergangenheit bereits öfters Reversionen beob-

bachtet. Diese führten zu einer Verringerung bzw. einer Aufhebung der MMC-Sensitivität, und somit des zellulären FA-Phänotyps. Ursächlich hierfür können *in vitro* Korrekturen einer der beiden Mutationen oder das Durchsetzen einer bereits *in vivo* revertierten Zellpopulation sein. So wurden in einem Patientenkollektiv (n=53) in neun etablierten lymphoblastoiden Zelllinien Reversionen beobachtet. Dies liegt knapp unter den in der Literatur beschriebenen 20-30 % (Hoehn et al. 2007). In diesen etablierten Linien vermuten wir, verglichen zum Patientenblut, einen ca. dreifach erhöhten Reversionsgrad. Aus diesem Grund sollte bei, auf B-LCL basierenden Versuchen, welche grenzwertige Ergebnisse aufweisen, ebenfalls auf Fibroblasten zurückgegriffen werden.

Beeinflussung der gDNA-Analysen durch falsch positive Selektion

Um auf Sequenzebene der verschiedenen Zelllinien keine falsch negativen bzw. positiven Schlüsse zu ziehen, erfolgte eine durchflusszytometrische Reinheitsprüfung der MACS-Separationen (3.6.3). Hierbei wurden deutliche Reinheitsunterschiede beobachtet. Die höchsten Reinheitsgrade konnten für die Isolationen der Granulozyten (bis zu 99,5 % (Patient 2) und die niedrigsten für die der Monozyten (91,2 - 37,6 % (Patient 1, 2) erzielt werden. Zur Erklärung des teilweise sehr hohen Granulozytenanteils (Patient 2: 57,2 %) in den Monozytenisolationen können zwei Gründe heran gezogen werden. Zum einen führt das zusätzliche, von Person zu Person variierende Vorhandensein des Endotoxinrezeptors CD14⁺ auf neutrophilen Granulozyten natürlicherweise zu geringen Anteilen dieser Population in den Monozytenisolaten. Stellt man der Expression des CD14⁺-Rezeptors auf den Granulozyten (3.300 +/-800) seine Expressionsraten auf den Monozyten gegenüber (115.400 +/-10.600), erklärt sich hieraus die Verunreinigung, allerdings nur marginal. Außerdem konnte eine weitere Korrelation der erhöhten Granulozytenraten in diesen Separationen im Zusammenhang mit der Transportdauer und den Transportbedingungen beobachtet werden. Sie beruht vermutlich auf der Fragilität der Granulozyten, welche nicht zuletzt auf ihre Größe zurückzuführen ist. Durch die Schädigung der Zellen, tritt DNA durch die Zellmembran und führt zu unspezifischen Bindungen, der für die Isolation verwendeten Antikörper. Besonders ausgeprägt konnte dieses Phänomen im Vergleich der Blutlinienisolationen von Patient 1 (sofortige Sortierung nach Blutentnahme, RT) und Patient 2 (Versand per Post, im Hochsommer) beobachtet werden (Tab. 6). Die, vom Hersteller angeratene, sofortige Separation der Zellen nach der Blutdonation konnte auf Grund der Verfügbarkeit der Patienten nicht immer eingehalten werden. Sie ist aber in Anbetracht unserer Ergebnisse sehr zu empfehlen. Diese Verunreinigungen der Isolationen sind unbedingt in der Einschätzung des Mosaikstatus zu berücksichtigen. Ein vermehrtes Auftreten der ersten Zellfraktion in der zweiten Isolation des zweistufigen Separationsprozesses (3.6.2) wurde nicht beobachtet und ist deshalb vernachlässigbar. Eine Schädigung der Granulozyten könnte auch durch das Verwenden zu dünner Kanülen für die Blutentnahme entstanden sein, dies konnte im Nachhinein jedoch nicht überprüft werden. Eine weitere, zellschonendere Möglichkeit der Zellseparation wäre die Verwendung eines Zellsorters. Bei dieser durchflusszytometrischen Analyse werden die Zellen aufgrund ihrer Größe und Granularität sortiert, so dass die

Behandlung mit Antikörpern entfällt. Aus Kostengründen und da die Antikörper keinen Einfluss auf die DNA-Isolation und die anschließende Weiterverarbeitung haben, wurde in unseren Versuchen auf das MACS-System zurückgegriffen. Dies bietet zudem den Vorteil, dass die Isolationen, wenn das mögliche Equipment vorhanden ist, direkt vor Ort durchgeführt werden können

Mosaikstatusbestimmung in Zelllinien mittels DNA-Mischungskurve

Die Bewertung des Mosaikstatus in T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten erfolgte anhand von DNA-Mischungskurven. Diese wurden durch Sangersequenzierungen von gDNA in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (mutiert vs. wildtyp) erstellt (4.1.3.1). Die Beobachtung der Abnahmen bzw. Zunahmen wildtypischer und mutationsbedingter Peakanteile am Gesamtpeak zeigte, dass ein direktes Ablesen der Reversion aus dem Elektropherogramm nicht, wie angenommen, zu einer Reversionsgeraden führt, sondern eher zu einer Kurve (Abb. 15). So steht zum Beispiel in der allgemeinen Mischungskurve dem theoretisch vermuteten Allelverhältnis von 25 % mut zu 75 % wt ein tatsächliches Verhältnis von 6 % mut zu 94 % wt nach detektiertem Flächeninhalt gegenüber. Aus diesem Grunde wurden Überlegungen, die reellen Reversionsgrade im Blut der Patienten auf die Peakhöhen der Fibroblastensequenzen bzw. auf ihren theoretischen Anteil von 50 % zu beziehen, verworfen und zur Abschätzung der Reversion die erstellten gDNA-Mischungskurven (Abb. 15 für Patienten 1, 3, 4, 5 bzw. Abb. 25 für Patient 2) herangezogen. Die Anwendbarkeit der allgemeinen Kurve („Reversion“ von G>A) wurde anhand der Sequenzierung von Fibroblasten-gDNA überprüft. Sie kam nur zum Einsatz, wenn der Flächeninhalt der Fibroblastensequenz des wildtypischen Peaks dem des mutierten Peaks entsprach und somit beide anteilig 50 % des Gesamtpeaks betragen. Dies traf für vier der fünf untersuchten Patienten (Patient 1, 3, 4, 5) zu.

Obwohl in der DNA heterozygoter Patienten theoretisch gleiche Anteile wildtypischen als auch mutierten Allels vorliegen, entsprechen methodenbedingt beide Peaks der DNA-Sequenz nicht immer 50 % des Gesamtpeaks. Zum einen kann es, bedingt durch die Primer, in PCR-Reaktionen zu einer Verschiebung der DNA-Verhältnisse kommen. Dies ist durch die Verwendung anderer Primerpaarungen teilweise kompensierbar. Einen weiteren Einfluss auf die Sequenzhöhen übt die unterschiedliche Stabilität der für die Sequenzierung verwendeten Fluorochrome aus. Da das empfindlichere Rot emittierende Fluorophor (ddTTP-gekoppelt) schneller abgebaut wird als das Blau emittierende (ddCTP-gekoppelt), nimmt der rote Peak schneller ab. Besonders stark zeigte sich der Effekt unterschiedlicher Sequenzhöhen bei Patient 2. Deshalb wurde für ihn eine eigene Mischungskurve erstellt. Hierbei war zu beobachten, dass der Mutationspeak (rot) sehr schnell abnahm und nur bis zu einem Anteil von ca. 70 % Reversion in der gDNA zu detektieren war. Aus diesem Grund sind die Reversionen für diesen Patienten nur grob abschätzbar. Sie liegen aber vermutlich höher, als bei den anderen Patienten. Geht man von einer Reversion von ca. 15 % in den Lymphozyten aus, so scheint das Mosaik im hämatopoetischen System des Patienten, bezogen auf das untersuchte restliche Patientenkollektiv, am stärksten durchgesetzt zu sein.

Reversionen im Patientenblut

Zur Untersuchung der Reversionen in den einzelnen Zelllinien - Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten sowie B- und T-Lymphozyten, wurden verschiedene Methoden herangezogen. Einen ersten Eindruck über mögliche Reversionen bzw. Reversionslevel im Patientenblut konnte durch die Beobachtung der Blutwerte gewonnen werden. Diese erfolgte, je nach Patient, über unterschiedliche Zeiträume (Patient 1: 17 Jahre; Patient 2: 13 Jahre, Patient 3: 15 Jahre, Patient 4: einmalig, Patient 5: 3,5 Jahre). Eine Abschätzung des Mosaikstatus in T-Lymphozyten konnte über Chromosomenbruchanalysen und die Bestimmung von G2-Phasearresten erzielt werden. Detailliertere Einblicke in die Durchsetzung revertierter Zellen der einzelnen Linien wurden auf Basis von Sanger-Sequenzierungen genomischer DNA erlangt.

Erkenntnisse aus Blutwertbeobachtungen:

Wie kennzeichnend für Mosaikpatienten beschrieben (Soulier et al. 2005) 86, zeigte sich für drei der fünf Patienten (1, 2, 5) eine Verbesserung der Blutwerte im Beobachtungszeitraum. Allen gemein war jedoch das fehlende Ansteigen der Lymphozytenzahlen. Diese befanden sich bei Patient 1 und 2 an der Untergrenze des Normbereichs und bei Patient 5 im unteren Normbereich. Therapiebedingt verbesserten sich die Blutwerte der Patienten 1 und 5 innerhalb kurzer Zeit. Bei Patient 1 (Oxymetholongabe im Alter von 5,5 bis 8 Jahren) war ein Anstieg von Hämoglobin sowie der Granulo- und Thrombozyten mit 5,5 Jahren und der Monozyten mit 6 Jahren zu beobachten. Patient 5 (Danazol ab 10,5 Jahre) zeigte eine Erhöhung der Mono-/Granulo-/Thrombozytenzahlen mit 10,7 Jahren und von Hämoglobin mit 11 Jahren. Die Anstiege der Thrombozytenzahl und des Hämoglobins, unter Danazoleinfluss, lagen im Rahmen der zuvor in Scheckenbach et al. 2012 beschriebenen. Das zwischenzeitliche kurze Absinken der Thrombozytenwerte während der Danazolgabe bei Patient 5, fiel mit einem starken grippalen Infekt zusammen. Die verringerte Anzahl lässt sich daher vermutlich auf die Antibiotikatherapie zurückführen. Die Stabilisierung bzw. der Anstieg der Hämoglobin- und Thrombozytenwerte des Patienten 1 nach Beginn der Oxymetholontherapie steht mit bisherigen Beobachtungen ebenso im Einklang, wie seine nur geringe Wirkung auf Leukozyten (Hast et al. 1978). Während die vermehrte Ausschüttung von Erythrozyten auf die therapiebedingte, erhöhte Erythropoetinmenge zurückzuführen ist, kommt es vermutlich durch die *in vivo* Wirkung von Oxymetholon auf Stammzellen nicht nur zu einem Anstieg der Thrombozyten (Hast et al. 1978), sondern auch zu der beobachteten Mono- und Granulozytenerhöhung. Nach Abschluss der Therapie, konnte für Patient 1, wie auch zuvor schon für andere (Hast et al. 1978), ein Sinken bzw. ein sich Einpendeln der einzelnen Werte beobachtet werden. Mit Ausnahme der Thrombozyten blieben alle weiteren beobachteten Werte, auf Normalniveau. Hierbei siedeln sich die Lymphozytenzahlen an der unteren Grenze des Normalbereiches an. Dies lässt unterschiedlich starke Reversionen in den Zelllinien vermuten, welche am stärksten in Mono-, Granulozyten und Erythrozyten, weniger stark in den Lymphozyten und am schwächsten in den Thrombozyten ausgeprägt zu sein scheint. In wie weit eine Androgentherapie die Entstehung des Mosaikes beeinflusst, kann nicht abgeschätzt werden. Jedoch könnten möglicherweise die

therapiebedingten erhöhten Proliferationsraten leicht positiv auf ein bereits vorhandenes Mosaik wirken. Um dies zu beurteilen, wäre eine Langzeitstudie mit einem größeren Patientenkollektiv notwendig. Für Patient 2 konnte, ohne Therapie, mit Ausnahme der Leukozyten, für alle zusammengestellten Blutwerte ein Anstieg beobachtet werden. Der Anstieg der Thrombozyten lässt auf einen relativ hohen Reversionsstatus auch in dieser Zelllinie schließen. Zu einer Entwicklung der Blutwerte von Patient 4 kann aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraums (2,5 Monate), keine Aussage getroffen werden. Sie lagen im alterstypischen Normbereich. Für Patient 3 wurde ein minimaler Anstieg der Blutwerte für Monozyten, Thrombozyten und Hämoglobin beobachtet. Die Anzahl der Granulo- und Leukozyten befanden sich jedoch weiterhin an der Untergrenze des Normbereiches. Während die grenzwertigen Leukozytenzahlen den Beobachtungen in anderen Patienten entsprachen, stehen das niedrige Level der Granulozyten und die steigenden Thrombozytenzahlen im Kontrast zu denen, der anderen, in dieser Studie untersuchten Patienten. Die Entwicklung seiner Blutwerte scheint somit nicht denen von Mosaikpatienten zu entsprechen.

Beobachtungen auf Zell- und DNA-Ebene:

Eine Analyse der Chromosomenbrüche PHA-stimulierter, MMC-behandelter Blutzellkulturen des Patienten 1 zeigte, wider Erwarten, keine mosaikpatiententypische bimodale Verteilung. Des Weiteren wurden keine typischen FA-Metaphasen mit mehr als zehn Brüchen detektiert. Dies und auch das Fehlen von 7-9 Bruchereignissen pro Metaphase spricht für einen sehr hohen Reversiongrad in den T-Lymphozyten des Patienten. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung eines hohen Metaphasenanteils mit 0-3 Brüchen (93 % der Metaphasen). Der sich abzeichnende hohe Grad an Reversion in dieser Zellpopulation wurde von den Ergebnissen der G2-Phase-Arrestanalysen unterstützt. Einem Anteil von 20-35 % revertierter Zellen, welche anhand der Blutmischungskurve (ohne MMC) vermutet wurde, stand auf gDNA-Ebene der frisch isolierten T-Lymphozyten im Blut ein Anteil von 14 % gegenüber. Dieser prozentuale Unterschied basiert vermutlich auf dem Proliferationsvorteil der Nicht-FA-Zellen gegenüber von FA-Zellen in Zellkulturen (Noll et al. 2001). Verdeutlicht wird dieser Vorteil revertierter gegenüber nicht-revertierter Zellen nach einer Behandlung mit der doppelstrangquervernetzenden Substanz MMC. Die durch die Behandlung entstehenden Schäden können aufgrund mangelnder DNA-Reparatur in FA-Zellen nicht oder mangelhaft repariert werden. Dies führt zu einem G2-Phase-Arrest der betroffenen Zellen und somit zur selektiven Wirkung von MMC. Anhand der DNA-Mischungskurven zeichnete sich in den T-Lymphozyten eine mögliche Reversion der Mutation (c.971 T>G *FANCA*) von 35-45 % ab. Für die weiteren isolierten Zelllinien wurde auf gDNA-Ebene eine vermutlich komplette Reversion detektiert (siehe Abb. 19). Ebenso konnte, bisher einmalig, eine vollständige Reversion in einer Knochenmarkfibroblastenlinie des Patienten beobachtet werden.

Patient 2 zeigt in G2-Phasearrestanalysen der T-Lymphozyten den höchsten beobachteten Reversionsgrad aller Patienten. Diese hohen Reversionen lassen auf ein sehr starkes Durchsetzen der revertierten, wildtypischen gegenüber den nicht-revertierten Zellen schließen. Auch hier wird der selektive Effekt von MMC

deutlich (spontane Arreste: 50-60 % Reversion/induzierte Arreste: 90-95 % Reversion). Aufgrund des, im Vergleich zum wt-Peak, schnell zurückgehenden Mutationspeaks (siehe: Mosaikstatusbestimmung in Zelllinien mittels DNA-Mischungskurve) können auf gDNA-Ebene über die Reversionsgrade in T-Lymphozyten, sowie allen anderen untersuchten peripheren Blutzelllinien nur grobe Abschätzungen erfolgen. Die im Vergleich zu anderen Patienten am stärksten ausgeprägte Reversion der Mutation c.856 C>T (*FANCA*) in den T-Lymphozyten, lässt einen sehr hohen Reversionsgrad in B-Lympho-, Mono- und Granulozyten vermuten. Möglicherweise könnte die Mutation in diesen Zellen komplett eliminiert worden sein. (Abb. 24). Die Verunreinigung der Monozytenseparation durch Granulozyten spielt bei der Einordnung des Mosaikstatus keine Rolle, da für beide Linien der Reversionsgrad unterhalb der Detektionsschwelle liegt.

Die Ergebnisse der Chromosomenbruchanalysen (100 ng/ml MMC) für Patient 4 lassen durch ihre Bimodalität auf einen Mosaikstatus in den T-Lymphozyten schließen. Der relativ geringe Anteil typischer FA-Metaphasen (14 % 9 bis ≥ 10 Brüche) lässt einen hohen Reversionsgrad vermuten. Vergleicht man jedoch diese Bruchraten mit denen der bei 50 ng/ml MMC kultivierten Zellen, so fällt eine nur langsam ansteigende MMC-Sensibilität und ein nur leicht erhöhter Anteil von typischen FA-Metaphasen auf. Außerdem zeigten die Zellen FA-typische G2-Phasearreste sowohl in spontanen, als auch in MMC-induzierten Untersuchungen, welche auf Basis der Blutmischungsreihen bei 22-42 % (spontan) bzw. 10-50 % (induziert) Reversion eingeordnet werden können. Dies deutet auf eine relativ geringe Reversion hin. Unterstrichen wird diese Beobachtung zusätzlich durch gDNA-Analysen der T-Lymphozyten, die keinen Rückgang der Mutation zeigten. Im Vollblut wurde auf gDNA-Ebene eine relativ geringe Reversion der Mutation c.3467-2 A>G (*FANCD2*) detektiert, welche auf den Rückgang der Mutation in B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zurückzuführen ist (Abb. 36).

Auch für den Patienten 5 (*FANCD2*) wurde in Chromosomenbruchanalysen (100 ng/ml MMC) eine mosaiktypische, bimodale Verteilung (14 % 0 Brüche, 46 % 1-6 Brüche, 40 % 8- ≥ 10 Brüche) der Bruchraten beobachtet. Der Anteil an detektierten FA-typischen Metaphasen lag höher als bei Patient 4. Die G2-Phasearreste hingegen zeigten Werte im Bereich normaler FA-Patienten. Die Analyse der gDNA von T-Lymphozyten stand im Einklang mit beiden Analysen. Relativ geringe Reversionen der Mutation c.3707 G>A wurden in allen weiteren Zelllinien beobachtet (Abb. 41). Wobei bei der Einstufung des Reversionsgrades in Monozyten der relative hohe Anteil von Granulozyten zu bedenken ist. Durch die stärkere Reversion in den Granulozyten kommt es in dem Fall zu einer unnatürlichen Steigerung des Reversionslevels.

Die Ergebnisse der Analysen von Patienten 3 standen im Kontrast zu den Ergebnissen der anderen Patienten. In Bruchanalysen konnte keine bimodale Verteilung beobachtet werden. Metaphasen ohne Chromosomenbrüche, die charakteristischerweise auch in Mosaikpatienten auftreten (Hoehn et al. 2007), konnten nicht detektiert werden. Die für FA typischen hohen Bruchraten (≥ 10 Brüche) lagen in 52 % der Metaphasen vor. Die restlichen 48 % verteilten sich auf 2-9 Brüche pro Metaphase. Durchflusszytometrische

Analysen weisen, bezogen auf spontane G2-Phasearreste, auf eine Reversion von 10 % und nach MMC-Behandlung einen Anteil von 10-50 % Nicht-FA-Zellen hin. Eine Analyse auf gDNA-Basis zeigte jedoch für keine der Zelllinien eine Korrektur der Mutationen. Auffällig bei diesem Patienten waren zusätzlich die stabilen bzw. sich leicht bessernden Blutwerte von Mono-, Thrombozyten und Hämoglobin, während die Zahlen der Granulozyten auf einem gleichbleibenden, grenzwertigen Niveau stagnierten und die Lymphozyten leicht abfielen. Diese Beobachtungen und auch das Fehlen einer Reversion in der B-LCL-Kultur sprechen gegen eine Mosaikbildung im Blut des Patienten.

