

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie
Leitung: Prof. Dr. E. Dikomey

Auswirkung eines Defekts in den Genen Fanconi A, B, D1 und D2 auf Replikationsprozesse sowie auf die Aktivierung ruhender Replikationsursprünge nach Behandlung mit genotoxischen Agenzien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Maren Rosenthal-Pihl

aus Winsen (Luhe)

Hamburg 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.09.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Kerstin Borgmann

Prüfungsausschuss, zweite(r) Gutachter/in: Prof. Dr. Kerstin Kutsche

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung.....	1
2.1 Fanconi-Anämie.....	1
2.2 Fanconi-Reparaturweg	3
2.3 Replikation und genomische Instabilität.....	3
3. Material und Methoden	5
3.1 Material.....	5
3.1.1 Zelllinien	5
3.1.2 Puffer und Medien	5
3.1.3 Antikörper für die Immunmarkierung des DNA Fiber Assays	8
3.1.4 Geräte und Computersoftware	8
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	9
3.2 Methoden	9
3.2.1 Zellkultivierung	9
3.2.2 Kryokonservierung.....	10
3.2.3 Induktion von DNA-Schäden.....	10
3.2.4 DNA Fibre Assay	10
4. Ergebnisse.....	12
4.1 Einfluss eines Defektes in unterschiedlichen Fanconi-Proteinen auf den Elongationsprozess.....	12
4.2 Einfluss eines Defektes in unterschiedlichen Fanconi-Proteinen auf die Initiation von Replikationsursprüngen	15
4.3 Einfluss eines Defektes in unterschiedlichen Fanconi-Proteinen auf die Initiation von Replikationsursprüngen nach Schädigung mit MMC.....	18
4.4 Einfluss eines Defektes in unterschiedlichen Fanconi-Proteinen auf die Initiation von Replikationsursprüngen nach Schädigung mit H ₂ O ₂	19
5. Diskussion	20
5.1 Auswirkungen eines Defektes in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 auf den Elongationsprozess im unbehandelten Zustand.....	20
5.2 Bedeutung eines Defektes in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 für die Initiation von Replikationsursprüngen im unbehandelten Zustand	22
5.3 Auswirkungen eines Defektes in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 auf die Initiation von Replikationsursprüngen nach DNA-Schädigung.....	23
5.4 Bedeutung unterschiedlicher Therapieansätze für Patienten mit einer Fanconi-Anämie	25

6. Zusammenfassung / Abstract	26
7. Literaturverzeichnis	29
8. Danksagung.....	32
9. Curriculum vitae	35
10. Eidesstattliche Versicherung	35

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Erhalt der genomischen Stabilität ist das grundlegende Ziel der Zelle. Dies wird unter anderem sowohl durch eine fehlerfreie DNA-Replikation als auch durch die Reparatur von DNA-Schäden gewährleistet. Bei Schädigung der DNA durch DNA-Intrastrang-vernetzende Agenzien wie Mitomycin C (MMC) oder Sauerstoff-Radikale wie Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) wird der Fanconi-Reparaturweg aktiviert, wobei es in erster Linie zur Interaktion der 15 Fanconi-Gene kommt. Hierbei bilden acht Fanconi-Gene (A, B, C, E, F, G, L und M) den sogenannten „Core“-Komplex, dessen Anwesenheit die Monoubiquitylierung und die daraus folgende Aktivierung des ID-Komplexes bewirkt, welcher aus den Fanconi-Genen I und D2 besteht. Die replikative S-Phase wird unterbrochen, weitere Initiationsereignisse der Replikation werden unterdrückt und die Reparatur erfolgt mittels Homologer Rekombination. Ein Defekt in den Genen des Fanconi-Reparaturweges führt zu einer erhöhten genomischen Instabilität, welche sich in einer erhöhten Krebs-Prädisposition bei Patienten mit einer Fanconi-Anämie manifestiert.

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, inwiefern sich ein Defekt in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 auf die Replikationsprozesse der Zelle auswirkt. Für eine detaillierte Untersuchung der Replikation sollen zunächst die Elongation sowie die Aktivierung von Replikationsursprüngen im unbehandelten Zustand betrachtet werden. Im Weiteren soll untersucht werden, wie sich die Replikation nach Behandlung mit MMC oder H_2O_2 verhält. Es ist von besonderem Interesse zu überprüfen, inwiefern die Fanconi-Proteine A und B, die als Proteine des „Core“-Komplexes agieren und somit maßgeblich für die Aktivierung des Reparaturweges durch die Monoubiquitylierung von Fanconi D2 verantwortlich sind, sich von den Fanconi-Proteinen D1 und D2 unterscheiden, die eine wichtige Rolle für die Prozessierung von DNA-Schäden spielen.

2. Einleitung

2.1 Fanconi-Anämie

Bei der Fanconi-Anämie (FA) handelt es sich um eine seltene genetische Erkrankung, die mit einer Inzidenz von weniger als 1:100.000 auftritt (D'Andrea and Grompe, 2003). Das Krankheitsbild zeigt sich in einer aplastischen Anämie sowie in einer gesteigerten Abbaurate von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Zudem treten häufig Skelettfehlbildungen,

Organfehlbildungen an Herz, Niere und Magen-Darm-Trakt, Pigmentanomalien der Haut (Café-au-lait-Flecken) sowie Minderwuchs mit Mikrozephalie und Mikrophthalmie auf (Alter et al., 2003, Kutler et al., 2003a).

Zurzeit sind 15 unterschiedliche FA-Untertypen bekannt (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N, O und P) (Crossan and Patel, 2011), dabei handelt es sich bei Defekten in Fanconi-B (FANCB) um eine x-chromosomale Vererbung, während Defekte in den anderen Typen allesamt autosomal-rezessiv vererbt werden. Bei 65 % der Betroffenen handelt es sich um einen FANCA Defekt (an Chromosomenort 16q24.3), bei 15 % um FANCC (9q22.3) und bei 10 % um FANCG (9p13) (D'Andrea and Grompe, 2003).

Die Interaktion dieser 15 Fanconi-Proteine wird als Fanconi-Reparaturweg beschrieben und spielt eine Rolle nach Auftreten von DNA-Schädigung vor allem während der Synthesephase der Zelle (Knipscheer et al., 2009). Dabei ist jedes einzelne Protein des Fanconi-Komplexes essentiell für eine effektive DNA-Reparatur. Kommt es zu einem biallelischen Defekt eines Fanconi-Gens, verursacht dieser Defekt die sogenannte Fanconi-Anämie und führt zu einer eingeschränkten DNA-Reparaturfähigkeit der Zelle, die sich in Form einer erhöhten Sensitivität gegenüber DNA-Intrastrang-vernetzenden Agenzien, Sauerstoff-Radikalen sowie ionisierender Strahlung zeigt (D'Andrea and Grompe, 2003). Aufgrund dieser eingeschränkten DNA-Reparaturfähigkeit geht die FA mit typischen Chromosomenbrüchen einher und bedingt darüber hinaus ein stark erhöhtes Risiko an Leukämien (besonders AML) und auch soliden Tumoren (besonders Schleimhauttumoren des Mund- und Halsbereiches sowie des gynäkologischen Systems) zu erkranken (Alter et al., 2003; Kutler et al., 2003; Rosenberg et al., 2003; Deans and West, 2011). Eine Ausnahme stellen dabei FANCD1 und FANCN dar. Es ist beschrieben, dass bereits ein monoallelischer Defekt in FANCD1, identisch mit dem wichtigen Brustkrebsgen BRCA2, und ein monoallelischer Defekt in FANCN, identisch mit PALB2, dem Partner von BRCA2, zu einem erhöhten Risiko an Mamma-, Ovarial- oder Pankreas-Tumoren zu erkranken führt (Kennedy and D'Andrea, 2005).

2.2 Fanconi-Reparaturweg

Der Fanconi-Reparaturweg beschreibt die Interaktion der 15 Fanconi Gene nach DNA Schädigung (Kim and D'Andrea, 2012).

Bei Schädigung der DNA durch Sauerstoff-Radikale oder DNA-Intrastrang-vernetzende Agenzien wie MMC bildet sich im Zellkern aus den acht Fanconi-Genen A, B, C, E, F, G, L und M ein „Core“-Komplex. Die Anwesenheit dieses „Core“-Komplexes bewirkt die Monoubiquitylierung und somit die Aktivierung des ID-Komplexes, bestehend aus FANCI und FANCD2. Sobald eines der acht Gene des „Core“-Komplexes einen biallelischen Defekt aufweist, kommt es nicht zur Monoubiquitylierung des ID-Komplexes.

Der monoubiquitylierte ID-Komplex bindet an das Chromatin, und gemeinsam mit weiteren Reparatur-Effektor-Proteinen wie RAD51, FANCD1 (= BRCA2), FANCN (= PALB2), FANCI (= BRIP1/BACH1) und BRCA1 kommt es zur Formation von DNA-Reparatur-Foci und der nachfolgenden DNA-Reparatur durch Homologe Rekombination.

Für den unmittelbaren Reparaturvorgang von DNA-Intrastrangvernetzungen ist der monoubiquitylierte ID-Komplex ebenfalls von Bedeutung, da er im Rahmen der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) das Ausschneiden des vernetzten Strangstücks und das Ausklappen des Tochterstranges in Gang setzt und somit den weiteren Reparaturvorgang ermöglicht.

2.3 Replikation und genomische Instabilität

Bei der Replikation handelt es sich um die exakte Verdopplung der DNA, welche in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus stattfindet, bevor die Zelle dann in die G2-Phase, in der die DNA nochmals auf Vollständigkeit und Schäden überprüft wird, und schließlich in die Mitose übergeht, um sich zu teilen. Die Replikation erfolgt nach dem semikonservativen Prinzip, wobei die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge entwunden wird und jeder einzelne Strang dann als Vorlage dient, an dem entlang die Synthese des komplementären Tochterstranges erfolgt. Die Replikation lässt sich in die Initiationsphase, die Elongationsphase und die Terminationsphase einteilen. Während der Initiation wird die DNA-Doppelhelix an mehreren Replikationsursprüngen, die über die gesamte DNA verteilt sind, mithilfe einer Helikase entwunden, und es werden zwei sogenannte Replikationsgabeln gebildet, die während der

Elongation in bidirektionale Richtung den komplementären DNA-Strang synthetisieren, bis sie auf Replikationsgabeln benachbarter Replikationsursprünge treffen und in der Terminationsphase die Replikation beenden.