Welche Zellreihen revertierten?

Auf gDNA-Ebene zeigt ein Vergleich der prozentualen Reversionen in den einzelnen Zelllinien für alle untersuchten und als Mosaik bestätigten Patienten (1, 2, 4, 5), eine einheitliche Tendenz. Die schwächsten Reversionsgrade fanden wir in den T-Lymphozyten. Sie liegen zwischen 0 % (Patient 4) und >15 % (Patient 2). Die höchsten Reversionslevel finden wir bei den Patienten 1 und 2 in Granulo-, Mono- und B-Lymphozyten. Hierbei scheint sich in beiden Patienten die Reversion vollständig durchgesetzt zu haben. Untersuchungen der Patienten 4 und 5 zeigen, dass sich Reversionen zuerst in Granulozyten und anschließend in Mono- und B-Lymphozyten durchsetzen bevor sie schließlich in den T-Lymphozyten detektierbar sind. Dies steht auch im Einklang mit den beobachteten Blutwerten des Patienten 2, die ohne therapeutische Gabe von Androgenen anstiegen. Bedenkt man die beobachteten Reversionen in allen Blutzelllinien, liegt auch bei den hier untersuchten Patienten eine Korrektur in einer gemeinsamen pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle nahe. Reversionen in der frühen Phase der Blutbildung und somit die Reversion in verschiedenen Blutzelllinien wurden zuvor auch schon für andere Patienten vermutet (Gregory et al. 2001; Gross et al. 2002).

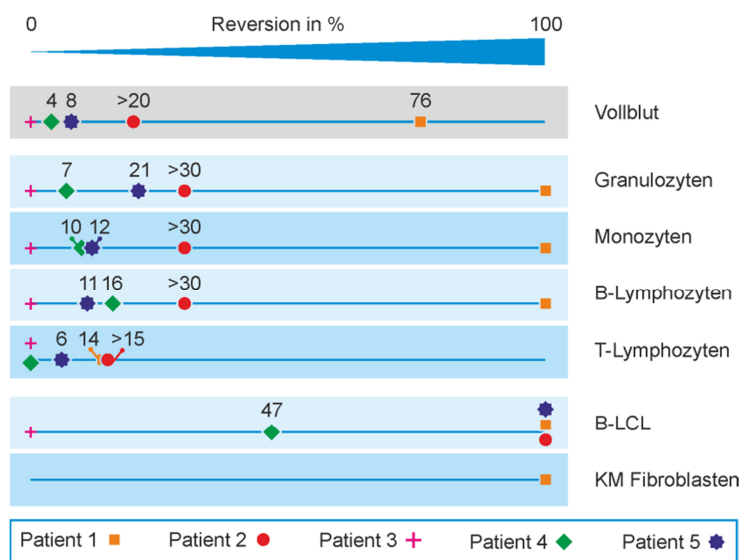


Abb. 68: Übersicht der Reversionen in den einzelnen Patientenzelllinien und im Vollblut auf gDNA-Basis. Die Einstufung erfolgte anhand der Mischungskurven.

Das versetzte in Erscheinung treten der Reversion in den unterschiedlichen Blutzelllinien, steht vermutlich im Zusammenhang mit der Lebensdauer der einzelnen Zelllinien. In Zelllinien mit geringerer Lebenspanne (B-Lymphozyten:-Tage bis Wochen (Fulcher and Basten 1997), Mono-, Granulozyten: Tage (Whitelaw 1966; Yousefi and Simon 2002)) setzen sich die Reversionen schneller durch, da die FA-Zellen dort frühzeitiger abgebaut werden. In den T-Lymphozyten, welche bis zu Jahren im Blut überleben

(Tough and Sprent 1995), wird die Mutation in gewisser Weise konserviert. Deshalb könnte in dieser Linie ein kompletter Rückgang der MMC-sensitiven Population selten zu beobachten sein (Hoehn et al. 2007). Die im Vergleich zu Granulozyten stärkere Reversion der Mono- und B-Lymphozytenlinien des Patienten 4, die gegen eine lebenszeitbedingten Erklärung der Reversionsgrade sprechen würde, lässt sich vermutlich durch das Vorliegen eines viralen Infekts erklären. Die in diesem Falle stärkere Bildung von B-Lymphozyten und Monozyten würde zu einer Proliferationssteigerung der Zelllinien und somit zu einer vorgetäuschten schnelleren Selektion hin zu Nicht-FA-Zellen führen. Da zusätzlich nichts über die Reinheiten der Zelltypisolationen bekannt ist (die Isolation wurde nicht von uns durchgeführt), kann es, bedingt durch die Fremdpopulationen, zusätzlich zu Abweichungen zwischen der detektierten und der tatsächlichen *in vivo* Situation im Blut des Patienten kommen. Außerdem ist zu beachten, dass es sich bei allen Analysen nur um Momentaufnahmen handelt. Aus diesem Grund kann es durch verschiedene Einflüsse, wie zum Beispiel bakterielle oder virale Infekte oder eine Medikamenteneinnahme zu einer Verschiebung im Blutbild kommen. Anders als erwartet, konnte bei Patient 1 zusätzlich eine Reversion in Knochenmarkfibroblasten festgestellt werden. Diese Teilpopulation der Knochenmarkstromazellen (50-70 %) reguliert die Hämatopoese durch Sekretion von Botenstoffen wie Scf (Ding et al. 2012) oder direkte Zellinteraktion mit den hämatopoetischen Zellen (Rougier et al. 1996). Wie genau der Lebenszyklus der Knochenmarkfibroblasten mit dem der hämatopoetischen Linien in Verbindung steht, kann in diesem Zusammenhang nicht erklärt werden. Bisher ging man von getrennten Entwicklungen dieser Zelllinien aus. Da in den Fibroblasten jedoch die Korrektur an derselben Position stattfand, könnte eine gemeinsame Vorläuferzelle auch hier eine Erklärung bieten. Als weitere Möglichkeit kann jedoch eine mögliche *in vitro* Reversion in der Knochenmarkfibroblasten-Zellkultur nicht ausgeschlossen werden.

Welche Mutationen revertieren?

Die von uns untersuchten Patienten, in deren Blutzellen Reversionen beobachtet wurden, gehören den Untergruppen FA-A und -D2 an, für welche diese Ereignisse bisher am häufigsten dokumentiert wurden (Hoehn et al. 2007). Weitere Reversionen sind für die Untergruppen FA-C, -D1, -L und -N beschrieben (Gross et al. 2002; Hoehn et al. 2007). Allen vier Patienten gemein war die Art der Reversion. Die Sequenzanalyse der beiden FANCD2-Patienten zeigte, ebenso wie die der beiden bereits in Gross et al. 2002 beschriebenen FA-A-Patienten (Patient 1 und 2), eine Reversion hin zur ursprünglichen Base. Diese Art der Reversion wurde bisher auch in weiteren FA-Patienten beobachtet (Gross et al. 2002; Hoehn et al. 2007). Ob es sich hierbei um Rückmutationen oder möglicherweise um Rekombinationen handelt, kann anhand der Sangersequenzierungen nicht beurteilt werden.

Eine Analyse der Umgebung aller Mutationen (+/- 25 bp) ergab das Vorhandensein von Mutationsmotiven in unmittelbarer Nähe der Basenpaarsubstitutionen (Patient 1, 2, 4, 5) bzw. der Deletion (Patient 3). Drei der vier *FANCA*-Mutationen der beiden Patienten 1 und 2 lagen in den Exons 10 und 11, einer als hochgradig mutabel bekannten Region mit zahlreichen, repetitiven Sequenzen. (Gross et al. 2002). Aber

nicht nur im Bereich dieser beiden Exons, sondern auch in unmittelbarer Nähe der anderen Mutationen, konnten zahlreiche repetitive Sequenzen und Mutationsmotive (TGGA, CAGG/CCTG, CpG-Insel, THEMIS-Motiv (WKVnRRRnVWK)) (Coulondre et al. 1978; Huff et al. 1995; Levran et al. 1997; Makridakis et al. 2009) nachgewiesen werden (Tabelle 9). Einerseits zerstörten die Mutationen diese, evtl. ihre Entstehung fördernden, Motive (Patient 1, Ex 11: CCTG; Patient 2, Ex 10: CAGG, THEMIS-Motiv; Patient 3, IVS 25: CAGG; Patient 4, Ex 26: CpG; Patient 5, Ex 37: CpG), andererseits entstanden so neue Mutationsmotive (Patient 1, Ex 11: CpG; Patient 4, IVS 34: CpG; Patient 5, Ex 12: CpG). Interessanterweise erfolgten zwei der beobachteten Reversionen an diesen neu entstandenen CpG-Inseln (Patient 1 (*FANCA*, Mutation c.971 T>G zu WT, Patient 4 (*FANCD2*, Mutation c.3467-2 A>G zu WT). Zu einer weiteren Reversion (Patient 5 (*FANCD2*, Mutation c.3707 G>A zu WT) kam es in einem erhalten gebliebenen THEMIS-Motiv. Im Rahmen einer Studie wurden innerhalb dieses Motives in 66 % von 56 Prostatakrebsfällen und 74 % von 122 Brustkrebspatienten somatische Mutationen beobachtet (Makridakis et al. 2009). Die Reversion in der DNA des Patienten 2 lag nicht in einem Mutationsmotiv. Sie befand sich jedoch zwei Basen von einer palindromischen Sequenz (Gross et al. 2002) entfernt. Alle nicht-revertierten Mutationen hingegen lagen, mit Ausnahme der Spleißdonor betreffenden 3 bp-Deletion (c.2316+1_2316+3delGTG) des Patienten 3 (im THEMIS-Motiv), nicht direkt in einem solchen Motiv. Diese Beobachtung könnte zu der Vermutung führen, dass diese Motive Rückmutationen fördern. Eine Analyse der genomischen Sequenz (+/-25 bp der Mutation) weiterer 10 Patienten, die Reversionen hin zum Wildtyp aufwiesen (SST, NR, IFAR557-2, EUFA173, EUFA449, FAD2-14/-15, FAD2-26 (Hoehn et al. 2007), EGF056, EGF071 (Pinto et al. 2009)), führt jedoch zur Infragestellung dieser Theorie, da hier nur eine der Reversionen an einer CpG-Insel erfolgte. Allerdings stellen CpG-Inseln eine gute Voraussetzung für Reversionen durch Punktmutationen dar.

Hierbei kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die Reversion nicht durch den gezielten Austausch gegen die wt-Base erfolgt. Vielmehr scheint sich diese, gegen andere unwillkürlich ausgewechselte Basen, aufgrund ihres Selektionsvorteils, durchzusetzen. Allerdings könnten die Reversionen in diesen Patienten zum Beispiel auch über homologe Rekombination und nicht durch eine direkte Rückmutation der Base erfolgt sein. So wäre es denkbar, dass begünstigende Mutationsmotive nicht in der untersuchten unmittelbaren Umgebung (+/-25 bp) die Reversionen in diesen Patienten begünstigten. Ob bestimmte Reversionsmechanismen oder Arten der Reversion gegenüber anderen bevorzugt werden, lässt sich auf Grund des Patientenkollektivs nicht abschätzen. Nimmt man alle bei Höhn et al. 2007 und Pinto et al. 2009 und die in dieser Dissertation beschriebenen Reversionen zusammen (n=27), so entfallen die Reversionen auf elf kompensatorische Mutationen, acht Rückmutationen, zwei Genkonversionen, zwei bis drei mitotische Crossover, sowie zwei Reversionen hin zum Wildtyp, für die kein Mechanismus bekannt ist. Auch auf die Frage nach einer bevorzugten Reversion einer der beiden im Patienten vorliegenden Mutationen, können unsere Untersuchungen keine Antwort geben. Um dies ansatzweise zu beurteilen, müsste eine ausreichende Anzahl revertierter, möglichst verwandter Patienten mit gleichen Mutationen, zur Ver-

fügung stehen. Die in der Literatur beschriebenen drei Fälle von hämatopoetischen Reversionen (Kalb et al. 2007; Mankad et al. 2006; Waisfisz et al. 1999) ein und derselben Mutation in Geschwistern lassen diesbezüglich nur Hinweise offen. Bei einem der Geschwisterpaare handelt es sich um monozygote Zwillinge, weshalb die Annahme besteht, dass die kompensatorische Mutation in einer hämatopoetischen Stammzelle des einen Embryos erfolgte und sich via intra-uteriner Zirkulation im hämatopoetischen System der zweiten Schwester etablierte (Mankad et al. 2006). Somit lässt dieser Fall ebenfalls keinen Rückschluss auf eine selektive Reversion zu. Als ein Hinweis könnten die in peripheren Blutzellen beobachteten kompensatorische Reversion in EUFA506 (Waisfisz et al. 1999) und seinem Bruder, sowie die in den Wildtyp revertierten Mutationen (c.2775_2776 CC>TT) der verwandten Patienten FANCD2-14 und FANCD2-15 (Kalb et al. 2007) angesehen werden. Jedoch kann anhand dieser wenigen Fälle keine Aussage getroffen werden.

Vergleich und Anwendbarkeit der einzelnen Methoden zur Abschätzung der Mosaikstatus im Patientenblut

Wie bereits dargestellt, kann durch die Beobachtung der Blutwerte über einen längeren Zeitraum hinweg ein erster Eindruck über die Entwicklung eines Mosaiks *in vivo* erlangt werden. Eine Einschätzung des Mosaikstatus an sich ist durch die reine Beobachtung der Blutwerte jedoch nicht möglich, da sie auch von der Ausprägung der Mutation (mild/schwer) sowie anderen Faktoren, wie Medikationen und allgemeiner Gesundheitszustand abhängen. Dies wird besonders bei Patient 4 deutlich der, trotz eines auf gDNA-Ebene vergleichsweise geringen Reversionsanteils (4 % im Vollblut), Werte innerhalb des Normbereiches (unterer Grenzbereich: Lymphozyten, Monozyten; unterer/mittlerer Normbereich: Granulozyten, Thrombozyten, Hämoglobin) aufweist. Für diese Blutwerte ist vermutlich nicht nur die Reversion verantwortlich, sondern auch die als verhältnismäßig mild beschriebene, nicht-revertierte Mutation c.2444 G>A (Kalb et al. 2007). Wie stark sich die Werte des Patienten im Laufe der Zeit verbesserten bleibt unklar, da diese nur für einen sehr kurzen Zeitraum vorliegen.

Vergleicht man die Ergebnisse der Chromosomenbruchanalysen mit denen der DNA-Sequenzanalysen, so wird besonders in der Gegenüberstellung der Analysen von Patienten 4 und 5 deutlich, dass aus den Bruchanalysen nur bedingt auf den möglichen Grad der Reversion geschlossen werden kann. Der Vergleich der Bruchraten beider Patienten ließe eine stärkere Durchsetzung der Reversion in den T-Lymphozyten des Patienten 4 (0 Brüche: 30 %; ≥ 10 Brüche: 12 %) als in Patienten 5 (0 Brüche: 14 %; ≥ 10 Brüche: 34 %) vermuten. Betrachtet man jedoch die Werte der gDNA-basierenden Reversion in dieser Zelllinie, so stehen 0 % Reversion (Patient 4) 6 % Reversion (Patient 5) gegenüber. Der Grund hierfür liegt in der Natur beider Analysen. Während es sich bei der Chromosomenbruchanalyse um einen funktionellen Test handelt, liegt der Sequenzanalyse die tatsächliche Situation in den Zellen zugrunde. Auf diese Weise führen hier vermutlich milde Mutationen, wie die für Patient 4 beschriebene (c.2444 G>A (Kalb et al. 2007)), zu geringeren Bruchraten. Zusätzlich kommt es durch die MMC-bedingte stärkere Stimulation von wildtypischen Zellen im Vergleich zu FA-Zellen (Noll et al. 2001; Thomas et al. 2004) zu einer weite-

ren Verschiebung der Bruchraten hin zu denen von Nicht-FA-Kontrollen. Dieselbe Beeinflussung durch MMC tritt bei der Bestimmung der G2-Phasearreste über die zweidimensionale BrdU/Hoechst-Zellzyklusanalyse zu tage. Auch bei dieser funktionellen Analyse kommt es nach MMC-Behandlung zu einer Verschiebung des Verhältnisses $\sum G2/GF$ (Summe G2-Phasen/Summe der Wachstumsfraktion) hin zu Nicht-FA-Kontrollen. Dieser Effekt lässt sich besonders für Patient 2 beobachten, dessen Ratio nach Behandlung mit 100 mg/ml MMC ganzheitlich (Alter: 11, 18, 26 Jahre) im Bereich von Nicht-FA-Kontrollen lag, während die Ratio für den spontanen Arrest (ohne MMC) zum selben Zeitpunkt (im Alter von 11 und 26 Jahren) noch an der Untergrenze der von FA-Patienten angesiedelt waren. Dies zeigt auch, dass die Methode allein nur unter Vorbehalt zur Einstufung eines Patienten als Mosaikpatienten herangezogen werden kann. Ebenso spielt hier, wie bei der Chromosomenbruchanalyse, der funktionelle Aspekt der Methode eine Rolle. Auch hier können milde Mutationen zu einer eher wildtypischen Erscheinung der Patientenzellen im Assay führen. Zusätzlich ist zu bedenken, dass die MMC-Sensitivität in peripheren Blutlymphozyten nicht nur durch eine Reversion, sondern auch durch einen erworbenen reduzierten G2-Phase-Arrest vermindert werden kann. Als Grundlage hierfür wurden reduzierte CHK1- und p53-Level beobachtet (Ceccaldi et al. 2011). Aus diesem Grund scheint die Methode allein zur Feststellung eines erworbenen Mosaiks anhand von stimulierten T-Lymphozyten nur bedingt geeignet. Zu einer Mosaikdiagnostik via G2-Phase-Arrest muss deshalb immer der Vergleich zu Fibroblastenkulturen (Ausgangssituation, siehe oben) herangezogen werden. Wurde die Diagnose Mosaik gestellt, kann über diese Methode die Durchsetzung der Reversion in T-Lymphozyten gut verfolgt werden (Patient 1 und 2). Die Abschätzung des Mosaikstatus über diese Methode erscheint auf Grund der Auswirkung des Mutationstyps (mild/schwer) und dem Aspekt der positiven Selektion jedoch etwas vage. Zusätzlich kommt hinzu, dass Mosaik in stimulierten T-Zellen, sowohl über den spontanen, als auch den MMC-induzierten G2-Phase-Arrest, erst ab einem Anteil von ca. 30 % revertierter Zellen detektierbar erscheinen. Berücksichtigt man die Beeinflussung beider funktioneller Analysen (Chromosomenbruch-/G2-Phasearrest-Analyse) durch die Mutationsausprägung, sowie die positive Selektion revertierter Zellen durch MMC (Thomas et al. 2004), so scheint die Einschätzung des Mosaikstatus auf gDNA-Ebene die *in vivo* Situation im Patienten am genauesten darzustellen.