Für die Zelle ist es von großer Bedeutung, ihre genomische Stabilität zu erhalten und die DNA fehlerfrei an die Tochterzelle weiterzugeben, da Veränderungen oder Schädigungen jeglicher Art die Entartung der Zelle verursachen können und somit die Entstehung von Tumoren begünstigen können (Kennedy and D'Andrea, 2006). Solche Schädigungen der DNA können durch Stoffwechselforgänge, den Einfluss mutagener Substanzen oder durch ionisierende Strahlung auftreten und können sich als Basenmodifikation, Einzelstrangbruch, Doppelstrangbruch oder DNA-Intrastrangvernetzung manifestieren, wobei der Doppelstrangbruch unrepariert zu einem Anhalten der Replikation führt und ein letales Ereignis für die Zelle darstellt. Der Replikationsapparat beinhaltet eine Vielzahl an Kontroll- und Reparaturkaskaden, mit denen eine Identifizierung von DNA-Schäden sowie deren effektive Reparatur gewährleistet werden. Dabei wird die weitere Initiierung neuer Replikationsursprünge unterdrückt und somit der Zelle eine akkurate Reparatur des Schadens gewährleistet (Conti et al., 2007). Nach Anhalten der Replikation besteht neben der Möglichkeit der Reparatur des DNA-Schadens die Option ruhende Replikationsursprünge zu aktivieren um die Replikation fortzusetzen. Die Initiation dieses Feuerns neuer Replikationsursprünge unterliegt bei intakten Zellen wiederum einer Reihe von Kontroll- und Signalkaskaden. Diese Regulation der Replikation stellt ein komplexes Zusammenspiel der beteiligten Proteine dar und ist abhängig von ihrer fehlerfreien Funktionalität.

Zellen mit Defekten in Fanconi-Genen weisen eine genomische Instabilität auf, die sich u.a. in typischen Chromosomenbrüchen äußert und auf unreparierte Schäden während der Replikation zurückzuführen ist. Mit dem sogenannten DNA Fibre Assay besteht die Möglichkeit Elongation, Anhalten von Replikationsgabeln sowie die Aktivierung von Replikationsursprüngen zu untersuchen, und es kann zudem überprüft werden, wie sich FA-defiziente Zellen während der Replikation unbehandelt und nach Behandlung mit genotoxischen Substanzen verhalten.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Experimente mit vier unterschiedlichen Zelllinien, die einen Defekt in den Fanconi-Genen A, B, D1 oder D2 aufweisen, im Vergleich mit dem Wildtyp durchgeführt. Es handelt sich hierbei um exponentiell wachsende Fibroblasten, die aus Hautzellen betroffener Patienten gewonnen und kultiviert wurden. Im Einzelnen wurden folgende Zelllinien verwendet:

07P0670:	Wildtyp
PD-A:	FANCA-defizient
HSC1199:	FANCB-defizient
HSC 62:	FANCD1-defizient
EUFA:	FANCD2-defizient

3.1.2 Puffer und Medien

Das verwendete Wasser wurde mit einer Millipore-Anlage (Milli-Q academic, Millipore, Billerica (USA)) aufbereitet und wird im Folgenden als Aqua bidest. bezeichnet. Falls angegeben, wurden Lösungen für 20 min bei 121 °C und 100 kPa autoklaviert (2540 EI, Tuttnauer, GD Breda, NL) bzw. steril filtriert (Steritop, Millipore, Billerica (USA)). Die Elektrolytlösung für den Coulter Counter (Isoton II) wurde von Beckman Coulter (Krefeld) bezogen.

Die Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.A.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Buchs, CH), J. T. Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (St. Louis, USA), Serva (Heidelberg).

Die verwendeten Puffer und Medien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Name	Zusammensetzung/ Hersteller	Lagerung
Blockierlösung	100 ml PBS 1 % BSA 0,1 % Tween20	Raumtemperatur
5-Chloro-2'-deoxyuridine (CldU)	Sigma, C6891-100MG	-20 °C
2,5 mM 5-Chloro-2'-deoxyuridine (CldU)	Die Mischung erfolgt in einem Verhältnis von 1:100 mit DMEM-Medium (Sigma, C6891-100MG)	Aliquots bei -20 °C
DMEM Low Glucose mit GlutaMAX™I, 1000 mg/L D-Glucose, Sodium Pyruvate	Invitrogen, Darmstadt, #21885-025	4 °C
EDTA	Serva, Heidelberg	Raumtemperatur
Ethanol 70% (V/V)	Merck, Darmstadt	Raumtemperatur
Essigsäure	J.T.Baker, Deventer (NL)	4 °C
Fixierungslösung	Methanol/Essigsäure-Gemisch: 3:1	Raumtemperatur
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, #10270-106 Gold, PAA, Cölbe, #A15-649	-20 °C
2,5 mM rauchende HCl	Merck, K31375917-245	Raumtemperatur
2,5 M HCl-Lösung	5,2 ml 37 % rauchende HCl 19,8 ml Aqua bidest.	Raumtemperatur
Tris-HCl pH 7,4	Trizma®HCl, Sigma, T3253 (-1KG)	Raumtemperatur
5-Iodo-2'-deoxyuridine (IdU)	Sigma, I7125-5G	4 °C
2,5 mM 5-Iodo-2'-deoxyuridine Stammlösung	Die Mischung erfolgt in einem Verhältnis von 1:10 mit DMEM-Medium (Sigma, I7125-5G)	Aliquots bei -20 °C
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt	Raumtemperatur
Kulturmedium 1	DMEM Low Glucose + 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, G418 5 ml Stocklösung auf 500 ml steril filtrieren	4 °C
Kulturmedium 2	Alpha-Medium + 13 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin	4 °C
Methanol	J.T.Baker, Deventer (NL)	Raumtemperatur
Mitomycin C	Medac GmbH, Hamburg	Raumtemperatur, lichtgeschützt
Mounting Medium	MP Biomedical's, LLC (Ohio/USA) #62270	Raumtemperatur

Name	Zusammensetzung/ Hersteller	Lagerung
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer (NL)	Raumtemperatur
Parformaldehyd	Roth, Karlsruhe	Raumtemperatur
4 %iges Paraformaldehyd in PBS	<u>In 45 ml PBS werden gelöst:</u> 2 g Paraformaldehyd Ca. 2-10 Tropfen 2N NaOH, so dass eine vollständige Auflösung des Paraformaldehyds in der Lösung erfolgt. Die Mischung der Substanzen erfolgt unter kontinuierlicher Wärmezufuhr mittels Heizplatte. Am Ende erfolgt die Aufsättigung der Lösung mittels PBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml.	Aliquots bei -20 °C
1xPBS (Phosphate Buffered Saline)	<u>In 1.000 ml Aqua bidest. werden gelöst:</u> 8,0 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	Raumtemperatur
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad (USA)	-20°C
Rinderserumalbumin (BSA)	Biochrom, Berlin	4 °C
0,5 % SDS (Sodium dodecyl sulfate)	0,5 % (w/v) SDS in H ₂ O bidest. Sigma-Aldrich, Steinheim	Raumtemperatur
Spreading Puffer	200 mM Tris-HCl: pH 7,4 50 mM EDTA 0,5 % SDS	Raumtemperatur
1x Trypsin-EDTA	0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA, Invitrogen, #25300-054	4°C
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Steinheim	Raumtemperatur
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Calbiochem GmbH, Darmstadt)	4°C, lichtgeschützt

3.1.3 Antikörper für die Immunmarkierung des DNA Fiber Assays

Antikörper	Hersteller	Nummer	Inkubationsbedingungen/ Konzentration
Monoclonal Rat anti-BrdU Clone BU1/75 (ICR1)	Abd Serotec Oxford, UK	# ABT0030G	1:1000 in PBS+1 % BSA+ 0.1 % Tween20 Bei 1 h RT
Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen Darmstadt	# A-11001	1:500 in PBS + 1 % BSA + 0.1 % Tween20 bei 1,5 h RT
Anti-BrdU (Clone B44) Mouse monoclonal IgG	Becton Dickinson New Jersey, USA	#347580 (7580)	1:1500 in PBS + 1 % BSA + 0,1 % Tween20 über Nacht bei 4 °C
Alexa Fluor 555 Goat anti-rat IgG (H+L)	Invitrogen Darmstadt	#A21434	1:500 in PBS + 1 %BSA + 0,1 % Tween20 bei 1,5 h RT

3.1.4 Geräte und Computersoftware

Gerät	Hersteller
Autoklav	Mediatech, Norderstedt
Inkubationsbehälter für Fibre Assay	Neolab, Heidelberg,# 2-1878
Coulter Counter	Model Z1, Beckmann Coulter, Krefeld
Bebrütungsschrank 1	5 % CO ₂ , ICN Flow, Model 160
Bebrütungsschrank 2	10 % CO ₂ , Sanyo,Ewald Innovationstechnik
Spritzenvorsatzfilter 0.22µm CM Membran	Merck Labor und ChemieVertrieb, Bruchsal, Artikel N° 5122110
Kamerasystem	Axio Cam M Rm, Zeiss, Göttingen
Magnetrührer	Ikamag Ret, Ika, Staufen
<u>Mikroskop:</u> Olympus IX81	Olympus Deutschland GmbH
Schüttler	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Waage	AE 160, Mettler Toledo, Giessen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Zellschaber	Cornig Incorporated, Mexiko

Computersoftware	Hersteller
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego (USA)
ImageJ 1.42q	National Institutes of Health, Maryland (USA)
Olympus Soft Imaging Solution	Olympus Imaging-Software (Germany)
Windows Microsoft Excel 2007	Microsoft Office Excel 2007, Redmond (USA)

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden in der Regel über die Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Brand (Melsungen), Corning (Corning, NY), eppendorf® (Hamburg) und Sarstedt (Nürmbrecht) bezogen. Gewebekulturflaschen wurden bei Greiner Bio-One (Frickenhausen), Deckgläser und Objektträger bei Marienfeld (Lauda-Königshofen) sowie die Plastic Coverslips bei Appligene Oncor (Illkirch Graffenstaden, F) erworben.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Das Zellwachstum wurde im inversen Mikroskop überprüft. Die Stammhaltung der Zellen erfolgte in 25 cm³-Gewebekulturflaschen in Brutschränken mit einer Wasserdampf-gesättigten, 10 % CO₂ enthaltenden Atmosphäre. Als Nährmedium wurde DMEM mit 10 % FCS sowie 1% Penicillin/Streptomycin eingesetzt. Die Zellen wurden alle fünf bis sieben Tage passagiert. Hierzu wurde das Nährmedium verworfen und der Zellrasen mit 37 °C warmem Trypsin für 2 min inkubiert. Die Zellen wurden durch Klopfen vom Flaschenboden gelöst und das Trypsin durch Zugabe von 37 °C warmem Nährmedium inaktiviert. Die Zelldichte wurde im Coulter Counter ermittelt und die Zellen in einer neuen Kulturflasche subkultiviert.