Allerdings ist auch diese aufwändigere Methode mit möglichen Fehlern und Schwächen belastet (siehe Analyse Patienten 2 und falsch positive Selektion). Zusätzlich können bei Sequenzanalysen methodenbedingt Schwankungen auftreten, weshalb eine Wiederholung der Analysen sinnvoll wäre. Aufgrund der geringen isolierbaren DNA-Mengen stellt sich dies wiederum problematisch dar. Eine mögliche Herangehensweise, das Vorhandensein und die Stärke eines vermuteten Mosaiks über Chromosomenbruchanalysen besser abschätzen zu können, wäre auch der Vergleich zwischen stimulierten Blutlymphozyten und Fibroblasten. Für diese Einschätzung bedürfte es Vergleichswerte eines großen Patientenkollektivs mit bekannten Mutationen sowie Mosaikstatus. Dieser sollte, meines Erachtens, nicht nur über Chromosomenbruchanalysen, sondern auch über DNA-Analysen bestimmt werden.

5.2 FANCO (RAD51C): Mutationen, Interaktionen, Struktur

Trotz seiner ersten Charakterisierung und Beschreibung als eines der RAD51-Paraloge vor über 15 Jahren (Dosanjh et al. 1998), konnten Mutationen in *RAD51C* erst im Jahr 2010 mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden. So zeigt unsere Studie (Vaz et al. 2010), dass biallelische Mutationen in diesem Gen zu einem „FA-ähnlichem“ Phänotyp führen. Die Zuordnung zu dieser Erkrankung erfolgte anhand von Untersuchungen einer pakistanischen Familie. Aus einer konsanguinen Partnerschaft ersten Grades gingen vier Kinder hervor, eine gesunde Tochter, zwei im Säuglingsalter verstorbene Kinder (Tochter † 2 Monate, Sohn † 2 Tage) eine Fehlgeburt (11. Woche) und ein, zum Zeitpunkt der Untersuchung, 10 Jahre alter Sohn. Alle betroffenen, lebend geborenen Kinder zeigten für FA-typische kongenitale Fehlbildungen. In den Lymphozyten der verstorbenen Tochter konnte nach MMC-Behandlung eine erhöhte Chromosomenbruchrate beobachtet werden. Typisch für FA zeigten sich in primären Fibroblasten des Sohnes gesteigerte Chromosomenbruchraten (MMC, DEB behandelt) und in primären Lymphozyten sowie einer Fibroblastenkultur erhöhte G2-Phase-Arreste. In einer über Genotypisierung eingegrenzten Region (Chr. 17q12-q24), wurden, die mit DNA-Reparatur verbundenen Gene EME, RAD51C und BRIP1, überprüft. RAD51C wies eine potentiell pathogene Basensubstitution auf (c.773 G>A, R258H). Die starke evolutionäre Konservierung des Arginins in verschiedenen Spezies (Huhn, Zebrafisch, Seeigel, kleine Ackererschmalwand) und innerhalb der Paraloge (RAD51, RAD51B, XRCC3) ließ auf eine pathologische Natur der Substitution schließen. Eine Einschätzung der Auswirkung anhand eines Homologiemodells auf der Basis von *rad51* aus *Pyrococcus furiosus* zeigte eine mögliche Veränderung der Sekundärstruktur, welche evtl. zur Beeinflussung der Proteineffektivität aufgrund einer veränderten Tertiärstruktur führt. Eine Wirkung auf die Proteinestabilität gilt als unwahrscheinlich. Funktionelle Tests bestätigten die auf *in silico* Basis vermuteten Auswirkungen der Sequenzveränderung. Analysen von Patientenfibroblasten zeigten eine stark reduzierte RAD51-Focibildung, sowie eine Camptothecinsensitivität in den Lymphoblasten. Beides sind Merkmale, wie sie auch für FANCD1/N-Defekte beobachtet wurden. Sie sind typisch für Proteine, welche in die DNA-Reparatur über Homologe Rekombination im FA/BRCA-Weg downstream des FANCD2 Proteins stehen. Diese Defekte konnten, ebenso wie die moderate Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und der moderat erhöhte G2-Phasearreste, durch die wildtypische *RAD51C*-Sequenz korrigiert werden. Da der Patient im Alter von 10 Jahren noch keine hämatopoetische Manifestation und keine anderen für FA typischen Tumore entwickelte, wurde die mit RAD51C in Verbindung stehende Erkrankung als „FA-like“ beschrieben. Allerdings bleibt zu bedenken, dass in diesem Alter weniger als 3 % der Patienten von Leukämien und anderen Tumoren sowie nur etwa 20-30 % von Knochenmarksdefekten betroffen sind (Vaz et al. 2010).

Eine parallel erscheinenden Studie an einem deutschen Patientenkollektiv zeigte auf, dass monoallelische Keimzellmutationen in *RAD51C* mit einer Prädisposition für Brust- und Ovarialkrebs assoziiert sind (Meindl et al. 2010). Somit gehört, neben *FANCD1* (*BRCA2*), *FANCI* (*BRIP1*) und *FANCN* (*PALB2*),

ein weiteres Mitglied der FA-Familie zu den Brustkrebsrisikogenen (Levy-Lahad 2010). Die Beobachtung von Meindl et al. 2012, dass monoallelische *RAD51C*-Mutationen in Familien mit Brust- und Ovarialkrebs auftreten (Frequenz: 1,3 %), nicht aber in solchen mit reinem Brustkrebs hintergrund, wurde in darauffolgenden Studien mit jeweils mehr als 100 Probanden kritisch hinterfragt (Blanco et al. 2014; Coulet et al. 2013; Loveday et al. 2012; Osorio et al. 2012; Rashid et al. 2014). Loveday et al. 2012 weist darauf hin, dass das Risiko für Ovarialkrebs zwar erhöht, aber eine Steigerung des Brustkrebsrisikos nicht gegeben scheint. In vier Studien aus China, den USA und Kanada (starker jüdischer und frankokanadischer Hintergrund) konnte die hohe Penetranz der *RAD51C*-Mutation nicht nachgewiesen werden (Osorio et al. 2012). Dem gegenüber stehen Studien mit finnischem, schwedischem, spanischem, australischem (Osorio et al. 2012), pakistanischem (Rashid et al. 2014), und französisch-europäischem Hintergrund (Coulet et al. 2013), die neben Meindl et al. 2010 (deutsches Patientenkollektiv) eine Prädisposition für beide Tumorarten beobachteten. Blanco et al. 2014 zeigte in einer spanischen Studie ebenfalls ein durch *RAD51C*-Mutationen erhöhtes Risiko für Brust- und Ovarialtumore, aber auch eines in reinen Brustkrebsfamilien. In einem französischen/europäischen Kollektiv (117 Brust- und Ovarialkrebsfamilien ohne BRCA1/2-Hintergrund) konnten drei pathogene *RAD51C*-Mutationen nachgewiesen werden. Zwei von ihnen wurden in Familien mit beiden Tumorarten, die dritte in einer reinen Ovarialkrebsfamilie detektiert (Coulet et al. 2013).

Auch unserer Studie, Osorio et al. 2012, zeigte in spanischen Brust- und /oder Ovarialkrebsfamilien ein erhöhtes Tumorrisiko von 1,3 % (4 von 300), was dem von Meindl et al. 2010 entsprach. Auffällig hierbei war der hohe Anteil von pathogenen Missense-Mutationen ((3 von 5: p.Leu138Phe), (p.Leu219Ser), (p.Gln143Arg)). Die Frequenz von *RAD51C*-Mutationen in Brustkrebsfamilien hingegen lag mit 0,2 % (1 von 438) auf einem sehr geringem Niveau. Bedenkt man die Variation der verschiedenen Studien bezüglich der Frequenz der *RAD51C*-Mutation in Brust- und/oder Ovarialkrebsfamilien, könnte der ethnische Hintergrund der untersuchten Kollektive eine Rolle spielen. Zudem scheinen aber auch die Auswirkungen von Missense-Mutationen teilweise unterschätzt zu werden. So schloss zum Beispiel Romero et al. 2011 eine mögliche klinische Relevanz des Basenaustauschs c.428 A>G (p.Gln143Arg) nicht aus, bezog ihn aber aufgrund mangelnder Überprüfung nicht mit in die Frequenzberechnung ein. Eine von uns durchgeführte funktionale Überprüfung der Mutation, in Form von Komplementationsstudien an *RAD51C*-defizienten Fibroblasten, zeigt eine nur teilweise Wiederherstellung der *RAD51*-FOCI-Bildung durch das mutierte Protein.

Das eine funktionale Überprüfung solcher Veränderungen für die Einschätzung der Frequenz wichtig ist, zeigt auch unsere Berechnung: Wurde nur die trunkierende Mutation (c.774delT) und die *in silico* als mutagen vorhergesagte Spleißmutation (p.Cys135Tyr) berücksichtigt, so betrug die *RAD51C*-Frequenz 0,6 %, nach ihrer funktionellen Überprüfung jedoch 1,3 %. Interessanterweise scheint sich diese Konstellation-bialleische Mutation FA, monoallelische Mutation Brust- bzw. Brust- und Ovarialkrebsrisikogen- weiter zu

ziehen. Mit XRCC2 scheint nun erneut ein für die HR essentielles Protein in dieses Schema zu passen. Auch für diesen indirekten Interaktionspartner von RAD51C (Schild et al. 2000) wurden monoallelische Mutationen beobachtet, die vermehrt zu Brustkrebs in den betroffenen Familien führt (Park et al. 2012). Außerdem wurde eine trunkierende Mutation beschrieben, von der angenommen wird, dass sie ursächlich für den FA-Phänotyp des Patienten sei. Die Autoren regen jedoch zusätzliche Analysen zur Bestätigung an (Shamseldin et al. 2012). Vor kurzem wurde mit RAD51B ein weiteres RAD51-Paralog als eines der seltenen Brustkrebsrisikogene identifiziert (Golmard et al. 2013) und Mutationen in RAD51D (Loveday et al. 2011), sowie XRCC3 (Yuan et al. 2014) scheinen für Ovarialkarzinome zu prädisponieren. Aufgrund dieser Tatsachen und den direkten Interaktionen mit RAD51C, im für die HR wichtigen BCDX2-Komplex, liegt die Überlegung nahe, dass es sich auch bei diesen Genen möglicherweise um mit FA-assoziierte bzw. FA-Gene handeln könnte. Aus dieser Sicht, scheint auch das RAD51-Paralog XRCC3 als potentielle FA-Genkandidaten interessant, da es wie auch andere Proteine des FA/BRCA-Weges eine Rolle in der RAD51-vermittelten HR spielt und ein Fehlen zu Defiziten in der RAD51-Foci-Entstehung führt. Somit scheint es wahrscheinlich, dass Interaktionspartner von RAD51C und den RAD51-Paralogen möglicherweise als Kandidaten für FA-Gene bzw. FA-assoziierte Gene in Frage kommen. Vor allem wenn man bedenkt, das erst kürzlich eine dominante Mutation in RAD51 (FANCR) als ursächlich für FA nachgewiesen werden konnte (Wang et al. 2015).

Missense-Mutationen und DNA-Interaktion von RAD51C

Im Vergleich zu anderen FA-Proteinen wie zum Beispiel FANCF, scheint RAD51C (FANCO) Missens-Mutationen gegenüber weniger tolerant. Während das Erstere aufgrund seiner hohen Toleranz gegenüber diesem Mutationstyp als flexibles Adapterprotein bezeichnet wird (Osorio et al. 2012), führen in RAD51C auch Missens-Mutationen häufig zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Einschränkungen bzw. Reduzierungen der Proteinfunktion, bis hin zu deren kompletten Verlust. Möglichkeiten, die Auswirkungen von Basensubstitutionen zu untersuchen, bieten verschiedene Herangehensweisen. Sehr oft werden *in silico* Analysen mit Programmen wie PolyPhen, SpliceFinder und SIFT verwendet. Diese schließen, zum Beispiel basierend auf bekannten Strukturen und Alignments mit anderen Sequenzen, auf mögliche Auswirkungen der Basenveränderungen. Auch der speziessübergreifende, evolutionäre Konservierungsgrad einer Aminosäure gibt Hinweise auf die Tolerierbarkeit von missensen Substitutionen, möglicher Deletionen oder Insertionen. Den besten Aufschluss über die Wirkung einer solchen Veränderung stellt jedoch die funktionelle Analyse in Komplementationsstudien dar (Osorio et al. 2012). Auch computergestützte Aminosäureaustausche in Homologiemodellen bekannter oder verwandter Proteinstrukturen (hier *archaele pRad51*) geben Anhaltspunkte über eine mögliche Pathogenität der Varianten. Ein solches Modell wurde zur Überprüfung der Auswirkung des Aminosäureaustauschs H258R in RAD51C herangezogen (Vaz et al. 2010).

Um bessere Voraussagen zu ermöglichen, war ein Teilziel dieser Arbeit, das humane RAD51C Proteins strukturell zu charakterisieren. Versuche in unterschiedlichen Expressionssystemen (*E. coli*, SF21, H5) und mit verschiedenen Puffervarianten führten zu geringen Ausbeuten des Proteins. Die stabilisierende Co-Expression seines Interaktionspartners XRCC3 (CX3-Komplex) führte zu einer für die Kristallographie unzureichenden Menge des Proteinkomplexes. Dass die Reinigung von RAD51C in ausreichender Menge mit Komplikationen verbunden ist, lassen auch einige bisher veröffentlichte Artikel vermuten. Auffällig ist, dass trotz großen Interesses an diesem Protein, bis zum heutigen Tage keine vollständig gelöste Struktur des humanen Proteins veröffentlicht wurde. Für RAD51C-Proteine anderer Spezies, z. B. *hyperthermophilic eukaryote Alvinella pompejana* wurden ebenfalls Strukturanalysen durchgeführt (Williams et al. 2015). Auf diese Weise konnten Domänen hochauflösend dargestellt werden (Williams et al. 2015), die übertragen auf das humane RAD51C einen Rahmen zur Abschätzung möglicher Auswirkungen von Mutationen bieten können.

Der Proteinkomplex wurde zwar bereits elektronenmikroskopisch als Einzelstruktur und gebunden an DNA dargestellt (Compton et al. 2010; Masson et al. 2001a), jedoch werden hierfür geringere Proteinmengen benötigt. Außerdem zeigte die in Compton et al. 2010 dargestellte mögliche Ringstruktur relativ viel Hintergrund, was wiederum möglicherweise auf aggregiertes Protein hinweist. Ein weiteres Anzeichen für die schwierige Reinigung und geringe Expressionsmenge stellt das in Compton et al. 2010 als repräsentativ dargestellte Elutionsprofil dar, welches auf eine geringe Proteinmenge schließen lässt.

Geringe Mengen der in SF21-Zellen exprimierten Proteine (HZI, Braunschweig) konnten im Rahmen dieser Arbeit gereinigt werden. Mit diesem Protein erfolgten initiale Interaktionsstudien mit ausgewählten DNA-Strukturen (Einzelstrang, 3'-Überhang, 5'-Überhang, Open Fork). In EMSA-Assays konnte das Binden des Proteinkomplexes an alle Substrate nachgewiesen werden. Anders als erwartet konnten wir keine vollständige Verschiebung der Bande auf dem Gel nachweisen. Jedoch stieg nach Zugabe von Protein die Cy3-markierte DNA in den Geltaschen proportional mit der Proteinmenge bis zu einem Maximum an. Eine Abnahme des nicht an DNA-gebundenen Proteins konnte bei den Substraten Openfork und 5'-Überhang beobachtet werden. Bei Verwendung des 3'-Überhangsubstrat war die Abnahme nur sehr schwach ausgeprägt. Dieser Effekt wurde zuvor auch schon bei der Verwendung von Polyacrylamidgelen zur Überprüfung der ssDNA-Bindung durch CX3 beobachtet (Masson et al. 2001a). Er kann möglicherweise durch das pI-abhängige Laufverhalten des DNA-Proteingemisches in den verwendeten nativen Gelen begründet werden. Einen weiteren Grund für das mangelnde in das Gel-Laufen des DNA-Proteingemisches in den Taschen des Gels könnte das *Coating* der DNA-Stränge durch die Proteine darstellen. So könnten durch Zusammenlagerung große Strukturen entstehen, die nicht ohne weiteres in die Poren des Gels eindringen können. In einer zusätzlichen Silberfärbung konnte ein Proteinschmier beobachtet werden, der sich ebenfalls mehr im oberen Bereich des Gels befand. Er spricht für das mögliche Vorliegen eines inhomogenen Proteingemisches aus zusammengelagerten Proteinen. Die Sättigung der

Reaktion beim Binden an Einzelstrang-DNA wurde bei 25°C Reaktionstemperatur bereits bei niedrigeren Proteinkonzentrationen (1,5 µM) erreicht, als bei einer Temperatur von 4°C (2,5 µM). Dies könnte auf den *in vivo*-ähnlicheren Bedingungen beruhen. Dafür war bei der niedrigeren Temperatur die Zunahme der CY3-markierten DNA in den Geltaschen besser zu beobachten.

Versuche mit weiteren DNA-Strukturen, welche alle ssDNA-Abschnitte beinhalteten, zeigten ebenso eine Zunahme der gebundenen DNA mit steigender CX3-Konzentration. Diese Beobachtung bestätigt diese bereits nachgewiesene Interaktion des Komplexes mit diesem DNA-Typ (Kurumizaka et al. 2003; Kurumizaka et al. 2001; Masson et al. 2001a). Dies würde auch die Rolle des CX3-Komplexes während der Auflösung von kollabierten Replikationsgabeln unterstreichen. Dieser funktionelle Test ermöglicht es, Auswirkungen von in Patienten beobachteten RAD51C-Missense-Mutationen auf die CX3-Komplex-DNA-Bindung zu untersuchen. Er ist jedoch nur für Mutationen mit geringeren Auswirkungen auf die Struktur anwendbar, da eine stark strukturändernde oder das RAD51C-Protein instabilisierende Wirkung möglicherweise direkt zu mangelnder bis keiner Proteinexpression führen. Außerdem sollte die Mutation die RAD51C-XRCC3-Bindung nur gering beeinflussen. Für weitere Versuche wären deshalb die Mutationen c.414 G>C (p.L138F, (Meindl et al. 2010; Osorio et al. 2012)), c.458 G>A (p.G153D, (Clague et al. 2011)), c.475 G>A (p.D159N, (Somyajit et al. 2012)), c.745 C>T (p.R249C, rs28363311, LOVD Datenbank Leiden) und c.773 G>A (p.R258H, (Vaz et al. 2010)) interessant. Ihre als mild zu erwartende Auswirkungen wurden anhand eines an das archeale pRAD51 angelehnte Homologiemodell abgeschätzt.

Qualitative und quantitative Untersuchung der FANCO (RAD51C)-Interaktionen innerhalb der RAD51-Paraloge, sowie mit RAD51 und FANCN- inklusive Beeinflussung durch MMC

Eine weitere Möglichkeit Auswirkungen von Mutationen auf die Funktionalität des Proteins zu testen, stellen Proteininteraktionsstudien dar. Um Interaktionen möglichst nah an der *in vivo* Situation zu untersuchen, wurde hier das Mammalian-Two- bzw. Three-Hybrid-System (M2/3H-System) in Verbindung mit HeLa-Zellen verwendet. Mit dieser Methode und der auf demselben Prinzip basierenden Yeast Two-/Three-Hybrid-System wurden zuvor schon verschiedene Interaktionen zwischen den FA-Proteinen und auch solche mit FA-assoziierten Proteinen untersucht (z.B. FANCA/ FANCG, FANCA/FANCC, FANCF/FANCG, FANCC/FANCE, FANCE/FANCD2, FAAP100+FANCB, FAAP100+FANCL (Gordon and Buchwald 2003; Ling et al. 2007; Reuter et al. 2000)). Mit der Zuordnung von RAD51C zum FA/BRCA-Weg rückten die RAD51-Paraloge näher in den Fokus der Fanconi Anämie-Forschung. Da diese Proteine in der DNA-Schadensignalisierung, der DNA-Reparatur über Homologe Rekombination und in der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen (Golmard et al. 2013; Scheckenbach et al. 2014; Suwaki et al. 2011), wurden ihre Interaktionen untereinander und mit anderen Proteinen in zahlreichen Studien untersucht (Masson et al. 2001b; Miller et al. 2004; Park et al. 2013; Rajesh et al. 2009; Rodrigue et al. 2006; Schild et al. 2000).