3.2.2 Kryokonservierung

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst und mit frischem Nährmedium versetzt. Die Zellen wurden zentrifugiert und auf eine Zelldichte von 10^6 Zellen/ml bis 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Das Zellpellet wurde im Verhältnis von 1:1 im Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und in auf 4°C vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden 1h auf Eis gelagert, anschließend über Nacht in Isopropanol bei -80°C verwahrt und schließlich langfristig bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Wiederanzucht wurden die eingefrorenen Zellen bei 37°C im Wasserbad angetaut und die zum Teil noch gefrorenen Zellen wieder in Kulturflaschen mit frischem Medium versetzt. Die Zellen wurden im Bebrütungsschrank verwahrt und nach einem Tag mit frischem Medium versetzt.

3.2.3 Induktion von DNA-Schäden

Zur Untersuchung der Replikationsprozesse und der Aktivierung von Replikationsursprüngen nach Behandlung mit genotoxischen Agenzien wurden Zellen mit MMC in einer Konzentration von $40\ \mu\text{M}$ behandelt, um DNA-Intrastrangvernetzungen zu induzieren. Durch Behandlung mit H_2O_2 in einer Konzentration von $200\ \mu\text{M}$ wurden Doppelstrangbrüche induziert.

3.2.4 DNA Fibre Assay

Der DNA Fibre Assay ermöglicht eine genaue Analyse von Initiation, Elongation und Termination der DNA-Replikation.

Replizierte DNA kann mithilfe der Thymidinanaloga 5-Chloro-2'-desoxyuridine (CldU) und 5-Iodo-2'-desoxyuridine (IdU) nachgewiesen werden. Die Thymidinanaloga werden der Zelle über das Medium angeboten, in der Synthesephase anstelle der Base Thymidin eingebaut und im Anschluss mit Fluoreszenz-Antikörpern detektiert.

Die Zellen wurden hierfür zunächst für 15 Minuten mit $0,025\ \text{mM}$ CldU-haltigem Medium inkubiert. Nach 15 Minuten wurde das schädigende Agenz MMC oder H_2O_2 in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und die Zellen für 30 Minuten weiter inkubiert. Anschließend wurde das CldU-haltige Medium abgenommen und die Zellen für 45 Minuten mit dem $0,25\ \text{mM}$ IdU-haltigen Medium inkubiert.

Nach Abnahme des IdU-haltigen Mediums und Überführung in eiskaltes PBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, auf einen Objektträger übertragen und mithilfe eines Spreading Puffers, der die Zellen zum Platzen bringt und somit die Verteilung der DNA-Stränge ermöglicht, auf dem Objektträger ausgespreizt und mit einer Methanol-Essigsäure-Lösung (3:1) fixiert.

Für die Immunfärbung der Chromatinfasern wurde die DNA auf dem Objektträger zunächst mit Aqua bidest. rehydriert und anschließend mit 2,5 M HCl denaturiert, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Im Folgenden wurden nacheinander vier unterschiedliche Antikörper verwendet, um die DNA zu detektieren. Für die Detektion der CldU-Nukleotide wurde ein primärer, monoklonaler anti-BrdU aus der Ratte verwendet, der mit 4%-iger Paraformaldehydlösung fixiert wurde und anschließend mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper anti-rat Alexa Fluor 555 detektiert wurde. Die Detektion der IdU-Nukleotide erfolgte mit einem primären, monoklonalen anti-BrdU aus der Maus, der analog mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper anti-mouse Alexa Fluor 488 detektiert wurde.

Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in einer feuchten, abgedunkelten Kammer und ab der Zugabe des zweiten Antikörpers unter Ausschluss direkten Lichteinfalls. Zwischen den einzelnen Antikörperzugaben wurde die DNA stets mit PBS und einer Blockierlösung gewaschen.

Abschließend wurden die Objektträger mit dem Eindeckmittel „Vectashield mounting“-Medium versehen und die daraufhin aufgelegten Deckgläschen mit Nagellack versiegelt.

Mit dem Mikroskop Axiovision Observer 21 (Zeiss) und den Filtersätzen 43 (für die Detektion des sekundären Fluoreszenz-Antikörper anti-rat Alexa Fluor 555) und 38 (für die Detektion des sekundären Fluoreszenz-Antikörper anti-mouse Alexa Fluor 488) wurden unter Ölimmersion bei 400-facher Vergrößerung die fluoreszenzmarkierten DNA-Stränge sichtbar gemacht. Mit der Kamera AxioCam MRm wurden daraufhin Bildaufnahmen der DNA-Strukturen erstellt, die mithilfe des Programms ImageJ ausgewertet wurden. ImageJ ermöglicht es, mit dem Instrument „Segmented lines“, die Länge der einzelnen DNA-Stränge zu messen. Um die Einheit „ μm “ zu erhalten, wurde ein 10 μm langer Balken in die Bildaufnahme eingebrannt und die daraufhin mit ImageJ ermittelte Länge von 98 durch 10 μm geteilt. Hieraus ergab sich für die Länge der Chromatin-Fasern ein Umrechnungsfaktor von 9,8. Um die Replikationsgeschwindigkeit in kb/min zu errechnen, wurde der Umrechnungsfaktor 1 μm = 2,59 kb (Jackson and Pombo, 1998) verwendet. Zudem ist es mit dem Instrument „Plug-In Analyze“ von ImageJ möglich die quantitative Verteilung von elongierenden und terminierenden Replikationsgabeln sowie neuer Initiationsereignisse zu ermitteln.

Zur weiteren Auswertung wurden die ermittelten Werte in eine Excel-Tabelle überführt. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss eines Defektes in unterschiedlichen Fanconi-Proteinen auf den Elongationsprozess

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich ein Defekt in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 auf die Replikationsprozesse der Zelle auswirkt. Für die detaillierte Untersuchung der Replikation sollte zunächst die Elongation im unbehandelten Zustand untersucht werden. Dabei war es von besonderem Interesse zu überprüfen, inwiefern sich die Fanconi-Gene A und B, die als Proteine des „Core“-Komplexes agieren und somit maßgeblich verantwortlich für die Monoubiquitinierung von FANCD2 sind, von den Fanconi-Genen D1 und D2 unterscheiden, die dahingegen eine wichtige Rolle bei der Prozessierung der DNA-Schäden spielen.

Für die Untersuchung der Replikationsvorgänge wurde der DNA Fibre Assay verwendet. Den Zellen wurden nacheinander die synthetischen Thymidinanaloga 5-Chloro-2'-deoxyuridine (CldU) und 5-Iodo-2'-deoxyuridine (IdU) über das Medium angeboten, die während der Replikation anstatt des Thymidins eingebaut werden und deren anschließende Immunfärbung mit Fluoreszenz-Antikörpern die Betrachtung unterschiedlicher Synthesevorgänge mit dem Mikroskop ermöglicht.

Die Zellen wurden zunächst für 45 Minuten mit CldU und anschließend für 45 Minuten mit IdU inkubiert, die DNA Stränge präpariert und die eingebauten Nukleotide mit spezifischen Antikörpern detektiert und gefärbt. Durch die Behandlung mit den primären und den fluoreszierenden sekundären Antikörpern stellten sich CldU rot und IdU grün dar (Abbildung 1A).

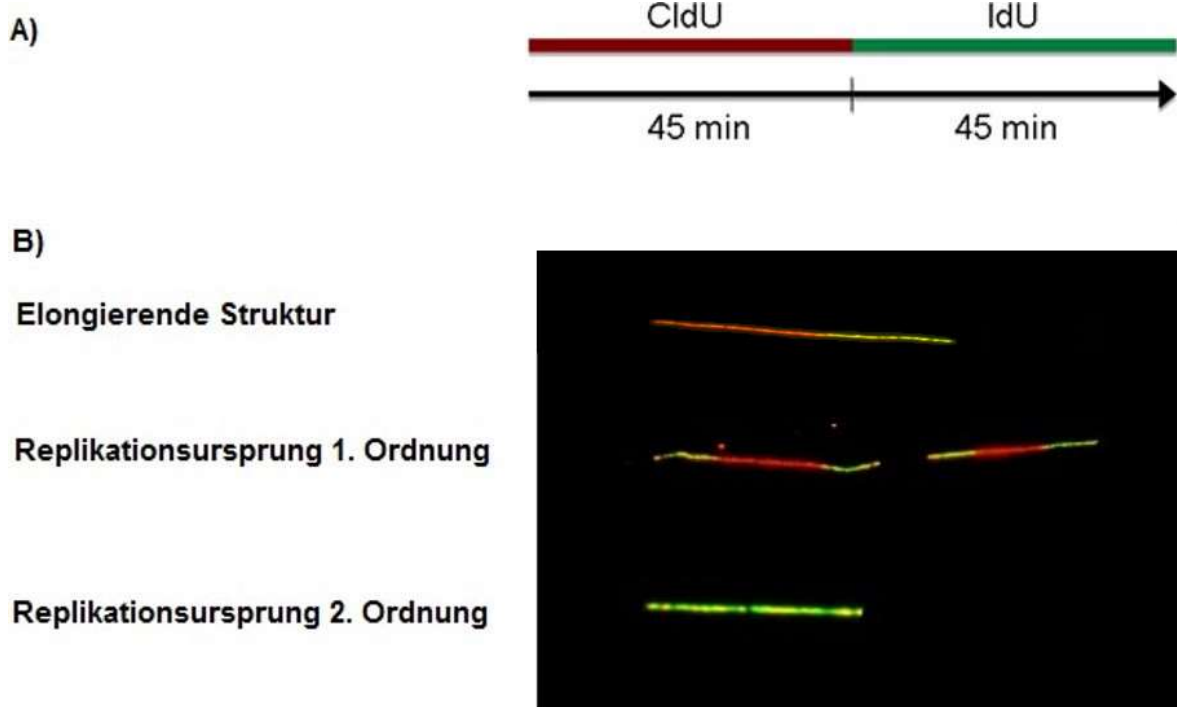


Abbildung 1: Replikations-Strukturen nach Gabe der Nukleotide CldU und IdU. Exponentiell wachsende Zellen mit Defekten in den Fanconi-Genen A, B, D1 oder D2 wurden für jeweils 45 Minuten mit CldU und IdU behandelt, die DNA extrahiert und die Replikationsstrukturen mithilfe der primären Antikörper Anti-BrdU (Clone BU1/75), Anti-BrdU (Clone B44) und der sekundären Antikörper Alexa-Fluor 555 (rot) und Alexa-Fluor 488 (grün) dargestellt (A). Es wurden drei unterschiedliche Replikationsstrukturen betrachtet. Die erste Struktur stellt eine elongierende Replikationsgabel dar, die zweite Struktur Replikationsursprünge 1. Ordnung und die dritte Struktur Replikationsursprünge 2. Ordnung (B).

Abbildung 1B zeigt drei der unterschiedlichen, farblich markierten Replikationsstrukturen, die in dieser Arbeit betrachtet wurden. In der ersten Struktur ist eine elongierende Replikationsgabel mit eingebauten CldU- und IdU-Nukleotiden dargestellt, die sich als rot-grüner Strang darstellt. Bei der zweiten Struktur handelt es sich um einen Replikationsursprung 1. Ordnung, bestehend aus zwei elongierenden Replikationsgabeln, die von einem Replikationsursprung aus in bidirektionale Richtung laufen und sich dementsprechend grün-rot-rot-grün darstellen. Die dritte Struktur zeigt einen Replikationsursprung 2. Ordnung, bei dem zwei Replikationsgabeln während der IdU-Markierungszeit die Replikation in bidirektionale Richtung starten und als grün-grüner Strang sichtbar werden.

Zunächst sollte die Elongation der Zelllinien mit Defekten in FANCA, FANCB, FANCD1 oder FANCD2 im Vergleich zur Wildtyp-Zelle im unbehandelten Zustand betrachtet werden. Hierzu wurde die Nukleotideinbaurrate der elongierenden Strukturen analysiert. Die Zellen wurden für jeweils 45 Minuten mit CldU und IdU markiert, anschließend wurde die DNA präpariert und die eingebauten Nukleotide mithilfe spezifischer Antikörper detektiert. Danach wurden die DNA-Stränge mit dem Programm ImageJ vermessen und die Längen in die Einbaurrate in kb/min umgerechnet.

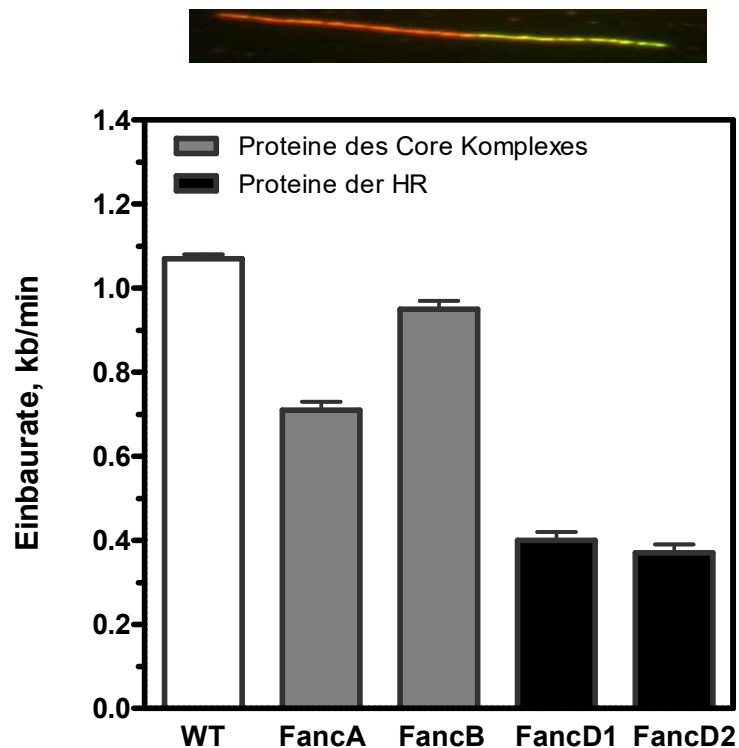


Abbildung 2: Mittlere Nukleotideinbaurrate der unterschiedlichen Zelllinien im unbehandelten Zustand im Vergleich zum Wildtyp. Exponentiell wachsende Zellen mit Defekten in den Fanconi-Genen A, B, D1 oder D2 wurden für jeweils 45 Minuten mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert, die Länge der DNA-Stränge mit ImageJ ermittelt und in kb/min umgerechnet.

Abbildung 2 zeigt die Einbauraten der Fanconi-Defizienten im Vergleich zur Wildtyp-Zelle in kb/min. Es zeigte sich eine große Varianz der Einbauraten von 0,37 bis 1,07 kb/min. Mit 0,37 und 0,4 kb/min zeigten Zelllinien mit einem Defekt in FANCD2 und FANCD1 die geringste Einbaurrate im Vergleich zu 1,07 kb/min im Wildtyp. Mit 0,71 kb/min und 0,95 kb/min zeigten Zelllinien mit einem Defekt in FANCA und FANCB eine leichte Reduktion in der Einbaurrate im

Vergleich zum Wildtyp. FANCD1- und FANCD2-defekte Zellen wiesen folglich eine deutlich langsamere Einbaurrate auf als FANCA- und FANCB-defekte Zellen. Demnach scheinen die Proteine des „Core“-Komplexes FANCA und FANCB keinen Einfluss auf die Replikationsgeschwindigkeit zu haben, während die für die Prozessierung von DNA-Schäden benötigten Proteine FANCD1 und FANCD2 für die Einbaurrate von großer Bedeutung sind.

4.2 Einfluss eines Defektes in unterschiedlichen Fanconi-Proteinen auf die Initiation von Replikationsursprüngen

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern Defekte in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 Einfluss auf die Regulation der Initiation neuer Replikationsursprünge nehmen. Hierzu wurde der prozentuale Anteil der Replikationsursprünge 1. Ordnung (Abbildung 1B) im unbehandelten Zustand betrachtet. Die Zellen wurden für jeweils 45 Minuten mit CldU und IdU markiert, anschließend wurde die DNA präpariert und die eingebauten Nukleotide mithilfe spezifischer Antikörper detektiert. Danach wurden die unterschiedlichen Replikationsstrukturen mit dem Programm ImageJ ermittelt und quantifiziert.

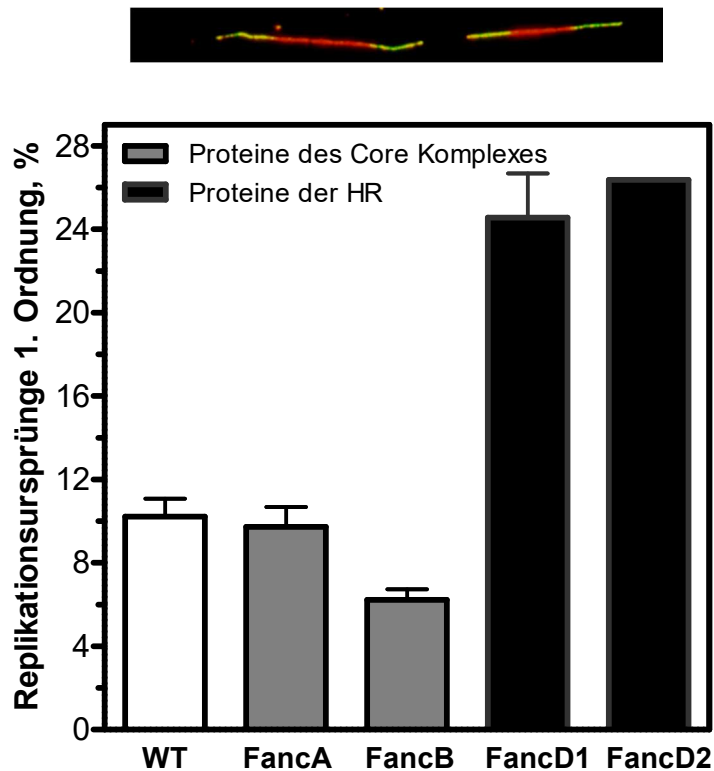


Abbildung 3: Prozentualer Anteil der Replikationsursprünge 1. Ordnung. Exponentiell wachsende Zellen mit Defekten in den Fanconi-Genen A, B, D1 oder D2 wurden für jeweils 45 Minuten mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert und die Replikationsstrukturen mit ImageJ ermittelt und quantifiziert.

Es zeigte sich hier ein breites Spektrum des Anteils von Replikationsursprüngen 1. Ordnung zwischen 6% und 27%. FANCD2-defekte Zellen zeigten mit 26,4% den größten Anteil an Replikationsursprüngen 1. Ordnung; bei FANCD1 lag der Anteil bei 24,6%. Bei FANCA-defekten Zellen wurde mit 9,7% ein deutlich geringerer Anteil neuer Replikationsursprünge ermittelt; bei FANCB-defekten Zellen betrug der Anteil 6,2%. FANCA und FANCB zeigten somit einen geringeren Anteil als der Wildtyp mit 10,2%. Hieraus ergibt sich, dass die Proteine des „Core“-Komplexes FANCA und FANCB für die Regulation der Initiation von Replikationsursprüngen 1. Ordnung keinen Einfluss haben, während die für die Prozessierung von DNA-Schäden benötigten Proteine FANCD1 und FANCD2 wesentlich daran beteiligt sind, was sich in dem stark erhöhten Anteil der Replikationsursprünge 1. Ordnung zeigt, die bei Defekten in eben diesen Genen auftreten und auf Defizite in der Regulation hindeuten.

Zudem sollte der Zusammenhang zwischen der Einbaurrate in kb/min (Abbildung 2) und dem prozentualen Anteil der Replikationsursprünge 1. Ordnung (Abbildung 3) betrachtet werden. Hierzu wurde der prozentuale Anteil der Replikationsursprünge 1. Ordnung im Verhältnis zur Einbaurrate in kb/min der jeweiligen Zelllinie aufgetragen.