Die hier vorliegende Studie zur Untersuchung von Interaktionen innerhalb der RAD51-Paraloge (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) stellt unseren Erachtens die bisher umfangreichste mit dem M2H-/M3H-System dar. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass mit ihr *in vivo* auftretende Veränderungen der Interaktionsintensität zwischen zwei Proteinen, auch in Anwesenheit eines dritten Proteins, im Falle von Sequenzveränderungen beobachtet werden können. Ebenso kann eine mögliche veränderte DNA-Schadensantwort nach MMC-Behandlung untersucht werden. Die Subkomplexbildungen von RAD51B mit RAD51C (BC) und RAD51D mit XRCC2 (DX2) sowie die Bildung eines Komplexes zwischen RAD51C und XRCC3 (CX3), welche zuvor schon in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Analysen nachgewiesen wurden, konnten verifiziert werden (Kurumizaka et al. 2001; Liu et al. 2002; Masson et al. 2001a; Sigurdsson et al. 2001; Wiese et al. 2002). Zusätzlich zeigten wir, dass die Zusammenlagerung beider Subkomplexe vermutlich eine wichtige Rolle für die Bildung des RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2 Komplex (BCDX2) spielt. Außerdem detektierten wir eine weitere, bisher nicht beschriebene Interaktion innerhalb des BCDX2-Komplexes, die zwischen RAD51B und XRCC2.

Aber nicht nur die Subkomplexpартner beeinflussen einander, sondern auch die Interaktion im CX3-Komplex scheint durch die anderen Paraloge (RAD51B, RAD51D, XRCC2) sowie durch RAD51 ihre Intensität zu verändern. Dies spricht für eine mögliche komplexübergreifende Regulation innerhalb der Paraloge, was mit dem dynamischen Ablauf der Reparaturprozesse in Verbindung stehen könnte. Eine Zusammenstellung aller Veränderungen zeigt die Abb. 45. RAD51 (FANCR) wurde zusätzlich mit in die Untersuchungen einbezogen, da für dieses Protein ebenfalls Interaktionen mit den Paralogen beschrieben wurden (Schild et al. 2000). Seine Co-Transfektion in M3H-Analysen zeigte Auswirkungen auf die Interaktionen im BCDX2- und im CX3-Komplex. Die bekannte Interaktion zwischen FANCN und RAD51C (Park et al. 2013) konnte im M2H-Assay nicht dargestellt werden. Nach MMC-induziertem DNA-Schaden konnte eine Veränderung der Interaktionsstärken zwischen den Paralogen beobachtet werden, welche deren Rolle in der Beseitigung von Doppelstrangbrüchen unterstreicht. Die funktionelle Überprüfung der Missense-Mutation c.773 G>A (p.R258H) in RAD51C spiegelte erneut ihre hypomorphe Natur wider.

Der BCDX2-Komplex:

Die zuvor über andere Methoden (Immunopräzipitationen, Ni+Pull-down-Experimente) an humanen Zellextrakten nachgewiesene (Liu et al. 2002; Masson et al. 2001b; Wiese et al. 2002) und von Schild et al. 2000 im Y2H als schwache detektierte Interaktion zwischen RAD51C und humanen RAD51D konnte im M2H nicht nachgewiesen werden. Erst eine Co-Transfektion ihrer Subkomplexpартner RAD51B (BC) und XRCC2 (DX2) in nativer Form führte zu einer Aktivierung des Assays. Eine verstärkende Wirkung von RAD51B auf die RAD51C-RAD51D-Interaktion wurde schon zuvor beschrieben (Schild et al. 2000). Eine neue Beobachtung innerhalb des heterotetrameren Komplexes war die schwache, aber signifikante Interaktion zwischen pMRAD51B und pVP16XRCC2. Diese wurde durch die Co-Transfektion von nativem RAD51D bidirektional signifikant stark intensiviert, was eine starke Interaktion der RAD51B-

XRCC2-Proteine im M3H spricht. Da in unseren M3H-Versuchen RAD51B die RAD51C-RAD51D-Interaktion und RAD51D die Interaktion von RAD51B mit XRCC2 verstärkt, scheint eine vorherige Subkomplexbildung für die Ausbildung des BCDX2-Komplexes förderlich. Somit suggerieren unsere Ergebnisse ein vom BCDX2-Komplex unabhängiges Vorkommen beider Subkomplexe. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass DX2 in Abwesenheit von DNA multimere, ringförmige Strukturen und in Anwesenheit von ssDNA filamentöse Strukturen ausbildet (Kurumizaka et al. 2002).

In Co-Immunopräzipitationen (Co-IPs) aus HEK293-Zellextrakten mit überexprimierten RAD51B und XRCC2 konnte keine Interaktion der Proteine nachgewiesen werden. Auch eine zusätzliche Co-Expression von nativem RAD51D, änderte dies nicht. Obwohl RAD51D in der Inputfraktion der XRCC2-Immunopräzipitation deutlich detektierbar war, zeigte die Westernblot-Analyse ein auffällig schwaches RAD51D-Signal in der mit α -XRCC2 isolierten Fraktion. Da der Nachweis von XRCC2 deutlich ein Binden an die für die Isolation verwendeten Agarose-Beads zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass die XRCC2-RAD51D-Bindung nicht optimal verlief. Bedenkt man, dass XRCC2 erst nach der Bindung an RAD51D verstärkt eine Interaktion mit RAD51B eingeht, so könnte dies evtl. den fehlenden Nachweis des RAD51B-Signals erklären. Solche Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen unterschiedlicher Assays wurden in der Literatur auch schon zu vor beschrieben. So wurde zum Beispiel im Y2H eine starke Interaktion von RAD51 und dem Paralog RAD55 beobachtet, welche in biochemischen Assays nur schwach nachgewiesen werden konnte oder das Fehlen der XRCC3-RAD51-Interaktion in WTK1 und TK6-Zelllinien, die in anderen Y2/3H-Studien als stark aufgezeigt wurde (Wiese et al. 2002). Berücksichtigt man dies, so könnten die Diskrepanzen bezüglich der RAD51B-XRCC2-Interaktion auf unterschiedliche Assays oder die Verwendung zweierlei Zelllinien (HeLa: M2H/M3H, HEK293: CoIP) zurückzuführen sein. Letzteres scheint aufgrund der Proteinüberexpression relativ unwahrscheinlich. Zusätzliche Analysen mit anderen Methoden und Zelllinien zur Untersuchung der möglichen RAD51B-XRCC2-Interaktion wären deshalb für die weitere Aufklärung sehr aufschlussreich.

Ein Indiz für die Wechselwirkung von RAD51B, RAD51D und XRCC2 lieferte die sinkende Interaktionsstärke im DX2-Komplex in Anwesenheit von RAD51B, sowie die Intensivierung der RAD51B-RAD51C-Interaktion in Anwesenheit von RAD51D. Zieht man die Ergebnisse unserer M2/3H-Analysen heran, so scheinen, anders als bisher angenommen (Masson et al. 2001b; Miller et al. 2005; Schild et al. 2000), RAD51B und XRCC2 nicht nur über RAD51C bzw. RAD51D in den BCDX2-Komplex integriert zu werden. Die Beobachtung dieser Interaktion liefert, zusammen mit dem bisher angenommenen Modell (Masson et al. 2001b), Indizien zur Ausbildung einer Ringstruktur. Einen zusätzlichen Hinweis geben die in M3H-Analysen beobachteten indirekten Interaktionen von RAD51B mit RAD51D, da Co-Transfektionen von nativem XRCC2 zu einer signifikanten und die von RAD51C zu einer grenzwertigen Systemaktivierung führten. Die Grenzwertigkeit der Signifikanz entsteht hierbei vermutlich durch die hohe Standardabweichung, welche wiederum möglicherweise von der Instabilität der Interaktion bedingt

sein könnte. Hinweise auf solch eine ringförmige Komplexstruktur lieferten zuvor auch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Compton et al. 2010. Sie zeigen das Zusammenlagern der Proteine in An- und Abwesenheit von DNA (Replikationsgabel, Holiday Junction). So scheint nicht nur der CX3-Komplex (Compton et al. 2010; Masson et al. 2001a), sondern auch der BCDX2-Komplex von ringförmiger Struktur.

Der CX3-Komplex und Wechselwirkungen der Komplexproteine inklusive RAD51:

Die *in vivo* Ausbildung des CX3-Komplex konnten wir über M2H-Studien bestätigen. Wir fanden bidirektional signifikante Interaktionen, die auch in den Westernblot-Analysen der RAD51C- und XRCC3-Co-IPs dargestellt werden konnten. Trotz der Vermutung, dass beide Paralogkomplexe in verschiedenen Phasen des BRCA1-BRCA2-abhängigen HR-Reparaturprozesses beteiligt sind (BCDX2 *upstream* und CX3 *downstream* der RAD51-Rekrutierung an die Orte der DNA-Schadenstellen) (Chun et al. 2013), beobachteten wir in M3H-Analysen, Einflüsse von BCDX2-Komplexproteinen auf die C-X3-Bindung. Während die Co-Transfektion von RAD51B, im Gegensatz zu den Y2H-Analysen von Schild et al. 2000, zu einer signifikanten Verringerung der Bindung führte, kam es durch natives XRCC2 zu einer Intensivierung derselben. Co-IPs mit überexprimierten XRCC3, RAD51C und RAD51B bestätigten die Interaktionen der drei Proteine. So konnte RAD51B unter Co-Expression von RAD51C mit XRCC3 aus einem HEK293-Proteingemisch extrahiert werden.

Umgekehrt beobachteten wir in unseren M3H-Analysen Beeinflussungen der internen BCDX2-Komplexbindungen durch XRCC3. Die Anwesenheit von nativem XRCC3 hob die moderate RAD51B-RAD51C-Interaktion einseitig, in der pMRAD51 + pVP16RAD51B-Richtung, fast vollständig auf und reduzierte die Intensität der starken DX2-Bindung in einer Richtung (pMXRCC2 + pVP16RAD51D) auf die Hälfte. Die schwache Interaktion zwischen RAD51B und XRCC2 verschwand im M3H mit XRCC3 komplett. Wie XRCC3 in Abwesenheit von RAD51C die letzten beiden Bindungen beeinflussen kann, ist unklar, denn RAD51C gilt bislang als einziger Interaktionspartner des Proteins (Masson et al. 2001b; Schild et al. 2000). All dies könnten mögliche Indizien für die parallele Existenz beider Komplexe an den RAD51-Filamenten darstellen. Mögliche Wechselwirkungen bzw. Regulationen zwischen den Komplexen oder einzelner Proteine wären auch denkbar. Bedenkt man die in unseren M3H-Analysen beobachteten Reduzierungen der Interaktionsstärken innerhalb des BCDX2-Komplexes durch die Anwesenheit von XRCC3, so könnte möglicherweise XRCC3 die Auflösung des *upstream* von RAD51 gelegenen Komplexes fördern und *downstream* mit RAD51C einen Komplex ausbilden. Ein ähnliches Gedankenmodell wurde von Liu N. et al. 2002 aufgestellt. Aber auch RAD51 scheint Einfluss auf den BCDX2-Komplex auszuüben. Ein Vergleich der Bindungsintensitäten M2H versus M3H mit nativem RAD51 zeigt, mit Ausnahme der verstärkten RAD51B-RAD51C-Interaktion, verminderte Interaktionsstärken. Zusätzlich steigert seine Anwesenheit die Bindungsintensität im CX3-Komplex und fördert so möglicherweise seine Bildung. Da es an beide Proteine binden kann (Liu et al. 1998; Schild et al. 2000), bleibt offen über welches diese Induktion erfolgt. Dieser gegensätzliche Einfluss steht im Einklang zur angenommenen Ansiedlung der

Komplexe *up-* und *downstream* von RAD51. Wie RAD51 auf die Bindung zwischen RAD51B und XRCC2 wirkt, bleibt jedoch unklar, da für diese Proteine in unseren M2H-Analysen keine Interaktionen detektiert wurden. Alle anderen für das Protein beschriebenen Interaktionen mit RAD51C, XRCC3 und RAD51D (Liu et al. 1998; Schild et al. 2000) konnten wir verifizieren, auch wenn sie sehr schwach ausfielen.

Die Interaktion von RAD51C mit FANCN:

Mit FANCN (PALB2) banden wir ein weiteres Protein in unsere M2H-Analysen ein, welches gemeinsam mit RAD51C und BRCA2 den sogenannten HR-Komplex bildet (Park et al. 2013). Wie bei RAD51C führen auch bei FANCN monoallelische Mutationen zu einer Prädisposition für Brust- sowie Ovarialkrebs und biallelische Mutationen zu Fanconi Anämie. Für beide Proteine ist eine direkte Interaktion beschrieben. Anders als erwartet konnten wir in M2H-Analysen der beiden Proteine keine Interaktion nachweisen. Da jedoch die c-terminale WD40-Domäne von FANCN eindeutig als Bindungsstelle für RAD51C charakterisiert wurde (Park et al. 2013), ist von einem falsch negativem Ergebnis unserer Analysen auszugehen. Eine Ursache hierfür könnte möglicherweise das Verdecken der Protein-Bindungsstellen durch die fusionierte DNA-Binde- bzw. Aktivierungsdomäne darstellen. Eine andere mögliche Erklärung für die fehlende Interaktion wäre, dass FANCN zwar die Bindungsstellen für RAD51C und BRCA2 separat bereitstellt, beide Proteine aber eine wechselseitige Aktivierung bzw. die eines anderen Partners benötigen. Aufgrund des Zeitmangels konnten für RAD51C und FANCN keine M3H-Analysen durchgeführt werden. Zur Aufklärung dieses Widerspruchs, sind diese jedoch dringend zu empfehlen.

Die Wirkung von MMC:

Da RAD51-Paraloge eine wichtige Rolle in der Beseitigung von DNA-Schäden via HR spielen (Brenneman et al. 2002; French et al. 2002; Takata et al. 2000; Wiese et al. 2006), schien es interessant, mögliche Veränderungen der Bindungsintensitäten innerhalb der Komplexe nach Induktion von DNA-Schäden zu untersuchen. Die MMC-induzierten Interstrang-Crosslinks, welche über HR aus der DNA entfernt werden, führten zu gegenläufigen, signifikant veränderten Interaktionsstärken im BCDX2-Komplex. Die Interaktionen zwischen RAD51C und RAD51D sowie die zwischen RAD51B und XRCC2 konnten nicht durch MMC getriggert werden. M3H-Analysen mit den entsprechenden für die Aktivierung benötigten Proteinen führten zu interkomplexen Veränderungen der Bindungsintensitäten. Diese entsprachen denen des jeweiligen vorhandenen Subkomplexes. So stieg, nach MMC-Behandlung, die Stärke der Interaktion im M3H-Assay mit RAD51C, RAD51D und nativem RAD51B ebenso wie die im BC-Komplex an. Die Schadensinduktion im M3H-Assay mit RAD51B, XRCC2 und nativem RAD51D führte, wie im DX2-Komplex zum Sinken der Interaktionsstärke. Die sich verändernden Interaktionsstärken weisen auf eine mögliche Konformationsänderung innerhalb des Komplexes, im Falle von DNA-Schäden, hin. Dies unterstreicht gewissermaßen ihre bekannte Beteiligung an diesem Reparaturweg. Es wäre auch denkbar, dass diese Konformationsänderungen die Bildung der Ringstruktur in Falle von DNA-Schädigung fördern.

Interessanterweise entsprechen die Richtungen dieser Intensitätsänderungen, denen der im M3H-Assay mit nativem RAD51 (ohne MMC) beobachteten. Die einzige Ausnahme hierbei bildet die Interaktion zwischen RAD51C und RAD51D, für dessen Aktivierung RAD51B benötigt wird. Die detektierte, interaktionssteigernde Wirkung von MMC auf den CX3-Komplex unterstreicht seine Involvierung in HR. Sie widerspricht aber früheren Beobachtungen von Wiese et al. 2002, die in Ni⁺-Pulldown-Experimenten keinen MMC-Effekt detektierten. Diese Diskrepanz könnte möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien (Wiese et al.: TK6-XRCC3 Zellen, wir HeLa) zurückgeführt werden.

Die Mutation R258H:

Da die RAD51C-Mutation R258H in bialleischer Ausprägung zu einem der Fanconi Anämie ähnlichen Phänotyp führt (Vaz et al. 2010), bezogen wir diese in unsere M2H/M3H-Studie ein. Anders als erwartet, konnten wir, im Vergleich zum wildtypischen Protein, weder in M2H- noch in M3H-Analysen eine Beeinflussung durch die Mutation beobachten. Die einzige Ausnahme hiervon bildete die Interaktion zwischen RAD51C und RAD51D in Anwesenheit von nativem RAD51B, welche nach Behandlung der Zellen mit MMC sank. Eine verringerte Aktivierung von RAD51C durch RAD51B wurde in entsprechenden M2H-Analysen ausgeschlossen. Bezogen auf die schematische Darstellung von Miller et al. 2003 liegt die Mutation in der c-terminalen Domäne von RAD51C, welche die für Proteininteraktionen wichtigen Walker A- und B- Motive enthält. Die Mutation betrifft keines der beiden Motive direkt, sondern eine nahegelegene hoch konservierte Aminosäure. Das könnte die reduzierte Bindungsaktivität von RAD51C zu RAD51D erklären. Allerdings ist nicht bekannt, ob diese Motive für die Bindung beider Proteine benötigt werden (Wiese et al. 2006). Die verbleibende Restaktivität des mutierten RAD51C bezogen auf diese Bindung lässt eine gewisse Tolerierbarkeit der Veränderung R258H vermuten. Diese Beobachtung steht im Einklang zu dem als hypomorph beschriebenen Erscheinungsbild des mutierten Proteins (Vaz et al. 2010). Bedenkt man die wichtige Funktion von RAD51C in der DNA-Reparatur und dass es sich bei dieser Mutation um die bisher einzige, in einem lebenden FA-ähnlichem Patienten, beschriebene handelt, scheint dieses Erscheinungsbild nicht verwunderlich. Eine stärkere Auswirkung auf das Zusammenspiel der RAD51-Paraloge wäre vermutlich nicht mit dem Leben vereinbar. Dies wird auch von der frühen embryonale Letalität als Folge bialleischer Rad51c-Abwesenheit im Mausmodell (Vaz et al. 2010) unterstrichen.

M2H-/M3H-Analysen in der Routinediagnostik

Ursprüngliche Überlegungen galten der routinemäßigen Nutzung von M2/3H-Analysen zur Einschätzung möglicher FA-Kandidatengene und der Auswirkungen von Mutationen. Nach Anwendung der Methode zur Verifizierung und Aufdeckung RAD51-Paraloginteraktionen und der Testung von R258H in RAD51C scheint diese durchaus sinnvoll. Trotzdem bleibt zu bedenken, dass die Interaktion zwischen RAD51C und FANCN im M2H nicht nachgewiesen werden konnte. Allerdings wurden aus zeitlichen Gründen nur direkte Interaktionen zwischen den Proteinen untersucht. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass evtl. die Co-Transfektion eines weiteren Partners zu einer Interaktion führt. Außerdem beobachteten nicht

nur wir Diskrepanzen verglichen mit Ergebnissen anderer Methoden (RAD51B-XRCC2-Interaktion). Auch in der Literatur sind vereinzelte kontroverse Ergebnisse aus M2/3H-Analysen und anderen Interaktionstests zu finden (Wiese et al. 2002). Ergebnisse sollten deshalb immer überprüft werden. Der Assay scheint daher in der Suche nach weiteren FA-Gen-Interaktionspartnern nur bedingt einsetzbar. Besser eignet er sich vermutlich zur funktionellen Überprüfung von Interaktionen, nach eingefügten Mutationen, geeignet. Da sich das Klonieren von FA-Genen teilweise als langwierig erwies, wäre das Anlegen einer cDNA-Bibliothek aller potentiell zu testenden Gene zu empfehlen, um an diesen entsprechende Mutagenesen durchzuführen. Der Einsatz als schnelle diagnostische Methode zur Abschätzung der Schwere der Mutation scheint ohne weiteres nicht sinnvoll.

Anhang I

Literaturverzeichnis

- Adachi D, Oda T, Yagasaki H, Nakasato K, Taniguchi T, D'Andrea AD, Asano S, Yamashita T (2002) Heterogeneous activation of the Fanconi anemia pathway by patient-derived FANCA mutants. *Hum Mol Genet* 11: 3125-34.
- Alter BP, Joenje H, Oostra AB, Pals G (2005) Fanconi anemia: adult head and neck cancer and hematopoietic mosaicism. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 131: 635-9. doi: 10.1001/archotol.131.7.635
- Alter BP, Knobloch ME, Weinberg RS (1991) Erythropoiesis in Fanconi's anemia. *Blood* 78: 602-8.
- Alter BP, Kupfer G (1993) Fanconi Anemia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K (eds) *GeneReviews*, Seattle (WA)
- Ameziane N, Errami A, Leveille F, Fontaine C, de Vries Y, van Spaendonk RM, de Winter JP, Pals G, Joenje H (2008) Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening. *Hum Mutat* 29: 159-66. doi: 10.1002/humu.20625
- Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T (2004) ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev* 18: 1958-63. doi: 10.1101/gad.1196104
- Auerbach AD (2009) Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 668: 4-10. doi: S0027-5107(09)00053-0 [pii] 10.1016/j.mrfmmm.2009.01.013
- Badie S, Liao C, Thanasoula M, Barber P, Hill MA, Tarsounas M (2009) RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation. *J Cell Biol* 185: 587-600. doi: 10.1083/jcb.200811079
- Bennett BT, Knight KL (2005) Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *J Cell Biochem* 96: 1095-109. doi: 10.1002/jcb.20640
- Berger R, Le Coniat M, Gendron MC (1993) Fanconi anemia. Chromosome breakage and cell cycle studies. *Cancer Genet Cytogenet* 69: 13-6.
- Bishop DK, Ear U, Bhattacharyya A, Calderone C, Beckett M, Weichselbaum RR, Shinohara A (1998) Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. *J Biol Chem* 273: 21482-8.
- Blanco A, Gutierrez-Enriquez S, Santamarina M, Montalban G, Bonache S, Balmana J, Carracedo A, Diez O, Vega A (2014) RAD51C germline mutations found in Spanish site-specific breast cancer and breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 147: 133-43. doi: 10.1007/s10549-014-3078-4
- Bogliolo M, Lyakhovich A, Callen E, Castella M, Cappelli E, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Kalb R, Neveling K, Schindler D, Surralles J (2007) Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J* 26: 1340-51. doi: 10.1038/sj.emboj.7601574
- Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, Trujillo JP, Minguillon J, Ramirez MJ, Pujol R, Casado JA, Banos R, Rio P, Knies K, Zuniga S, Benitez J, Bueren JA, Jaspers NG, Scharer OD, de Winter JP, Schindler D, Surralles J (2013) Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet* 92: 800-6. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.002
- Bohgaki T, Bohgaki M, Hakem R (2010) DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome Integr* 1: 15. doi: 10.1186/2041-9414-1-15
- Braybrooke JP, Spink KG, Thacker J, Hickson ID (2000) The RAD51 family member, RAD51L3, is a DNA-stimulated ATPase that forms a complex with XRCC2. *J Biol Chem* 275: 29100-6. doi: 10.1074/jbc.M002075200
- Brenneman MA, Wagener BM, Miller CA, Allen C, Nickoloff JA (2002) XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell* 10: 387-95.
- Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, Dasi A, Estella JM, Munoz A, Ortega JJ, de Winter J, Joenje H, Schindler D, Hanenberg H, Hodgson SV, Mathew CG, Surralles J (2005) A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* 105: 1946-9. doi: 2004-07-2588 [pii] 10.1182/blood-2004-07-2588

-
- Ceccaldi R, Briot D, Larghero J, Vasquez N, Dubois d'Enghien C, Chamousset D, Noguera ME, Waisfisz Q, Hermine O, Pondarre C, Leblanc T, Gluckman E, Joenje H, Stoppa-Lyonnet D, Socie G, Soulier J (2011) Spontaneous abrogation of the G(2)DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. *J Clin Invest* 121: 184-94. doi: 10.1172/JCI43836
- Chun J, Buechelmaier ES, Powell SN (2013) Rad51 paralog complexes BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway. *Mol Cell Biol* 33: 387-95. doi: 10.1128/MCB.00465-12
- Ciccio A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40: 179-204. doi: S1097-2765(10)00747-1 [pii] 10.1016/j.molcel.2010.09.019
- Clague J, Wilhoite G, Adamson A, Bailis A, Weitzel JN, Neuhausen SL (2011) RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer cases from high-risk families. *PLoS One* 6: e25632. doi: 10.1371/journal.pone.0025632
- Cohen-Haguenauer O, Peault B, Bauche C, Daniel MT, Casal I, Levy V, Dausset J, Boiron M, Auclair C, Gluckman E, Marty M (2006) In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2340-5. doi: 10.1073/pnas.0510613103
- Collis SJ, Ciccio A, Deans AJ, Horejsi Z, Martin JS, Maslen SL, Shekel JM, Elledge SJ, West SC, Boulton SJ (2008) FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the fanconi anemia core complex. *Mol Cell* 32: 313-24. doi: S1097-2765(08)00729-6 [pii] 10.1016/j.molcel.2008.10.014
- Compton SA, Ozgur S, Griffith JD (2010) Ring-shaped Rad51 paralog protein complexes bind Holliday junctions and replication forks as visualized by electron microscopy. *J Biol Chem* 285: 13349-56.
- Coulet F, Fajac A, Colas C, Eyries M, Dion-Minière A, Rouzier R, Uzan S, Lefranc JP, Carbonnel M, Cornelis F, Cortez A, Soubrier F (2013) Germline RAD51C mutations in ovarian cancer susceptibility. *Clin Genet* 83: 332-6. doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01917.x
- Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W (1978) Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274: 775-80.
- Davis TR, Trotter KM, Granados RR, Wood HA (1992) Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion. *Biotechnology (N Y)* 10: 1148-50.
- De Bont R, van Larebeke N (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19: 169-85.
- Deans AJ, West SC (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* 11: 467-80. doi: 10.1038/nrc3088
- Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481: 457-62. doi: 10.1038/nature10783
- Dosanjh MK, Collins DW, Fan W, Lennon GG, Albala JS, Shen Z, Schild D (1998) Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acids Res* 26: 1179-84.
- Ellis NA, Ciocci S, German J (2001) Back mutation can produce phenotype reversion in Bloom syndrome somatic cells. *Hum Genet* 108: 167-73.
- Fanconi G (1927) Familiäre infantile perniziösaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung*, vol 117, Wien, pp 257-280
- French CA, Masson JY, Griffin CS, O'Regan P, West SC, Thacker J (2002) Role of mammalian RAD51L2 (RAD51C) in recombination and genetic stability. *J Biol Chem* 277: 19322-30. doi: 10.1074/jbc.M201402200
- Fulcher DA, Basten A (1997) B cell life span: a review. *Immunol Cell Biol* 75: 446-55. doi: 10.1038/icb.1997.69
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7: 249-62. doi: S1097-2765(01)00173-3 [pii]
- Garner E, Smogorzewska A (2011) Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway. *FEBS Lett* 585: 2853-60. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.078
- German J, Schonberg S, Louie E, Chaganti RS (1977) Bloom's syndrome. IV. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes. *Am J Hum Genet* 29: 248-55.
-

-
- Godthelp BC, Artwert F, Joenje H, Zdzienicka MZ (2002) Impaired DNA damage-induced nuclear Rad51 foci formation uniquely characterizes Fanconi anemia group D1. *Oncogene* 21: 5002-5. doi: 10.1038/sj.onc.1205656
- Golmard L, Caux-Moncoutier V, Davy G, Al Ageeli E, Poirot B, Tirapo C, Michaux D, Barbaroux C, d'Enghien CD, Nicolas A, Castera L, Sastre-Garau X, Stern MH, Houdayer C, Stoppa-Lyonnet D (2013) Germline mutation in the RAD51B gene confers predisposition to breast cancer. *BMC Cancer* 13: 484. doi: 10.1186/1471-2407-13-484
- Gordon SM, Buchwald M (2003) Fanconi anemia protein complex: mapping protein interactions in the yeast 2- and 3-hybrid systems. *Blood* 102: 136-41. doi: 10.1182/blood-2002-11-3517
- Gregory JJ, Jr., Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD (2001) Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2532-7. doi: 10.1073/pnas.051609898
- Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H (2002) Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* 98: 126-35. doi: 69805
- Gruver AM, Miller KA, Rajesh C, Smiraldo PG, Kaliyaperumal S, Balder R, Stiles KM, Albala JS, Pittman DL (2005) The ATPase motif in RAD51D is required for resistance to DNA interstrand crosslinking agents and interaction with RAD51C. *Mutagenesis* 20: 433-40. doi: 10.1093/mutage/gei059
- Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2298-302.
- Habi O, Girard J, Bourdages V, Delisle MC, Carreau M (2010) Correction of Fanconi Anemia Group C Hematopoietic Stem Cells Following Intrafemoral Gene Transfer. *Anemia* 2010. doi: 10.1155/2010/947816
- Hansmann T, Pliushch G, Leubner M, Kroll P, Endt D, Gehrig A, Preisler-Adams S, Wieacker P, Haaf T (2012) Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer. *Hum Mol Genet* 21: 4669-79. doi: 10.1093/hmg/ddc308
- Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28: 739-45. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.015
- Hast R, Engstedt L, Jameson S, Killander A, Lundh B, Reizenstein P, Skarberg KO, Uden AM, Wadman B (1978) Oxymetholone treatment in myelofibrosis. *Blut* 37: 19-26.
- Hirschhorn R, Yang DR, Puck JM, Huie ML, Jiang CK, Kurlandsky LE (1996) Spontaneous in vivo reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nat Genet* 13: 290-5. doi: 10.1038/ng0796-290
- Hoehn H, Kalb R, Neveling K, Friedl R, Bechtold A, Herterich S, Sun Y, Gruhn B, Hanenberg H, Schindler D (2007) Revertant Mosaicism in Fanconi Anemia: Natural Gene Therapy at Work. In: Schmid M (ed) *Fanconi anemia : a paradigmatic disease for the understanding of cancer and aging*, vol Vol. 15, No. , 2007. Karger, Basel, Karger, pp 149-172
- Hoeijmakers JH (2009) DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361: 1475-85. doi: 10.1056/NEJMra0804615
- Huen MS, Chen J (2008) The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res* 18: 8-16. doi: 10.1038/cr.2007.109
- Huff V, Jaffe N, Saunders GF, Strong LC, Villalba F, Ruteshouser EC (1995) WT1 exon 1 deletion/insertion mutations in Wilms tumor patients, associated with di- and trinucleotide repeats and deletion hotspot consensus sequences. *Am J Hum Genet* 56: 84-90.
- Ishiai M, Kitao H, Smogorzewska A, Tomida J, Kinomura A, Uchida E, Saberi A, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, Tashiro S, Elledge SJ, Takata M (2008) FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* 15: 1138-46. doi: nsmb.1504 [pii] 10.1038/nsmb.1504
- Iyama T, Wilson DM, 3rd (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)* 12: 620-36. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071-8. doi: 10.1038/nature08467
- Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB (1981) Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature* 290: 142-3.
-

-
- Joenje H, Patel KJ (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2: 446-57. doi: 10.1038/35076590 35076590 [pii]
- Joseph RE, Andreotti AH (2008) Bacterial expression and purification of interleukin-2 tyrosine kinase: single step separation of the chaperonin impurity. *Protein Expr Purif* 60: 194-7. doi: 10.1016/j.pep.2008.04.001
- Kalb R, Neveling K, Hoehn H, Schneider H, Linka Y, Batish SD, Hunt C, Berwick M, Callen E, Surralles J, Casado JA, Bueren J, Dasi A, Soulier J, Gluckman E, Zwaan CM, van Spaendonk R, Pals G, de Winter JP, Joenje H, Grompe M, Auerbach AD, Hanenberg H, Schindler D (2007) Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 80: 895-910. doi: 10.1086/517616
- Kim YJ, Wilson DM, 3rd (2012) Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol* 5: 3-13.
- Klinke R, Silbernagl S, Bauer C (2003) *Lehrbuch der Physiologie 55 Tabellen*, 4., korrigierte Aufl. edn. Thieme, Stuttgart [u.a.]
- Krawczak M, Cooper DN (1991) Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet* 86: 425-41.
- Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Rabinovitch PS (1985) Cell cycle kinetics by BrdU-Hoechst flow cytometry: an alternative to the differential metaphase labelling technique. *Cell Tissue Kinet* 18: 551-62.
- Kupfer GM (2013) Fanconi Anemia: A Signal Transduction and DNA Repair Pathway. *Yale J Biol Med* 86: 491-497.
- Kurumizaka H, Enomoto R, Nakada M, Eda K, Yokoyama S, Shibata T (2003) Region and amino acid residues required for Rad51C binding in the human Xrcc3 protein. *Nucleic Acids Res* 31: 4041-50.
- Kurumizaka H, Ikawa S, Nakada M, Eda K, Kagawa W, Takata M, Takeda S, Yokoyama S, Shibata T (2001) Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3.Rad51C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5538-43. doi: 10.1073/pnas.091603098
- Kurumizaka H, Ikawa S, Nakada M, Enomoto R, Kagawa W, Kinebuchi T, Yamazoe M, Yokoyama S, Shibata T (2002) Homologous pairing and ring and filament structure formation activities of the human Xrcc2*Rad51D complex. *J Biol Chem* 277: 14315-20. doi: 10.1074/jbc.M105719200
- Lai-Cheong JE, McGrath JA, Uitto J (2011) Revertant mosaicism in skin: natural gene therapy. *Trends Mol Med* 17: 140-8. doi: 10.1016/j.molmed.2010.11.003
- Levrán O, Diotti R, Pujara K, Batish SD, Hanenberg H, Auerbach AD (2005) Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum Mutat* 25: 142-9. doi: 10.1002/humu.20125
- Levrán O, Erlich T, Magdalena N, Gregory JJ, Batish SD, Verlander PC, Auerbach AD (1997) Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13051-6.
- Levy-Lahad E (2010) Fanconi anemia and breast cancer susceptibility meet again. *Nat Genet* 42: 368-9. doi: 10.1038/ng0510-368
- Li X, Heyer WD (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18: 99-113.
- Lim ET, Wurtz P, Havulinna AS, Palta P, Tukiainen T, Rehnstrom K, Esko T, Magi R, Inouye M, Lappalainen T, Chan Y, Salem RM, Lek M, Flannick J, Sim X, Manning A, Ladenvall C, Bumpstead S, Hamalainen E, Aalto K, Maksimow M, Salmi M, Blankenberg S, Ardisino D, Shah S, Horne B, McPherson R, Hovingh GK, Reilly MP, Watkins H, Goel A, Farrall M, Girelli D, Reiner AP, Stitzel NO, Kathiresan S, Gabriel S, Barrett JC, Lehtimäki T, Laakso M, Groop L, Kaprio J, Perola M, McCarthy MI, Boehnke M, Altshuler DM, Lindgren CM, Hirschhorn JN, Metspalu A, Freimer NB, Zeller T, Jalkanen S, Koskinen S, Raitakari O, Durbin R, MacArthur DG, Salomaa V, Ripatti S, Daly MJ, Palotie A, Sequencing Initiative Suomi P (2014) Distribution and medical impact of loss-of-function variants in the Finnish founder population. *PLoS Genet* 10: e1004494. doi: 10.1371/journal.pgen.1004494
- Ling C, Ishiai M, Ali AM, Medhurst AL, Neveling K, Kalb R, Yan Z, Xue Y, Oostra AB, Auerbach AD, Hoatlin ME, Schindler D, Joenje H, de Winter JP, Takata M, Meetei AR, Wang W (2007) FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J* 26: 2104-14. doi: 7601666 [pii] 10.1038/sj.emboj.7601666
- Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, Schild D, Tucker JD, Shen MR, Brookman KW, Siciliano MJ, Walter CA, Fan W, Narayana LS, Zhou ZQ, Adamson AW, Sorensen KJ, Chen DJ, Jones NJ, Thompson LH (1998) XRCC2 and
-

- XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell* 1: 783-93.
- Liu N, Schild D, Thelen MP, Thompson LH (2002) Involvement of Rad51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells. *Nucleic Acids Res* 30: 1009-15.
- Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC (2004) RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* 303: 243-6. doi: 10.1126/science.1093037
- Liu Y, Tarsounas M, O'Regan P, West SC (2007) Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem* 282: 1973-9. doi: 10.1074/jbc.M609066200
- Longerich S, Kwon Y, Tsai MS, Hlaing AS, Kupfer GM, Sung P (2014) Regulation of FANCD2 and FANCI monoubiquitination by their interaction and by DNA. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gku198
- Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, Hughes D, Ruark E, Frankum JR, Bowden G, Kalmyrzaev B, Warren-Perry M, Snape K, Adlard JW, Barwell J, Berg J, Brady AF, Brewer C, Brice G, Chapman C, Cook J, Davidson R, Donaldson A, Douglas F, Greenhalgh L, Henderson A, Izatt L, Kumar A, Laloo F, Miedzybrodzka Z, Morrison PJ, Paterson J, Porteous M, Rogers MT, Shanley S, Walker L, Breast Cancer Susceptibility C, Eccles D, Evans DG, Renwick A, Seal S, Lord CJ, Ashworth A, Reis-Filho JS, Antoniou AC, Rahman N (2011) Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet* 43: 879-82. doi: 10.1038/ng.893
- Loveday C, Turnbull C, Ruark E, Xicola RM, Ramsay E, Hughes D, Warren-Perry M, Snape K, Eccles D, Evans DG, Gore M, Renwick A, Seal S, Antoniou AC, Rahman N (2012) Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet* 44: 475-6; author reply 476. doi: 10.1038/ng.2224
- Ma Y, Schwarz K, Lieber MR (2005) The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)* 4: 845-51. doi: 10.1016/j.dnarep.2005.04.013
- MacMillan ML, Auerbach AD, Davies SM, Defor TE, Gillio A, Giller R, Harris R, Cairo M, Dusenbery K, Hirsch B, Ramsay NK, Weisdorf DJ, Wagner JE (2000) Haematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anaemia using alternate donors: results of a total body irradiation dose escalation trial. *Br J Haematol* 109: 121-9.
- MacMillan ML, Wagner JE (2010) Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia - when and how? *Br J Haematol* 149: 14-21. doi: BJH8078 [pii] 10.1111/j.1365-2141.2010.08078.x
- Makridakis NM, Caldas Ferraz LF, Reichardt JK (2009) Genomic analysis of cancer tissue reveals that somatic mutations commonly occur in a specific motif. *Hum Mutat* 30: 39-48. doi: 10.1002/humu.20810
- Mankad A, Taniguchi T, Cox B, Akkari Y, Rathbun RK, Lucas L, Bagby G, Olson S, D'Andrea A, Grompe M (2006) Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia. *Blood* 107: 3084-90. doi: 10.1182/blood-2005-07-2638
- Masson JY, Stasiak AZ, Stasiak A, Benson FE, West SC (2001a) Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8440-6.
- Masson JY, Tarsounas MC, Stasiak AZ, Stasiak A, Shah R, McIlwraith MJ, Benson FE, West SC (2001b) Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev* 15: 3296-307.
- Matulis D, Kranz JK, Salemme FR, Todd MJ (2005) Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry* 44: 5258-66. doi: 10.1021/bi048135v
- May M (2011) Mutations to the rescue. *Nat Med* 17: 405-7. doi: 10.1038/nm0411-405
- Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin M, Joenje H, de Winter JP, Wang W (2005) A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* 37: 958-63. doi: ng1626 [pii] 10.1038/ng1626
- Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, Freund M, Lichtner P, Hartmann L, Schaal H, Ramser J, Honisch E, Kubisch C, Wichmann HE, Kast K, Deissler H, Engel C, Muller-Myhsok B, Neveling K, Kiechle M, Mathew CG, Schindler D, Schmutzler RK, Hanenberg H (2010) Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 42: 410-4. doi: 10.1038/ng.569
- Miller KA, Hinz JM, Yamada NA, Thompson LH, Albala JS (2005) Nuclear localization of Rad51B is independent of Rad51C and BRCA2. *Mutagenesis* 20: 57-63. doi: 10.1093/mutage/gei011
- Miller KA, Sawicka D, Barsky D, Albala JS (2004) Domain mapping of the Rad51 paralog protein complexes. *Nucleic Acids Res* 32: 169-78.

-
- Miller KA, Yoshikawa DM, McConnell IR, Clark R, Schild D, Albala JS (2002) RAD51C interacts with RAD51B and is central to a larger protein complex in vivo exclusive of RAD51. *J Biol Chem* 277: 8406-11. doi: 10.1074/jbc.M108306200
- Nagaraju G, Hartlerode A, Kwok A, Chandramouly G, Scully R (2009) XRCC2 and XRCC3 regulate the balance between short- and long-tract gene conversions between sister chromatids. *Mol Cell Biol* 29: 4283-94. doi: 10.1128/MCB.01406-08
- Neveling K, Endt D, Hoehn H, Schindler D (2009) Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668: 73-91.
- Noll M, Bateman RL, D'Andrea AD, Grompe M (2001) Preclinical protocol for in vivo selection of hematopoietic stem cells corrected by gene therapy in Fanconi anemia group C. *Mol Ther* 3: 14-23. doi: 10.1006/mthe.2000.0226
- O'Reilly DR, Miller L, Luckow VA (1992) Baculovirus expression vectors a laboratory manual. W.H. Freeman, New York
- Oostra AB, Nieuwint AW, Joenje H, de Winter JP (2012) Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia* 2012: 238731. doi: 10.1155/2012/238731
- Osorio A, Endt D, Fernandez F, Eirich K, de la Hoya M, Schmutzler R, Caldes T, Meindl A, Schindler D, Benitez J (2012) Predominance of pathogenic missense variants in the RAD51C gene occurring in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 21: 2889-98. doi: 10.1093/hmg/dds115
- Park DJ, Lesueur F, Nguyen-Dumont T, Pertesi M, Odefrey F, Hammet F, Neuhausen SL, John EM, Andrulis IL, Terry MB, Daly M, Buys S, Le Calvez-Kelm F, Lonie A, Pope BJ, Tsimiklis H, Voegelé C, Hilbers FM, Hoogerbrugge N, Barroso A, Osorio A, Breast Cancer Family R, Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast C, Giles GG, Devilee P, Benitez J, Hopper JL, Tavtigian SV, Goldgar DE, Southey MC (2012) Rare mutations in XRCC2 increase the risk of breast cancer. *Am J Hum Genet* 90: 734-9. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.02.027
- Park JY, Singh TR, Nassar N, Zhang F, Freund M, Hanenberg H, Meetei AR, Andreassen PR (2013) Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2013.421
- Park JY, Yoo HW, Kim BR, Park R, Choi SY, Kim Y (2008) Identification of a novel human Rad51 variant that promotes DNA strand exchange. *Nucleic Acids Res* 36: 3226-34.
- Park JY, Zhang F, Andreassen PR (2014) PALB2: The hub of a network of tumor suppressors involved in DNA damage responses. *Biochim Biophys Acta* 1846: 263-275. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.06.003
- Pasmooij AM, Jonkman MF, Uitto J (2012) Revertant mosaicism in heritable skin diseases: mechanisms of natural gene therapy. *Discov Med* 14: 167-79.
- Pfeiffer HG, Liebhaufsky HA (1951) The origins of Beer's law. *Journal of Chemical Education* (3) 28 123 - 125. doi: 10.1021/ed028p123
- Pinto FO, Leblanc T, Chamousset D, Le Roux G, Brethon B, Cassinat B, Larghero J, de Villartay JP, Stoppa-Lyonnet D, Baruchel A, Socie G, Gluckman E, Soulier J (2009) Diagnosis of Fanconi anemia in patients with bone marrow failure. *Haematologica* 94: 487-95. doi: 10.3324/haematol.13592
- Poon RY (2014) DNA damage checkpoints in nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 50: 339-44. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.01.009
- Poot M, Gross O, Epe B, Pflaum M, Hoehn H (1996) Cell cycle defect in connection with oxygen and iron sensitivity in Fanconi anemia lymphoblastoid cells. *Exp Cell Res* 222: 262-8. doi: 10.1006/excr.1996.0033
- Rajesh C, Gruver AM, Basur V, Pittman DL (2009) The interaction profile of homologous recombination repair proteins RAD51C, RAD51D and XRCC2 as determined by proteomic analysis. *Proteomics* 9: 4071-86. doi: 10.1002/pmic.200800977
- Rashid MU, Muhammad N, Faisal S, Amin A, Hamann U (2014) Deleterious RAD51C germline mutations rarely predispose to breast and ovarian cancer in Pakistan. *Breast Cancer Res Treat* 145: 775-84. doi: 10.1007/s10549-014-2972-0
- Reuter T, Herterich S, Bernhard O, Hoehn H, Gross HJ (2000) Strong FANCA/FANCG but weak FANCA/FANCC interaction in the yeast 2-hybrid system. *Blood* 95: 719-20.
-

-
- Rickman KA, Lach FP, Abhyankar A, Donovan FX, Sanborn EM, Kennedy JA, Sougnez C, Gabriel SB, Elemento O, Chandrasekharappa SC, Schindler D, Auerbach AD, Smogorzewska A (2015) Deficiency of UBE2T, the E2 Ubiquitin Ligase Necessary for FANCD2 and FANCI Ubiquitination, Causes FA-T Subtype of Fanconi Anemia. *Cell Rep* 12: 35-41. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.014
- Rihs HP, Hoffmeyer F, Bruning T (2009) [DNA repair: from the mechanisms to the impact on occupational research]. *Pneumologie* 63: 319-24. doi: 10.1055/s-0029-1214671
- Rodrigue A, Lafrance M, Gauthier MC, McDonald D, Hendzel M, West SC, Jasin M, Masson JY (2006) Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *Embo J* 25: 222-31.
- Romick-Rosendale LE, Lui VW, Grandis JR, Wells SI (2013) The Fanconi anemia pathway: repairing the link between DNA damage and squamous cell carcinoma. *Mutat Res* 743-744: 78-88. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.01.001
- Rose SR, Kim MO, Korbee L, Wilson KA, Ris MD, Eyal O, Sherafat-Kazemzadeh R, Bollepalli S, Harris R, Jeng MR, Williams DA, Smith FO (2014) Oxandrolone for the treatment of bone marrow failure in Fanconi anemia. *Pediatr Blood Cancer* 61: 11-9. doi: 10.1002/pbc.24617
- Rosenberg PS, Tamary H, Alter BP (2011) How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *Am J Med Genet A* 155A: 1877-83. doi: 10.1002/ajmg.a.34087
- Rosendorff J, Bernstein R, Macdougall L, Jenkins T (1987) Fanconi anemia: another disease of unusually high prevalence in the Afrikaans population of South Africa. *Am J Med Genet* 27: 793-7. doi: 10.1002/ajmg.1320270408
- Rougier F, Dupuis F, Denizot Y (1996) Human bone marrow fibroblasts--an overview of their characterization, proliferation and inflammatory mediator production. *Hematol Cell Ther* 38: 241-6.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
- Sawyer SL, Tian L, Kahkonen M, Schwartzentruber J, Kircher M, University of Washington Centre for Mendelian G, Consortium FC, Majewski J, Dymant DA, Innes AM, Boycott KM, Moreau LA, Moilanen JS, Greenberg RA (2015) Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discov* 5: 135-42. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1156
- Scheckenbach K, Baldus SE, Balz V, Freund M, Pakropa P, Sproll C, Schafer KL, Wagenmann M, Schipper J, Hanenberg H (2014) RAD51C - A new human cancer susceptibility gene for sporadic squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *Oral Oncol* 50: 196-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.11.007
- Scheckenbach K, Morgan M, Filger-Brillinger J, Sandmann M, Strimling B, Scheurlen W, Schindler D, Gobel U, Hanenberg H (2012) Treatment of the bone marrow failure in Fanconi anemia patients with danazol. *Blood Cells Mol Dis* 48: 128-31. doi: 10.1016/j.bcmd.2011.11.006
- Schild D, Lio YC, Collins DW, Tsomondo T, Chen DJ (2000) Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J Biol Chem* 275: 16443-9.
- Schindler D, Endt D, Neveling K (2012) Fanconi Anemia. In: Schwab M (ed) *Encyclopedia of Cancer*, 3 edn. Springer
- Schindler D, Hoehn H (1988) Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am J Hum Genet* 43: 429-35.
- Schindler D, Hoehn H (2007) *Fanconi anemia : a paradigmatic disease for the understanding of cancer and aging*. Karger, Basel ; New York
- Schroeder-Kurth TM (1989) *Fanconi anemia : clinical, cytogenetic and experimental aspects*. Springer, Berlin [u.a.]
- Schroeder TM, Drings P, Beilner P, Buchinger G (1977) Clinical and cytogenetic observations during a six-year period in an adult with Fanconi's anaemia. *Blut* 34: 119-32.
- Shamseldin HE, Elfaki M, Alkuraya FS (2012) Exome sequencing reveals a novel Fanconi group defined by XRCC2 mutation. *J Med Genet* 49: 184-6. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100585
- Sigurdsson S, Van Komen S, Bussen W, Schild D, Albala JS, Sung P (2001) Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev* 15: 3308-18. doi: 10.1101/gad.935501
-

-
- Singh TR, Bakker ST, Agarwal S, Jansen M, Grassman E, Godthelp BC, Ali AM, Du CH, Roomans MA, Fan Q, Wahengbam K, Steltenpool J, Andreassen PR, Williams DA, Joenje H, de Winter JP, Meetei AR (2009) Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M. *Blood* 114: 174-80. doi: 10.1182/blood-2009-02-207811
- Sinha RP, Hader DP (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1: 225-36.
- Somyajit K, Subramanya S, Nagaraju G (2012) Distinct roles of FANCO/RAD51C protein in DNA damage signaling and repair: implications for Fanconi anemia and breast cancer susceptibility. *J Biol Chem* 287: 3366-80. doi: 10.1074/jbc.M111.311241
- Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, Esperou H, Ferry C, Jubert C, Feugeas JP, Henri A, Toubert A, Socie G, Baruchel A, Sigaux F, D'Andrea AD, Gluckman E (2005) Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood* 105: 1329-36. doi: 10.1182/blood-2004-05-1852
- Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41: 207-34.
- Suhasini AN, Brosh RM, Jr. (2012) Fanconi anemia and Bloom's syndrome crosstalk through FANCD1-BLM helicase interaction. *Trends Genet* 28: 7-13. doi: 10.1016/j.tig.2011.09.003
- Suwaki N, Klare K, Tarsounas M (2011) RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol* 22: 898-905. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.07.019
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Fukushima T, Morrison C, Albala JS, Swagemakers SM, Kanaar R, Thompson LH, Takeda S (2000) The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* 20: 6476-82.
- Taniguchi T, D'Andrea AD (2006) Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* 107: 4223-33. doi: 10.1182/blood-2005-10-4240
- Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, Scheerer JB, Siciliano MJ, Hwang M, Liu N, Legerski RJ, Thompson LH (1995) Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6354-8.
- Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR (2004) *Thomas' hematopoietic cell transplantation : stem cell transplantation, 3rd ed. edn.* Malden, Mass. : Blackwell Pub., 2004, United States
- Thomas P, Smart TG (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51: 187-200. doi: 10.1016/j.vascn.2004.08.014
- Thompson LH, Schild D (1999) The contribution of homologous recombination in preserving genome integrity in mammalian cells. *Biochimie* 81: 87-105.
- Thompson LH, Schild D (2002) Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 509: 49-78.
- Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, Moses R, Grompe M (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 7: 241-8.
- Tolar J, Adair JE, Antoniou M, Bartholomae CC, Becker PS, Blazar BR, Bueren J, Carroll T, Cavazzana-Calvo M, Clapp DW, Dagleish R, Galy A, Gaspar HB, Hanenberg H, Von Kalle C, Kiem HP, Lindeman D, Naldini L, Navarro S, Renella R, Rio P, Sevilla J, Schmidt M, Verhoeyen E, Wagner JE, Williams DA, Thrasher AJ (2011) Stem cell gene therapy for fanconi anemia: report from the 1st international Fanconi anemia gene therapy working group meeting. *Mol Ther* 19: 1193-8. doi: 10.1038/mt.2011.78
- Tough DF, Sprent J (1995) Life span of naive and memory T cells. *Stem Cells* 13: 242-9. doi: 10.1002/stem.5530130305
- Tu Z, Aird KM, Bitler BG, Nicodemus JP, Beechery N, Xia B, Yen TJ, Zhang R (2011) Oncogenic RAS regulates BRIP1 expression to induce dissociation of BRCA1 from chromatin, inhibit DNA repair, and promote senescence. *Dev Cell* 21: 1077-91. doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.010
- Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13: 213-7.
- Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, Neveling K, Endt D, Kesterton I, Autore F, Fraternali F, Freund M, Hartmann L, Grimwade D, Roberts RG, Schaal H, Mohammed S, Rahman N, Schindler D, Mathew CG (2010) Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet* 42: 406-9. doi: ng.570 [pii]10.1038/ng.570
-

-
- Virts EL, Jankowska A, Mackay C, Glaas MF, Wiek C, Kelich SL, Lottmann N, Kennedy FM, Marchal C, Lehnert E, Scharf RE, Dufour C, Lanciotti M, Farruggia P, Santoro A, Savasan S, Scheckenbach K, Schipper J, Wagenmann M, Lewis T, Leffak M, Farlow JL, Foroud TM, Honisch E, Niederacher D, Chakraborty SC, Vance GH, Pruss D, Timms KM, Lanchbury JS, Alpi AF, Hanenberg H (2015) AluY-mediated germline deletion, duplication and somatic stem cell reversion in UBE2T defines a new subtype of Fanconi anemia. *Hum Mol Genet* 24: 5093-108. doi: 10.1093/hmg/ddv227
- Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CG, Hoatlin ME, Ianzano L, Gibson RA, Arwert F, Savoia A, Mathew CG, Pronk JC, Joenje H (1999) Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet* 22: 379-83. doi: 10.1038/11956
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945-51.
- Wang AT, Kim T, Wagner JE, Conti BA, Lach FP, Huang AL, Molina H, Sanborn EM, Zierhut H, Cornes BK, Abhyankar A, Sougnez C, Gabriel SB, Auerbach AD, Kowalczykowski SC, Smogorzewska A (2015) A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol Cell* 59: 478-90. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.009
- Wang LC, Gautier J (2010) The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 424-39. doi: 10.3109/10409238.2010.502166
- Wang W (2007) Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* 8: 735-48. doi: nrg2159 [pii]10.1038/nrg2159
- Whitelaw DM (1966) The intravascular lifespan of monocytes. *Blood* 28: 455-64.
- Wickham TJ, Davis T, Granados RR, Shuler ML, Wood HA (1992) Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog* 8: 391-6. doi: 10.1021/bp00017a003
- Wiese C, Collins DW, Albala JS, Thompson LH, Kronenberg A, Schild D (2002) Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and XRCC3 in human cells. *Nucleic Acids Res* 30: 1001-8.
- Wiese C, Hinz JM, Tebbs RS, Nham PB, Urbin SS, Collins DW, Thompson LH, Schild D (2006) Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 34: 2833-43. doi: 10.1093/nar/gkl366
- Wijker M, Morgan NV, Herterich S, van Berkel CG, Tipping AJ, Gross HJ, Gille JJ, Pals G, Savino M, Altay C, Mohan S, Dokal I, Cavenagh J, Marsh J, van Weel M, Ortega JJ, Schuler D, Samochatova E, Karwacki M, Bekassy AN, Abecasis M, Ebell W, Kwee ML, de Ravel T, Mathew CG, et al. (1999) Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Hum Genet* 7: 52-9. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200248
- Williams GJ, SilDas S, Anand A, Schild D, Tainer JA (2015) 204 Structural insights into the RAD51 paralog complexes reveal molecular details of disease causing mutations. *J Biomol Struct Dyn* 33 Suppl 1: 137. doi: 10.1080/07391102.2015.1033150
- Wu Q, Kim YC, Lu J, Xuan Z, Chen J, Zheng Y, Zhou T, Zhang MQ, Wu CI, Wang SM (2008) Poly A- transcripts expressed in HeLa cells. *PLoS One* 3: e2803. doi: 10.1371/journal.pone.0002803
- Xie W, Yang X, Xu M, Jiang T (2012) Structural insights into the assembly of human translesion polymerase complexes. *Protein Cell* 3: 864-74. doi: 10.1007/s13238-012-2102-x
- Yokoyama H, Sarai N, Kagawa W, Enomoto R, Shibata T, Kurumizaka H, Yokoyama S (2004) Preferential binding to branched DNA strands and strand-annealing activity of the human Rad51B, Rad51C, Rad51D and Xrcc2 protein complex. *Nucleic Acids Res* 32: 2556-65. doi: 10.1093/nar/gkh578
- Yousefi S, Simon HU (2002) Granulocyte apoptosis: death by a secreted lipocalin? *Cell Death Differ* 9: 595-7. doi: 10.1038/sj/cdd/4401037
- Yousoufian H, Pyeritz RE (2002) Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet* 3: 748-58. doi: 10.1038/nrg906
- Yuan C, Liu X, Yan S, Wang C, Kong B (2014) Analyzing association of the XRCC3 gene polymorphism with ovarian cancer risk. *Biomed Res Int* 2014: 648137. doi: 10.1155/2014/648137
- Zhang QS, Marquez-Loza L, Eaton L, Duncan AW, Goldman DC, Anur P, Watanabe-Smith K, Rathbun RK, Fleming WH, Bagby GC, Grompe M (2010) *Fancd2*^{-/-} mice have hematopoietic defects that can be partially corrected by resveratrol. *Blood* 116: 5140-8. doi: blood-2010-04-278226 [pii] 10.1182/blood-2010-04-278226
-

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
3'-OH	Hydroxygruppe am 3' Ende
A	Adenin
AD	VP16-Aktivierungsdomäne (pVP16-Vektor)
AK	Antikörper
AT	Ataxia telangiectasia
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B-LCL	Blutlymphozytenzelle
B-LCLs	Blut-Lymphozytenzellen
BD	Bindedomäne
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar
BRCA	breast cancer tumor suppressor protein
BRIP	BRCA1 interacting protein
BS	Bloom Syndrom
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka
cDNA	complementary DNA
Co-IP	Co-Immumopräzipitation
CS	Cockayne Syndrom
DE	Deutschland
DEB	Diepoxybutan
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxynukleotid – Triphosphate
DDR	DNA-damage response (DNA-Schadensantwort)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-BD	GAL4-DNA-Bindedomäne (pM-Vektor)
dNTPs	Desoxynukleotid- Triphosphate
dsDNA	Doppelstrang DNA

DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
F	vorwärts (forward)
FA	Fanconi Anämie
FA- (D2)	Fanconi-Anämie Untergruppe- (D2)
<i>FANC-</i> (D2)	Fanconi-Anämie-Gen (D2)
FANCD2-L	Fanconi-Anämie-Protein D2, monoubiquitinierte Form
FANCD2-S	Fanconi-Anämie-Protein D2, native Form
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G2	Gap2-Phase
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
HSE-Puffer	Harnstoff-Saccharose-EDTA-Puffer
ICL	Interstrang-Crosslink-Reparatur
kDA	Kilodalton
M	Molar
MEM	minimal essential medium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMC	Mitomycin C
MMR	Missmatchreparatur (Basenfehlpaarungsreparatur)
mut-	mutierter Typ
mRNA	Messenger-RNA
MW	Mittelwert
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NES	nuclear export sequence (Kernexportsequenz)
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NLS	nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal)

ng	Nanogramm
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PHA	Phytohämagglutinin
pM	Pikomol
Pol III	Polymerase III
R	rückwärts (reverse)
RLE	relative Lichteinheiten
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Spleiß-Akzeptor
SD	Spleiß-Donor
SDS	Sodium dodecyl sulfate oder Natriumdodecylsulfat
SNP	Short Nucleotide Polymorphism
ssDNA	single strand DNA
STABWN	Standardabweichung
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TLS	Translänionssynthese
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTD	Trichothiodystrophie
U	Unit
UAS	upstream activating sequence
UV	ultraviolett
V	Volt
WS	Werner Syndrom
wt	Wildtyp
(w/v)	weight per volume
XP	Xeroderma pigmentosum

Primersequenzen

In Mosaikstudien verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')
FAA, gDNA Ex 10 for ¹	CAC TGC AGC CCA GAC TGT AA
FAA, gDNA Ex 10 rev ¹	CAG GAA AAG GCT GAC CAG AG
FAA, gDNA Ex 11 for ¹	AGT GGC CTG GCC AAG AAA GCC
FAA, gDNA Ex 11 rev ¹	GTC CTA GAA TTC CTG GCA TCT CC
FAA, gDNA Ex 25 for ²	TTC TTC GGC CGC TGG TGG TTG
FAA, gDNA Ex 25 rev ²	CGA GAA TGA GGG TGG CAG AGC AGA
FAA, gDNA Ex 35 for ¹	GGA TCC TCC TGT CAG CTT CTT G
FAA, gDNA Ex 35 rev ¹	TTT CCC TGA GAT GGT AAC ACC
FAA, gDNA Ex 40 for ¹	CCA GCT GCT GAC AGG TAC
FAA, gDNA Ex 40 rev ¹	CAT CTC AGC ACC TCT GGG TCC
FANCD2_Ex12_for ¹	AGA TTG TCA TGG TAG AGA GCC TGG
FANCD2_Ex12_rev ¹	GAT CGG AGT TCC TGC CAT GT
FAD2, gDNA Ex 26 for unique ²	CAC ATA CGA ATT TCA ATA GGG AGT TC
FAD2, gDNA Ex 26 rev unique ²	CTC GTG CCC AGC TGA TAT TTT TAA TG
FA-D2, gDNA_Ex 28_F ³	TCT TCT ACC TCT AGG CAG TTT
FA-D2, gDNA_Ex_28 rev ³	ACC GAT TAC TCC AAC GCC TAA
FAD2, gDNA Ex 35 for ⁴	TTA GAC CGG GAA CGT CTT AGT
FAD2, gDNA Ex 35 rev ⁴	GTC CAG TCT CTG ACA AAC AAC
FANCD2_Ex37 II_for ¹	CAT CCT CTT ACT AAG GAC CCT AGT GAA AG
FANCD2_Ex37 II_rev ¹	CAG CAA CTT CCA AGT AAT CCA AAG TCC AC

Hersteller: 1 Biologio, 2 SIGMA Genosys, 3 MWG -Biotech AG, 4 TIB MOLBIOL

Primer für herkömmliche Klonierung

in die Vektoren *pM* und *pVP16* (Mammalian Two-Hybrid Assay)

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')
EcoRI_RAD51B_f	cgc gaattc <i>CTG</i> GGT AGC AAG AAA CTA AAA CGA GTG G
HindIII_RAD51B_r	ccc <u>aagctt</u> TTA AAA AAT TAG CTG GGT ATG GTG GCAC
EcoRI_RAD51C_f	cgc <u>gaattc</u> <i>CTG</i> CGC GGG AAG ACG TTC CGC TTT
PstI_RAD51C_r	aaa ctgcag TTA TAA TTC TTC CTC TGG GTC TCG TGAC C
EcoRI_RAD51D_f	cgc <u>gaattc</u> <i>CTG</i> GGC GTG CTC AGG GTC G
EcoRI_RAD51D_r	cgc <u>gaattc</u> TCA TGT CTG ATC ACC CTG TAA TGT GG
XRCC2 EcoRI_f	cgc <u>gaattc</u> <i>CTG</i> TGT AGT GCC TTC CAT AGG G
XRCC2 SalI_r	acgc <u>gtcgac</u> TCA ACA AAA TTC AAC CCC ACT TTC TC
EcoRI_XRCC3f	cgc <u>gaattc</u> <i>CTG</i> GAT TTG GAT CTA CTG GAC CTG AAT CCC
HindIII_XRCC3r	ccc <u>aagctt</u> TCA GTG GGA CTG GGT CCC AGG T

kleine Buchstaben: zusätzlich eingefügte Nukleotide für bessere Bindung der Restriktionsenzyme, Unterstrichen: Schnittstellen für Restriktionsenzyme; große Buchstaben: Gensequenz; große, kursive Buchstaben: durch Leucin (CTG) ersetztes Startcodon (ATG); Hersteller: Sigma-Aldrich

Sequenzierprimer zur Überprüfung der inserierten Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')
<i>plasmid-interne Primer (pM-/pVP16-Vektor)</i>	
pM_BD_msc_f	CAT CAT CGG AAG AGA GTA G
pVP16_AD_mscf	GCC GAC TTC GAG TTT GAG
pM_pVP16_msc_r	GTA TGG CTG ATT ATG ATC ATT TAC
<i>RAD51B-Primer</i>	
Rad51b_134_f	GTT ATC GAG GTG TCC ATG AAC TTC TAT G
Rad51b_448_f	GAA AGA CTG GTT GAA ATA GCA GAA TCC C
sRad51b_716_f	CAT CCT CCT TGA AGT ATT TGG CTG AG
<i>RAD51C-Primer</i>	
cRAD51c_1forseq	CGA GCT TAG CAA AGA AGT TGG GAT ATC
cRAD51c_1rseq	CTC TTC TGA TAA TTT GCA GAG TTT CTA AGG
cRAD51c_2forseq	CCA GGT GTT GGA AAA ACA CAA TTA TGT ATG
cRAD51c_3forseq	CTG TCG TGA CTA CAC AGA GTT ACT G
cRAD51c_4forseq	GAT AGA AAT CAG GCC TTG CTT GTT CC
cRAD51c_Rev	GTA ACA AGT CCA CTT GTA CAC ATT GAT TTC
<i>RAD51D-Primer</i>	
RAD51D_255f	CAT TGG CAG TCT TGA TAA ACT
RAD51D_762r	GTC TCG AGT TAT GTG GTT G
<i>XRCC2-Primer</i>	
XRCC2_244f	GAT ACA GAT TAC CAC TTT GAT ATG
XRCC2_578f	CAA CGA CAC AAA CTA TAA TGC AG
<i>XRCC3-Primer</i>	
XRCC3_180_f	CAG CAT CCT TAC AGC ACT GCA GC
XRCC3_155_r	GTT CTC AGC AAG TGC CAG ACC TC
XRCC3_505_f	CTG CTT CAG AAG CTC CGA TTT GGC AG
XRCC3_554_r	GCC ACG TGC TCG ATG AAG ATC TG
sXRCC3_818_f	TGG GGT TCT GGG ACG AAC GTG TTTC

Hersteller: Biolegio

Primer für Mutgenesen:**hRAD51C**

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
51C_c404G->A_f	GGAAAAACACAATTAT A TATGCAGTTGGCAGTAG
51C_c404G->A_r	CTACTGCCAACTGCATA T ATAAATTGTGTTTTC
51C_c656T->C_f	CGTGACTACACAGAGT C ACTGGCACAAGTTTATC
51C_c656T->C_r	GATAAACTTGTGCCAGT G ACTCTGTGTAGTCACG
51C_c341G->A_f	GATATTCTTGGGGGTG A AGTGCCCTTAATGAAAAC
51C_c341G->A_r	GTTTTTCATTAAGGGCACT T CACCCCCAAGAATATC
51C_308delTCT_f	GGCTTCATAATCACCT - GTTCAGCACTAGATG
51C_308delTCT_r	CATCTAGTGCTGAAC - AGGTGATTATGAAGCC
51C_c485G->A_f	GCAGTTTTTATTGATACAGAGG A AAGTTTTATGGTTGATAG
51C_c485G->A_r	CTATCAACCATAAAACTT T CCTCTGTATCAATAAAAACTGC
51C_c89C->A_f	GAAGCTGGTGTCTG A GGGGTTCCAGACTGC
51C_c89C->A_r	GCAGTCTGGAACCCC T CAGACACCAGCTTC
51C_c428A->G_f	GTTGGCAGTAGATGTGC G GATACCAGAATGTTTTGG
51C_c428A->G_r	CCAAAACATTTCTGGTATC C GCACATCTACTGCCAAC
51C_c772C->T_f	CTAGATGACCTGTCTCTT T G TACTCGGTTATTAATG
51C_c772C->T_r	CATTTAATAACCGAGTAC G AAGAGACAGGTCATCTAG
51C_c341G->T_f	GATATTCTTGGGGGTG T AGTGCCCTTAATGAAAAC
51C_c341G->T_r	GTTTTTCATTAAGGGCACT A CACCCCCAAGAATATC
51C_c745C->T_f	GGTATTGCTTTTTCCATTT T GTCATGACCTAGATGAC
51C_c745C->T_r	GTCATCTAGGTCATGAC A AAATGGAAAAGCAATACC

hRAD51D

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
RAD51D_c334G->A_f	GTAGGAGGCCAGGTAGC A GCAAACCTCAGGTATG
RAD51D_c334G->A_r	CATACCTGAGTTTTGC T GCTACCTGGGCCCTCCTAC
RAD51D_c796C->T_f	CAAACCTGCCCTCGGA T GCTCCTGGAGCTTTG
RAD51D_c796C->T_r	CAAAGCTCCAGGAGC A TCCGAGGGCAGGTTTG

Primer für die In-Fusion-Klonierung**hRAD51 (Mammalian Two-/Three-Hybrid Assay)**

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Plasmid
pVP_RAD51 M2H_Eco_f	gacgagtacggtggg AAT TCC TGG CAA TGC AGA TG	pVP16
pVP_RAD51 M2H_Sal_r	agcttctgcagacgcgtcgac TCA GTC TTT GGC ATC T	pM/pVP16
pM_RAD51 M2H_Eco_f	ttagctgtatcgccgaattc CTG GCA ATG CAG ATG	pM

kleine Buchstaben: Vektorsequenz, große Buchstaben: Gensequenz; Hersteller: Biolegio

hRAD51C (Strukturanalysen)

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')	Plasmid
rad51cf_ncoI	tttcagggcgccATG CGC GGG AAG ACG TTC CGC TTT GA	pETM-11 / pBADM-11
rad51cr_hindIII	gtgcggccgcaagctTTA TAA TTC TTC CTC TGG GTC T	pETM-11 / pBADM-11
rad51cr_XhoI**	gggtggtgctcgagTAA TTC TTC CTC TGG GTCT	pBADM-11, ohne Stopp
rad51cf_NdeI	aaggagatatacatag CGC GGG AAG ACG TTC CGC TTT GA	pET21-b (+)
rad51cr_XhoI	gggtggtgctcgac TAA TTC TTC CTC TGG GTC TCG TGA CCG T	pET21-b (+) ohne Stopp
rad51c_NcoIf (pFastBacHTa)	tttcagggcgcc atgCGC GGG AAG ACG TTC CGC TTT GA	pFastBacHTa
rad51c_XhoIr* (pFast- BacHTa)	taccgcatgcctcgag TTA TAA TTC TTC CTC TGG GTC TCG TGA CCG T	pFastBacHTa

* N-terminaler 6x His-TAG, ** ohne Stopp (TAA) -> Nutzung c-terminaler 6X His-TAG; kleine Buchstaben: Vektorsequenz, große Buchstaben: Gensequenz; Hersteller: Biologio

Primer für die In-Fusion-Klonierung XRCC3 - virale Infektion

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')	Plasmid
XRCC3f_ncoI*	tttcagggcgccatg GAT TTG GAT CTA CTG GAC CTG	pBADM-11
XRCC3r_hindIII	gtgcggccgcaagctTCA GTG GGA CTG GGT CCC AG	pBADM-11
XRCC3_NcoIf	tttcagggcgccatgGAT TTG GAT CTA CTG GAC CTG	pFastBacHTa
XRCC3_XhoIr*	taccgcatgcctcgagTCA GTG GGA CTG GGT CCC AG	pFastBacHTa

* N-terminaler 6x His-TAG, ** ohne Stopp (TAA) -> Nutzung c-terminaler 6x His-TAG; kleine Buchstaben: Vektorsequenz, große Buchstaben: Gensequenz; Hersteller: Biologio

Umklonierung Codon-optimiertes hRAD51C (aus pFastBacHTa-inkl. His-Tag down-stream of PH Promotor) und hXRCC3 (downstream p10 Promotor) in pFastBac-Dual

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')	Plasmid
hRAD51C_EcoRI-f (pFastBac-Dual)	cggtcggaagcgcgcggaatt GAT CTC GGT CCG AAA CCA TGT CG	pFastBac-Dual
hRAD51C_HindIII-r (pFastBac-Dual)	gtacttctcgacaagctt TT ATA ATT CTT CCT CTG GGT CTC GTG ACC	pFastBac-Dual
hXRCC3_XhoI-f (pFastBac-Dual)	ttgatcaccgggatctcgag ATG GAT TTG GAT CTA CTG GAC CTG	pFastBac-Dual
hXRCC3_KpnI-r (pFastBac-Dual)	cctccccatctccggtacc TCA GTG GGA CTG GGT CCC AG	pFastBac-Dual

kleine Buchstaben: Vektorsequenz, große Buchstaben: Gensequenz; Hersteller: Biologio;

Primer für Codon-optimiertes hRAD51C

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')	Plasmid
<i>Infusion Klonierung</i>		
rad51cf_NcoI_11	tttcagggcgcc ATG CGT GGT AAA ACC TTT CGT TT	pETM-11
rad51cr_XhoI_11	gtgggtgggtgggtgctcgag TTA CAG TTC TTC TTC CGG ATC	pETM-11
rad51cf_NcoI_28	taagaaggagatatacc ATG CGT GGT AAA ACC TTT CGT TT	pET28a(+)
rad51cr_XhoI_28**	gtgggtgggtgggtg CTC GAG CAG TTC TTC TTC CGG ATC ACG	pET28a(+) (ohne Stop)
<i>Reinsertion Stop in pET28a(+)</i>		
pET28a Stop F	CCGGAAGAAGAAGACTGTA ACT CGAGCACCACCAC	
pET28a Stop R	GTGGTGGTGCTCGAG TTACAGTTC TTCITCCGG	
<i>Sequenzierung</i>		
rad51c_opt280r	CCT GTT CCA GCA GTT CCA G	
rad51c_opt224f	ATG CAG GCA CCA GCG AAA G	
rad51c_opt571f	GAA CAT CGT AAA GCC CTG G	
rad51c_opt835f	GCA GTT ATT CTG ACC AAT CAG	

kleine Buchstaben: Vektorsequenz, große Buchstaben: Gensequenz; **ohne Stop: c-terminaler 6x His Tag; kursiv: Stopkodon Hersteller: Biolegio

Primer zur Generierung von DNA-Strukturen für DNA-Bindungsstudien

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')	Label
Hef_bottom_5'Cy3	AGC TAT GAC CAT GAT TAC GAA TTG CTT GGA ATC CTG ACG AAC TGT AG	5'Cy3
Hef_bot_3'-15	AGC TAT GAC CAT GAT TAC GAA TTG CTT AAT TCG T	
Hef_bot	AGC TAT GAC CAT GAT TAC GAA TTG CTT GGA ATC CTG ACG AAC TGT AG	
Hef_top_3'Cy3	AGC TAC CAT GCC TGC ACG AAT TAA GCA ATT CGT AAT CAT GGT CAT AGC T	3'Cy3
Hef_top_5'-15	ATT CCA AGC AAT TCG TAA TCA TGG TCA TAG CT	

konzipiert von Florian Rohleder, AG Kisker, Rudolf Virchow Zentrum, Würzburg, Hersteller: Biomers

Codon-Optimierung

E. coli-Codon-optimierte Sequenz des humanen *RAD51C* in pMA-T

KpnI

*ggtacc*ATGCGTGGTAAAAACCTTTTCGTTTTGAAATGCAGCGTGATCTGGTTAGCTTTCCGCT-
 GAGTCCGGCAGTTCGTGTTAAACTGGTTAGCGCAGGTTTTTCAGACCCGAGAAGAAGCTGCTG-
 GAAGTTAAACCGAGCGAACTGAGCAAAGAAGTTGGTATTAGCAAAGCAGAAGCACTGGAAAC-
 CCTGCAGATTATTCGTGCGTGAATGTCTGACCAATAAACCGCGTTATGCAGGCACCA-
 GCGAAAGCCATAAAAAATGTACCGCACTGGAACCTGCTGGAACAGGAACATACCCAGGGTTT-
 TATTATTACCTTTTGTAGCGCACTGGATGATATTCTGGGTGGTGGTGTCCGCTGATGAAAAC-
 CACCGAAATTTGTGGTGCACCGGGTGTGGTAAAACCCAGCTGTGTATGCAGCTGGCAGTT-
 GATGTTTCCAGATTCCGGAATGTTTTGGTGGTGTGCGCGTGAAGCAGTTTTTTATTGATAC-
 CGAAGGTAGCTTTATGGTTGATCGTGTGTTGATCTGGCAACCGCATGTATTCA-
 GCATCTGCAGCTGATTGCCGAAAAACACAAAGGTGAAGAACATCGTAAAGCCCTGGAAGATT-
 TACCCTGGATAATATTCTGAGCCATATTTATTATTTTCGCTGCCGTGATTATAC-
 CGAACTGCTGGCCAGGTTTATCTGCTGCCGATTTTCTGAGCGAACATTCAAAAGTT-
 CGTCTGGTTATTGTGGATGGTATTGCATTTCCGTTTCGTCATGATCTGGATGATCT-
 GAGCCTGCGTACCCGCTGCTGAATGGTCTGGCACAGCAGATGATTAGCCTGGCAAATAAT-
 CATCGTCTGGCAGTTATTCTGACCAATCAGATGACCACCAAAATTGATCGTAATCA-
 GGCAGTCTGGTTCCGGCACTGGGTGAAAGCTGGGGTCATGCAGCAACCATTCTGCTGATTT-
 TTCATTGGGATCGTAAACAGCGTCTGGCAACCCGTATAAAAAGCCCGAGCCAGAAAGAATG-
 TACCGTTCTGTTTCAGATTAAACCGCAGGGTTTTCTGTGATACCGTTGTTACCAGCGCATG-
 TAGCCTGCAGACCGAAGGTAGTCTGAGCACCCGTAAACGTAGCCGTGATCCGGAAGAAGAAGCTGTA*Agagctc*

SacI

Hersteller: GENEART, Regensburg, DE

Vektorkarten

Humane Expressionsvektoren

(Mammalian Two-Three-Hybrid Assay / Co-Immunopräzipitation)