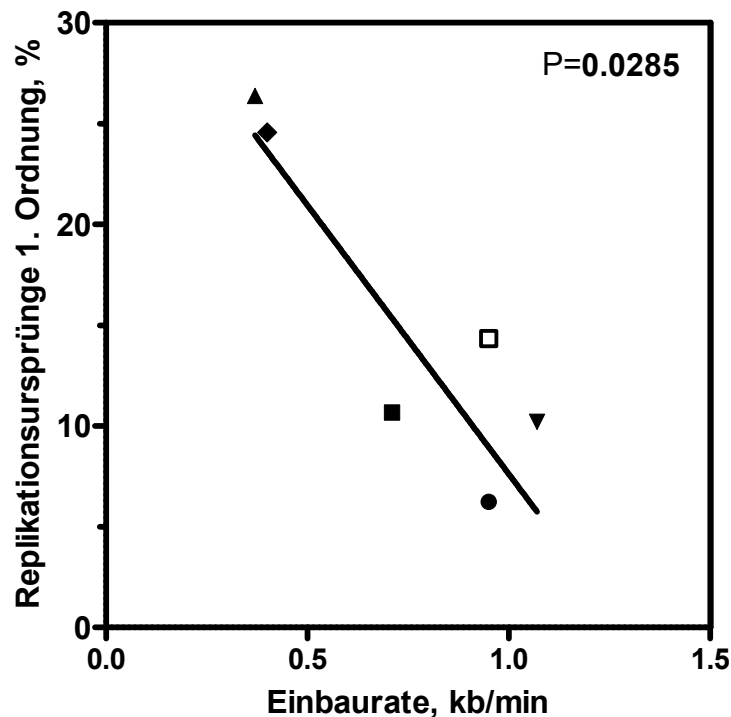


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der Replikationsursprünge 1. Ordnung im Verhältnis zur Einbaurrate in kb/min. Exponentiell wachsende Zellen mit Defekten in den Fanconi-Genen A, B, D1 oder D2 wurden für jeweils 45 Minuten mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert, die Länge der DNA-Stränge mit ImageJ ermittelt und in kb/min umgerechnet. Zudem wurden die Replikationsstrukturen mit ImageJ ermittelt und quantifiziert und im Verhältnis zur Einbaurrate der jeweiligen Zellen aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, dass diejenigen Zellen mit der niedrigsten Einbaurrate den höchsten Anteil neuer Replikationsursprünge aufwiesen. Dahingegen zeigten Zellen mit der höchsten Einbaurrate den geringsten Anteil von Replikationsursprüngen 1. Ordnung. Somit konnte eine signifikante Korrelation ($P=0,0285$) zwischen der Einbaurrate und der Aktivierung der Replikationsursprünge 1. Ordnung gezeigt werden (Abbildung 4).

4.3 Einfluss eines Defektes in unterschiedlichen Fanconi-Proteinen auf die Initiation von Replikationsursprüngen nach Schädigung mit MMC

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich ein Defekt in den Fanconi-Genen A, B, D1 oder D2 auf die Initiation neuer Replikationsursprünge auswirkt, nachdem die Zellen mit MMC behandelt wurden, was zur Bildung von DNA-Intrastrangvernetzungen führt. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit CldU markiert, daraufhin mit 40 μM MMC geschädigt, anschließend für weitere 30 Minuten mit CldU inkubiert und abschließend für 45 Minuten mit IdU markiert. Die DNA wurde präpariert und die eingebauten Nukleotide mithilfe spezifischer Antikörper detektiert. Danach wurden die unterschiedlichen Replikationsstrukturen mit dem Programm ImageJ ermittelt und quantifiziert, die Replikationsursprünge 2. Ordnung (Abbildung 1B) ermittelt und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

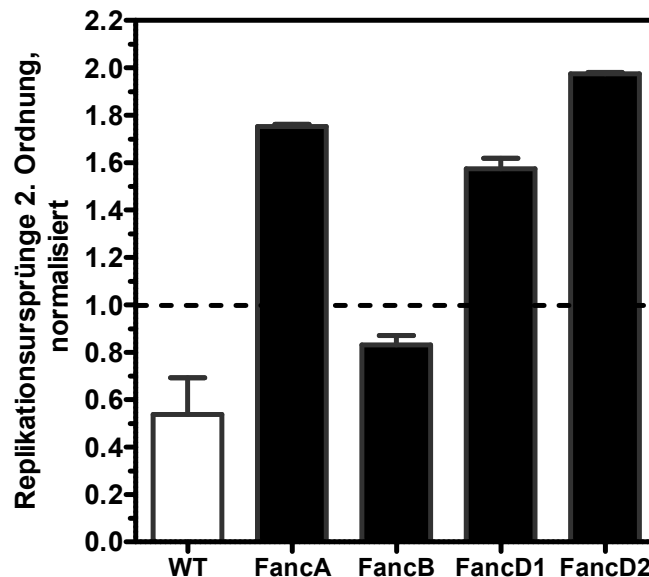


Abbildung 5: Normalisierter Anteil der Replikationsereignisse 2. Ordnung nach Behandlung mit 40 μM MMC. Exponentiell wachsende Zellen mit Defekten in den Fanconi-Genen A, B, D1 oder D2 wurden für jeweils 45 Minuten mit CldU und IdU markiert, hierbei nach 15 Minuten der CldU-Markierungszeit mit MMC geschädigt, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert und die Replikationsursprünge 2. Ordnung mit ImageJ ermittelt und quantifiziert.

Es zeigte sich ein breites Spektrum des Anteils von Replikationsursprüngen 2. Ordnung zwischen 0,54 und 1,98.

Zellen mit einem Defekt in FANCD2 zeigten mit 1,98 den höchsten Anteil von Replikationsursprüngen 2. Ordnung, FANCA-defekte Zellen wiesen einen Anteil von 1,75 auf, FANCD1-defekte Zellen einen Anteil von 1,57, und FANCB-defekte Zellen zeigten einen deutlich geringeren Anteil von 0,83 im Vergleich zum Wildtyp, der mit 0,54 den geringsten

Anteil von Replikationsursprüngen 2. Ordnung nach Schädigung mit MMC aufwies. Dies zeigt, dass die Fanconi-Gene D2, A und D1 auch nach Induktion von DNA-Intrastrangvernetzungen von wichtiger Bedeutung für die Regulation des Feuerns neuer Replikationsursprünge sind, während FANCB nicht wesentlich daran beteiligt ist.

4.4 Einfluss eines Defektes in unterschiedlichen Fanconi-Proteinen auf die Initiation von Replikationsursprüngen nach Schädigung mit H₂O₂

Abschließend wurde untersucht, inwiefern sich ein Defekt in den Fanconi-Genen A, B, D1 oder D2 auf die Initiation neuer Replikationsursprünge nach Induktion von Doppelstrangbrüchen auswirkt. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit CldU markiert, daraufhin mit 200 µM H₂O₂ geschädigt, anschließend für weitere 30 Minuten mit CldU inkubiert und abschließend für 45 Minuten mit IdU markiert. Die DNA wurde präpariert und die eingebauten Nukleotide mithilfe spezifischer Antikörper detektiert. Danach wurden die unterschiedlichen Replikationsstrukturen mit dem Programm ImageJ quantifiziert, die Replikationsursprünge 2. Ordnung ermittelt und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

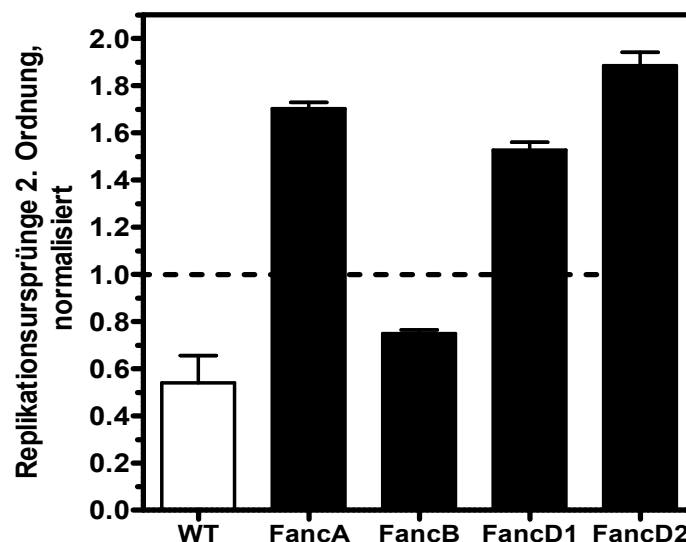


Abbildung 6: Normalisierter Anteil der Replikationsereignisse 2. Ordnung nach Behandlung mit 200 µM H₂O₂. Exponentiell wachsende Zellen mit Defekten in den Fanconi-Genen A, B, D1 oder D2 wurden für jeweils 45 Minuten mit CldU und IdU markiert, hierbei nach 15 Minuten der CldU-Markierungszeit mit H₂O₂ geschädigt, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert und die Replikationsursprünge 2. Ordnung mit ImageJ ermittelt und quantifiziert.

Es zeigte sich hier ein breites Spektrum des Anteils von Replikationsursprüngen 2. Ordnung zwischen 0,54 und 1,88 (Abbildung 5).

Zellen mit einem Defekt in FANCD2 zeigten mit 1,88 den größten Anteil von Replikationsursprüngen 2. Ordnung, FANCA-defekte Zellen wiesen einen Anteil von 1,70 auf, FANCD1-defekte Zellen einen Anteil von 1,53 und FANCB-defekte Zellen zeigten einen deutlich geringeren Anteil von 0,75 im Vergleich zum Wildtyp, der mit 0,54 den geringsten Anteil von Replikationsursprüngen 2. Ordnung nach Schädigung mit H₂O₂ aufwies. Dies zeigt, dass ein Defekt in den Fanconi-Genen D2, A und D1 zu einer erhöhten Aktivierung neuer Replikationsursprünge nach Schädigung mit H₂O₂ führt, während ein Defekt in FANCB sich im Wesentlichen wie die Wildtyp-Zelle verhält und die Replikationsursprünge 2. Ordnung herunterreguliert.

5. Diskussion

Ein Defekt in den Genen des Fanconi-Reparaturweges führt zu einer erhöhten genomischen Instabilität, welche sich in einer erhöhten Krebs-Prädisposition bei Patienten mit einer Fanconi-Anämie manifestiert.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern sich ein Defekt in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 auf die Replikationsprozesse der Zelle auswirkt. Für eine detaillierte Untersuchung der Replikation wurden zunächst die Elongation und die Aktivierung von Replikationsursprüngen im unbehandelten Zustand untersucht. Im Weiteren wurde untersucht, wie sich die Replikation nach Behandlung mit MMC oder H₂O₂ verhält. Es war von besonderem Interesse zu überprüfen, inwiefern die Fanconi-Proteine A und B, die als Proteine des „Core“-Komplexes agieren und somit maßgeblich für die Aktivierung des Reparaturweges durch die Monoubiquitylierung von Fanconi D2 verantwortlich sind, sich von den Fanconi-Proteinen D1 und D2 unterscheiden, die dahingegen eine wichtige Rolle in der Prozessierung von DNA-Schäden spielen.