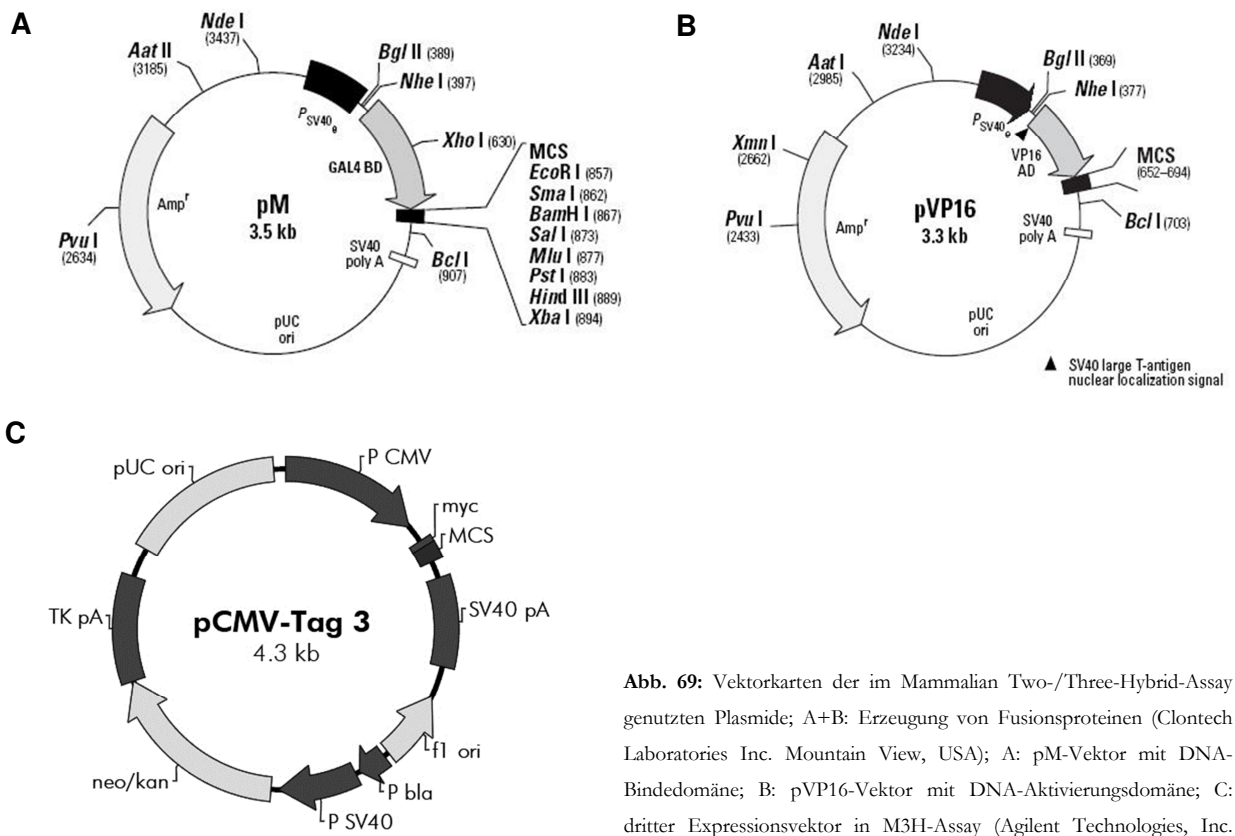


Abb. 69: Vektorkarten der im Mammalian Two-/Three-Hybrid-Assay genutzten Plasmide; A+B: Erzeugung von Fusionsproteinen (Clontech Laboratories Inc. Mountain View, USA); A: pM-Vektor mit DNA-Bindedomäne; B: pVP16-Vektor mit DNA-Aktivierungsdomäne; C: dritter Expressionsvektor in M3H-Assay (Agilent Technologies, Inc.)

Luciferase-Reporter-Vektoren (Mammalian Two-Three-Hybrid Assay)

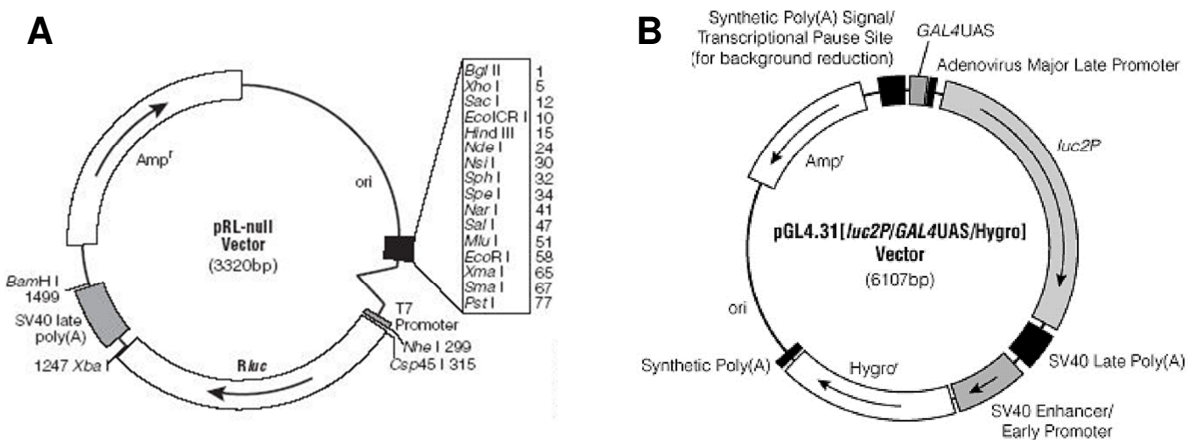


Abb. 70: Karten der im Dual-Luciferase-Assay genutzten luciferasetragenden Reportergenvektoren A: pRL-null mit konstitutiver Renilla-Luciferase, B: pGL4.31[luc2P/GAL4UAS/Hygro] mit anschaltbarer Fire Fly-Luciferase (Promega Corp., Madison, USA)

Expression in Bakterien

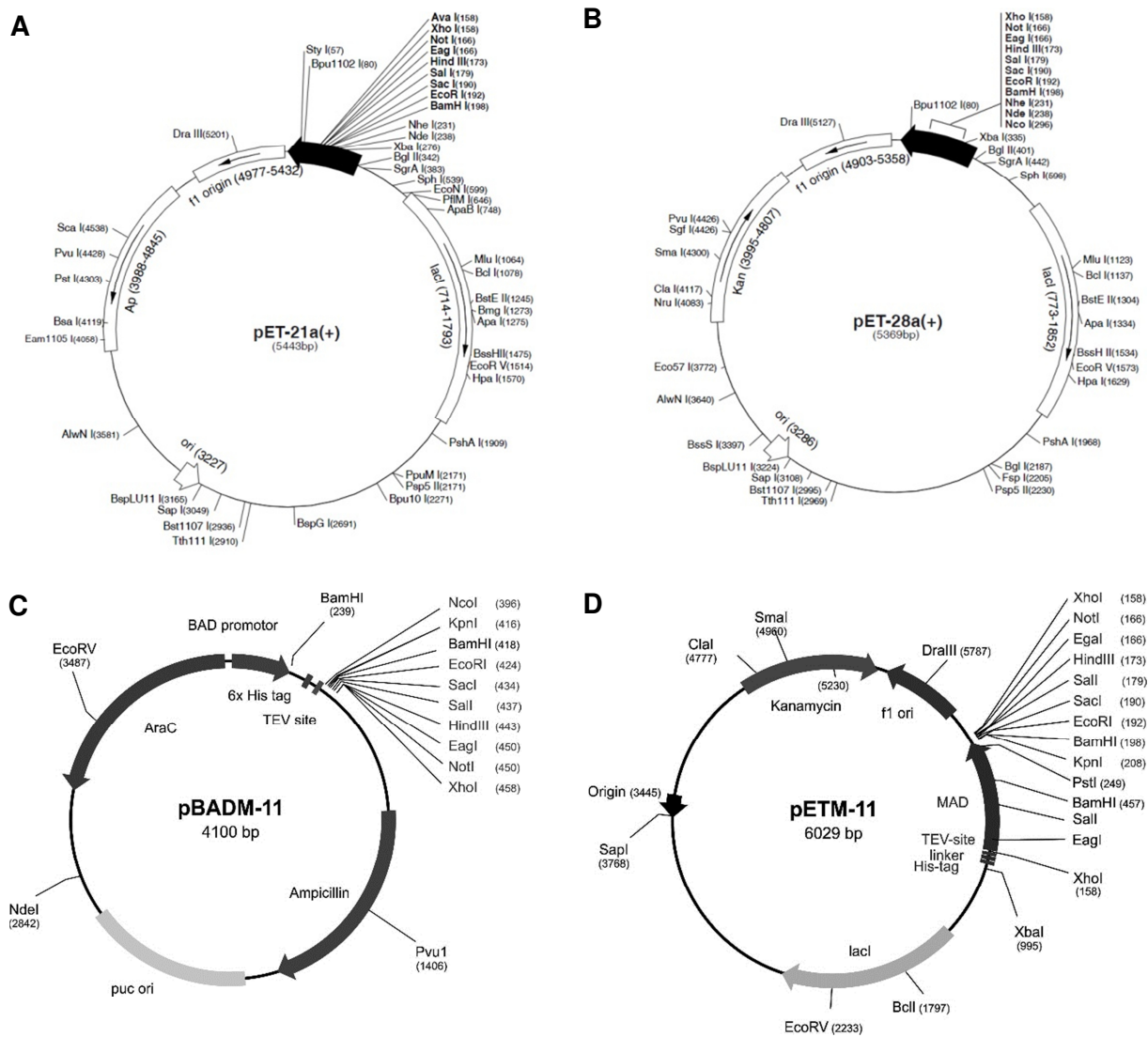


Abb. 71: in E. Coli verwendete humane Expressionsvektoren für hRAD51C, hRAD51C (E. coli-codonoptimiert) und hXRCC3 A: pET-21a(+)*; B: pET-28a(+)*; C: pBADM-11**; D: pETM-11**; *Merck KGaA, Darmstadt, DE; ** EMBL Heidelberg

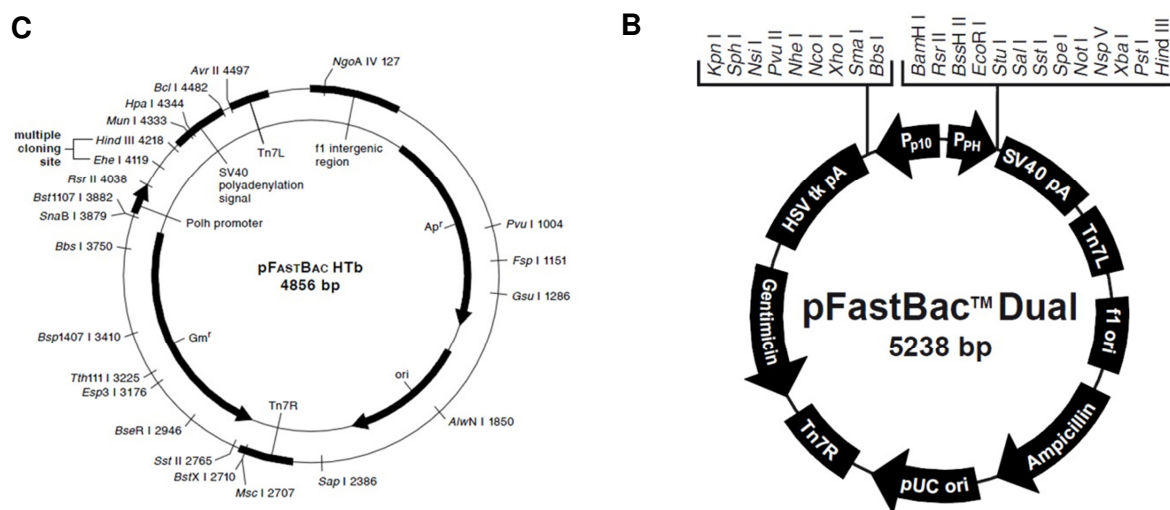


Abb. 72: zur Virusgenerierung verwendete Insektenexpressionsvektoren A: pFASTBac HTb als Variante des verwendeten pFASTBac HTa zur Expression von hRAD51C und getrennter Co-Expression von hRAD51C und hXRCC3 B: pFastBac™Dual-Vektors zur Co-Expression von hRAD51C und hXRCC3 (Life Technologies, Carlsbad, USA)

Anhang II

Eigene Publikationen

Artikel

Neoplasia, ageing, and genetic instability due to defective caretaker genes. Hoehn H, Neveling K, **Endt D**, Melcher R, Schindler D. 2008;30(5):461-2.

Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. Neveling K, **Endt D**, Hoehn H, Schindler D. 2009 Jul 31;668(1-2):73-91. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.05.006. Epub 2009 May 21.

Fanconi Anemia. Schindler D, **Endt D**, Neveling K; In: Schwab M (ed) Encyclopedia of Cancer, 3 edn. Copyright 2011, doi: 10.1007/978-3-642-27841-9_6904-2, ISBN: 978-3-642-16482-8 (Print) 978-3-642-16483-5 (Online) Publisher: Springer Berlin Heidelberg, Copyright Holder Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, Neveling K, **Endt D**, Kesterton I, Autore F, Fraternali F, Freund M, Hartmann L, Grimwade D, Roberts RG, Schaal H, Mohammed S, Rahman N, Schindler D, Mathew CG. 2010 May;42(5):406-9. doi: 10.1038/ng.570. Epub 2010 Apr 18.

Predominance of pathogenic missense variants in the RAD51C gene occurring in breast and ovarian cancer families. Osorio A, **Endt D**, Fernández F, Eirich K, de la Hoya M, Schmutzler R, Caldés T, Meindl A, Schindler D, Benitez J. 2012 Jul 1;21(13):2889-98. doi: 10.1093/hmg/dds115. Epub 2012 Mar 26.

Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer. Hansmann T, Pliushch G, Leubner M, Kroll P, **Endt D**, Gehrig A, Preisler-Adams S, Wieacker P, Haaf T.; 2012 Nov 1;21(21):4669-79. doi: 10.1093/hmg/dds308. Epub 2012 Jul 27.

Artikel im Review-Prozess:

Fanconi Anemia. Schindler D., **Endt D.**, Neveling K.; Schwab M (ed) Reference Work Title: Encyclopedia of Cancer, Copyright 2015, doi: 10.1007/978-3-642-27841-9, ISBN: 978-3-642-27841-9 (online) Publisher: Springer Berlin Heidelberg, Copyright Holder Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Tagungsbeiträge

(nur Erstautorschaften)

Endt D., Neveling K., Meier D., Schindler D. „Investigations in to interactions between the Fanconia Anemia Proteins FANCI, FANCD2 and FANCN”; 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2008, Hannover, Deutschland.

Endt D., Neveling K., Schindler D. „Mammalian Two- and Three-Hybrid Studies of RAD51 paralogs”; 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2009, Aachen, Deutschland.

Endt D., Steiner B., Neveling K., Eirich K., Schinzel A., Hoehn H., Hanenberg H., Schindler D. „Blood cell mosaicism in Fanconi Anemia”; 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2010, Hamburg, Deutschland

Endt D., Kuper J., Schindler D., Kisker C. „From gene to function: Towards a structure of the RAD51C protein“; 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2011, Regensburg, Deutschland

Endt D., Niklaus A., Schindler D. „Interaction of the RAD51 paralogs in the mammalian 2/3 hybrid system“; European Human Genetics Conference 2012, Nürnberg, Deutschland

Endt D., Eirich K., Gross M., Schindler D. „Blood cell mosaicism: Natural gene therapy in Fanconi Anemia“; 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2013, Dresden, Deutschland

Endt D., Niklaus A., Schindler D. “RAD51B: A crucial player in Homologous Recombination”; 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2014, Essen, Deutschland

Vorträge

Endt D., Blutzellmosaik in Fanconi Anämie „natürliche Genterapie“, „Jahrestreffen 2014“ für Fanconi-Anämie-Familien, Nottuln, Deutschland

Auszeichnungen

Discovery Award of the Fanconi Anemia Research Fund, 2010

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik in der Arbeitsgruppe von Herr **Prof. Dr. Schindler** angefertigt. Ich danke ihm, meinem Doktorvater, für die für die Möglichkeit die er mir bot, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, für die interessante Fragestellung, die Kontaktherstellung zu Patienten sowie zu Herr Ralf Dietrich vom „Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V.“. Vielen Dank für die Ratschläge, die Anleitung, die konstruktiven Diskussionen, den Support den ich während dieser Zeit erhalten habe und die Unterstützung seit der Bearbeitung meiner Bachelor-Thesis.

Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Thomas Haaf**, der es mir ermöglichte meine Arbeit an seinem Institut anzufertigen.

Ich danke Frau **Prof. Dr. Caroline Kisker** vom Virchow-Zentrum in Würzburg, für die gegebene Möglichkeit, einen Teil der Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Vielen Dank auch für die Anleitung sowie die voranbringenden Diskussionen und Anregungen.

Mein ganz besonders großer Dank gilt den **Fanconi-Patienten**, die durch die Bereitstellung ihrer Daten und ihres Blutes diese Arbeit erst ermöglichten. Ebenso bedanke ich mich bei Herr **Ralf Dietrich** für die Kontaktvermittlung und die durch ihn gebotene Möglichkeit Fanconi Anämie-Patienten auf dem Familientreffen in Nottuln kennen zu lernen. Vielen Dank auch an die Ärzte der Patienten besonders an **Eunike Velleuer** für die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich auch ganz besonders bei Herr **Prof. Dr. Holger Höhn**, der mir sowohl vor als auch nach seiner Emeritierung – seit dem Beginn meiner Bachelor-Thesis – mit fachlichen Rat, Tat, voranbringenden Diskussionen und jeder Menge aufbauender Worte zur Seite stand. Danke für Ihre liebe, lustige Art und die gelegentlichen Süßigkeiten, die den Himmel an so manchem Tag aufbelebten.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau **Prof. Dr. Traute Schroeder-Kurth**, die einen Teil meiner Arbeit finanziell unterstützte. Danke auch für die interessanten, vielseitigen Beiträge und Diskussionen in unserem wöchentlichen Freitagsseminaren, die sie uns mit Leckereien versüßte.

Danke an meine lieben Mitstreiter in der AG Schindler. Vielen Dank an **Richard Friedl** für seinen technischen Support und die vielen Gespräche. Einen ganz lieben Dank an **Isabell Rost, Kerstin Knies, Julia Kühn, Christin Berger, Timo Staab, Beatrice Schuster** und **Benni Gottwald** für die Anregungen, die gegenseitige Unterstützung, die zahlreichen konstruktiven Gespräche, aufbauenden Worte und den Spaß während dieser gemeinsamen Zeit. Vielen Dank auch an meine Masterandinnen **Andrea Nicklaus** und **Elisabetta Rossato**, meine **Praktikanten** und alle **Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik** für ihre Unterstützung.

Ich bedanke mich bei den **Mitarbeitern der AG Kisker und Schindelin** für die Aufnahme in ihre Mitte und ihre Unterstützung. Ein ganz besonderer Dank geht hier an **Dr. Jochen Kupper** der die Betreuung meiner Arbeit in der Gruppe von Caroline Kisker maßgeblich übernahm und mir mit Rat, Tat sowie der Überlassung seines Arbeitsplatzes zur Seite stand. Ebenfalls bedanke ich mich bei **Gudrun Michels** für die Einarbeitung in die Methoden und ihre vielen guten Ratschläge.

Vielen herzlichen Dank auch an **Dr. Kornelia Neveling** für ihre Ratschläge, Anregungen, konstruktiven Gespräche sowie praktischen Hilfestellungen und die Einführung in grundlegende Methoden.

Mein Dank geht auch an Herr **Prof. Dr. Georg Krohne** für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich meiner lieben Familie, meinen **Eltern** und **Großeltern** und meinem **Bruder** für ihre Unterstützung und den Rückenhalt während der gesamten Zeit und dafür, dass sie immer an mich glaubten.

Ebenso danke ich meinem lieben **Freund** und meinen besten **Freunden** für die Geduld, und das Verständnis besonders während arbeitsintensiven Zeiten.