5.1 Auswirkungen eines Defektes in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 auf den Elongationsprozess im unbehandelten Zustand

Eine fehlerfreie Replikation ist entscheidend für das zelluläre Überleben und die genomische Stabilität. Zellen mit einem Defekt in Fanconi-Genen weisen typischerweise eine erhöhte genomische Instabilität auf, die sich u.a. in Chromosomenbrüchen äußert (Kee and D'Andrea, 2010). Es wird vermutet, dass die genomische Instabilität auf unreparierte Schäden während

der Replikation zurückzuführen ist (Knipscheer et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien mit einem Defekt in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 daraufhin untersucht, ob eine gestörte Replikation vorliegt.

Für die Untersuchung der Replikation wurde der DNA Fiber Assay verwendet, der eine genaue Analyse der einzelnen Schritte der Replikation erlaubt. Zunächst wurde die Elongation der Replikation untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass sich ein Defekt der Gene FANCD1 und FANCD2 beträchtlich auf den Fortschritt der Elongation der Replikation auswirkt, indem eine signifikant geringere Einbaurrate im Vergleich zum Wildtyp bestimmt wurde. Dahingegen konnte für die Zelllinien mit einem Defekt in den Genen FANCA und FANCB nur eine geringe Reduktion im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden.

Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass FANCD1 und FANCD2, die in der Fanconi-Reparaturkaskade für die Prozessierung der Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich sind, ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Replikation zugesprochen werden kann. Dahingegen konnte für Zellen mit einem Defekt in FANCA und FANCB, die als Proteine des „Core“-Komplexes agieren und maßgeblich für die Aktivierung des Reparaturweges zuständig sind, keine größere Bedeutung für die Replikation zugeteilt werden.

Eine ähnliche Beobachtung in Bezug auf die Reduktion der Elongation konnte für Proteine der Homologen Rekombination (HR) beschrieben werden. Mehrere Arbeiten an HR-defizienten Zellen zeigten, dass eine Depletion oder ein Defekt eines HR-Proteins ebenfalls unter unbehandelten Bedingungen eine deutliche Reduktion der Elongationsraten verursacht. Die Reduktion der Elongation bei FANCD1- und FANCD2-defizienten Zellen ist dabei vergleichbar mit der Reduktion der Elongation bei einem Defekt in einem HR-Gen (Parplys et al., 2015). Proteine der Homologen Rekombination sind genau wie FANCD1 und FANCD2 für die Prozessierung der Reparatur von DNA-Schäden zuständig. Zellen mit einem Defekt in der Homologen Rekombination weisen genauso wie Zellen mit einem Defekt in FANCD1 und FANCD2 eine erhöhte Akkumulation unreparierter DNA-Schäden auf und diese unreparierten Schäden führten zur Reduktion der Elongationsrate und zur genomischen Instabilität der Zelle (Wilhelm et al., 2013; Parplys et al., 2015). Alles spricht dafür, dass jeweils die Reparatur-Effektor-Proteine des Fanconi-Reparaturweges von Bedeutung für einen ungestörten Fortschritt der Replikation sind.

In weiteren Arbeiten konnte die Wichtigkeit von HR- und Fanconi-Proteinen für die Replikation gezeigt werden. Arbeiten von Schlacher et al. und Pathania et al. beschreiben, dass Fanconi- und HR-Proteine wichtig für die Stabilität des Replikationsapparates sind und die Toleranz gegenüber Replikationsstress so minimieren (Schlacher et al., 2011; Schlacher et al., 2012; Pathania et al., 2015). Alles spricht dafür, dass die Proteine des Fanconi-Reparaturweges und

der Homologen Rekombination nicht nur reparaturabhängig interagieren, sondern auch während der Replikation gleichermaßen von Bedeutung für die Zelle sind. Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Bedeutung der Reparaturreffektorproteine des Fanconi-Reparaturweges eine ähnlich wichtige Bedeutung für eine fehlerfreie Replikation und Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität haben wie die Proteine der Homologen Rekombination.

5.2 Bedeutung eines Defektes in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 für die Initiation von Replikationsursprüngen im unbehandelten Zustand

Die Initiation der Replikation ist ein streng regulierter Prozess, bei dem die zeitliche Abfolge sowie die Dichte der Replikationsursprünge von großer Bedeutung für die Genauigkeit der Replikation sind. Liegt eine Störung in der Aktivierung der Replikationsursprünge vor, kann dies zur genomischen Instabilität führen (Huang and Koshland et al., 2003). Im vorherigen Abschnitt konnte bereits gezeigt werden, dass eine Reduktion der Einbaurrate der Replikation mit einer genomischen Instabilität der Zelle in Zusammenhang gebracht werden kann. Im Weiteren sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob ebenfalls Unterschiede in der Initiation der Replikation vorliegen. Mit Hilfe des DNA Fiber Assays wurde der prozentuale Anteil der Replikationsursprünge 1. Ordnung im unbehandelten Zustand bestimmt. FANCD1- und FANCD2-defiziente Zellen wiesen einen stark erhöhten Anteil von Replikationsursprüngen 1. Ordnung im Vergleich zum Wildtyp auf. Dahingegen zeigten FANCA- und FANCB-defiziente Zellen einen ähnlichen prozentualen Anteil von Replikationsursprüngen 1. Ordnung wie der Wildtyp.

In einer weiteren Analyse konnte eine signifikante Korrelation ($P= 0,0285$) zwischen der Einbaurrate und der Aktivierung der Replikationsursprünge 1. Ordnung gezeigt werden (Abbildung 4). Die FANCD1- und FANCD2-defizienten Zellen wiesen mit der niedrigsten Einbaurrate den höchsten Anteil von Replikationsursprüngen 1. Ordnung auf. Dahingegen zeigten FANCA- und FANCB-defiziente Zellen mit der höchsten Einbaurrate den geringsten Anteil von Replikationsursprüngen 1. Ordnung. FANCD1- und FANCD2-defiziente Zellen unterscheiden sich im Vergleich zum Wildtyp und zu FANCA- und FANCB-defizienten Zellen deutlich im Replikationsverhalten, sowohl in der Elongation als auch in der Aktivierung von Replikationsursprüngen. Der erhöhte Anteil von Replikationsursprüngen 1. Ordnung in FANCD1- und FANCD2-defizienten Zellen könnte eine Kompensation der verkürzten Elongationsrate sein.

Es kann angenommen werden, dass die Reparatur-Effektor-Proteine FANCD1 und FANCD2 eine große Bedeutung für eine akkurat regulierte Replikation haben. Eine Arbeit an PALB2 (FANCN)-defizienten Zelllinien bestätigt diese Vermutung. Eine Mutation von PALB2/FANCN führt zu einer Reduktion der Einbaurate und einer erhöhten Aktivierung von Replikationsursprüngen 1. Ordnung im unbehandelten Zustand (Nikkilä et al., 2013). Das Protein PALB2/FANCN zählt wie FANCD1 und FANCD2 zu den Reparatur-Effektor-Proteinen des Fanconi-Reparaturweges.

Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass FANCD2 in Interaktion mit dem Bloom-Syndrom-Protein wichtig für die Reaktivierung angehaltener Replikationsgabeln ist (Chaudhury et al., 2013). Ein Defekt des Bloom-Syndrom-Proteins führt ebenfalls zu einer reduzierten Elongationsrate, die mit einer höheren Dichte an Replikationsursprüngen korreliert werden konnte (Rao et al., 2007).

Für FANCA und FANCB konnte keine Literatur gefunden werden, die diesen Phänotyp beschreibt.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass Reparatur-Effektor-Proteine wie FANCD1 und FANCD2, Interaktionspartner von FANCD2 wie das Bloom-Protein und HR-Proteine eine wichtige Rolle für eine ungestörte Replikation innehaben, während FANCA und FANCB von untergeordneter Wichtigkeit für die Replikation sind. Hierbei handelt es sich bei den Reparatur-Effektor-Proteinen um Proteine, die Downstream der Reparaturkaskade aktiv sind und für die direkte Prozessierung von DNA-Schäden verantwortlich sind.

5.3 Auswirkungen eines Defektes in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 auf die Initiation von Replikationsursprüngen nach DNA-Schädigung

Fanconi-defiziente Zellen weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-Intrastrang- vernetzenden Agenzien und Sauerstoff-Radikalen auf. Das lässt sich auf eine Störung des für die DNA-Reparatur essentiell wichtigen Fanconi-Reparaturweges zurückführen (Digweed et al., 2002; Howlett et al., 2002). Sowohl DNA-Intrastrangvernetzungen als auch durch Sauerstoff-Radikale erzeugte DNA-Schäden führen zum Anhalten der Replikationsmaschinerie; darüber hinaus werden Kontroll- und Reparaturkaskaden aktiviert, um eine effektive Reparatur gewährleisten zu können (Parplys et al., 2012). Es ist entscheidend, dass eine weitere Aktivierung neuer Replikationsursprünge unterdrückt wird, um die Kollision der unreparierten Schäden mit neu aktivierten Replikationsgabeln sowie eine Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich eine Schädigung von Fanconi-defizienten Zellen mit dem DNA-Intrastrang-vernetzenden Agens Mitomycin C (MMC) und mit der Behandlung von H₂O₂ auf die Aktivierung von Replikationsursprüngen 2. Ordnung auswirkt. Die Aktivität neuinitiiertter Replikationsursprünge nach DNA-Schädigung sollte somit Aufschluss darüber geben, in welchem Ausmaß sich die erzeugten Schäden auf die Replikation auswirkten.

Nach der Induktion von DNA-Intrastrangvernetzungen mit MMC zeigte sich, dass dies bei Zellen mit einem Defekt in den Fanconi-Genen A, D1 und D2 zu einer erhöhten Aktivierung von Replikationsursprüngen 2. Ordnung führt, während eine FANCB-defiziente Zelle sich im Wesentlichen wie die Wildtyp-Zelle verhält. Nach der Inkubation mit 200 µM H₂O₂, welches in dieser Konzentration DNA-Doppelstrangbrüche induziert (Benitez-Bribiesca and Sanchez-Suarez, 1999), zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach der Induktion von MMC. Zellen mit einem Defekt in den Fanconi-Genen A, D1 und D2 wiesen einen erhöhten Anteil von Replikationsursprüngen 2. Ordnung auf, während eine FANCB-defiziente Zelle sich im Wesentlichen wie die Wildtyp-Zelle verhält.

Kollidiert die Replikationsmaschinerie während der S-Phase mit einem DNA-Schaden, verhindert in der Regel Chk1 den Fortschritt der S-Phase. Ein Hindernis während der Replikation führt dabei zur Entkopplung der Helikase von der Polymerase und es wird lange einzelsträngige DNA generiert. Dies führt über den ATR-ATRIP-Komplex zur Phosphorylierung von Chk1 (MacDougall et al., 2007). Phosphoryliertes Chk1 inhibiert alle weiteren Replikationsprozesse und der Intra-S-Phase-Checkpoint wird ausgelöst (Conti et al., 2007).

Es kann angenommen werden, dass Zellen mit einem Defekt in den Genen FANCA, FANCD1 und FANCD2 einen Intra-S-Phase-Checkpoint-Defekt aufweisen, da die Zellen trotz der Induktion von DNA-Intrastrangvernetzungen und Doppelstrangbrüchen weitere Replikationsursprünge aktivieren. Die Behandlung von Zellen in diesem Konzentrationsbereich führt normalerweise zur Inhibition der Polymerase, zum Anhalten von Replikationsgabeln und im weiteren zur Inaktivierung weiterer Replikationsursprünge (Parpys et al., 2012). Diese Beobachtung wurde bereits für andere Fanconi-defiziente Zellen beschrieben. Schwab und Kollegen konnten zeigen, dass FANCM-defiziente Zellen nach der Induktion von replikationsassoziierten Doppelstrangbrüchen vermehrt Replikationsursprünge aktivieren, nicht in der Lage sind Chk1 zu phosphorylieren und somit einen Defekt im Intra-S-Phase-Checkpoint aufweisen (Schwab et al., 2010). Eine weitere Arbeit beschreibt die Rolle von FANCD2 und BLM in der Reaktivierung von angehaltenen Replikationsgabeln nach der Gabe von Aphidicolin, einem Inhibitor der replikativen Polymerase. FANCD2 und BLM

unterdrücken dabei die weitere Aktivierung von Replikationsursprüngen, um der Zelle Zeit zu geben den Schaden zu beheben. FANCD2- und BLM-defiziente Zellen sind hierzu nicht in der Lage und weisen einen erhöhten Anteil an angehaltenen Replikationsgabeln sowie eine hohe Aktivierung von weiteren Replikationsursprüngen auf (Chaudhury et al., 2013).

Hieraus ergibt sich zusammenfassend, dass die Fanconi-Gene A, D1 und D2 von wichtiger Bedeutung für die Herunterregulation des Feuerns neuer Replikationsursprünge nach DNA-Schädigung sind, um angehaltene Replikationsgabeln zu reaktivieren, während FANCB nicht wesentlich daran beteiligt ist.

5.4 Bedeutung unterschiedlicher Therapieansätze für Patienten mit einer Fanconi-Anämie

Eine kurative Therapie der Fanconi-Anämie ist derzeit nicht möglich. Für das erhöhte Risiko kongenitaler Fehlbildungen sowie der Entstehung maligner Tumoren besteht aufgrund des genetischen Vererbungsmusters kein Therapieansatz, während für die hämatologische Symptomatik des zunehmenden Knochenmarkversagens unterschiedliche therapeutische Optionen bestehen.

Die derzeitige Standardbehandlung der Fanconi-Anämie besteht daher aus einer symptomatischen Therapie mit Behandlung der gesundheitlichen Probleme wie beispielsweise der Panzytopenie sowie der chirurgischen Behandlung der Fehlbildungen und der Therapie entstandener solider maligner Tumoren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einem Defekt in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 bereits im unbehandelten Zustand eine stark fehlerhafte Replikation aufweisen. Es kann angenommen werden, dass nicht nur, wie bereits beschrieben, der defekte Fanconi-Reparaturpfad, sondern auch die defekte Replikation dazu führen, dass unreparierte DNA Schäden während der Replikation akkumulieren und dies die Entstehung von Tumoren begünstigt. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass das DNA-Intrastrang- vernetzenden Agens Mitomycin C (MMC) und die Behandlung mit H₂O₂ sich im hohen Maße auf die Replikation auswirken und einen enormen Replikationsstress verursachen.

Der Replikationsstress könnte auch in diesem Fall in Kombination mit dem defekten Fanconi-Reparaturpfad die erhöhte Sensitivität gegenüber Chemo- und Strahlentherapie von FA-Patienten erklären. Somit scheint eine gezielte Schädigung der Replikation ein optimales Ziel für Fanconi-Anämie-Patienten zu sein.

Bei einem Defekt im Fanconi-Reparaturpfad liegt eine somatische Mutation des betroffenen Genes vor. Somit betrifft die hohe Sensitivität gegenüber Chemotherapie nicht nur die zu behandelnden Tumorzellen, sondern auch das Normalgewebe. Eine Therapie der malignen Tumoren ist nur dosisreduziert einsetzbar. Hier ist in Zukunft eine antitumorale Therapie mit einem PARP1-Inhibitor in Kombination mit einer Strahlentherapie denkbar (Moldovan et al., 2009). Der Einsatz von PARP1-Inhibitoren basiert auf der Beobachtung, dass PARP-Inhibitoren selektiv HR-defiziente Krebszellen schädigen, indem die sogenannte synthetische Letalität zum Einsatz kommt. Es konnte bereits an Kopf-Hals-Tumorzelllinien mit einem Defekt in Homologer Rekombination gezeigt werden, dass die Gabe eines PARP1-Inhibitors in Kombination mit Strahlentherapie die Therapeutische Ratio erhöht, indem vor allem die Replikationsprozesse gestört werden (Wurster et al., 2016).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass in der Therapie der Fanconi-Anämie bisher die symptomatischen Behandlungsoptionen überwiegen, während unterschiedliche kurative Therapieansätze weiterhin Gegenstand der Forschung sind.

6. Zusammenfassung / Abstract

Der Erhalt der genomischen Stabilität ist das fundamentale Ziel der Zelle. Dies wird unter anderem sowohl durch eine fehlerfreie DNA-Replikation als auch durch die Reparatur von DNA-Schäden gewährleistet. Kollidiert die Replikationsmaschinerie mit DNA-Insta-Strang-Vernetzungen, wird der Fanconi-Reparaturweg aktiviert, wobei es in erster Linie zur Interaktion der 15 Fanconi-Gene kommt. Die replikative S-Phase wird unterbrochen, weitere Initiationsereignisse der Replikation werden unterdrückt und die Reparatur erfolgt mittels Homologer Rekombination. Ein Defekt in den Genen des Fanconi-Reparaturweges führt zu einer erhöhten genomischen Instabilität, welche sich in einer erhöhten Krebs-Prädisposition manifestiert.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern sich ein Defekt in den Fanconi-Genen A, B, D1 und D2 auf die Replikationsprozesse der Zelle auswirkt. Für eine detaillierte Untersuchung der Replikation wurden zunächst die Elongation und die Aktivierung von Replikationsursprüngen im unbehandelten Zustand untersucht. Im Weiteren wurde untersucht, wie sich die Replikation nach Behandlung mit Mitomycin C oder Wasserstoff-Peroxid verhält. Es war von besonderem Interesse zu überprüfen, inwiefern die Fanconi-Proteine A und B, die als Proteine des „Core“-Komplexes agieren und somit maßgeblich für die Aktivierung des Reparaturweges durch die Monoubiquitylierung von Fanconi D2 verantwortlich sind, sich von

den Fanconi-Proteinen D1 und D2 unterscheiden, die eine wichtige Rolle in der Prozessierung von DNA-Schäden spielen.

Es zeigte sich, dass ein Defekt in den Reparatur-Effektor-Proteinen FANCD1 und FANCD2 sich bereits im unbehandelten Zustand stark auf die Replikation auswirkt, gekennzeichnet durch einem signifikant reduzierten Fortschritt der Elongation. Die Proteine des „Core“-Komplexes FANCA und FANCB zeigten dagegen keine Auffälligkeit gegenüber dem Wildtyp. Für FANCD1 und D2 wurde darüber hinaus eine Reduktion des Elongationsfortschritts sowie eine erhöhte Initiationsrate von Replikationsursprüngen beobachtet. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass FANCD1 und FANCD2 maßgeblich an der Regulation der Replikation beteiligt sind.

Nach Induktion von DNA-Intrastrangvernetzungen mit Mitomycin C sowie Induktion von Doppelstrangbrüchen mit Wasserstoff-Peroxid kam es zu einer erhöhten Initiation von Replikationsursprüngen 2. Ordnung bei den FANCA-, FANCD1- und FANCD2-defizienten Zellen, was auf eine Funktion dieser Gene für die Regulation von Replikationsursprüngen im Rahmen der DNA-Reparatur schließen lässt.

Diese Beobachtungen sind von besonderem medizinischen Interesse, da die Bedeutung einzelner Fanconi-Gene genutzt werden könnte, um eine individualisierte anti-tumorale Therapie beispielweise mit einem PARP1-Inhibitor weiter zu entwickeln.

Abstract

The maintenance of genome stability is the fundamental aim of the cell. This is ensured both by faultless DNA-replication and several DNA repair pathways. The cellular response to DNA-crosslinks occurring during the replication is the activation of the Fanconi Anemia pathway which involves the interaction of the 15 Fanconi anemia genes. The replicative S-phase will be interrupted, further initiation of replication will be suppressed and the repair will be executed by homologous recombination. Mutations in the Fanconi anemia genes are attended by an increased genome instability which becomes manifested in a raised cancer predisposition.

The intention of this work was to investigate how deficiencies in the Fanconi genes A, B, D1 and D2 affect the cellular replication processes. For detailed investigations of replication, initially the elongation and the activation of new replication origins in untreated state were observed. Furthermore, the replication after treatment with Mitomycin C or Hydrogen Peroxide was explored. The special interest was to survey in what way the Fanconi genes A

and B, which act as proteins of the Core-Complex and which are significantly involved in the activation of the DNA-repair pathway by the monoubiquitination of Fanconi D2 differ from the Fanconi genes D1 and D2 which play an important role in the repair process of DNA damage.

It appeared that a deficiency in the repair effector proteins FANCD1 and FANCD2 causes considerable replication impacts already in untreated state, characterized by a significant reduced elongation progress. On the contrary, the proteins of the Core-Complex FANCA and FANCB did not show an abnormality compared with the wild type. Additionally, both a reduction of the elongation progress and an increased rate of new replication origins was observed in FANCD1 and FANCD2. The conclusion to be drawn from this is the significant involvement of FANCD1 and FANCD2 in regulation processes of DNA replication.

After induction of DNA crosslinks with Mitomycin C and induction of DNA double strand breaks with Hydrogen Peroxide, an increased rate of second-order replication origins was observed in FANCA-, FANCD1- and FANCD2-deficient cells which concludes with the distinguished function of these genes in the regulation of replication origins during DNA repair processes.

These observations are of particular medical interest because the function of the several Fanconi genes could be adjuvant to develop an individualized anti-tumoral therapy with a PARP1-inhibitor.

7. Literaturverzeichnis

Alter, B.P. (2003). Cancer in Fanconi Anemia, 1927-2001. *Cancer* 97: 425-440.

Auerbach, A.D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research* 668: 4-10.

Benitez-Bribiesca, L. and Sanchez-Suarez, P. (1999). Oxidative damage, bleomycin and gamma radiation induce different types of DNA strand breaks in normal lymphocytes and thymocytes. A comet assay study. *Annals of the New York Academy of Sciences* 887: 133-149.

Ben-Yehoyada, M., Wang, L.C., Kozekov, I.D., Rizzo, C.J., Gottesman, M.E., Gautier, J. (2009). Checkpoint signaling from a single DNA interstrand crosslink. *Molecular Cell* 35: 704-715.

Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434: 913-917.

Ceccaldi, R., Liu, J.C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M.I., O'Connor, K.W., Konstantinopoulos, P.A., Elledge, S.J., Boulton, S.J. (2015). Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Poltheta-mediated repair. *Nature* 518: 258-262.

Chaudhury, I., Sareen, A., Raghunandan, M., Sobek, A. (2013). FANCD2 regulates BLM complex functions independently of FANCI to promote replication fork recovery. *Nucleic Acids research* 41: 6444-6459.

Chirnomas, D., Taniguchi, T., de la Vega, M., Vaidya, A.P., Vasserman, M., Hartman, A.R., Kennedy, R., Foster, R., Mahoney, J., Seiden, M.V. (2006). Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Molecular Cancer Therapeutics* 5: 952-961.

Clauson, C., Scharer, O.D., Niedernhofer, L. (2013). Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: a012732.

Conti, C., Seiler, J. A., Pommier, Y. (2007). The mammalian DNA replication elongation checkpoint. *Cell Cycle* 6:22: 2760-2767.

Crossan, G.P. and Patel, K.J. (2011). The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. *The Journal of Pathology* 226: 326-337.

D'Andrea, A.D. (2010). Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 362: 1909-1919.

D'Andrea, A.D. and Grompe, M. (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nature Reviews* 3: 23-34.

Deans, A.J. and West, S.C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer* 11: 467-480.

Digweed, M., Rothe, S., Demuth, I., Scholz, R., Schindler D., Stumm, M., Grompe, M., Jordan, A., Sperling, K. (2002). Attenuation of the formation of DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi anaemia. *Carcinogenesis* 23: 1121-1126.

- Dronkert, M.L. and Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research* 486: 217-247.
- Gaillard, H., Garcia-Muse, T., Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer* 15: 276-289.
- Ho, G. P., Margossian, S., Taniguchi, T., D'Andrea, A. D. (2006). Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Molecular and Cellular Biology* 26: 7005-7015.
- Howett, N. G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, E. A., D'Andrea, A. D. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297: 606-609.
- Huang, D. and Koshland, D. (2003). Chromosome integrity in *Saccharomyces cerevisiae*: the interplay of DNA replication initiation factors, elongation factors and origins. *Genes & Development* 17: 1741-1754.
- Huang, M., Kim, J. M., Shiotani, B., Yang, K., Zou, L., D'Andrea, A. D. (2010). The FANCM/FAAP24 complex is required for the DNA interstrand crosslink-induced checkpoint response. *Molecular Cell* 39: 259-268.
- Huang, Y., Leung, J.W., Lowery, M., Matsushita, N., Wang, Y., Shen, X., Huang, D., Takata, M., Chen, J., Li, L. (2014). Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. *Cell Reports* 7: 1849-1857.
- Kee, Y. and D'Andrea, A. D. (2010). Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes & Development* 24: 1680-1694.
- Kennedy, R. D. and D'Andrea, A. D. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes & Development*. 19: 2925-2940.
- Kennedy, R. D. and D'Andrea, A. D. (2006). DNA repair pathways in clinical practice: Lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *Journal of Clinical Oncology* 24: 3799-3808.
- Kim, H. and D'Andrea, A. D. (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes & Development* 26: 1393-1408.
- Knipscheer, P., Räschle, M., Smogorzewska, A., Enoiu, M., Ho, T. V., Schärer, O. D., Elledge, S., J., Walter, J. C. (2009). The Fanconi Anemia pathway promotes replication-dependent DNA Interstrand Cross-Link repair. *Science express* 12 November 2009: 1-10.
- Kutler, D.I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S.D., Berwick, M., Giampietro, P. F., Hanenberg, H., Auerbach, A. D. (2003). A 20-year-perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 101: 1249-1256.
- MacDougall, C. A., Byun, T. S., Van, C., Yee, M. C., Cimprich, K. A. (2007). The structural determinants of checkpoint activation. *Genes & Development* 21: 898-903.
- Moldovan, G. L. and D'Andrea, A. D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annual Review of Genetics* 43: 223-249.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability- an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 220-228.

- Nikkilä, J., Parpys, A. C., Pylkäs, K., Bose, M., Huo, Y., Borgmann, K., Rapakko, K., Nieminen, P., Xia, B., Prospiech, H., Winqvist, R. (2013). Heterozygous mutations in PALP2 cause DNA replication and damage response defects. *Nature communications* 4: 2578.
- Parpys, A. C., Petermann, E., Petersen, C., Dikomey, E., Borgmann, K. (2012). DNA-damage by X-rays and their impact on replication processes. *Radiotherapy and oncology* 102: 466-471.
- Parpys, A. C., Zhao, W., Sharma, N., Groesser, T., Liang, F., Maranon, D. G., Leung, S. G., Grundt, K., Dray, E., Idate, R., Ostvold, A. C., Schild, D., Sung, P., Wiese, C. (2015). NUCKS1 is a novel RAD51AP1 paralog important for homologous recombination and genome stability. *Nucleic acids research* 16: 9817-9834.
- Parpys, A. C., Seelbach, J. I., Becker, S., Behr, M., Wrona, A., Yend, C., Mansour, W. Y., Joosse, S. A., Stuerzbecher, H. W., Pospiech, H., Petersen, C., Dikomey, E., Borgmann, K. (2015). High levels of RAD51 perturb DNA replication elongation and cause unscheduled origin firing due to impaired CHK 1 activation. *Cell cycle* 14: 3190-3202.
- Pathania, S., Bade, S., Le Guillou, M., Burke, K., Reed, R., Bowman-Colin, C., Su, Y., Ting, D., Polyak, K., Richardson, A., Feunteun, J., Garber, J., Livingston, D. (2014). BRCA1 haploinsufficiency for replication stress suppression in primary cells. *Nature communications* 5: 5496.
- Rao, V.A., Conti, C., Guirouilh-Barbat, J., Nakamura, A., Miao, Z. H., Davies, S. L., Sacca, B., Hickson, A. D., Bensimon, A., Pommier, Y. (2007). Endogenous gamma-H2AX-ATM-Chk2 checkpoint activation in Bloom's syndrome helicase deficient cells is related to DNA replication arrested forks. *Molecular cancer research* 5: 713-724.
- Rosenberg, P. S., Greene, M. H., Alter, B. P. (2003). Cancer incidence in persons with Fanconi Anemia. *Blood* 101: 822-826.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE 11. *Cell* 145: 529-542.
- Schlacher, K., Wu, H., Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer cell* 22: 106-116.
- Schwab, R. A., Blackford, A. N., Niedzwiedz, W. (2010). ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. *EMBO Journal* 29: 806-818.
- Wang, W. (2007). Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nature Reviews Genetics* 8: 735-748.
- Wilhelm, T., Magdalou, I., Barascu, A., Técher, H., Debatisse, M., Lopes, B. (2014). Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *PNAS* 111: 763-768.
- Wurster, S., Hennes, F., Parpys, A. C., Seelbach, J. I., Mansour, W. Y., Zielinski, A., Petersen, C., Clauditz, T. S., Münscher, A., Friedl, A. A., Borgmann, K. (2016). PARP1 inhibition radiosensitizes HNSCC cells deficient in homologous recombination by disabling the DNA replication fork elongation response. *Oncotarget* 6947.

8. Danksagung

Diese Arbeit verdankt ihre Existenz auch dem Engagement all derer, die mich in meinem Vorhaben unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey danken, der es mir als Leiter des Instituts für Strahlentherapie und Radioonkologie ermöglicht hat diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank richtet sich an Frau PD Dr. Kerstin Borgmann, die mir als Doktormutter mit einem hohen Maß an Motivation, Geduld und Fürsorge zur Seite stand und mir immer wieder wertvolle Anregungen, Material und Hinweise gab.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. Ann Christin Parplys, die mich als Betreuerin in die Techniken des DNA Fibre Assays einführte und mich stets freundlich und motivierend mit Rat und Tat unterstützte.

Weiterhin danke ich Frau Alexandra Zielinski, die mich geduldig in die grundlegenden Versuchstechniken einwies und für mich stets eine verlässliche Ansprechpartnerin war.

Mein spezieller Dank gilt meinem Patensohn-Neffen Julian, der mir auf seine unvergleichliche Art und Weise tatkräftig und liebevoll zur Seite stand.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Tochter Leanna Marie und meinem Sohn Lennart Mattis, die mein größtes Glück sind und in mir durch ihr bezaubernd lebendiges Wesen und unser inniges Miteinander eine ganz besondere Motivation entfachten.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, denen ich diese Dissertation widme und die mir mein Leben lang voller Liebe einen unbeschreiblich wertvollen Rückhalt gaben. Ihr unermüdliches Engagement war und ist mir eine großartige Unterstützung.

9. Curriculum vitae

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: