

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

Funktionelle und molekulare Pränataldiagnostik der Fanconi-Anämie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Astrid Bechtold
aus Wolfenbüttel

Würzburg, Mai 2005

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Korreferent: Prof. Dr. med. D. Schindler

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2005

Die Promovendin ist Ärztin.

FÜR SIEGFRIED, JUSTUS UND GERLINDE

1. EINLEITUNG	1
1.1 Klinische Symptomatik der Fanconi-Anämie	1
1. 2 Genetische Grundlagen der Fanconi-Anämie	2
1. 3 Diagnostik bei Fanconi-Anämie	3
1.3.1 Chromosombruchanalyse	3
1.3.2 Durchflußzytometrische Analyse	4
1.3.3 Komplementationsanalyse	4
1.3.4 Mutationsanalyse	5
1.4 Therapieansätze bei Fanconi-Anämie	6
1.4.1 Knochenmarkstransplantation (KMT)	6
1.4.2 Medikamentöse Therapie	7
1.4.3. Somatische Gentherapie	7
1.5 Fragestellung	8
2. METHODEN	10
2. 1. Fruchtwasserzellkultur	10
2.2 Kultur von Chorionbiopsiematerial	10
2.2.1 Kurzzeitkultur	10
2.2.2 Langzeitkultur	11
2.3. Kultur von Blutlymphozyten	11
2.4 Zellpräparation und Färbung für die Durchflußzytometrie	12
2.5 Zellzyklusanalyse	12
2.6 Exemplarische Darstellung der durchflußzytometrischen Analyse	14
2.7 Zellwachstumsanalyse von Amnionzellen	16
2.8 Mutationsanalyse	17
2.8.1 DNA-Isolation und PCR	17
2.8.2 DNA- Sequenzierung	17
3. ERGEBNISSE	19
3. 1 Pränatale Diagnostik bei Familien der Kategorie I	19
3.1.1 Kategorie I, Familie 1:	19
3. 1. 2 Kategorie I, Familie 2:	20
3.1.3 Kategorie I, Familie 3:	22
3.1.4 Kategorie I, Familie 4:	22
3.1.5 Kategorie I, Familie 5:	23
3.1.6 Kategorie I, Familie 6:	25
3.1.8 Kategorie I, Familie 8:	27

3.1.9 Kategorie I, Familie 9:	28
3.1.10 Kategorie I, Familie 10:	29
3. 2 Pränatale Diagnostik bei Familien der Kategorie II	31
3.2.1a Kategorie II, Familie 1, zweites Kind:	31
3.2.1b Kategorie II, Familie 1, drittes Kind:	33
3.2.2 Kategorie II, Familie 2:	35
3.2.3 Kategorie II, Familie 3:	36
3.2.4 Kategorie II, Familie 4:	37
3.2.5 Kategorie II, Familie 5:	38
3.2.6 Kategorie II, Familie 6:	39
3.2.7 Kategorie B, Familie 7:	40
3.2.8 Kategorie II, Familie 8:	41
Pränatale Diagnostik bei Familien der Kategorie III	42
3.3.1 Kategorie III, Familie 1:	42
3.3.2 Kategorie III, Familie 2:	44
3.3.3 Kategorie III, Familie 3:	48
3.3.4 Kategorie III, Familie 4:	50
3.3.6a Kategorie III, Familie 6, zweites Kind:	54
3.3.6b Kategorie III, Familie 6, drittes Kind:	56
3.3.6c Kategorie III, Familie 6, viertes Kind:	58
4. DISKUSSION	63
4.1 Historische Entwicklung der Pränataldiagnostik bei Fanconi-Anämie	63
4.2 Bewertung der Ergebnisse der funktionellen Pränataldiagnostik	64
4.2.1 Zweiparametrische Zellzyklusdiagnostik an kultivierten Fruchtwasserzellen	64
4.2.2 Einparametrische Zellzyklusdiagnostik an kultivierten Fruchtwasserzellen	67
4.2.3 Zellzyklusdiagnostik an Nabelschnurblut	68
4.2.4 Bestimmung der MMC-Sensitivität des FW-Zellwachstums als Alternative zur Zellzyklusmessung	70
4.3 Erkenntnisse aus den Ergebnissen der funktionellen Zelldiagnostik in Familien der Kategorien I und II	71
4.4 Erkenntnisse aus den Ergebnissen der molekulargenetischen Diagnostik in Familien der Kategorie III	72
4.5. Präimplantationsdiagnostik (PID) als Alternative zur konventionellen PD?	73
4.6 Zusammenfassung	76
5. LITERATUR	77

1. EINLEITUNG

1.1 Klinische Symptomatik der Fanconi-Anämie

Die Fanconi-Anämie (FA) ist ein seltenes autosomal-rezessiv vererbtes Krankheitsbild, welches durch angeborene Fehlbildungen an verschiedenen Organen, frühes Knochenmarksversagen sowie die Prädisposition zu Leukämien und soliden Tumoren gekennzeichnet ist. Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung 1927 von dem Schweizer Pädiater Guido Fanconi. Die Prävalenz wird mit 1:200 000 (Digweed et al, 1996) bzw. 1: 1 Million (Joenje, Patel, 2001) angegeben. Das Krankheitsbild ist heterogen und variiert von Patient zu Patient, weshalb die klinische Diagnose oftmals erschwert ist. Zu den besonders häufigen Manifestationen gehören mit 51% der Kleinwuchs, mit 55% Hauthyperpigmentierungen und Cafe-au-lait-Flecken, mit 43% Fehlbildungen der oberen Extremitäten (insbesondere Radialstrahldefekte bis zur kompletten Radiusaplasie) und mit 32% urogenitale Störungen bei männlichen Patienten; bei den weiblichen hingegen nur zu 3% (Alter et al, 2003). Seltener (< 30%) beobachtet werden Nierenfehlbildungen, Mikrocephalie, Hörstörungen, Strabismus und Herzfehler (de Kerviler et al, 2000; German, 1973; Alter, 1993). Relativ selten (<10%) wird eine geistige Retardierung gefunden. Neben einem initial niedrigen Geburtsgewicht kommt es häufig zu Gedeihstörungen und Wachstumsretardierung (Alter et al, 1993 und 2003). Bis zu 80% der Patienten weisen Störungen des endokrinen Systems auf (Hyperinsulinämie, Wachstumshormon-Insuffizienz, Hypothyreose) (Wajnrajch et al, 2001). Im Mittelpunkt der hämatologischen Erkrankungen steht das Knochenmarkversagen (Panzytopenie), jedoch besteht auch ein stark erhöhtes Leukämie-Risiko (AML). Im Erwachsenenalter kommt es im Rahmen der Fanconi-Anämie besonders häufig auch zur frühzeitigen Entwicklung von soliden Tumoren. Ganz überwiegend handelt es sich dabei um gynäkologische und gastrointestinale Neoplasien mit besonderer Häufigkeit von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Alter, 1993; Joenje, Patel, 2001). Allerdings sterben viele Patienten an Knochenmarksversagen oder Leukämien, noch bevor sie andere Malignome entwickeln. Die durchschnittliche Lebenserwartung der Patienten mit FA wird mit 20 Jahren (Berger et al, 1996) bzw. 24 Jahren angegeben (Kutler et al, 2003).

Auffällig werden die Patienten meist durch im Kindesalter beginnende rezidivierende Infekte und anhaltende, schwer stillbare Blutungen, bedingt durch Versagen der Blutbildung mit Thrombozytopenie, Granulozytopenie und Anämie. Eine progrediente Entwicklung der Erkrankung führt im Alter von 6 bis 9 Jahren schließlich zum Knochenmarksversagen unter dem Bild einer Panzytopenie. Wegen der großen Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes bedarf die klinische Verdachtsdiagnose der Bestätigung durch spezielle Laboruntersuchungen. Hierzu gehören der Nachweis spontaner Chromosomeninstabilität sowie der Hypersensibilität der Zellen gegenüber alkylierenden Substanzen oder der Nachweis charakteristischer Zellzyklusstörungen in der Durchflußzytometrie (D'Andrea et al, 1997). Die Kombination aus zyto genetischer und durchflußzytometrischer Methode hat sich in der diagnostischen Praxis bewährt.

1. 2 Genetische Grundlagen der Fanconi-Anämie

Mit Hilfe von Komplementationsstudien wurden bislang elf FA-Komplementationsgruppen (FANCA bis FANCI, einschließlich D1 und D2) identifiziert (Levitus et al, 2004). Die Definition einer Komplementationsgruppe erfolgt entweder durch Fusion von Zellen jeweils zweier nicht verwandter FA-Patienten (Levitus et al, 2004) oder durch retrovirale Transduktion eines bereits bekannten FA-Gens in eine bisher nicht zugeordnete Zelllinie (Popp et al, 2003). Wenn nach der Fusion die Sensitivität der Zellhybride gegenüber der alkylierenden Substanz Mitomycin C derjenigen von gesunden Zellen entspricht, ist dies der Hinweis darauf, dass die beiden Mutationen der Zellen in Genen unterschiedlicher Komplementationsgruppen zu finden sind. Im Fall der retroviralen Transduktion bedeutet die Wandlung zum Wildtyp-Phänotyp, dass mit der Wildtyp-DNA eine Korrektur des FA-Phänotyps stattgefunden hat, wodurch das defekte Gen durch das Wildtyp-Gen ersetzt und somit identifiziert wurde. Die Defekte in Zellen der verschiedenen Komplementationsgruppen reflektieren jeweils den Ausfall eines unterschiedlichen FA-Gens. (Duckworth-Rysiecki et al, 1985; Strathdee et al, 1992; Joenje et al, 1995,1997). Bisher wurden 8 der verantwortlichen Gene identifiziert. Die meisten Patienten des „International Fanconi Anemia Registry“ (IFAR) gehören der Komplementationsgruppe A an (65%), immerhin 15% der Gruppe C und 10% der Gruppe G (Kutler et al, 2003). Die Zuordnung zu einer bestimmten

Komplementationsgruppe ist insofern von Bedeutung, als dass sie die Mutationssuche erleichtert. Die Art der Mutation in dem jeweiligen Gen ist hinsichtlich des klinischen Verlaufes und der Prognose von größerer Bedeutung als die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Komplementationsgruppe. Ebenso ergeben sich auf Grund der Kenntnis des ursächlichen Gendefektes auch verschiedene Therapieoptionen (Kutler et al, 2003). Des Weiteren ist die genaue Kenntnis des Gendefektes von Bedeutung für die pränatale Diagnostik sowie für zukünftige gentherapeutische Ansätze.

Die Proteine, welche von den FA-Genen kodiert werden, scheinen in der nicht mutierten Form eine Rolle bei der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden sowie bei der Regulation des Zellzyklus zu spielen. Dabei interagieren sie mit den Genprodukten anderer Caretaker-Gene wie ATM (ataxia-teleangiectasia mutated protein) und BRCA1 (breast cancer susceptibility protein 1), um Schäden in der DNA zu erkennen und zu beseitigen. Als Antwort auf Schädigungen durch alkylierende Substanzen wie Mitomycin C oder Diepoxybutan oder auch durch endogene Schadstoffe wie Sauerstoffradikale bildet sich im Zytoplasma ein Komplex aus mehreren FA-Proteinen, der nach Phosphorylierung in den Zellkern transportiert wird und dort das FANCD2-Protein aktiviert. FANCD2 assoziiert sich im Zellkern mit BRCA2. Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung von BRCA2, welches mit dem FA-Gen FANCD1 identisch ist und die RAD51-Rekombinase an geschädigtes Chromatin rekrutiert. Bei FA-Patienten ist die Bildung der aktiven Kernkomplexe aufgrund der mutierten Gene gestört, so dass die Schadenserkennung und die folgenden Reparaturvorgänge nicht regelrecht stattfinden können (Kutler et al, 2003).

1. 3 Diagnostik bei Fanconi-Anämie

1.3.1 Chromosombruchanalyse

In kultivierten mononukleären Blutzellen von FA-Patienten finden sich bereits spontan charakteristische Chromatidbrüche und Reunionsfiguren, die erstmals von Traute Schroeder im Jahre 1964 beschrieben wurden (Schroeder et al, 1964). Nach Behandlung der Zellen mit Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB) erhöht sich die Rate an geschädigten Chromosomen erheblich, was die Sensitivität der FA-Zellen gegenüber alkylierenden und DNA-vernetzenden Agentien belegt. Allerdings

weisen Patientenzellen häufig ein ungenügendes Wachstum auf, so daß nur wenige brauchbare Metaphasen zur Verfügung stehen. Außerdem ist der Zeitaufwand für die Chromosomenbruchanalyse erheblich.

1.3.2 Durchflußzytometrische Analyse

Die erheblich schnellere Durchflußzytometrie kann sowohl zur Zellzyklusanalyse von Blutlymphozyten, lymphoblastoiden Zellen als auch von Fibroblasten angewandt werden. Vorteile des Verfahrens sind Schnelligkeit, statistische Sicherheit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Subjektive Einschätzungen (wie bei der Chromosomenbruchanalyse) entfallen. Mit dem Pflanzenlektin Phytohämagglutinin stimulierte Lymphozyten gesunder Spender durchlaufen innerhalb von 72 Stunden bis zu vier vollständige Zellzyklen, ohne dass die Zellen in irgendeinem Zellzykluskompartiment arretiert werden. Im Gegensatz dazu akkumulieren Zellen von FA-Patienten in den S- und G2-Phasen aufeinanderfolgender Zellzyklen, so dass nur wenige oder überhaupt keine Zellen in den 3. oder 4. Zellzyklus gelangen (Kubbies et al, 1985). Grundsätzlich werden Zellen in der G2-Phase arretiert, wenn ihre DNA nicht vollständig repliziert ist oder nicht reparierte DNA-Schäden aufweist. Die typische Erhöhung der G2-Phasen-Fractionen bei FA-Patienten reflektiert also die hohe (endogene) Schädigungsrate der Patienten-Zellen (Seyschab et al, 1993).

1.3.3 Komplementationsanalyse

Es gibt zwei Verfahren, um FA-Patienten einer Komplementationsgruppe zuzuordnen: Durch die Fusion verschiedener FA-Zellen und anschließender Selektion (Joenje et al, 1995, 1997; Levitus et al, 2004), oder durch retroviralen Gentransfer (Hananberg et al, 2002). Das einfachere und schnellere Verfahren ist der retrovirale Gentransfer: Die viralen Vektoren enthalten jeweils ein intaktes FA-Gen, was in die „Testzelle“ transfiziert wird. Bleibt nach der Transfektion die MMC-Überempfindlichkeit der Testzellen bestehen, so entspricht das transfizierte Gen nicht dem defekten Gen der Testzelle. Kommt es umgekehrt zur Korrektur der MMC-Sensitivität, so ist damit belegt, dass das transfizierte Gen dem defekten Gen der Testzellen entspricht, d.h. es kommt zur funktionellen Komplementation.

1.3.4 Mutationsanalyse

Durch Mutationsanalysen können direkt Aussagen über die Art und Lage der Mutation gemacht werden. Bisher wurden Gene und deren Mutationen von 8 Komplementationsgruppen kloniert (Levitus et al, 2004; Joenje and Patel 2001). Ihre Eigenschaften sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1 : Fanconi-Anämie-Genfamilie: Charakteristika der Gene und ihrer Produkte

Gen	%	Chromosom	Exons	mRNA (kb)	AA	Protein (kDa)	Konserv.	Motive
FANCA	70	16q24.3	43	5.5	1456	163	Nein	NLS; LZ
FANCD1	<5	13q12	27		3418	384	Nein	NLS, BRC-Repeats
FANCC	8	9q22.3	14	4.7	558	63	Nein	LZ (?)p53 binding?
FANCD2	<5	3p25.3	44	4.4	1451	166	Ja	HMG-like
FANCE	<5	6p21.3	10	2.6	536	60	Nein	2 NLS
FANCF	<5	11p15	1	1.2	374	42	Nein	ROM?
FANCG	12	9p13	14	2.7	622	68	Nein	=XRCC9; LZ
FANCL		2p16.1	14	1.678	375	43	Ja, identisch mit PHF9	Zinkfinger

Abkürzungen:

% = Prozentsatz der Patienten europ. Ursprungs mit Mutationen im betreffenden FANC-Gen

NLS = Kernlokalisierungssignal

LZ = Leuzin-Zipper (Protein-Protein-Interaktionssignal)

HMG = High Mobility Group Proteins (DNA-Bindungsmotive von Nicht-Histon-Kernproteinen und Transkriptionsregulatoren)

ROM = RNA-Modulator1

XRCC9 = menschl. DNA-Reparaturgen, welches die Mitomycin C- und UV-sensitive Chinesische Hamsterzellelinie UV40 komplementiert

Konserv. = evolutionär konservierte Sequenzmotive und Ähnlichkeiten zu bekannten Genen in den verfügbaren Datenbasen

Die genaue Kenntnis der krankheitsverursachenden Mutationen ist aus folgenden Gründen wichtig: a) Der Mutationsnachweis bestätigt die Ergebnisse klinischer und funktioneller Diagnostik und schließt andere Ursachen (z.B. Phänokopien) des Krankheitsbildes aus. b) Eine charakterisierte Mutation dient zur Etablierung von Genotyp-Phänotyp Korrelationen, welche zur Beurteilung des wahrscheinlichen Krankheitsverlaufes (= Prognose) wichtig sind. c) Ist die Mutation bekannt, so ermöglicht dieses Wissen die Diagnostik bei weiteren Familienangehörigen bzw. eine direkte pränatale Diagnostik.

1.4 Therapieansätze bei Fanconi-Anämie

1.4.1 Knochenmarkstransplantation (KMT)

Als kurativer Ansatz hinsichtlich der hämatologischen Erkrankungen der FA-Patienten kommt zur Zeit nur die Knochenmarkstransplantation (KMT) in Frage (Gluckmann, 1996). Jedoch hängt der Erfolg einer solchen Transplantation entscheidend von der Verfügbarkeit eines passenden Spenders ab. Das beste Ergebnis ist bei MHC- identischen Geschwisterspendern (MHC matched sibling) zu erwarten (Guardiola et al, 1998). Nach den Erbgeln besteht eine Wahrscheinlichkeit von 1:4, dass ein Geschwister denselben MHC-Typ hat wie der Patient, so dass bei den meisten der heutigen Kleinfamilien mit nur 1 oder 2 Kindern kein geeignetes Geschwisterkind als KM-Spender zur Verfügung steht. Zur Konditionierung vor der KMT werden Zytostatika und Bestrahlung eingesetzt. Allerdings muß bei dieser Konditionierung auf die erhöhte Sensitivität der FA-Patienten gegenüber zytotoxischen Medikamenten Rücksicht genommen werden. (Flowers et al, 1993). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dem Patienten Stammzellen aus dem Nabelschnurblut eines neugeborenen Geschwisters zu transplantieren. Hierzu muß bei dem ungeborenen Geschwisterspender vorgeburtlich eine Fanconi-Anämie ausgeschlossen werden. Nabelschnurblut eines gesunden Geschwisterkindes kann auch eingefroren werden, um zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung zu stehen (Gluckmann et al, 1989). Fremdspender-Transplantationen sind weniger erfolgreich und mit einem viel höheren Risiko behaftet.

1.4.2 Medikamentöse Therapie

Die Alternative zur KMT, besonders bei Patienten ohne passende Knochenmarkspender, besteht vor allem in der Gabe von Androgenen zur Stimulation der Hämatopoiese. Nach Androgen-Gabe werden Erythrozyten und Thrombozyten wieder vermehrt gebildet. Die Leukozyten bleiben häufig unbeeinflusst. Nebenwirkungen der Therapie sind vor allem Ikterus und Leberadenome, seltener Virilisierung. Cortison wird in niedriger Dosierung zur Normalisierung der Knochenreifung gegeben, welche durch Androgene beschleunigt wird. Rein unterstützende Maßnahmen sind Bluttransfusionen mit Erythro- und Thrombozytenkonzentraten. Dabei müssen die Spenderleukozyten vorher entfernt werden, um das Risiko einer Unverträglichkeit zu minimieren. Bei der Gabe von Erythrozytenkonzentraten ist zu beachten, dass eine Eisenüberladung des Körpers vermieden werden soll, z.B. durch Gabe eines Chelatbildners. Vor Knochenmarkstransplantation dürfen keinesfalls Blutprodukte von einem potentiellen Spender übertragen werden, da sonst eine Immunisierung stattfindet. Eine weitere Möglichkeit der medikamentösen Therapie stellt die Gabe von Wachstumsfaktoren dar. Am häufigsten wird Granulozyten-stimulierender Faktor (G-CSF) verwendet, welcher vor allem das Wachstum von neutrophilen Granulozyten anregt. Da FA-Zellen besonders sauerstoffempfindlich sind (Schindler and Hoehn, 1988), werden viele Patienten auch mit Antioxidantien behandelt.

1.4.3. Somatische Gentherapie

Da das menschliche Knochenmark leicht zugänglich ist, sollte die gentherapeutische Veränderung von Knochenmarkstammzellen ein vielversprechender therapeutischer Ansatz bei der Fanconi-Anämie sein. Zur Erprobung der Gentherapie wurde eine Studie mit drei Patienten der Komplementationsgruppe C durchgeführt (Otsuki et al, 1998). Hierfür wurde die Wildtyp-cDNA von FANCC ex-vivo in hämatopoietische Stammzellen transduziert. Dieser Weg sollte zur Heilung führen, sofern die korrigierten Zellen einen Selektionsvorteil besitzen und mit der Zeit das gesamte hämatopoietische System ersetzen. Stammzellen aus dem Blut der Patienten wurden mit G-CSF stimuliert und nach erfolgter Transduktion mit der cDNA den Patienten wieder zugeführt. Ein Problem, welches eine solche Therapie erschwert, ist die niedrige Effizienz der retroviralen Transduktion. Leider ließ sich bei den bisherigen Versuchen ein dauerhafter Erfolg der Gentherapie nicht nachweisen. (Otsuki, 1998).

1.5 Fragestellung

Trotz erheblicher Fortschritte in der Behandlung mittels KMT und Medikamenten bleibt die Fanconi-Anämie für die Mehrzahl der Betroffenen eine sehr schwerwiegende und lebensbedrohliche Erkrankung. Insbesondere Eltern, die bereits ein oder mehrere erkrankte Kinder haben, entscheiden sich bei weiteren Schwangerschaften nicht selten für eine pränatale Diagnostik. Wie oben beschrieben erfolgt die Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose einer FA durch eine Reihe von Laboruntersuchungen. Diese reichen von der funktionellen Analyse auf der Zellebene bis zur Mutationsanalyse auf der molekularen Ebene. Das gesamte Spektrum der diagnostischen Methoden kann ebenso zur pränatalen Diagnostik eingesetzt werden. Wie die Tabelle 2 zeigt, ergeben sich bei der pränatalen Diagnostik ganz unterschiedliche Ausgangssituationen, welche jeweils entsprechend andere diagnostische Methoden erfordern.

Tabelle 2: Ausgangssituationen bei der pränatalen Diagnostik der Fanconi-Anämie. Die unterschiedlichen anamnestischen und diagnostischen Vorinformationen werden den Kategorien I bis III zugeordnet (nach D. Schindler, Institut für Humangenetik der Universität Würzburg).

Kategorie/Situation	pränatale Testung	Material
I: keine FA in der Familie bekannt, jedoch auffälliger Ultraschallbefund	funktionell	Amnionzellen, Nabelschnurblut
II: bereits betroffenes Kind, Komplementationsgruppe und Mutation unbekannt	funktionell	Amnionzellen, Nabelschnurblut
III: bereits betroffenes Kind, Komplementationsgruppe bekannt, Mutation in manchen Fällen bekannt	indirekte Genotypisierung, funktionell, teilweise direkte Gendiagnostik	Chorionzellen, Amnionzellen, Nabelschnurblut

Es ist die Zielsetzung dieser Arbeit, die verschiedenen Ansätze der pränatalen Diagnostik zum Ausschluss bzw. zur Bestätigung einer FA anhand der im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg durchgeführten Untersuchungen zu dokumentieren.

2. METHODEN

2. 1. Fruchtwasserzellkultur

Für die Kultur von Amnionzellen werden 10-15 ml Fruchtwasser (FW) verwendet. Das FW wird zunächst zentrifugiert (1100 rpm; 10 min), und der Überstand wird verworfen. Die gewonnenen Zellen werden auf zwei Ansätze (einer mit, einer ohne FCS) mit jeweils 4 ml RPMI-Medium (+ 1% Gentamycin sowie BrdU) verteilt und in Kulturflaschen gesät, wobei MMC in Konzentrationen von 0, 10 oder 30 ng/ml zugegeben wird. Nun werden die Zellen sechs Tage bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel wird alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Nach 10-12 Tagen ist mit einer brauchbaren Anzahl von Zellklonen zu rechnen. Zum Abbruch der Kultur werden 0,2 ml Colcemid in die Kulturflasche gegeben und über 3 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wird abgenommen, und die Kulturflasche mit 2 ml PBS nachgespült. Zum Ablösen der adhärenen Zellen werden 4 ml Trypsin zugegeben. Die Zellsuspension wird abzentrifugiert (1100 rpm; 10 min). Der Überstand wird verworfen, und das Zellpellet mit der hypotonen KCl-Lösung resuspendiert. Nach 15 min bei 37°C wird wieder zentrifugiert (1100 rpm; 10 min), der Überstand verworfen, und das Zellpellet in ein Fixativ aus Methanol und Eisessig (1:3) aufgenommen und für 30 min bei -20°C gelagert. Danach wird zentrifugiert (1100 rpm; 10 min), der Überstand verworfen, wieder mit Fixativ resuspendiert, erneut zentrifugiert. Das Zellpellet kann sowohl für die Chromosomenanalyse, für die Durchflußzytometrie als auch zur DNA-Extraktion verwendet werden.

2.2 Kultur von Chorionbiopsiematerial

2.2.1 Kurzzeitkultur

Dem RPMI-Medium werden 1% Gentamycin, Glutamin, PenStrep und FCS sowie BrdU zugesetzt (ein Ansatz wird ohne FCS vorbereitet). Bevor das Zottenmaterial verarbeitet werden kann, müssen die kindlichen von den mütterlichen Zellen unter dem inversen Mikroskop separiert werden. Danach wird das Material in Petrischalen mit dem vorbereiteten Medium und MMC in verschiedenen Konzentrationen (0, 10 und 30 ng/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wird Colcemid (auf 2 ml Medium 0,1 ml Colcemid) hinzugesetzt und über 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wird Natriumcitrat für 20 min hinzugefügt, zentrifugiert, und für 20 min bei Raumtemperatur fixiert (Eisessig und Methanol, 1:3).

Das Pellet wird mit Essigsäurelösung (0,5 ml; 60%) für 15-25 min behandelt. Danach können aus dem Material Präparate für die Chromosomenanalyse hergestellt werden, wobei die Zellsuspension nach Abtrennen der Zottenbäumchen auf Objektträger aufgetragen wird. Alternativ kann jetzt DNA-Isolation erfolgen oder die Färbung der Zellen für die Durchflußzytometrie.

2.2.2 Langzeitkultur

Hierfür werden die Zottenbäumchen in Petrischalen mit Chang-Medium (supplementiert mit + 1% Gentamycin), welches mit verschiedenen Konzentrationen an MMC versetzt ist (0, 10 und 30 ng/ml), eingelegt und bei Bedarf über Nacht bei 37°C kultiviert, falls die Verarbeitung nicht noch am selben Tag erfolgen kann. Am nächsten Tag werden 2 ml Trypsin für 1 h Inkubationszeit dazugegeben, danach erfolgt der Zusatz von 2 ml Kollagenaselösung für weitere 3 h. Nun wird der gesamte Ansatz zentrifugiert (1100 rpm; 10 min), der Überstand verworfen, und die Zellen werden mit RPMI-Medium (+ 1% Gentamycin, Glutamin, PenStrep und FCS bzw. kein FCS) resuspendiert. Die jeweilige Suspension wird in eine Kulturflasche gegeben und für 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die weitere Handhabung der Zellen orientiert sich am Protokoll für Amnionzellkultur.

2.3. Kultur von Blutlymphozyten

Aus 3-10 ml heparinisiertem Vollblut (Versand und Lagerung bei Raumtemperatur) werden Lymphozyten isoliert und in Kultur genommen. Die Verarbeitung sollte möglichst innerhalb von 24 h erfolgen. Alle Arbeitsschritte müssen steril durchgeführt werden. Die Isolation der mononukleären Zellen erfolgt mittels Ficoll-Paque-Technik: Das Plasma wird durch Zentrifugation (1200 rpm, 10 min) von den zellulären Bestandteilen getrennt und verworfen. Dieses Volumen wird durch HBSS (Hanks Balanced Salt Solution; PAA Laboratories GmbH; Linz) ersetzt, und die entstandene Suspension noch einmal im Verhältnis 1:2 mit HBSS verdünnt. Jeweils 3 ml Ficoll-Paques (Amersham Pharmacia Biotech AB, Freiburg) werden mit 4-10 ml des verdünnten Blutes überschichtet und zentrifugiert (2100 rpm, 30 min, 4°C). Der HBSS-Überstand wird verworfen. Es bleibt ein mit Lymphozyten angereicherter Ring an der Phasengrenze übrig, welcher vorsichtig abgenommen und mit HBSS suspendiert wird. Nach Waschung und Zentrifugation (900 rpm, 15 min) wird das Zellpellet in RPMI 1640-Medium gelöst, und einige µl dieser Suspension werden mit

10 ml Essigsäure (1%; Merck, Darmstadt) versetzt. Zur Einstellung der Zelldichte auf 1×10^6 Zellen/ml werden 10 μ l dieses Gemisches mit derselben Menge Trypanblau 0,2% (Boehringer Mannheim) gemischt und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Brand; Wertheim) ausgezählt. Zur Kultivierung der Zellen werden zwei Ansätze (mit und ohne BrdU; Sigma) hergestellt. Das RPMI-Medium wird in 50 ml-Kulturflaschen vorbereitet. Das Lektin Phytohämagglutinin (PHA) dient als Mitogen, die Zugabe von 2'-Deoxycytidin dient der Verhinderung potentieller unerwünschter Wirkungen von BrdU, da es reversible Bindungen damit eingeht. Jeweils 0,5 ml Zellsuspension (entsprechen 1×10^6 Zellen/ml) werden in die Kulturflaschen gegeben. Mitomycin C wird in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt (0, 5, 10 und 50 ng/ml). Zur Vermeidung von lichtinduzierten Chromosomenbrüchen in Anwesenheit von BrdU werden die Flaschen mit Silberfolie umwickelt und aufrecht für 72 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Ernte erfolgt unter Abdunklung. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (900 rpm, 15 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 1,5 ml Einfriermedium (RPMI 1640 80%, FCS 10%, DMSO 10%) gelöst. Die Proben werden bei -20°C bis zur Messung gelagert.

2.4 Zellpräparation und Färbung für die Durchflußzytometrie

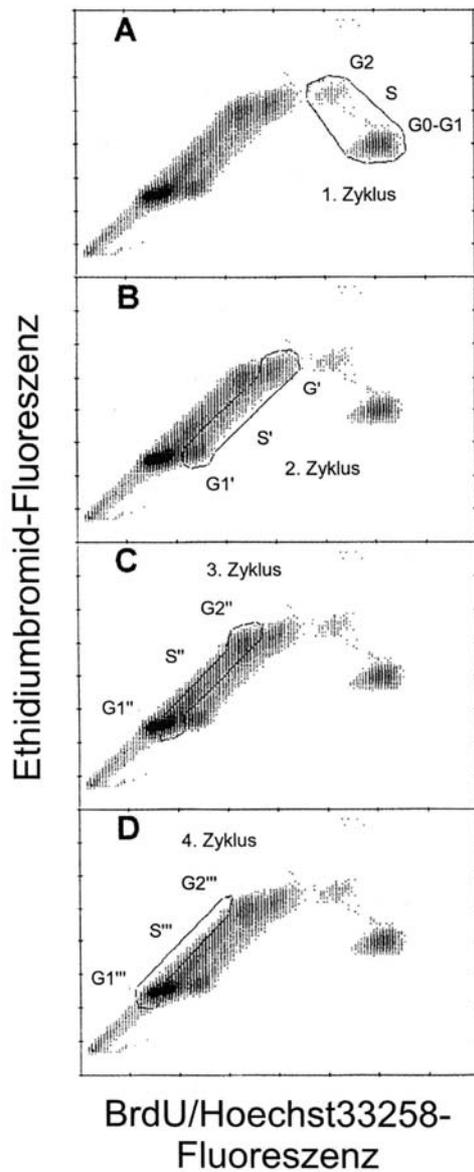
Für zweiparametrische Messungen wird der Überstand nach Auftauen der Zellen im Wasserbad bei Raumtemperatur und Zentrifugation (1100 rpm, 8 min) verworfen, und das Pellet in 1,2 μ g/ml Hoechst 33258-Färbepuffer (4°C, gelöst in Ampuwa; Stammlösung Hoechst 33258 2 mg/ml in Ampuwa; Sigma) suspendiert. Die Inkubation findet bei 4°C im Dunkeln für 15 min statt. Danach wird Ethidiumbromid-Färbepuffer in einer Konzentration von 1,5 μ g/ml dazugegeben und für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Die Messung muss innerhalb einiger Stunden erfolgen. Bis dahin müssen die Zellen vor Lichteinwirkung geschützt werden. Die Färbung der Zellproben für einparametrische Messungen orientiert sich am Protokoll für zweiparametrische Messungen. Gegebenenfalls werden die Zellproben aufgetaut und in jedem Fall zentrifugiert. Das Zellpellet wird dann jedoch in einer DAPI-Färbelösung suspendiert und nach zumindest 15-minütiger Färbung vermessen.

2.5 Zellzyklusanalyse

PHA-stimulierte Lymphozyten von gesunden Kontrollspendern sind in der Lage, innerhalb von 72 Stunden bis zu vier vollständige Zellzyklen zu durchlaufen. Blut-

und Hautzellen von Fanconi-Anämie-Patienten hingegen zeigen eine Störung der Zellzyklusprogression, die sich typischerweise als Akkumulation von Zellen in der G2-Phase manifestiert (Kubbies et al, 1985; Schindler et al, 2002). Ursache der Progressionsstörung ist die konstitutiv erhöhte Zahl genomisch geschädigter Zellen bei FA-Patienten, die auf Grund dieser Schädigung den normalen Replikations- und Teilungszyklus nicht regelrecht durchlaufen können (Kubbies et al, 1985; Seyschab et al, 1993). Mittels Durchflußzytometrie kann die für FA-Zellen pathognomonische Akkumulation in sukzessiven G2-Phasen erfasst und quantifiziert werden. Hierzu eignet sich besonders die zweiparametrische Messung: Dabei kann einerseits die Gesamt-DNA-Menge (2c vs. 4c DNA-Gehalt) durch Ethidiumbromid-Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Andererseits kann durch die Substitution von Thymidin durch Bromdeoxyuridin (BrdU) während der semikonservativen DNA-Replikation die Anzahl der sukzessiven Zellteilungen dargestellt werden. Grundlage hierfür ist die Verringerung der Hoechst 33258-spezifischen Fluoreszenz durch BrdU-substituierte DNA (sogenannter „Quench-Effekt“) (Rabinovitch et al, 1988; Poot et al, 1994). Hoechst 33258 ist ein nicht interkalierendes Fluorochrom, welches bevorzugt an AT- bzw. A-BrdU-reiche Sequenzen in der DNA bindet (Southwick, 1990). Nach Anregung mit Licht im UV-Bereich lässt sich die BrdU-Substitutionsrate der zellulären DNA anhand der Fluoreszenzintensität im charakteristischen Emissionsmaximum bei 465 nm bestimmen (Anregung bei 350 nm, Emission bei 450-500 nm) (Rabinovitch et al, 1988). Hingegen bindet Ethidiumbromid kovalent und basenunspezifisch an DNA. Die EB-spezifische Fluoreszenz reflektiert daher die Oszillation des 2c/4c-DNA-Gehaltes während des mitotischen Zellzyklus. Nach Doppelfärbung mit EB und Hoechst 33258 werden die Zellen über eine Kapillare im Durchflußzytometer hydrodynamisch fokussiert. Mit Flussgeschwindigkeiten von mehreren tausend pro Minute passieren die Zellen die Messkammer, wo sie vom Anregungslicht getroffen werden (Haynes, 1988). Der Gesamtlichtimpuls beider verwendeter Farbstoffe wird über Filter für verschiedene Wellenlängen separat erfasst und auf zwei Photomultiplier übertragen. Für die Messungen der Zellproben wurde das Durchflußzytometer LSR1 von BD (Becton Dickinson, Heidelberg) mit der Software Cellquest zur Datenaufnahme verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software M Plus von Phoenix Flow Systems.

2.6 Exemplarische Darstellung der durchflußzytometrischen Analyse



Die Tafeln A bis D der Abbildung 2.1 zeigen zweiparametrische zweidimensionale Zytogramme von Blutlymphozyten. Dabei repräsentiert die Abszisse die BrdU/Hoechst 33258-Fluoreszenz, die Ordinate die Ethidiumbromid-Fluoreszenz. Die einzelnen Zellzyklen (1 bis 4) und ihre entsprechenden Kompartimente (G0-G1, S, G2) wurden zur Illustration eingrahmt.

Abbildung 2.1. nach: Schindler u. Hoehn, 1999. Modifiziert von D. Wiesel.

Die Abbildung 2.2 zeigt einen Vergleich einer zweiparametrischen zweidimensionalen Messung von einer Negativkontrolle und einem FA-Patienten. Hierbei ist der hohe Anteil an Zellen in den G2-Phasen des 1. bis 3. Zellzyklus beim Patienten deutlich sichtbar, ebenso wie der fehlende 4. Zellzyklus. Die Negativkontrolle hingegen zeigt keine solche Akkumulation von Zellen in den G2-Phasen, und ein 4. Zellzyklus lässt sich erkennen.

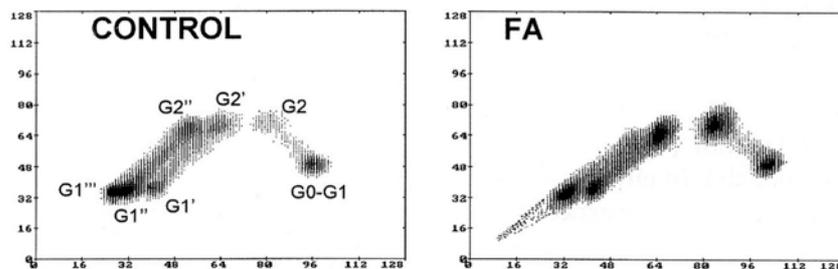


Abbildung 2.2. aus: Schindler u. Hoehn, 1999.

In Abbildung 2.3 ist eine einparametrische eindimensionale Messung dargestellt. Dabei wird jeweils eine Analyse von Amnionzellen ohne (A) bzw. mit Behandlung durch MMC (B) gezeigt. Die Abszisse repräsentiert den DNA-Gehalt der Zellen in den einzelnen Zellzykluskompartimenten, die Ordinate die Zellzahl. Einzelne Zellzyklen können nicht unterschieden werden; aufgetragen ist immer die Gesamtzellzahl eines bestimmten Zykluskompartimentes. Auffällig ist der erhöhte G2-Peak in Abb. B nach MMC-Behandlung.

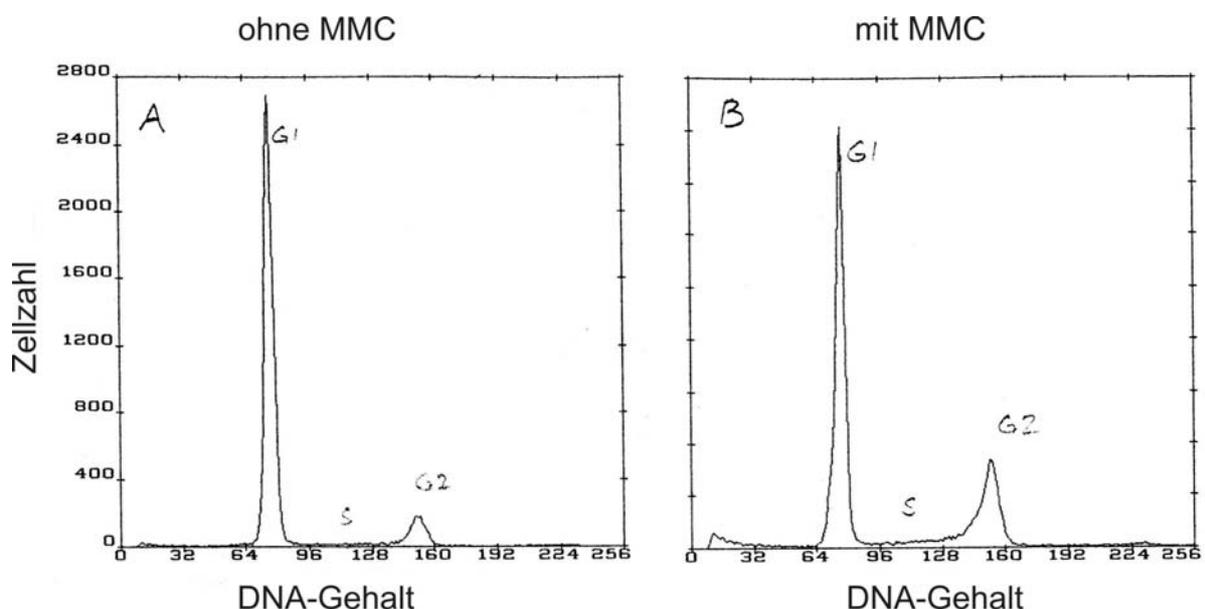


Abbildung 2.3

Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen Kontrollen und FA-Patienten zeigt die Abbildung 2.4 einen Vergleich von eindimensionalen einparametrischen Messungen von Amnionzellen: Die Zellen des Patienten (mittlere Spalte) weisen ohne MMC-Behandlung (obere Abbildung) eine ähnlich niedrige G2-Phase auf wie die der Kontrolle (links oben). Nach MMC-Behandlung (untere Abbildungen) kommt es jedoch zu einer deutlichen Erhöhung des G2-Phasen Peaks als Ausdruck der erhöhten MMC-Sensitivität von FA-Zellen. Der Befund entspricht damit einer positiven Kontrolle (Patient mit bekannter FA).

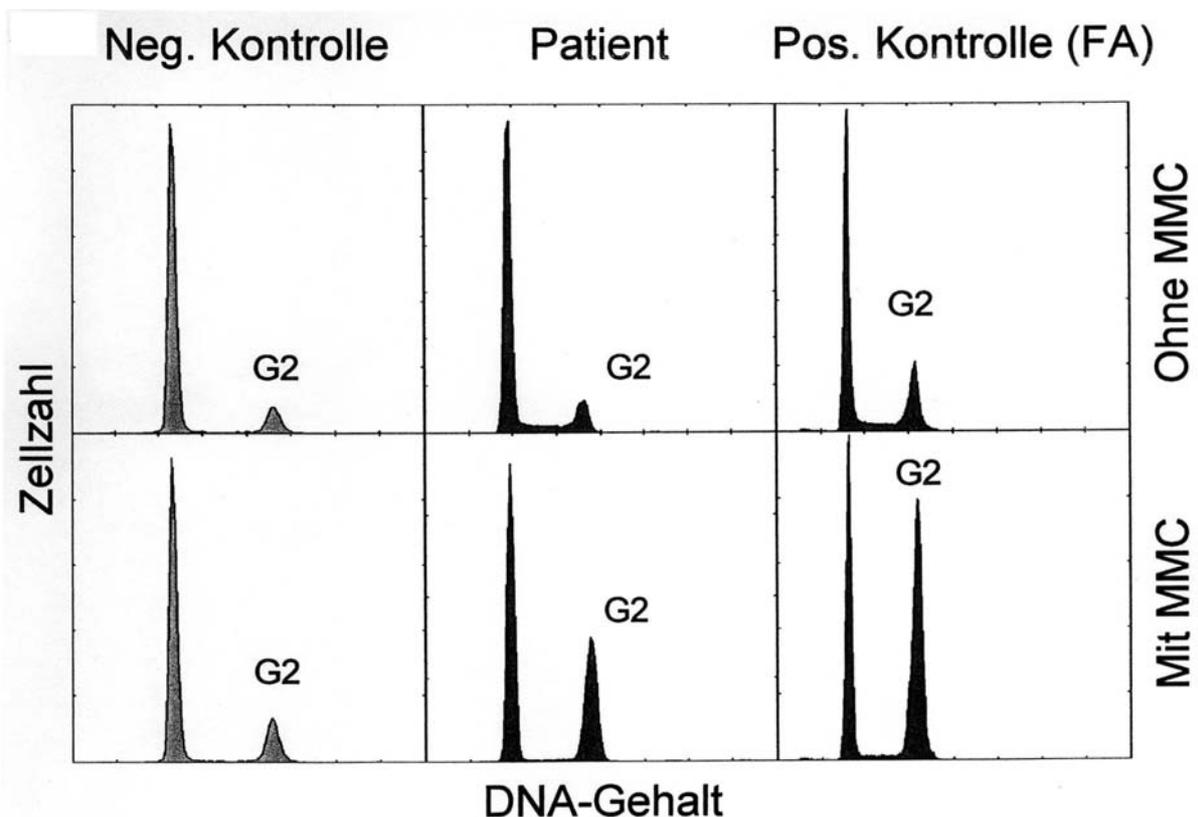


Abbildung 2.4

2.7 Zellwachstumsanalyse von Amnionzellen

Die Amnionzellen werden in Parallelansätzen mit verschiedenen Dosen Mitomycin C (MMC; 0, 0,5, 1 und 2ng/ml) behandelt. Die Zellproliferation wird jeweils bei normaler Umgebungssauerstoffkonzentration (20% Vol/Vol) sowie bei erniedrigter Sauerstoffkonzentration (5% Vol/Vol) analysiert, da FA-Zellen bei erniedrigter Sauerstoffkonzentration ein verbessertes Wachstum zeigen. Die Zellzählung erfolgt über einen Zeitraum von 3-6 Tagen.

2.8 Mutationsanalyse

2.8.1 DNA-Isolation und PCR

Voraussetzung für die Mutationsanalyse ist die erfolgreiche Zuordnung des Patienten zu einer der bisher bekannten Komplementationsgruppen. Diese Zuordnung erfolgt durch die Transduktion der Patientenzellen mit retroviralen Vektoren, welche jeweils eines der bisher bekannten FA-Gene beinhalten (Hananberg et al, 2002). Zur Durchführung der Mutationsanalyse muss Patienten-DNA aus entsprechenden Zelllinien oder DNA aus Amnionzellen bzw. Nabelschnurblutzellen des Foeten isoliert werden. Dies erfolgt mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit. Durch Inkubation des jeweiligen Gewebes oder des Blutes mit einem speziellen Puffer in Anwesenheit von Proteinase K erfolgt die Zellyse. Anschließend werden die Nukleinsäuren spezifisch in Gegenwart eines chaotropen Salzes an Glasfaseroberflächen gebunden. Durch Zentrifugation mit Passage durch das Glasfaservlies wird die Filterung der DNA erreicht. Das Material liegt nach einem Waschvorgang frei von allen Begleitsubstanzen isoliert vor. Die Elution wird mit Tris-Puffer durchgeführt. Mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction) können die zu untersuchenden Exons unter Verwendung der entsprechenden Primer amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Die PCR besteht aus einer repetitiven Abfolge (30-35 Zyklen) folgender Schritte:

1. Denaturierung des DNA-Matrizenstranges bei 95°C
2. Hybridisierung der Primer (18-30 bp) an ihre komplementäre Zielsequenz auf dem Matrizenstrang („annealing-Phase“ bei 54-68°C)
3. Elongation der DNA-Kette durch die DNA-Polymerase bei 72°C

Die optimalen Bedingungen (Temperatur und Inkubationszeiten) müssen für jedes DNA-Fragment in Abhängigkeit von Primern und Template neu ermittelt werden. Die jeweiligen Primer für die Exons der verschiedenen FA-Gene finden sich in den entsprechenden Publikationen (z.B. Wijker et al, 1999).

2.8.2 DNA- Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA wird die Didesoxy-Methode nach der Sanger et al. (1977) angewandt. Durch den Einbau von 2',3'-Didesoxyribonukleotiden (ddNTP) wird ein Abbruch der DNA-Polymerisation hervorgerufen, da für die Knüpfung einer neuen Phosphodiesterbindung keine freie 3'-OH-Gruppe vorhanden ist. Enthält das Reaktionsgemisch sowohl dNTPs als auch markierte ddNTPs, so kann statistisch

gesehen an jeder Nukleotidposition ein Kettenabbruch stattfinden, wobei dann unterschiedlich lange Fragmente entstehen, die jeweils an ihrem Ende eine Markierung tragen. Alle zur Sequenzierung notwendigen Reagenzien außer Primer und Template sind im ABI PRISM Dye Terminator Sequenzierung Kit (PE Biosystems) enthalten. Markiert sind die ddNTPs jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Die Unterscheidung der Basen erfolgt über das spezifische Emissionsmaximum des detektierten Farbstoffs. Zur Amplifikation wird die thermostabile AmpliTaq-DNA-Polymerase verwendet.

Ansatz:

1 µl	Primer (10 pmol)
2 µl	„BigDye“ Terminator Ready Reaction Mix
2-6 µl	gereinigte DNA
ad 10 µl	HPLC-H ₂ O

Die Reaktion wird unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms in 0,2 µl Mikroreaktionsgefäßen im Thermocycler Primus 96 plus durchgeführt:

1. Denaturierung:	96°C	30 sec.	25 Zyklen
2. Annealing:	59°C	10 sec.	25 Zyklen
3. Elongation:	60°C	4 min	25 Zyklen

Anschließend wird die DNA mit 100% Ethanol und 3 M Natriumacetat ausgefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird getrocknet und danach für die Messung in „Template Suppression Reagent“ aufgenommen. Nach Denaturierung der DNA bei 92°C kann die Probe bis zur Sequenzierung bei 4°C gelagert werden. Zur automatischen Sequenzierung wird der ABI PRISM 310 Genetic Analyser verwendet. Die DNA-Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt, gefolgt von der Detektion des Emissionsspektrums der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Base. Hierzu werden die Bedingungen der vorhergehenden Polymerisationsreaktion so gewählt, dass ein Kettenabbruch an jeder Stelle mit derselben Wahrscheinlichkeit stattfindet, wodurch die genaue Basenabfolge mithilfe der entsprechenden Software erstellt werden kann.

3. ERGEBNISSE

Die Voraussetzungen für die pränatale Diagnostik zum Ausschluss einer Fanconi-Anämie sind je nach Anamnese und Art der Vorinformationen unterschiedlich. Dementsprechend ergeben sich verschiedene diagnostische Kategorien (vgl. Tabelle 1). Vorgehen und Ergebnisse der Fälle in den unterschiedlichen Kategorien werden im Folgenden in der Form von Kasuistiken dargestellt. Soweit nicht anders vermerkt konnten die Ergebnisse der pränatalen Diagnostik postnatal bestätigt werden.

3.1 Pränatale Diagnostik bei Familien der Kategorie I

In diesen Fällen sind in der Familie bisher keine Patienten mit FA bekannt, bzw. die Verdachtsdiagnose FA bei Kindern aus früheren Schwangerschaften ist nicht gesichert. Die Indikation zum pränatalen Ausschluss einer FA beruht zumeist auf sonographischen Auffälligkeiten. Da bezüglich FA keine weiteren Informationen vorliegen, beschränkt sich die pränatale Diagnose auf die funktionelle Analyse von Chorionzellen, Amnionzellen oder Zellen des Nabelschnurblutes.

3.1.1 Kategorie I, Familie 1:

Das erste Kind von Familie B. hatte eine Radiusaplasie. Es wurde außerdem eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit berichtet. Die Diagnose FA konnte im Rahmen von auswärtigen Voruntersuchungen jedoch nicht gesichert werden. In der jetzigen 2. Schwangerschaft wurden auf Wunsch der Familie Amnionzellen durchflußzytometrisch untersucht. Das Ergebnis war unauffällig. Ebenso war die endogene wie auch die DEB-induzierte Chromosomenbrüchigkeit in den Fruchtwasserzellen gegenüber den Normwerten nicht erhöht, wie eine auswärts durchgeführte Untersuchung zeigte. Abbildung 3.1 zeigt die einparametrischen Messungen der Amnionzellen ohne bzw. mit 10 ng/ml MMC-Zusatz. Nach Behandlung mit MMC erhöht sich die G2/M-Phase von 9 auf 23%. Diese Erhöhung befindet sich noch im Bereich von Kontrollzellen (vgl. Abbildung 2.4 unter Material und Methoden). Sie ergibt also keinen sicheren Hinweis auf eine erhöhte MMC-Sensitivität.

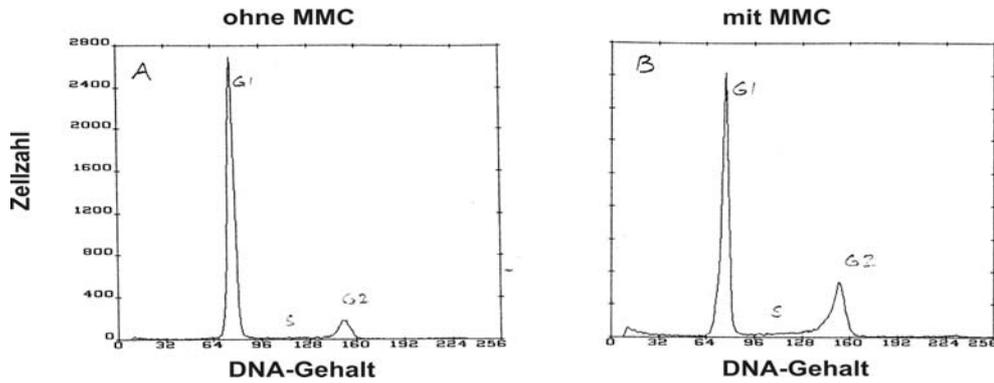


Abbildung 3.1

Abbildung 3.2 zeigt die entsprechenden zweiparametrischen Messungen der Amnionzellen ohne bzw. mit 10 ng/ml MMC-Zusatz. Für diese Messungen wurden die BrdU-exponierten Zellen sowohl mit Ethidiumbromid als auch mit Hoechst 33258 gefärbt. Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war nicht zu beobachten (10,8% Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus ohne MMC; 13,7% nach MMC-Zugabe). Auch die $\Sigma G2/GF$ lag mit 0,25 bzw. 0,29 im Bereich der Werte von Kontrollpersonen.

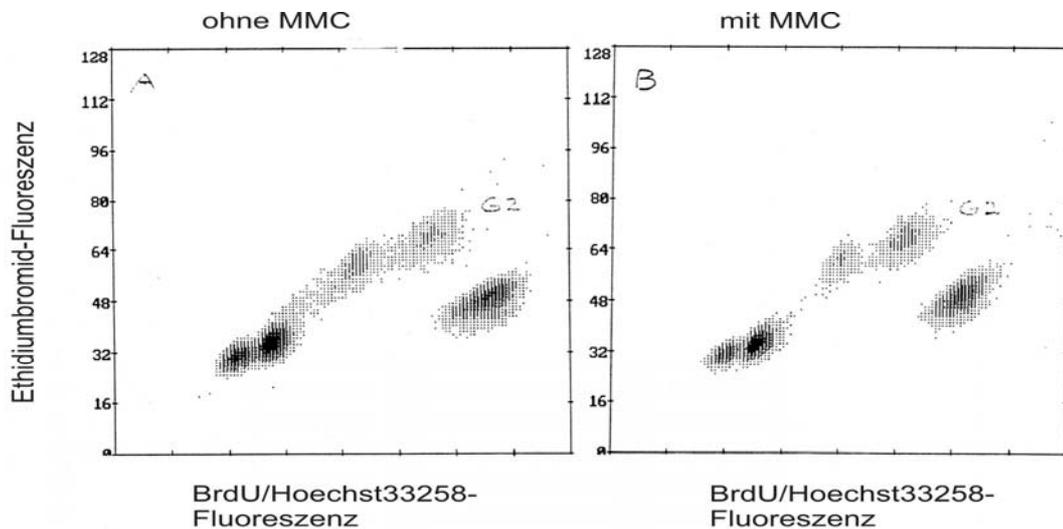


Abbildung 3.2

3. 1. 2 Kategorie I, Familie 2:

Frau S. hatte bereits 5 Fehlgeburten in der Anamnese. In der 22. Woche der aktuellen Schwangerschaft fielen in der Sonographie eine einseitige Radiusaplasie, eine verkürzte Ulna, eine singuläre Nabelschnurarterie sowie ein Herzvitium beim Foeten auf.

Differentialdiagnostisch kamen hier das TAR-Syndrom, das Holt-Oram-Syndrom sowie die FA in Frage. Es wurde die Durchflußzytometrie von Nabelschnurblutzellen durchgeführt. Das Ergebnis war unauffällig. Die Abbildung 3.3 zeigt das Ergebnis der zweiparametrischen Messung der Nabelschnurblutzellen ohne MMC-Zusatz. Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war nicht zu beobachten (2,8 % Zellen in der G2-Phase des 1.

Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,153 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht.

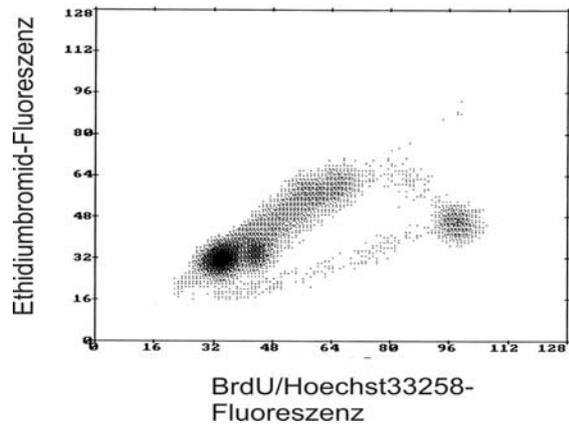


Abbildung 3.3

Abbildung 3.4 zeigt das Ergebnis der zweiparametrischen Messung der Nabelschnurblutzellen im Vergleich zu postnatal gewonnenen Werten aus unbehandelten Blutlymphozyten von gesicherten FA-Patienten (FA), Patienten mit Aplastischer Anämie (AA) und Negativkontrollen (CON). Der Wert von Frau S. ist mit PAT gekennzeichnet. Es zeigt sich, dass der Messwert von Frau S. im Bereich der Kontrollen liegt.

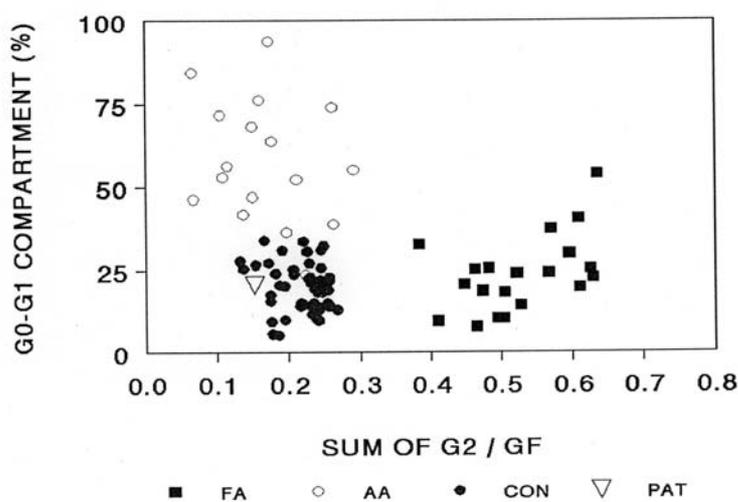


Abbildung 3.4

3.1.3 Kategorie I, Familie 3:

Aufgrund einer Radiusaplasie und weiterer nicht näher beschriebener auffälliger sonographischer Befunde beim Foeten von Frau S. erfolgte nach der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) eine Zellzyklusanalyse von Nabelschnurblutzellen. Das Ergebnis sprach gegen die Diagnose FA. Abbildung 3.5 zeigt zweiparametrische Messungen der Nabelschnurblutzellen ohne (Abb. li.) und mit MMC-Zusatz (50 ng/ml; Abb. re.). Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war ohne MMC nicht zu beobachten (1,4 % Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,179 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Die $\Sigma G2/GF$ erhöhte sich mit MMC auf 0,423. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus stieg auf 16,5% an. Eine solche Veränderung der Werte findet sich auch bei Negativkontrollen nach Zusatz von 50 ng/ml MMC und ist somit nicht als erhöhte MMC-Sensitivität zu interpretieren.

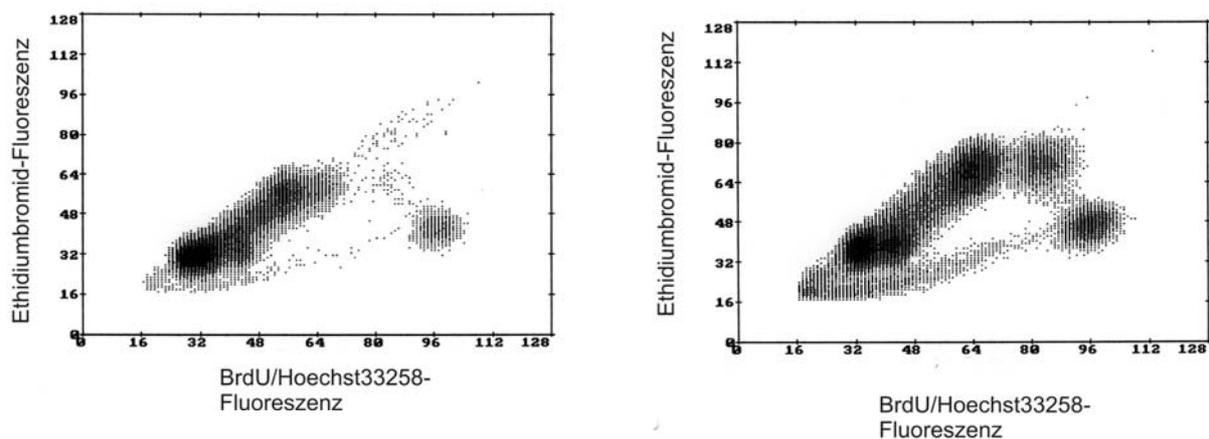


Abbildung 3.5

3.1.4 Kategorie I, Familie 4:

In der 34. SSW von Frau B. fiel beim Foeten eine rechtsseitige Radiusaplasie im Ultraschall auf. Die linke Hand wurde als inaktiv und wenig beweglich beschrieben. Zur diagnostischen Abklärung wurde Nabelschnurblut zur Durchflußzytometrie an das Humangenetische Institut geschickt. Die Analyse ergab einen unauffälligen Befund. Die Abbildung 3.6 zeigt Messungen von Nabelschnurblutzellen ohne und mit Zusatz von MMC (50 ng/ml). Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war ohne MMC (Abb. li.) nicht zu beobachten (2,5 % Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,115 gegenüber

Negativkontrollen nicht erhöht. Die $\Sigma G2/GF$ erhöhte sich mit MMC (Abb. re.) auf 0,403. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus stieg auf 22,7% an. Im Vergleich zur ersten Messung ohne MMC ist dies ein deutlicher Anstieg, jedoch kommt der erhöhte Wert erst nach Zusatz von 50 ng/ml MMC zustande.

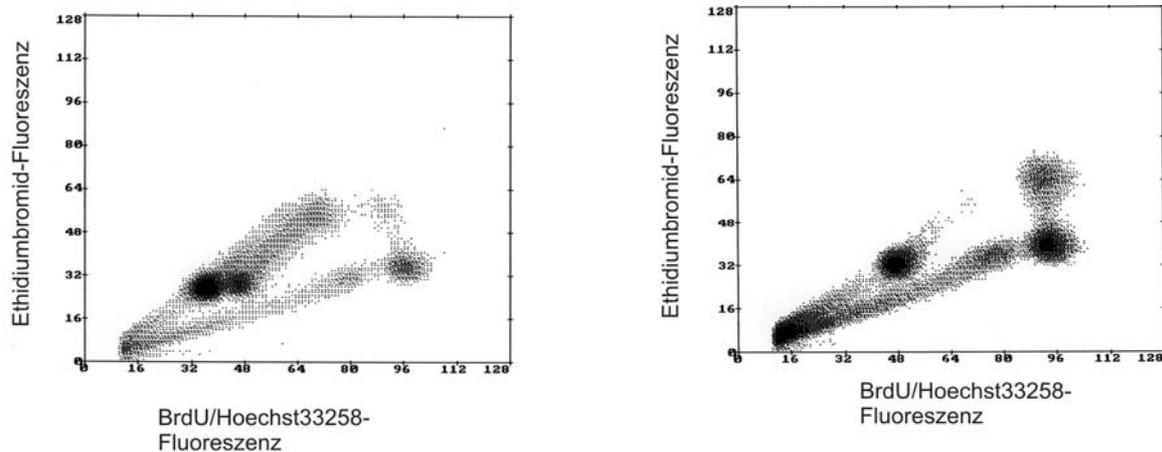


Abbildung 3.6

3.1.5 Kategorie I, Familie 5:

Das erste Kind von Familie P. hatte einen Immundefekt und multiple Fehlbildungen, die jedoch keinem Syndrom zugeordnet werden konnten. Es verstarb vier Monate nach der Geburt, ohne dass eine Diagnose gestellt wurde. In der darauffolgenden Schwangerschaft wurden aufgrund eines Verdachts auf FA Amnionzellen durchflußzytometrisch analysiert. Das Ergebnis war fraglich. Deshalb wurde außerdem Nabelschnurblut untersucht. Bei dieser Untersuchung konnte die Diagnose FA sicher ausgeschlossen werden. So wurde der fraglich positive Befund der Amnionzellen relativiert. Abbildung 3.7 zeigt die Messungen der Amnionzellen ohne und mit Zusatz von MMC (10 ng/ml). Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war in diesem Fall bereits ohne MMC (Abb. li.) zu beobachten (25,8 % Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,441 gegenüber Negativkontrollen bereits ohne MMC erhöht und lag im Bereich der Werte von Personen mit Fanconi-Anämie. Nach Zusatz von MMC (Abb. re.) ist die $\Sigma G2/GF$ mit 0,885 deutlich erhöht, ebenso wie der Anteil der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus mit 65,2%. Die MMC-Werte sind mehr als doppelt so hoch wie die nativen Werte, die jedoch bereits deutlich erhöht waren, was auf einen hohen Anteil tetraploider Zellen bzw. eine BrdU-Sensitivität der Amnionzellkultur hinweist.

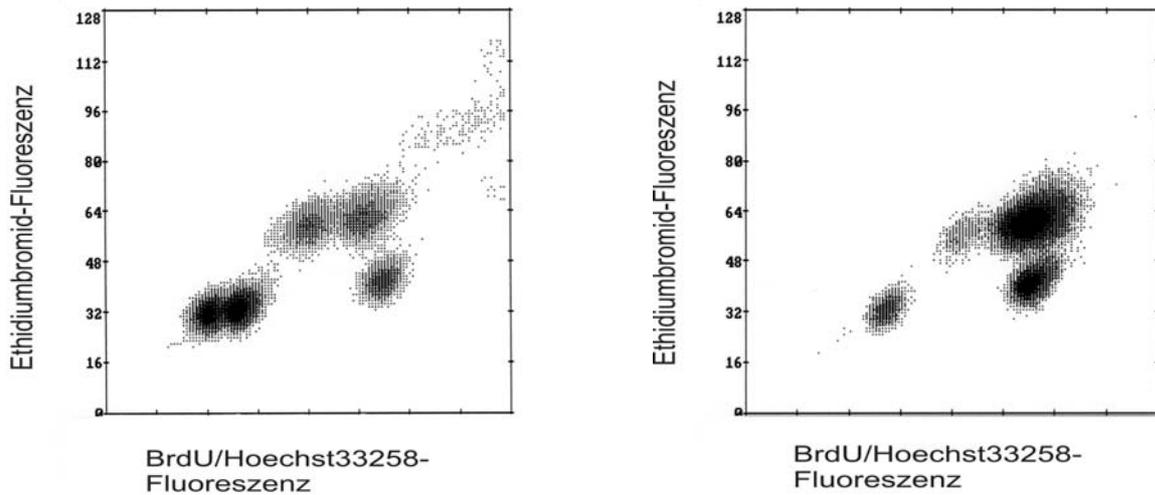


Abbildung 3.7

Zur Verdeutlichung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 3.8 ein Diagramm mit $\Sigma G2/GF$ -Werten (gewonnen aus Lymphozytenmessungen) von FA-Patienten, Negativkontrollen und Frau P. (Patient; hier Amnionzellen) dargestellt. Es zeigt sich, dass die Amnionzellen von Frau P. mit ihren Werten im Bereich jener von FA-Patienten lagen; in ihrem Fall ist der Anstieg nach MMC-Zusatz sogar noch wesentlich deutlicher als bei FA-positiven Kontrollzellen.

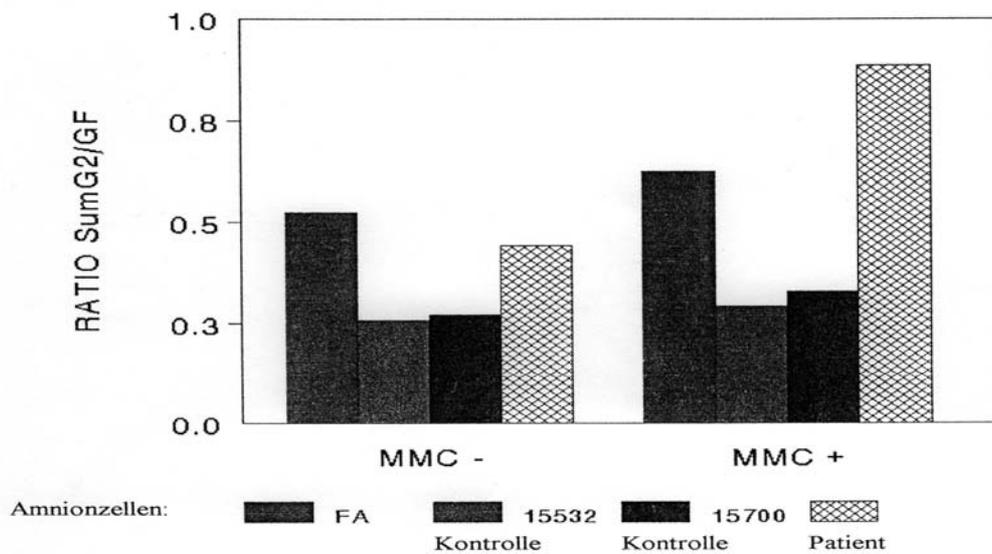


Abbildung 3.8

Dieser Befund hätte mit der Diagnose FA vereinbar sein können. Daher wurde zur Klärung Nabelschnurblut untersucht

Abbildung 3.9 zeigt das Ergebnis der Messung der Nabelschnurblutzellen ohne MMC- Zusatz. Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war nicht zu beobachten (nur 2,0 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,115 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Dieser negative Nabelschnurblut-Befund sprach eindeutig gegen die Diagnose FA.

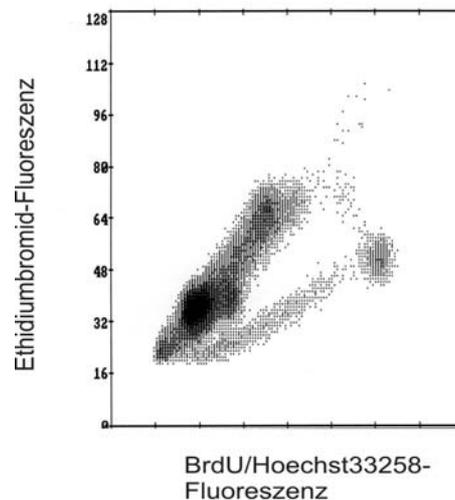


Abbildung 3.9

3.1.6 Kategorie I, Familie 6:

Anlässlich einer in der 20. SSW sonographisch festgestellten Aortenstenose, Radiusaplasie und-hypoplasie beim Foeten von Frau W. wurde eine Plazentazentese durchgeführt und Chorionzottenzellen flowzytometrisch analysiert. Der Befund war unauffällig, ebenso wie ein zusätzlich angefertigtes Karyogramm. Als Nebenbefund fielen dem behandelnden Arzt die beiden dreijährigen Zwillinge auf, die bei der Sonographie der Mutter anwesend waren. Sie erschienen dem Arzt als „auffällig klein mit kleinen Köpfen“.

Die Messungen der Chorionzottenzellen ohne und mit Zusatz von MMC (10 ng/ml) sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war ohne MMC (Abb. li.) nicht zu beobachten (7,4 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,126 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Eine Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war auch mit MMC (Abb. re.) nicht zu beobachten (24,4 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,294 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Wegen der unbefriedigenden Qualität der zweiparametrischen Messung wurde eine zusätzliche einparametrische Messung durchgeführt.

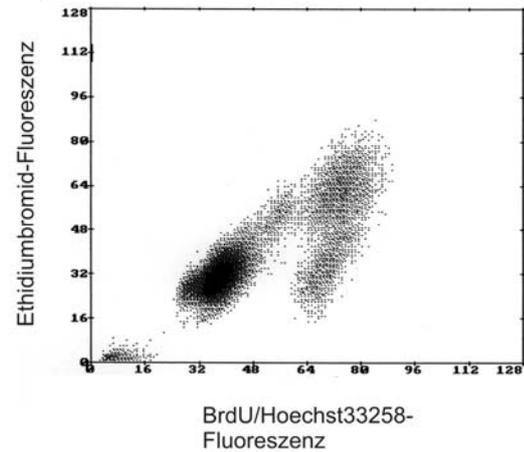
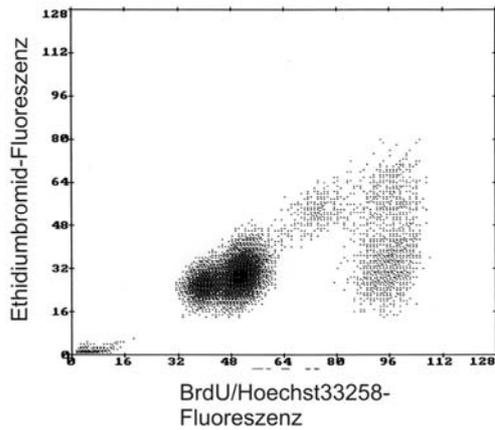


Abbildung 3.10

Die einparametrische Messung in Abbildung 3.11 zeigt die Zellen ohne und mit 10 ng/ml MMC-Zusatz im Vergleich zu einer Positivkontrolle. Die Höhe des G2-Phasen-Peaks bei Frau W. (Patient) ergab weder in der unbehandelten Kultur (11,4%) noch nach MMC-Behandlung (18,6%) einen Hinweis auf das Vorliegen einer Fanconi-Anämie. Vielmehr ist das unterschiedliche Verhalten der

Patientenzellen (links) zur Positivkontrolle (rechts) sehr deutlich.

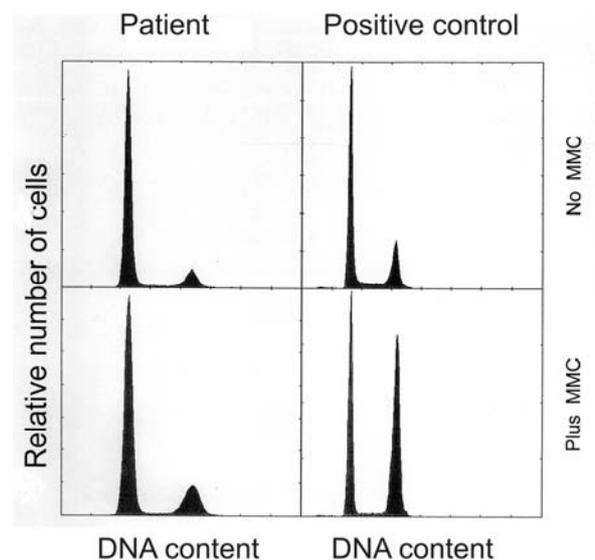


Abbildung 3.11

3.1.7 Kategorie I, Familie 7:

Eine in der 21. SSW sonographisch festgestellte Radiusaplasie des Foeten war der Anlaß für eine Zellzyklusanalyse von Amnionzellen bei Frau A. Die Diagnose FA konnte ausgeschlossen werden. Ein zusätzliches Karyogramm war ebenfalls unauffällig. In Abbildung 3.12 ist das Ergebnis der einparametrischen Messung der Amnionzellen ohne (A) und mit Zusatz von 12 ng/ml MMC (B) zu sehen. Die Größe der G2-Phase weder in der unbehandelten Kultur (11,3%) noch nach MMC-Behandlung (10,0%) ergab einen sicheren Hinweis auf eine erhöhte MMC-Sensitivität der FW-Zellen.

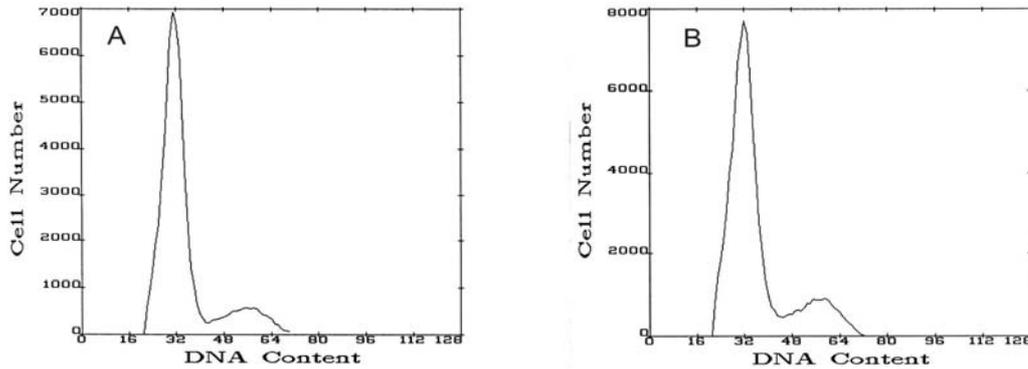


Abbildung 3.12

3.1.8 Kategorie I, Familie 8:

In der 16. SSW fielen sonographisch eine Radiusaplasie, verkürzte Röhrenknochen sowie eine Wachstumsretardierung des Foeten von Frau R. auf. Die Nabelschnurblutzellanalyse mittels Durchflußzytometrie konnte die Diagnose FA ausschließen. Allerdings hatte sich Frau R. bereits vor Erhalt des Ergebnisses zu einem Schwangerschaftsabbruch entschieden. Der Befund der Obduktion des Foeten liegt nicht vor. In Abbildung 3.13 sind die zweiparametrischen Messungen der Nabelschnurblutzellen ohne und mit Zusatz von MMC (50 ng/ml) dargestellt. Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war ohne MMC (Abb. links) nicht zu beobachten (0,9 % Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,087 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Nach Zusatz von MMC (Abb. rechts) ist die G2-Phase im 1. Zyklus mit 2,3% Zellen gegenüber der ersten Messung nur geringgradig angestiegen. Auch die $\Sigma G2/GF$ liegt nach MMC mit 0,253 weiterhin im Bereich von Negativkontrollen. Auffällig ist lediglich ein erhöhter Zellerfall, welcher die G0/G1-Phase des ersten sowie die G1-Phasen des 2. und 3. Zellzyklus betrifft.

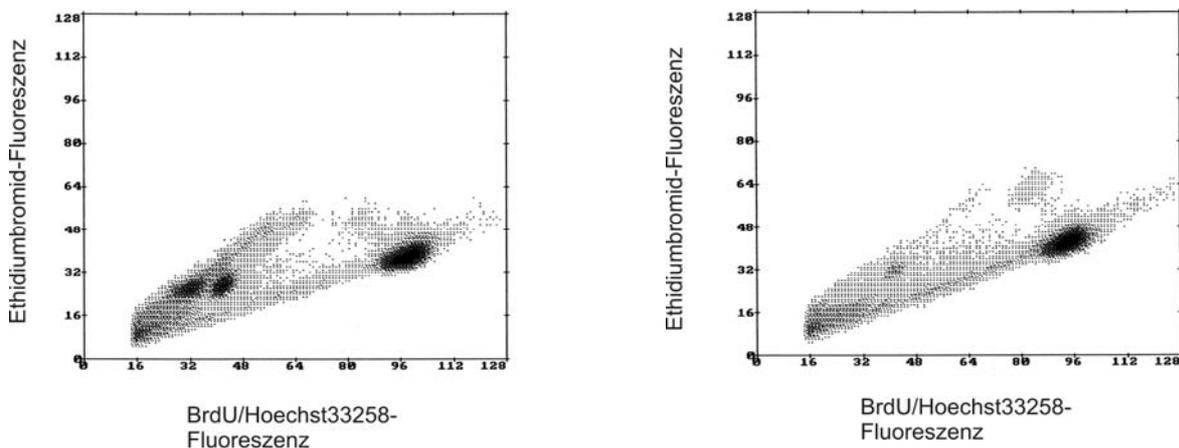


Abbildung 3.13

3.1.9 Kategorie I, Familie 9:

Eine Radiusaplasie des Foeten in der 21. SSW war bei Frau S. der Anlaß für eine durchflußzytometrische Analyse von Amnionzellen. Der Foet konnte als FA-negativ diagnostiziert werden. Die Patientin hatte jedoch eine Interruptio vornehmen lassen, ohne die Diagnose abzuwarten. Bei der Obduktion wurden abgesehen von der bereits bekannten Radiusaplasie keine weiteren pathologischen Befunde erhoben. Abbildung 3.14 zeigt eine sonographische Aufnahme des Foeten. Der Pfeil kennzeichnet die Region zwischen Hand und Oberarm, in welcher der Radius fehlt.



Abbildung 3.14

In der Abbildung 3.15 sind die zweiparametrischen Messungen der Amnionzellen ohne und mit Zusatz von MMC (10 ng/ml) dargestellt. Eine spontane Akkumulation der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war bereits ohne MMC (Abb. li.) zu beobachten (22,6 % Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus; ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,434 gegenüber Negativkontrollen bereits erhöht). Der Wert der G2-Phase im 1. Zyklus betrug nach MMC-Zusatz (Abb. re.) 38,2 %; die $\Sigma G2/GF$ betrug 0,567. Bei der ersten Messung waren diese Werte bereits erhöht; bei der zweiten Messung fand ein verhältnismäßig geringgradiger zusätzlicher Anstieg statt. Dieses Verhalten ist untypisch für FA; es weist auf einen erhöhten Anteil tetraploider Zellen in der Amnionzellkultur hin.

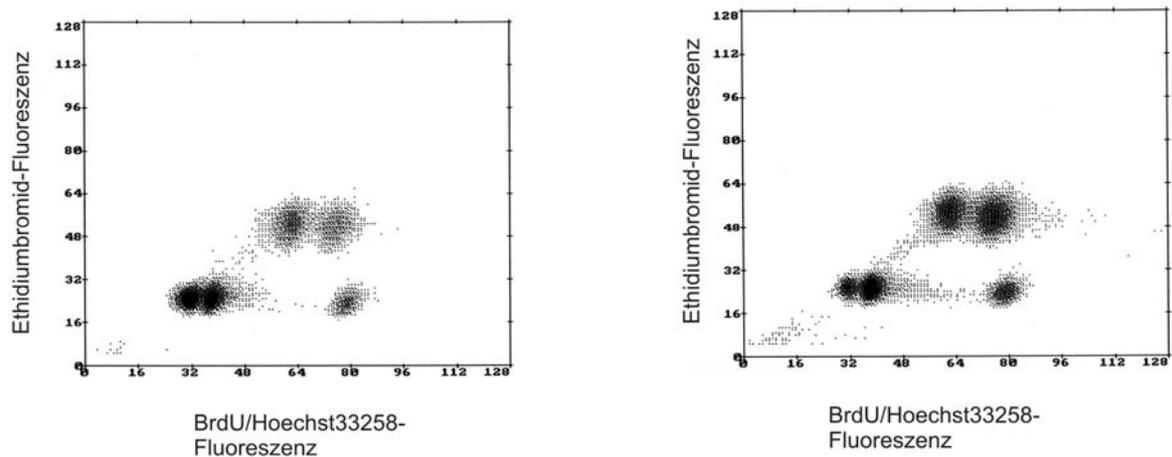


Abbildung 3.15

Die Ergebnisse von zusätzlichen einparametrischen Messungen ohne und mit MMC-Zusatz (10 ng/ml) im Vergleich mit Positiv- und Negativkontrollen sind in Abbildung 3.16 gezeigt. Im Vergleich zur Negativkontrolle ergab die Höhe des G2-Phasen-Peaks bei Frau S. (Patient) weder in der unbehandelten Kultur (9,2%) noch nach MMC-Behandlung (16,2%) einen Hinweis auf das Vorliegen einer Fanconi-Anämie.

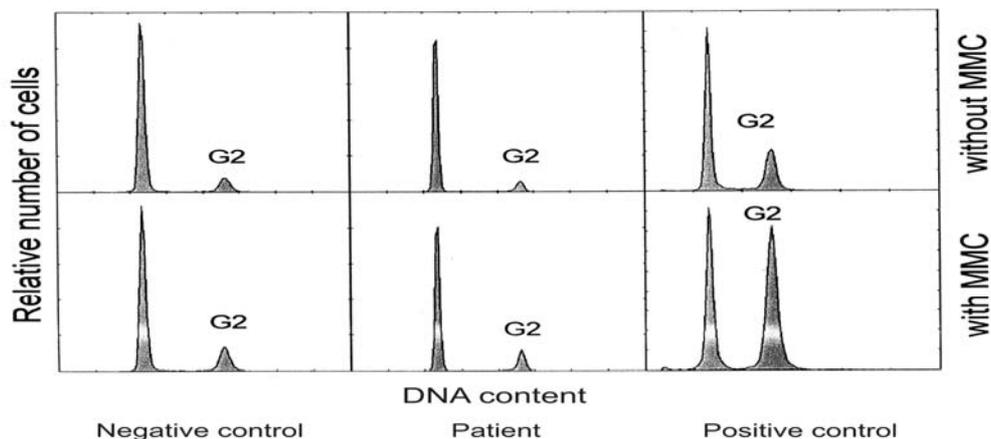


Abbildung 3.16

In diesem Fall ist das Ergebnis der einparametrischen Messung sehr viel eindeutiger zu interpretieren als das Ergebnis der zweiparametrischen Messung. Im Vergleich mit einer Positiv- (G2-Phase 28,8% bzw. 56,8%) und einer Negativkontrolle (G2-Phase 12,0% bzw. 18,8%) zeigt sich der Foet als eindeutig negativ.

3.1.10 Kategorie I, Familie 10:

In der 22.Schwangerschaftswoche wurden beim Foetus von Frau W. eine linksseitige Radius- und Daumenaplasie mit Ulnardeviation der Hand sowie rechts ein

komplettes Fehlen des Unterarmes mit nur rudimentären Fingeranlagen sonographisch festgestellt. Zusätzlich bestand der Verdacht auf Nierenagenesie rechts und Ohrdysplasie links. Differentialdiagnostisch kamen VACTERL-Assoziation (falls weitere Fehlbildungen hinzukommen sollten), Holt-Oram-Syndrom und FA in Betracht. Zum Ausschluß der Fanconi-Anämie wurden Nabelschnurblutzellen durchflußzytometrisch untersucht, und zwar mit unauffälligem Ergebnis. Abbildung 3.17 zeigt die durchflußzytometrischen Messungen ohne und mit Zusatz von MMC (10 ng/ml). Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war ohne MMC (Abb. li.) nicht zu beobachten (3,1 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,189 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Der Wert der G2-Phase des 1. Zyklus erhöhte sich nach MMC-Zusatz (Abb. re.) auf 8,7%, die $\Sigma G2/GF$ auf 0,302. Diese Werte liegen noch im Bereich der Kontrollen.

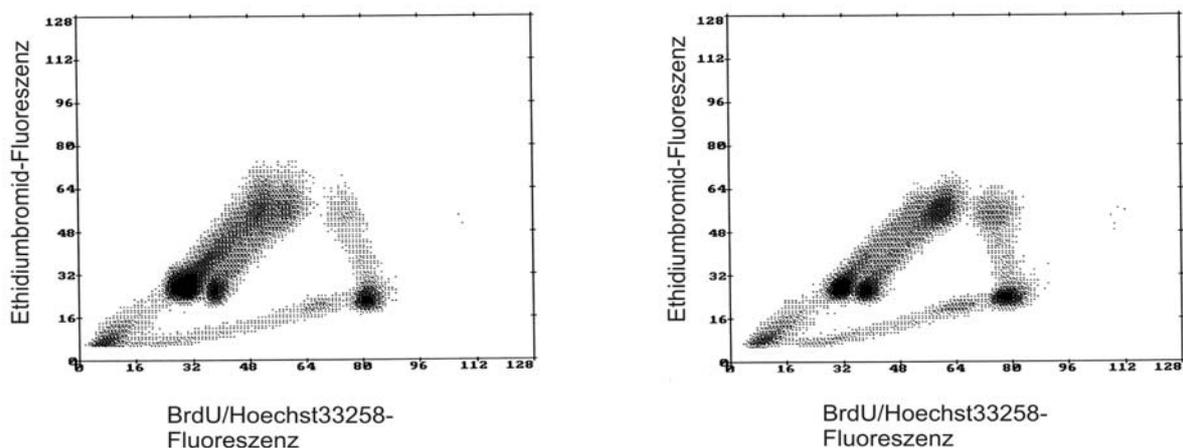


Abbildung 3.17

Das Kind wurde in der 36. SSW mit einem Gewicht von 1960 g, einer Oesophagusatresie, rechtsseitiger Nierenagenesie, Mikrotie rechts mit Gehörgangsatresie, Hypospadie, Wirbelkörperfehlbildungen und Ventrikelseptumdefekt geboren, was die Vermutung eines komplexen Fehlbildungssyndrom im Sinne einer VACTERL-Anomalie o.ä. nahelegt. Die Ergebnisse der postnatalen Kontrolluntersuchungen stehen noch aus.

3. 2 Pränatale Diagnostik bei Familien der Kategorie II

Der Kategorie II (vgl. Tabelle 2) wurden Familien zugeordnet, in denen bereits ein oder mehrere FA-Patienten mit gesicherter Diagnose bekannt sind. Jedoch sind Komplementationsgruppe und Mutationen bisher unbekannt. Eine weitere Schwangerschaft ist entweder geplant oder besteht bereits, und die Ratsuchenden möchten FA bei diesem Kind pränatal ausschließen. Die Diagnosestellung erfolgt daher nur durch funktionelle Testung.

3.2.1a Kategorie II, Familie 1, zweites Kind:

Familie C.s erstes Kind litt an FA und verstarb im Alter von 8 Jahren. Nach vier Fehlgeburten kam es zu der jetzigen Schwangerschaft. Es wurden Amnionzellen durchflußzytometrisch untersucht, wobei die Messung der Zellen ohne MMC-Zusatz erhöhte Werte (% der Zellen in der G2-Phase; $\Sigma G2/GF$) erbrachte. Zur Klärung der Diagnose wurde daher Nabelschnurblut analysiert. Das Ergebnis war hierbei unauffällig und wies darauf hin, dass das Resultat der Amnionzellanalyse durch einen hohen Anteil tetraploider Zellen nicht zuverlässig interpretiert werden konnte. Eine auswärts durchgeführte Chromosomenbruch-Analyse war ebenfalls unauffällig. Die Abbildung 3.18 zeigt das Ergebnis der Messungen der Amnionzellen ohne und mit Zusatz von MMC (10 ng/ml). Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war bereits ohne MMC (Abb. li.) zu beobachten (21,3 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,422 gegenüber Negativkontrollen erhöht und lag im Bereich der Werte von Personen mit Fanconi-Anämie. Der Wert der G2-Phase des 1. Zyklus betrug nach MMC-Zusatz (Abb. re.) 20,8%, die $\Sigma G2/GF$ betrug 0,448. Somit fand kaum eine Erhöhung der Werte statt, was gegen die Verdachtsdiagnose spricht.

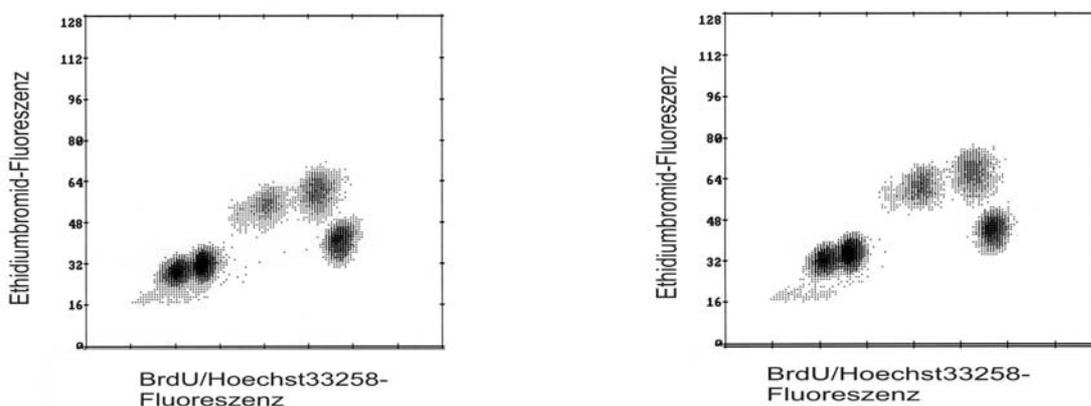


Abbildung 3.18

Zur Verdeutlichung dieser problematischen Ergebnisse sind in Abbildung 3.19 die Messwerte der Amnionzellen als Diagramm im Vergleich mit Negativ- und Positivkontrollen gezeigt. Die Werte Frau C.s sind mit Patient gekennzeichnet. Es zeigt sich, dass Frau C. mit ihren Werten im Bereich jener von FA-Patienten lag. Daher könnte dieser Befund mit FA vereinbar sein.

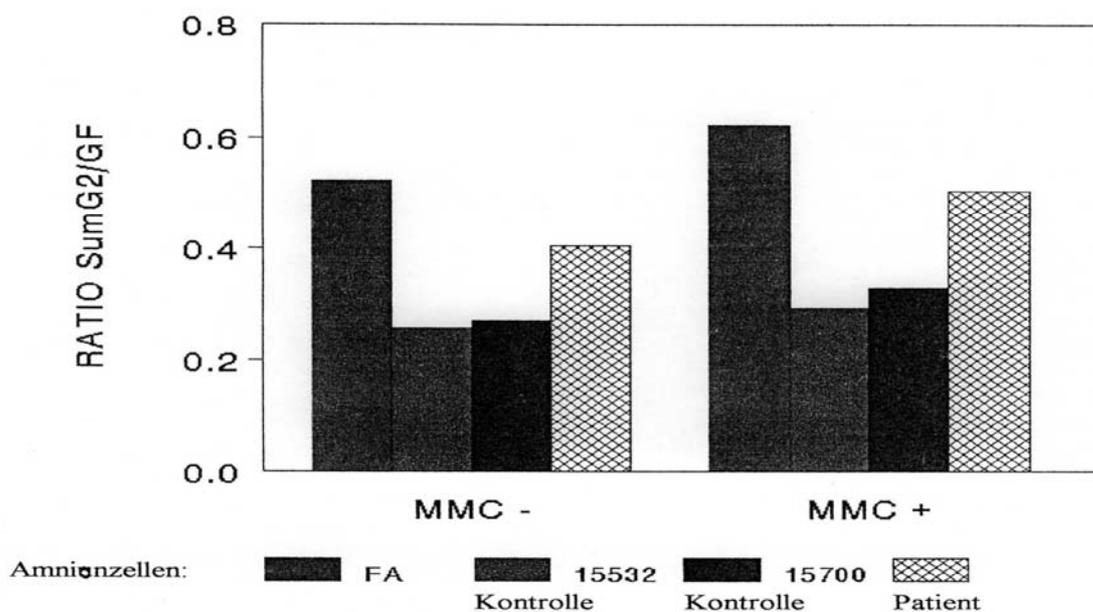


Abbildung 3.19

Zur Klärung des fraglich-positiven Amnionzellbefundes wurden Nabelschnurblutzellen untersucht. Abbildung 3.20 zeigt die Messungen der Nabelschnurblutzellen ohne und mit Zusatz von MMC (10 ng/ml). Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war ohne MMC (Abb. li.) nicht zu beobachten (3,9 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,150 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Der Wert der G2-Phase des 1. Zyklus betrug nach MMC-Zusatz (Abb. re.) 8,5%; die $\Sigma G2/GF$ betrug 0,249. Damit wurde der suggestiv-positive Befund der Amnionzellen relativiert und als Ergebnis erhöhter Tetraploidie interpretiert.

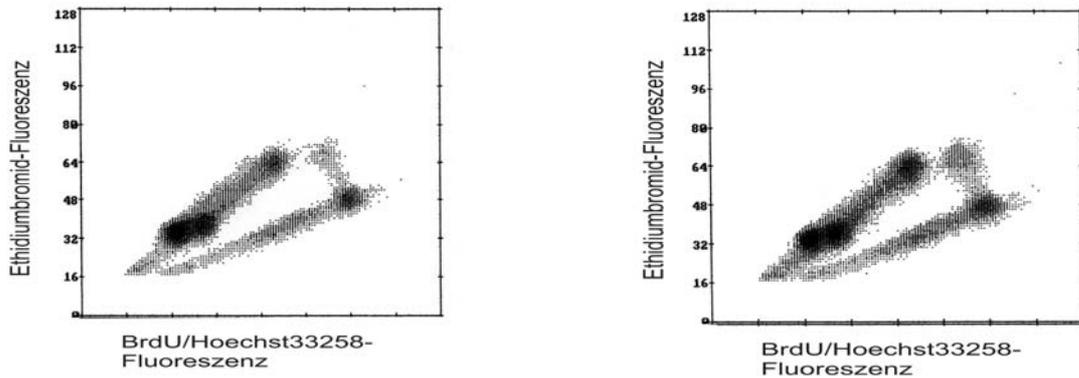


Abbildung 3.20

3.2.1b Kategorie II, Familie 1, drittes Kind:

In der 3. Schwangerschaft von Frau C. wurde das Wachstum von Amnionzellen unter MMC-Zusatz mit verschiedenen O₂-Konzentrationen analysiert. Diese Untersuchung ergab deutliche Hinweise auf MMC-Sensitivität der Amnionzellen. Die Bestätigung der Verdachtsdiagnose FA erfolgte durch funktionelle Untersuchung von Nabelschnurblutzellen. Eine auswärtig angefertigte Chromosomenbruchanalyse zeigte von 50 Mitosen 9 mit jeweils einem einzelnen Chromosomenbruch (ohne Bruchinduktion). In Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse der MMC-Sensitivitätstestung der Amnionzellen dargestellt. Die Zellproliferation der Patientenzellkulturen wurde schon bei geringen, wie auch bei allen höheren MMC-Konzentrationen ungleich stärker inhibiert als bei Kulturen von gesunden Kontrollpersonen. Dieses Ergebnis stimmte in allen Ansätzen überein. Das Zellwachstum war bei der niedrigen Sauerstoffkonzentration etwas besser als bei der normalen. Damit stehen die Ergebnisse im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Fanconi-Anämie.

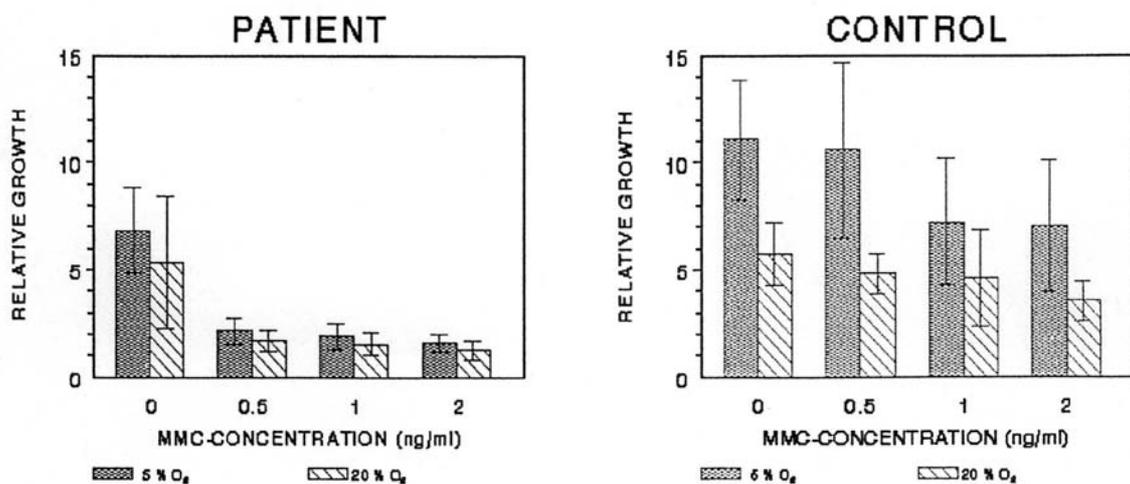


Abbildung 3.21

Abbildung 3.22 zeigt das Ergebnis der zusätzlichen Messung von Nabelschnurblutzellen ohne Zusatz von MMC. Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen (ohne Zusatz von MMC) war in diesem Fall zu beobachten (10,8 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,338 gegenüber Negativkontrollen erhöht und lag im unteren Bereich der Werte von Personen mit Fanconi-Anämie. Damit bestätigte sich der Verdacht auf das Vorliegen einer FA.

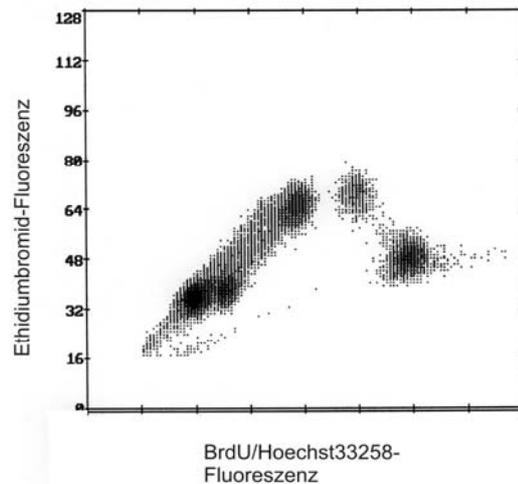


Abbildung 3.22

In der Abbildung 3.23 ist ein Vergleich der Werte $\Sigma G2/GF$ und G0/G1-Fraktion von Frau C., FA-Patienten (FA), Patienten mit Aplastischer Anämie (AA) und Kontrollen (CON) gezeigt. Hierbei wird deutlich, dass Frau C. mit ihren Werten im unteren Bereich der gesicherten FA-Patienten liegt.

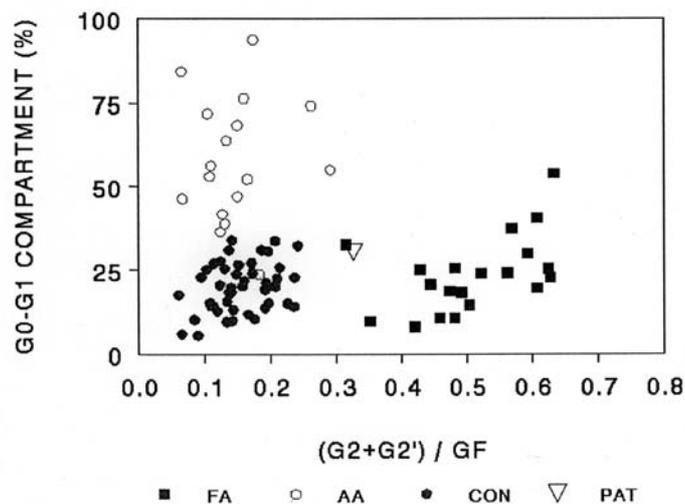


Abbildung 3.23

3.2.2 Kategorie II, Familie 2:

Aus der 1. Schwangerschaft hat Frau G. bereits ein Kind mit gesicherter FA. In der 2. Schwangerschaft wurde beim Foeten pränatal ebenfalls FA diagnostiziert. Die zweite Schwangerschaft wurde daraufhin abgebrochen, und der Befund wurde am Abortmaterial bestätigt. In der folgenden 3. Schwangerschaft wurden sowohl Chromosomen auf abnorme Brüchigkeit als auch Amnionzellen funktionell untersucht. Beide Analysen lieferten unauffällige Ergebnisse. Die DEB-induzierte Chromosomenbrüchigkeit war im Vergleich zu Kontrollen erhöht, jedoch nicht so stark wie bei von FA betroffenen Foeten. Die Abbildung 3.24 zeigt die Messungen der Amnionzellen ohne und mit Zusatz von MMC (10 ng/ml). Es fand sich eine geringfügige spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen ohne MMC (Abb. li.) (10,1 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Der Parameter $\Sigma G2/GF$ lag mit 0,270 im oberen Bereich der Negativkontrollen. Nach MMC-Zusatz (Abb. re.) fand sich keine für FA typische starke Erhöhung der G2-Phasen (1. Zyklus 12,1%) oder der $\Sigma G2/GF$ (0,328).

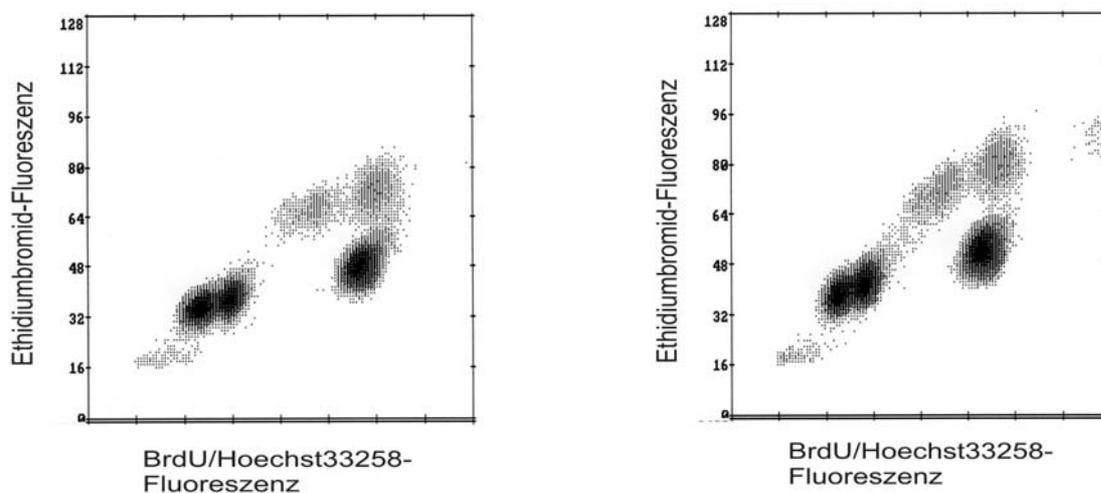


Abbildung 3.24

Das Diagramm von Abbildung 3.25 verdeutlicht diese Ergebnisse im Vergleich mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle. Der Wert von Frau G. liegt im oberen Bereich der Negativkontrollen bzw. ist leicht erhöht, erreicht jedoch nicht die Werte der Positivkontrolle.

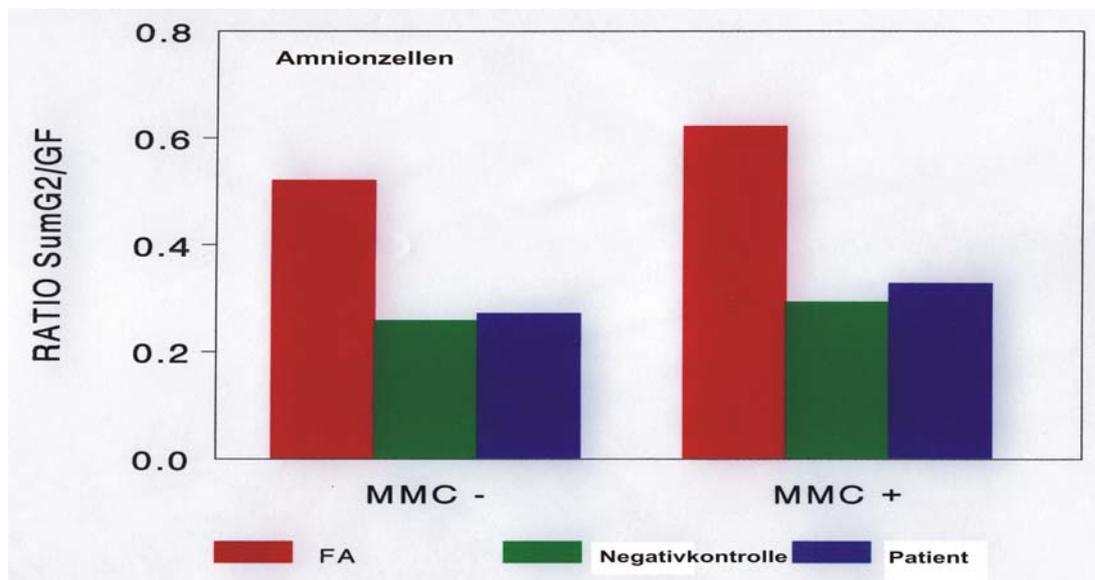


Abbildung 3.25

Der postnatale Verlauf ergab deutliche klinische Hinweise auf das Vorliegen einer FA, die durch eine Chromosomenbruchanalyse bestätigt wurden. Bei diesem Fallbeispiel handelt es sich also um einen falsch-negativen pränatalen Befund, der die Problematik der amnionzellbasierten pränatalen FA-Diagnostik verdeutlicht.

3.2.3 Kategorie II, Familie 3:

Das erste Kind von Familie M. leidet an FA. In der 2. Schwangerschaft wurde der Foetus sonographisch mit einem Hydrocephalus auffällig. Die funktionelle Analytik von Amnionzellen sprach dafür, dass der Foet FA-positiv war. Daraufhin wurde die Schwangerschaft abgebrochen. Die Obduktion ergab eine einseitige Nierenaplasie mit reduzierter Morphologie der anderen Niere sowie einen Hydrocephalus internus. Abbildung 3.26 zeigt die Messungen der Amnionzellen ohne und mit Zusatz von MMC (10 ng/ml). Eine spontane Erhöhung der G2-Phase war ohne MMC (Abb. li.) bereits deutlich (17,7 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Jedoch war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,252 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht und lag im Bereich der Werte von Negativkontrollen. Nach MMC-Zusatz (Abb. re.) zeigte sich eine starke Größenzunahme sowohl im Anteil der Zellen in der G2-Phase des 1. Zyklus mit 56,0% als auch bei der $\Sigma G2/GF$ mit 0,696. Der sehr deutliche Anstieg dieser Werte ist typisch für FA-positive Zellen.

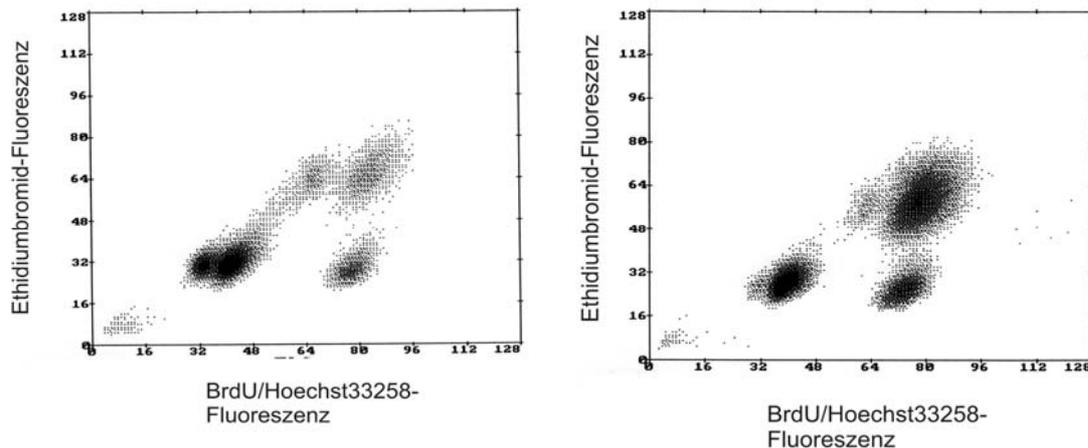


Abbildung 3.26

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden einparametrische Messungen ohne und mit MMC-Zusatz (10 ng/ml) im Vergleich mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle (G2-Phasenanteil 12% bzw. 18,8%) durchgeführt (vgl. Abbildung 2.4 im Material-und-Methoden-Teil). Die einparametrischen G2-Phasen Werte lagen mit 10,4% bzw. 38,5% im Bereich von denen der Positivkontrolle (21,3% bzw. 54,5%).

3.2.4 Kategorie II, Familie 4:

Ein bereits verstorbene Kind von Familie G. war FA-positiv. Daher wurden in der 2. Schwangerschaft Amnionzellen durchflußzytometrisch analysiert, und zwar mit negativem Ergebnis. Die einparametrischen Messungen ohne und mit MMC (10 ng/ml) sind in Abbildung 3.27 zu sehen. Die Größe der G2-Phase ergab weder in der unbehandelten Kultur (9,8%) noch nach MMC-Behandlung (12,5%) einen Hinweis auf das Vorliegen einer Fanconi-Anämie.

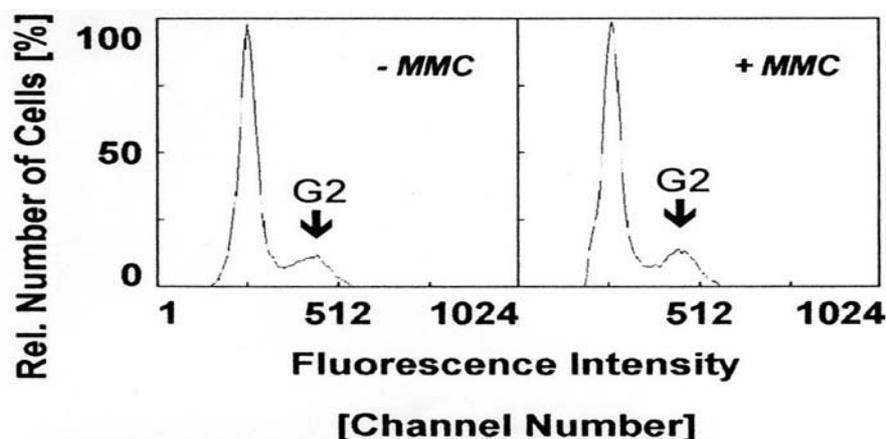


Abbildung 3.27

Die Ergebnisse der zweiparametrischen Messungen ohne und mit MMC (10 ng/ml) sind in Abbildung 3.28 dargestellt. Eine leichte Erhöhung der G2-Phase des ersten Zellzyklus war bereits ohne MMC (Abb. li.) zu beobachten (12,1 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Jedoch war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,250 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Eine deutliche Zunahme der G2-Phasen-Fraktion der proliferierenden Zellen war nach MMC-Zusatz (Abb. re.) nicht zu beobachten (19,2 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ nach MMC-Zusatz mit 0,370 gegenüber Negativkontrollen nicht deutlich erhöht.

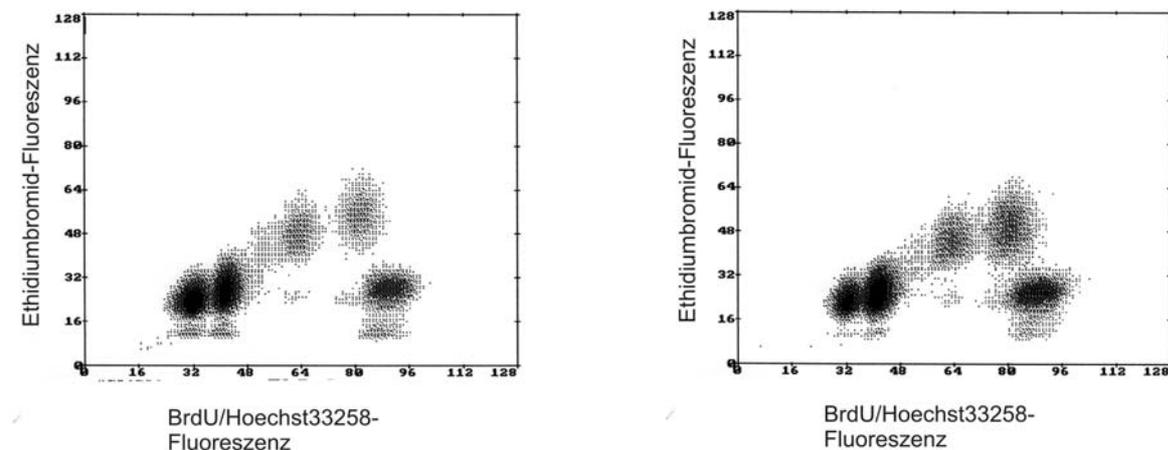


Abbildung 3.28

3.2.5 Kategorie II, Familie 5:

Familie C. hat bereits ein Kind mit FA. In der folgenden Schwangerschaft wurden auf Wunsch der Eltern Amnionzellen durchflußzytometrisch untersucht. Der Foet erwies sich als FA-negativ. Die Abbildung 3.29 zeigt die Messungen der Zellen ohne und mit MMC (10 ng/ml). Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war ohne MMC (Abb. li.) nicht zu beobachten (4,4 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,164 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Nach MMC-Zusatz (Abb. re.) lag der Anteil der Zellen in der G2-Phase des 1. Zyklus bei 5,9%, die $\Sigma G2/GF$ bei 0,270. Ein so geringer Anstieg der Werte gegenüber der ersten Messung steht im Widerspruch zur Diagnose FA.

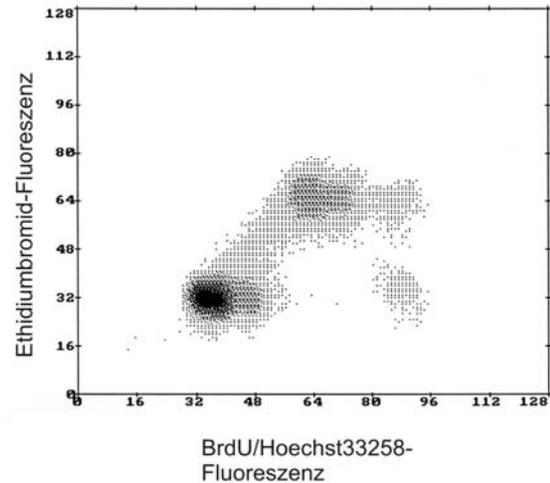
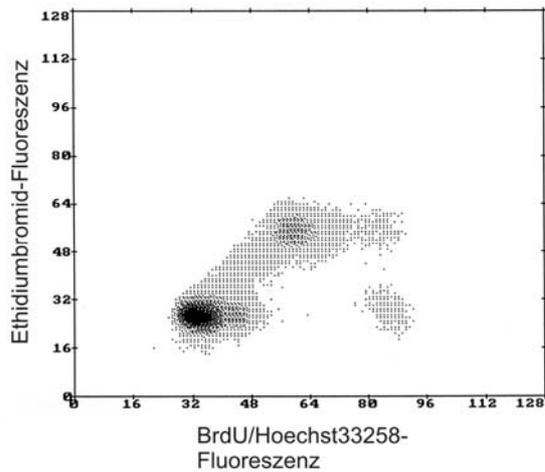


Abbildung 3.29

Die zusätzlichen einparametrischen Messungen ohne und mit MMC (10 ng/ml) sind in Abbildung 3.30 im Vergleich mit einer Positivkontrolle (G2-Phasenanteil 21,3% bzw. 54,4%) dargestellt. Die Größe der G2-Phase ergab weder in der unbehandelten Kultur (11,6%) noch nach MMC-Behandlung (15,5%) einen Hinweis auf das Vorliegen einer Fanconi-Anämie.

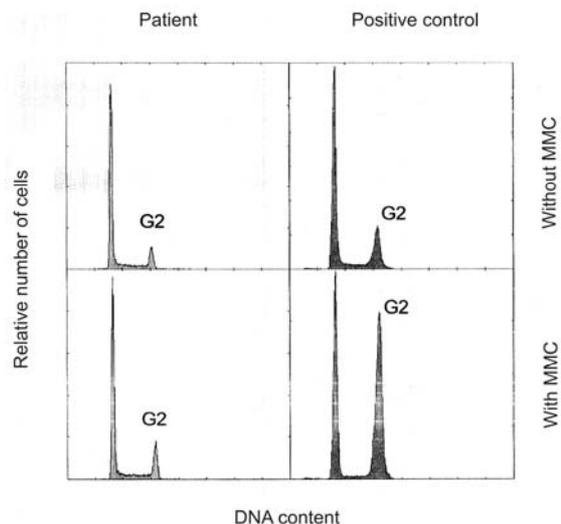


Abbildung 3.30

3.2.6 Kategorie II, Familie 6:

Das erste Kind der Familie B.-S. war an FA erkrankt und ist bereits verstorben. In der Durchflußzytometrie zeigten die Amnionzellen aus der folgenden Schwangerschaft ein unauffälliges Bild. Die Ergebnisse der einparametrischen Messungen der Amnionzellen ohne und mit MMC-Zusatz (30 ng/ml) sind der Abbildung 3.31 zu entnehmen. Die Größe der G2-Phase ergab weder in der unbehandelten Kultur (6,2%) noch nach MMC-Behandlung (8,0%) einen Hinweis auf das Vorliegen einer Fanconi-Anämie-typischen G2-Phasen-Erhöhung.

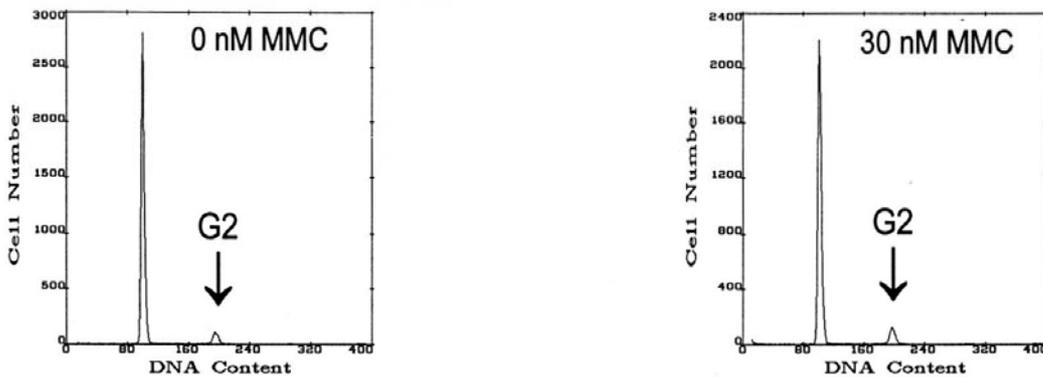


Abbildung 3.31

3.2.7 Kategorie B, Familie 7:

Ein Kind aus einer früheren Beziehung des Partners von Frau H. war an FA erkrankt und ist bereits verstorben. In der 1. gemeinsamen Schwangerschaft des Paares wurden Amnionzellen in der Durchflußzytometrie untersucht. Der Foetus zeigte sich hierbei als nicht von FA betroffen.

Die Ergebnisse der einparametrischen Messungen der Amnionzellen ohne und mit MMC-Zusatz (10 ng/ml) im Vergleich mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle sind der Abbildung 3.32 zu entnehmen. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase betrug bei der Positivkontrolle ohne MMC 21,3%, mit MMC 54,4% und bei der Negativkontrolle 12,0% bzw. 18,8%. Die Größe der G2-Phase bei den Zellen von Frau H. ergab weder in der unbehandelten Kultur (11,3%) noch

nach MMC-Behandlung (15,1%) einen Hinweis auf das Vorliegen einer Fanconi-Anämie.

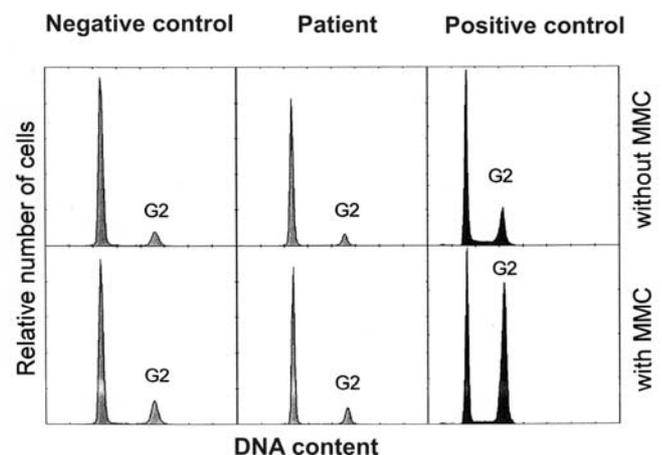


Abbildung 3.32

Die Ergebnisse der zweiparametrischen Messungen ohne und mit MMC-Zusatz (10 ng/ml) sind in Abbildung 3.33 gezeigt. Eine Prominenz der G2-Phasen war bereits ohne MMC (Abb. li.) zu beobachten (13,1 % der Zellen in der G2-Phase des 1.

Zellzyklus). Der Parameter $\Sigma G2/GF$ hingegen lag mit 0,284 im oberen Bereich der Negativkontrollen. Nach MMC-Zusatz (Abb. rechts) kam es jedoch nicht zu einer deutlichen Erhöhung der G2-Phasen-Werte (18,8 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,387 gegenüber MMC-behandelten Negativkontrollen nicht erhöht.

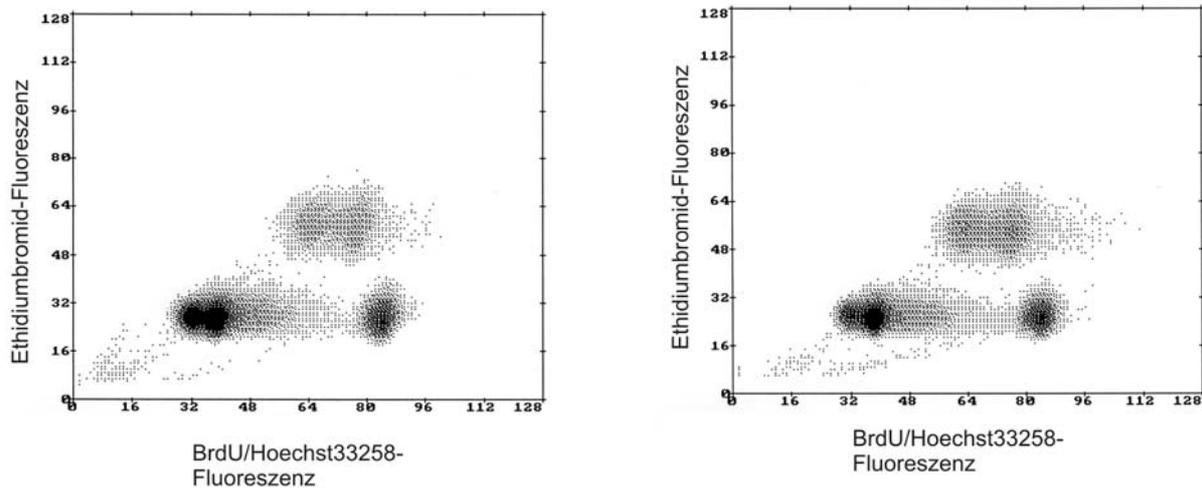


Abbildung 3.33

3.2.8 Kategorie II, Familie 8:

Das erste Kind von Familie M. hat Fanconi-Anämie und gehört der Komplementationsgruppe A an. Obwohl die Information über die Gruppe vorliegt, wurde in der 2. Schwangerschaft von Frau M. aus Kosten- und Zeitgründen zunächst eine funktionelle Diagnostik an Nabelschnurblutzellen durchgeführt. Sie lieferte ein unauffälliges Ergebnis.

Abbildung 3.34 zeigt die Messung der Nabelschnurzellen ohne Zusatz von MMC. Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war nicht zu beobachten (2,0 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,168 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Auffällig war ein prominenter Zellzerfall aus der G0/G1-Phase.

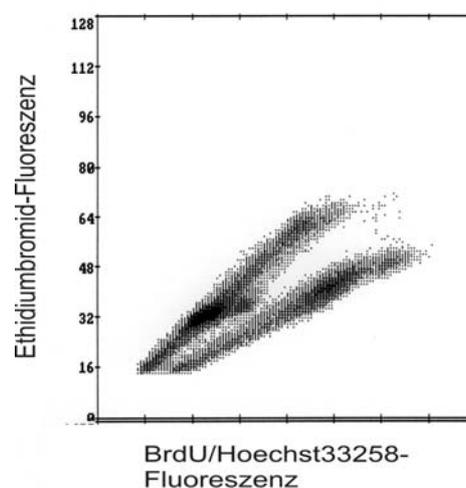


Abbildung 3.34

Pränatale Diagnostik bei Familien der Kategorie III

Zu Kategorie III gehören Familien, in deren Vorgeschichte ein oder mehrere Fälle von FA bekannt sind. Des Weiteren ist darüber hinaus die jeweilige Komplementationsgruppe des Patienten bestimmt worden. Daher kann in diesen Fällen die Diagnosestellung zusätzlich zur funktionellen Analytik auch mit Hilfe indirekter Gendiagnostik erfolgen. Bei manchen der Familien wurden überdies bereits Mutationen identifiziert, so dass hier eine direkte Genanalyse möglich ist.

3.3.1 Kategorie III, Familie 1:

Zwei Kinder der Familie haben Fanconi-Anämie und gehören der Komplementationsgruppe A an. Die Zuordnung zu dieser Gruppe wurde durch Komplementation der jeweiligen Patientenzelllinie hinsichtlich der MMC-Hypersensitivität mittels retroviralen Gentransfers mit dem FANCA-Gen erreicht. Die krankheitsverursachenden Mutationen im FANCA-Gen sind bisher jedoch nicht bekannt.

In der 3. Schwangerschaft von Frau S. wurde in einem auswärtigen Institut eine indirekte Gendiagnostik mit FANCA-assoziierten Mikrosatelliten-Markern durchgeführt. Hierfür wurde DNA der Eltern und Geschwister sowie Chorionzotten-DNA analysiert. Die Haplotypen für folgende polymorphe Marker auf Chromosom 16 wurden durch PCR-Amplifikation und Bestimmung der Produktlängen untersucht: D16S413, D16S3121, D16S3407 und D16S303. Der maternale Haplotyp, welcher mit der Mutation assoziiert ist, konnte mit 137-77-198-119 bestimmt werden. Der paternale Haplotyp, assoziiert mit einer zweiten unbekanntem Mutation, war 137-79-198-121. In den Chorionzotten wurde der maternale Haplotyp 143-83-198-121, jedoch der paternale Haplotyp 137-79-198-121 gefunden. Der Foetus trägt somit nur das väterliche Mutations-Allel und ist als heterozygot einzustufen. Die Ergebnisse der indirekten Genotyp-Diagnostik sind in Abbildung 3.35 dargestellt.

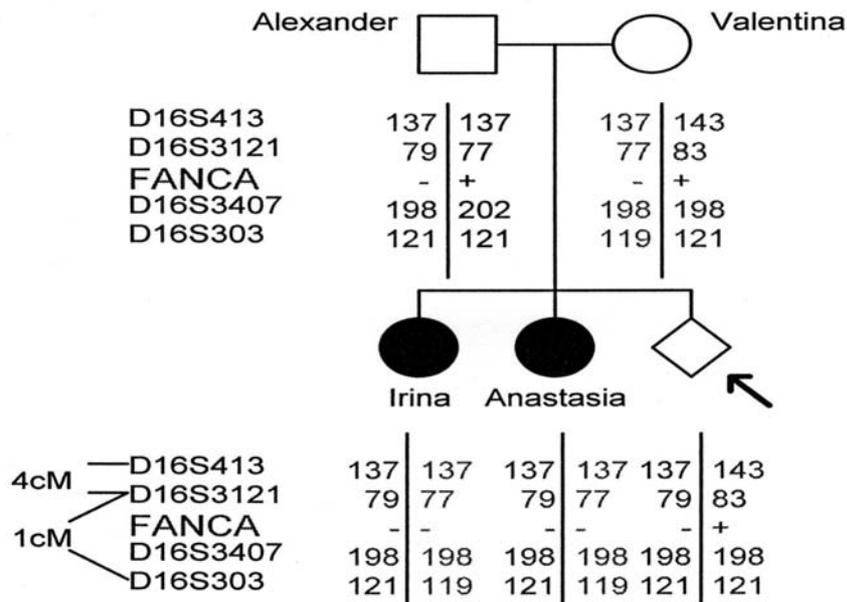


Abbildung 3.35

Die Ergebnisse wurden am hiesigen Institut für Humangenetik bestätigt: DNA der Eltern, der zwei betroffenen Kinder sowie des Foeten wurde genomisch sequenziert, basierend auf diallelischen intragenischen Polymorphismen. Folgende Polymorphismen erwiesen sich in dieser Familie als informativ: G501S in Exon 16 (bei den Geschwistern mit FA homozygot vorhanden), P643A in Exon 22 und T1328A in Exon 40 (bei den Geschwistern mit FA homozygot Normaltyp). Die Eltern erwiesen sich als heterozygot für eine (Mutter, Polymorphismus in Exon 16) bzw. zwei (Vater, Polymorphismus in Exon 22 und 40) dieser Varianten. Der Vater zeigte sich gleichzeitig homozygot für den Polymorphismus in Exon 16. Beim Foetus wiesen die Polymorphismen in Exon 22 und 40 homozygot den Normaltyp auf. Dies bedeutet, dass das ungeborene Kind vom Vater das mutierte Allel ererbt hat. Der Polymorphismus in Exon 16 (auf dem mutierten Allel) zeigte beim Foeten aber neben der mutierten Form ebenfalls den Normaltyp. Dies bedeutet, dass das ungeborene Kind von der Mutter nicht das Mutationsallel, sondern das Normalallel ererbt hat. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der indirekten Genotyp-Diagnostik sowohl mit flankierenden als auch mit intragenen Markern dafür, dass das von Frau S. erwartete Kind nicht von Fanconi-Anämie betroffen, sondern lediglich heterozygot und damit gesund sein würde. Die Ergebnisse der Diagnostik mit intragenen Markern werden in Abbildung 3.36 illustriert.

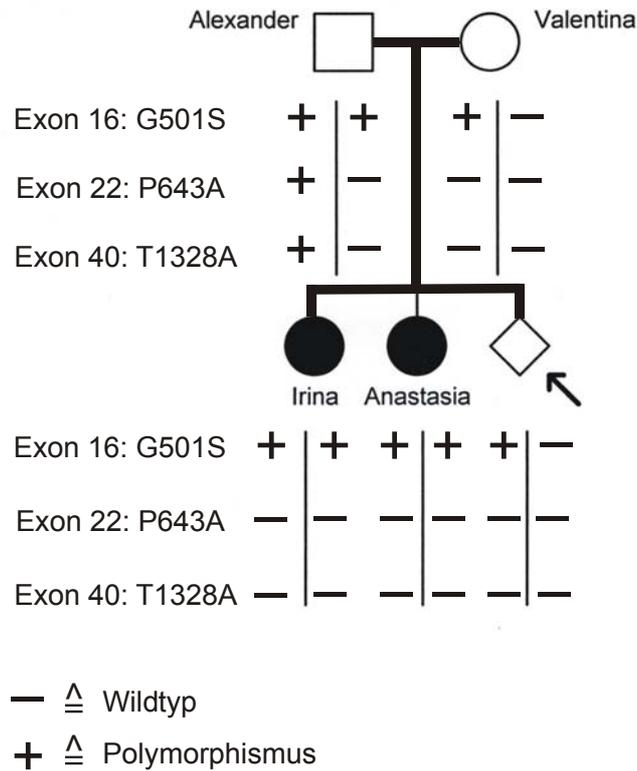


Abbildung 3.36

3.3.2 Kategorie III, Familie 2:

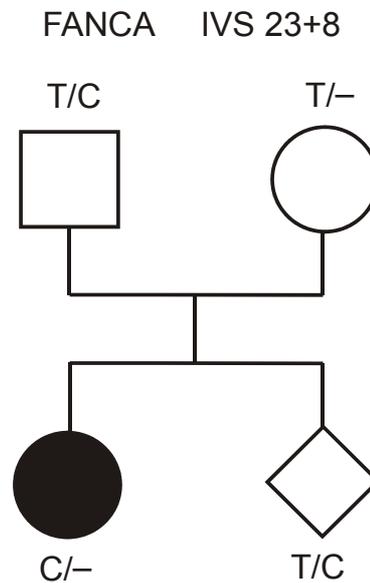
In Familie C. gibt es bereits ein Kind mit FA, welches der Komplementationsgruppe A angehört (nachgewiesen durch retrovirale Komplementation). Die Mutationen sind jedoch nicht bekannt. So wurde in der 2. Schwangerschaft von Frau C. indirekte Gendiagnostik an Chorionzotten-DNA sowie DNA der Eltern und des betroffenen Kindes durchgeführt. Es wurden intragene Polymorphismen im FANCA-Gen mittels PCR und Sequenzierung untersucht. Dabei wurde in Exon 26 ein Basenaustausch an Position 2426G von G zu A gefunden, welcher als nicht konservativer Aminosäureaustausch an einer konservierten Genposition bezeichnet werden kann und in einer Aminosäuresubstitution resultiert. Daher wurde vermutet, dass es sich nicht um einen Polymorphismus, sondern um eine krankheitsverursachende Mutation handelt. Der Foetus zeigte sich mit G und A an dieser Position als heteroallelisch. Bei dem von FA betroffenen lebenden Kind hingegen fand sich lediglich A. Die Mutter wies nur die Wildtyp-Sequenz auf (G), der Vater war heteroallelisch mit G und A. Das Vererbungsmuster lässt sich nur erklären, wenn man annimmt, dass Mutter und betroffenes Kind ein deletiertes FANCA-Allel haben. Die Mutter wäre dann genotypisch 2426G/- und das betroffene Kind 2426A/-. Die Mutationen wären dann 2426A und 2426/-. Der Foetus erschien daher heterozygot, und zwar mit dem

paternalen Mutationsallele und dem nicht-deletierten, daher intakten maternalen Allel. Die entsprechenden DNA-Sequenzen sind in der folgenden Abbildung (3.37) gezeigt.

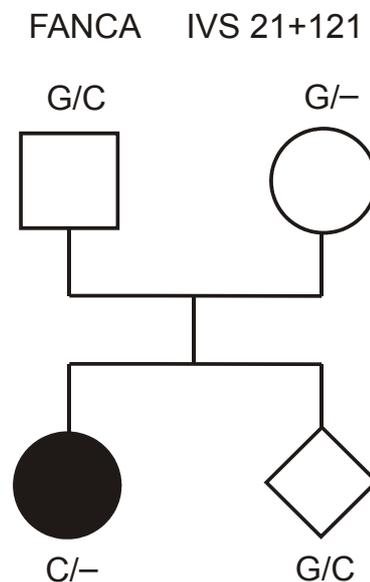


Eine weitere FANCA-Genveränderung fand sich bei der Untersuchung von Exon 23. An der Position IVS23+8 ist der Foetus heteroallelisch für T/C, wobei T der Konsensussequenz entspricht. Das von FA betroffene erste Kind der Familie besitzt an dieser Stelle nur C, die Mutter nur T und der Vater T/C. Hier ist die Erklärung des Segregationsmusters wieder ein deletiertes Allel bei der Mutter. Diese ist dann T/-, und das betroffene Kind C/-. Auch das Ergebnis dieser Untersuchung ergab, dass der Foetus

das paternale Mutationsallel und das maternale Wildtyp-Allel ererbt haben sollte (s. folgende Abbildung [3.38]).



Weiterhin fand sich ein Polymorphismus an der FANCA-Position IVS21+121. Der Foetus ist heteroallelisch für G/C, wobei G der Konsensussequenz entspricht. Das betroffene Kind der Familie besitzt nur C, die Mutter nur G und der Vater G/C. Auch hier musste man also ein deletiertes mütterliches Allel annehmen, so dass sie G/- und das betroffene Kind C/- ist. Wiederum besagte das Segregationsmuster, dass der Foetus das väterliche Mutationsallel und das mütterliche Wildtypallel ererbt hatte. Diese Ergebnisse sind im Stammbaum der folgenden Abbildung 3.39 dargestellt.

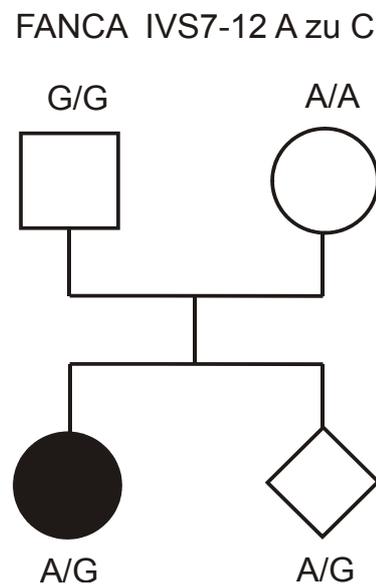
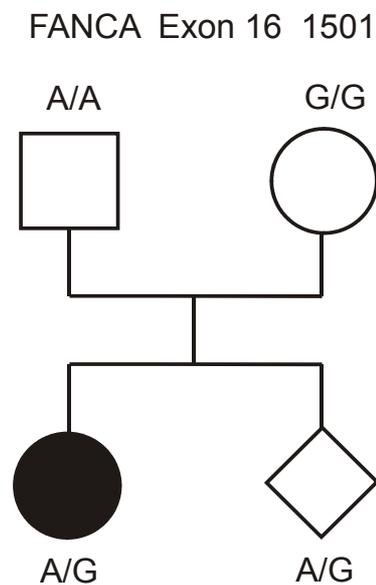


Schließlich wurde noch ein Polymorphismus im FANCA-Exon 16 analysiert. Der Foetus zeigte sich heteroallelisch für 1501A/G, wobei A als Konsensus gilt. Es handelt sich um einen bekannten Polymorphismus (beschrieben von Savino et al, 1997; Gross 2002) der in der konservativen Aminosäuresubstitution S501G resultiert.

Das betroffene Kind der Familie besitzt ebenfalls A/G, der Vater A/A und die Mutter G/G. Dieser Polymorphismus ist nicht informativ, ließ aber mit hoher Wahrscheinlichkeit vermuten, dass eine mütterliche Deletion hier nicht

Ebenso verhielt es sich mit einem Polymorphismus nahe Exon 8, IVS7-12A zu C. Auch dieser war nicht informativ, der Foetus zeigte sich mit A/G (A ist Konsensus), die Patientin hat ebenfalls A/G, der Vater G/G und die Mutter A/A. Eine mütterliche Deletion an dieser Stelle war jedoch auszuschließen. Die Daten sind im Stammbaum der folgenden Abbildung 3.41 dargestellt.

vorlag. Diese Ergebnisse sind im Stammbaum der folgenden Abbildung 3.40 dargestellt.



Zusammenfassend lässt sich aus diesen umfangreichen Untersuchungen schließen, dass beide familiären FANCA-Mutationen identifiziert wurden, und zwar paternal der Basenaustausch 2426G zu A, und maternal eine große Deletion, die sich mindestens über 5 Exons erstreckt. Selbst wenn hierin ein Irrtum bestanden hätte, so hätte sich

der Foetus doch in drei informativen Genveränderungen von dem betroffenen Kind unterschieden. So konnte gesagt werden, dass Frau C. ein Kind erwartet, das mit hoher Wahrscheinlichkeit heterozygot ist. Es besitzt das maternale Wildtyp-Allel und den paternalen FANCA-Basenaustausch in Exon 26, 2426G zu A, der in einer Aminosäuresubstitution resultiert.

3.3.3 Kategorie III, Familie 3:

Familie C. hat bereits ein Kind mit FA, welches der Komplementationsgruppe FANCA angehört. Die Mutationen sind bisher nicht bekannt. Der Foetus einer weiteren Schwangerschaft war ebenfalls betroffen. Die Schwangerschaft wurde abgebrochen. In der 3. Schwangerschaft wurde indirekte Gendiagnostik anhand von intragenen Polymorphismen durchgeführt. Es wurde die DNA der Eltern, des erkrankten lebenden Kindes sowie die des Foeten aus der dritten Schwangerschaft sequenziert. Dabei ließ bereits die Untersuchung zweier dimorpher Basenpositionen in Exon 22 des FANCA-Gens erkennen, dass der Foetus zumindest heterozygot für ein Mutationsallel sein musste: Die Basenaustausche 1963 C zu T und 1969 T zu C kamen beim Vater heterozygot vor, während die Mutter, das betroffene Kind und der Foetus homozygot für das jeweilige Wildtypallel (C/C bzw. T/T der Konsensussequenz) waren. Die väterliche Mutation muss daher auf dem väterlichen Wildtypallel für die genannten Polymorphismen liegen, das der Foetus ererbt hat. Die Abbildungen 3.42 und 3.43 zeigen diese Ergebnisse.

FANCA Exon 22 1963 C zu T

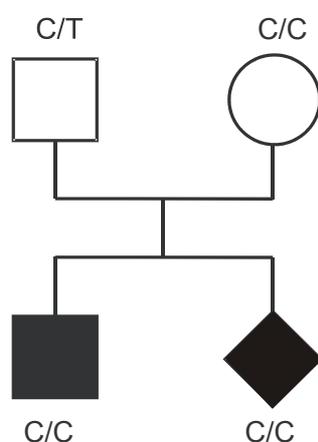


Abbildung 3.42

FANCA Exon 22 1969 T zu C

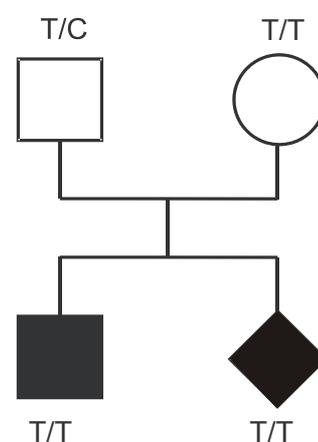


Abbildung 3.43

Die definitive Diagnose ergab sich nach Untersuchung eines weiteren Polymorphismus in Intron 13, nämlich IVS 13-20 A zu G. Beide Elternteile sind heterozygot für diesen Polymorphismus, während das betroffene lebende Kind wie auch der Foetus homozygot sind für das Wildtypallel (A der Konsensussequenz). Sowohl die väterliche als auch die mütterliche Mutation muss daher auf dem Wildtypallel für diesen Polymorphismus liegen. Der Foetus hat nach diesen Ergebnissen, die in Abbildung 3.44 dargestellt sind, das väterliche und mütterliche Mutationsallel ererbt.

FANCA Intron 13 IVS13-20 A zu G

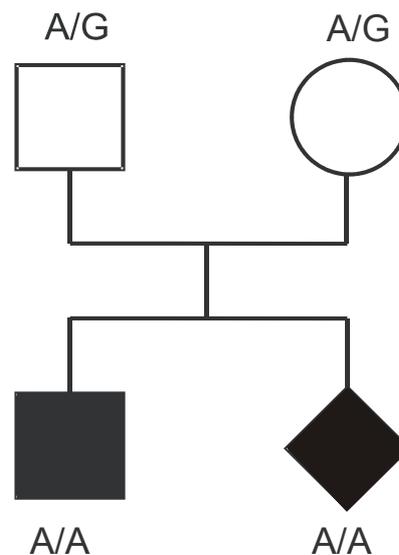


Abbildung 3.44

Ferner wurden die Haplotypen am Ort des FANCA-Gens untersucht durch Amplifikation der Mikrosatelliten D16S413, D16S3023, D16S1321, D16S3407 und D16S303 beim Vater, der Mutter, dem betroffenen lebenden Kind, dem Foeten aus der 2. Schwangerschaft und dem Foeten aus der 3. Schwangerschaft. Die Bestimmung der PCR-Produktlängen erfolgte mittels Fragmentanalyse. Zwei der Mikrosatelliten, D16S413 und D16S3121, erwiesen sich als nicht informativ. Hinsichtlich der informativen Marker D16S3023, D16S3407 und D16S303 ist der väterliche Haplotyp mit einer unbekanntem FANCA-Mutation, offensichtlich 84-201-118, und der mütterliche Haplotyp mit dem mutierten FANCA-Allel 86-201-118 assoziiert. Der Foetus wies diese beiden Haplotypen auf. Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die doppelt gesicherten Ergebnisse der indirekten Gendiagnostik dafür sprechen, dass das von Frau C. erwartete Kind von FA betroffen sein wird. Die Ergebnisse der Mikrosatelliten-Untersuchungen finden sich in Abbildung 3.45.

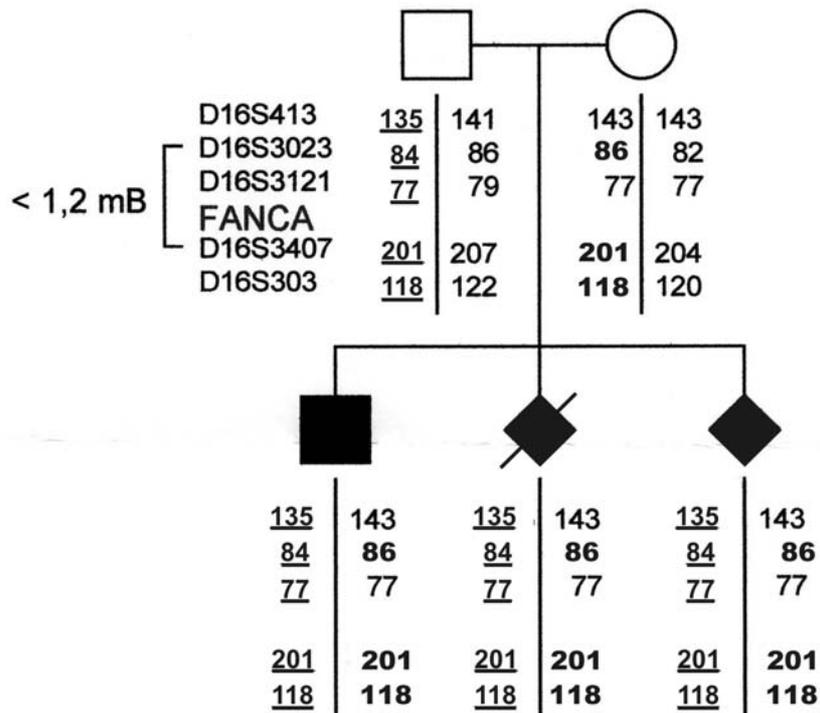


Abbildung 3.45

3.3.4 Kategorie III, Familie 4:

Zwei Kinder des Ehepaars G. sind an FA erkrankt. Sie gehören der Komplementationsgruppe FANCD-2 an. Die Mutationen hingegen sind nicht bekannt. In der jetzigen Schwangerschaft von Frau G. wurden Amnionzellen durchflußzytometrisch untersucht. Die einparametrische Messung (Abbildung 3.46) zeigte keine Überempfindlichkeit der Zellen nach Behandlung mit MMC.

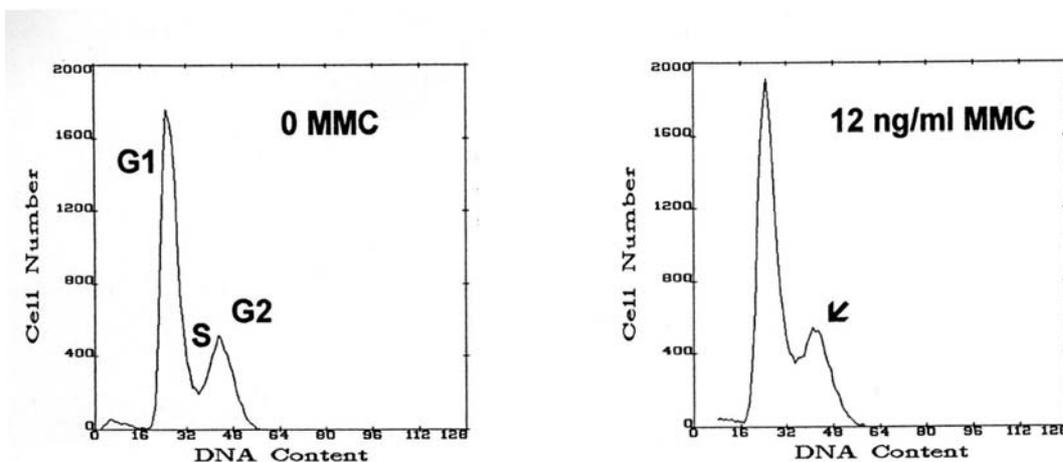


Abbildung 3.46

Die zweiparametrische Messung (Abbildung 3.47) zeigte mit einer $\Sigma G2/GF$ von 0,438 und einer G2-Phase von 26,8% eine deutlich erhöhte G2-Phase nach MMC-Behandlung (11 ng/ml; rechte Abb.), jedoch bei hohem Ausgangswert der nicht mit MMC-behandelten Kultur (0,368 und 23,0%; li. Abb.), so dass – auch unter Berücksichtigung der einparametrischen Messung – eine BrdU-Toxizität bzw. erhöhte Tetraploidie wahrscheinlicher erschien als eine MMC-Überempfindlichkeit.

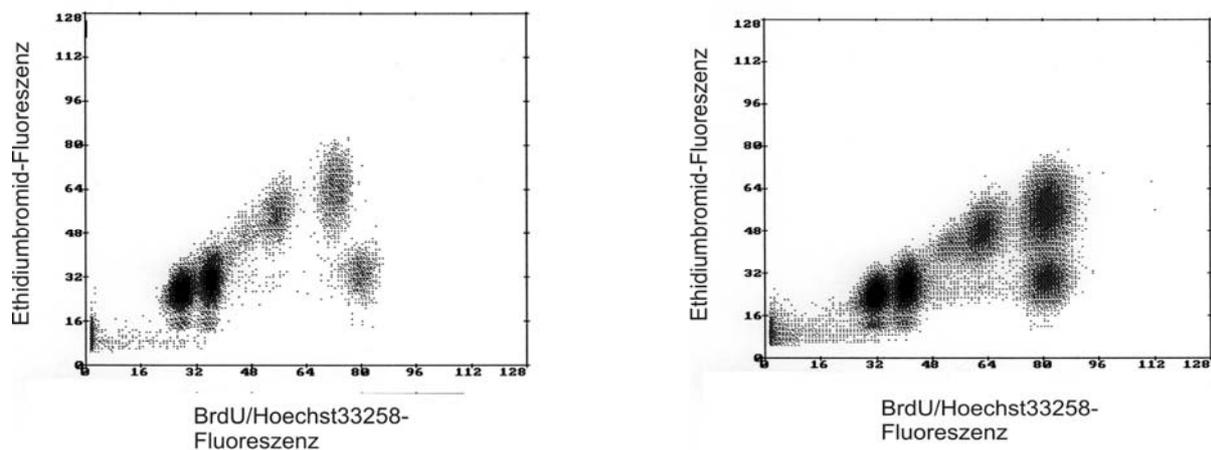
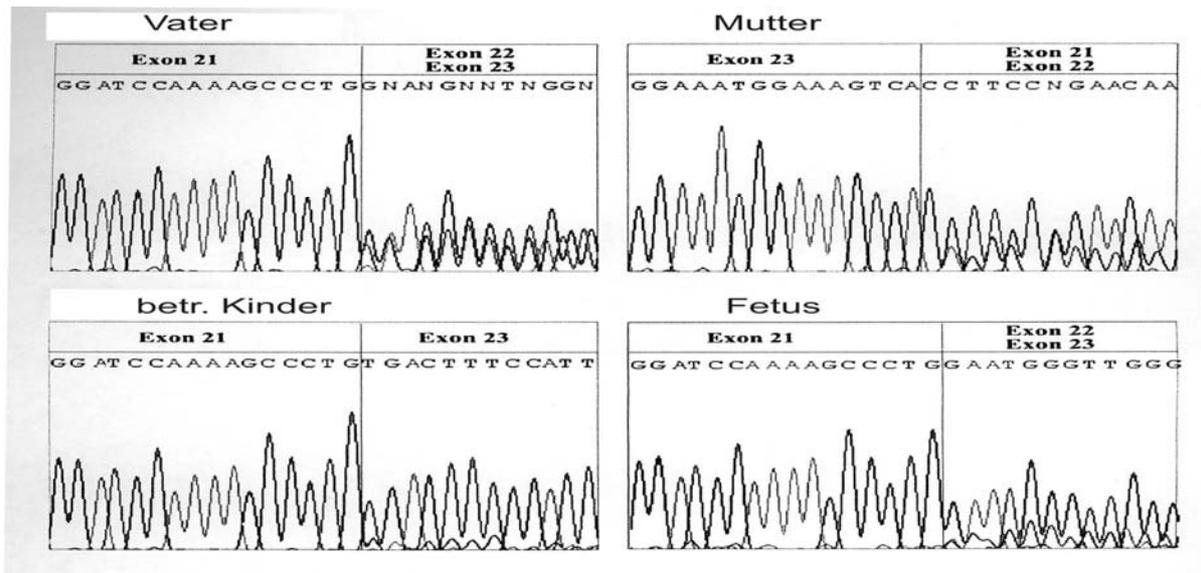


Abbildung 3.47

Wegen der nicht eindeutigen Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen wurden auch Analysen von mRNA bzw. cDNA der Eltern, der beiden betroffenen Kinder sowie des Foeten durchgeführt. Dabei konnte ein Skipping von FANCD2-Exon 22 (r.1948_2021del74) bei den betroffenen Kindern gefunden werden. Dieses wurde als Konsequenz einer homozygot vorliegenden Spleissmutation gewertet, zumal die Eltern für die genannte Veränderung heterozygot sind. Daß das Skipping von FANCD2-Exon 22 (r.1948_2021del74) Ausdruck einer Mutation ist und nicht als alternatives Spleissen gedeutet werden kann, wurde daraus geschlossen, dass bei einem anderen türkischen FA-D2-Patienten dieselbe Veränderung gefunden werden konnte. Der Foetus der Familie G. erwies sich als heterozygot für das Skipping von FANCD2-Exon 22 (r.1948_2021del74) wie die Eltern und wurde deshalb als nicht von FA betroffen diagnostiziert. Die Ergebnisse finden sich in der folgenden Abbildung 3.48.



Genomische Untersuchungen im FANCD2-Gen sind dadurch kompliziert, dass mindestens acht Pseudogene nahe dem aktiven Gen existieren, so dass man auch bei sorgfältigster Primerwahl nicht sicher sein kann, nicht doch das Pseudogen zu amplifizieren. Insbesondere für die Umgebung von Exon 22 gibt es Anhaltspunkte hierfür, so dass die genomische Mutation der Familie G. zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht endgültig definiert werden kann.

Wegen dieser Unsicherheit wurde zusätzlich eine indirekte Gendiagnostik durchgeführt. Die betroffenen Kinder erwiesen sich als homozygot für drei Polymorphismen (IVS5-14delTT, IVS16+38A>C und IVS40+103C>T), für welche der Vater wiederum heterozygot ist. Damit ist die Segregation des väterlichen Mutationsallels zum Foeten gezeigt. Leider erwiesen sich weder die drei genannten Polymorphismen als auch sechs weitere [1222A>G (V374V), 1509C>T (N503N), 2141A>C (P714L), 4098T>G (L1366L), 4453G>A und 4478A>G] hinsichtlich des maternalen Allels als informativ. Für alle diese Marker waren Mutter und Foetus homozygot. Diese Ergebnisse weisen auf eine hohe Homogenität der beiden mütterlichen Allele hin. Jedoch widerspricht dies nicht der angenommenen Heterozygotie des Foetus, da die Mutter ja nicht erkrankt ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse für Heterozygotie des Foeten für die FANCD-2-Mutation mit Skipping von FANCD-2-Exon 22 (r.1948_2021del74) sprechen. Eine Restunsicherheit der genetischen Analyse verbleibt, weil für die indirekte Gendiagnostik kein informativer mütterlicher Polymorphismus gefunden werden konnte. Diese Unsicherheit wurde jedoch, alle Ergebnisse gemeinsam betrachtet, als

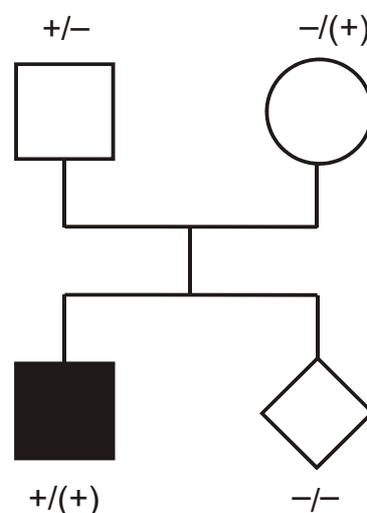
gering eingestuft. Dennoch werden zur Zeit weitere genomische DNA-Abschnitte sequenziert, deren Befunden noch nicht vorliegen.

3.3.5 Kategorie III, Familie 5

Das erste Kind der Familie L. hat Fanconi-Anämie und gehört zur Komplementationsgruppe A. Es fand sich als erste Mutation im FANCA-Gen eine Deletion von zwei Basenpaaren in Exon 2 an cDNA-Position 154-155 (154-155 delGA). Diese Deletion stellt eine sichere Mutation dar, denn sie führt zu einem Frameshift und zur prämaturnen Termination des resultierenden Peptids, womit sie als eine trunkierende Mutation klassifiziert werden konnte. Das betroffene erste Kind zeigte sich heterozygot für diese Mutation, welche auch beim Vater nachgewiesen werden konnte. Das betroffene Kind muss daher noch eine zweite Mutation im FANCA-Gen tragen, welche bisher jedoch nicht gefunden wurde.

In der aktuellen 2. Schwangerschaft von Frau L. wurden Amnionzellen auf die bekannte Mutation hin untersucht. Sie konnte nicht nachgewiesen werden, so dass das Ergebnis dagegen sprach, dass der Foetus von FA betroffen sein würde. Die Ergebnisse der Mutationsanalysen sind in der folgenden Abbildung 3.49 wiedergegeben.

FANCA Exon 2 154-155delGA



(+)= unbekannte Mutation

Weiterhin wurde das Proliferationsverhalten von Amnionzellen untersucht. Die Zellen verhielten sich in ihrem Wachstum mit und ohne MMC wie solche von Kontrollpersonen, d. h. es fand sich lediglich eine geringfügige Wachstumsreduktion bei 2 ng/ml MMC und keine Hypersensitivität wie bei FA. Auch ergab sich keine überproportionale Wachstumsverbesserung der Zellen bei erniedrigter O₂-

Konzentration (Abbildung 3.50). Somit standen die Ergebnisse im Widerspruch zur Diagnose Fanconi-Anämie.

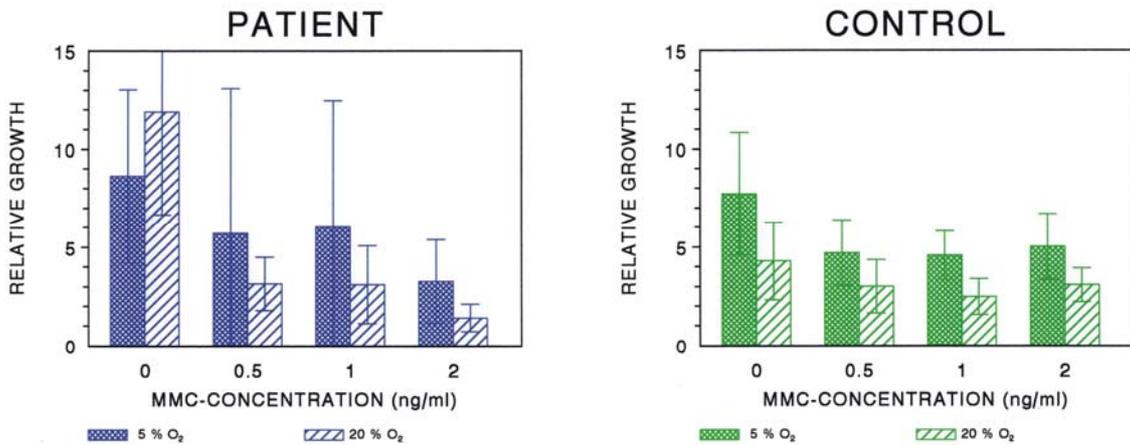


Abbildung 3.50

3.3.6a Kategorie III, Familie 6, zweites Kind:

Ein Kind der Familie A. ist an FA erkrankt. In der zweiten Schwangerschaft von Frau A. wurden auswärts Amnionzellen auf abnorme Brüchigkeit untersucht. Die Bruchrate lag im unteren Bereich der FA-positiven Befunde, wobei die Zahl der auswertbaren Mitosen zu gering war, um eine sichere Beurteilung zu ermöglichen. Daher wurde außerdem am hiesigen Institut Durchflußzytometrie an Amnionzellen durchgeführt, wobei sich der Foet als FA-positiv herausstellte. Die Abbildung 3.51 zeigt Messungen der Amnionzellen ohne und mit Zusatz von MMC (30 ng/ml). Bei den unbehandelten Zellen fand sich bereits ein G2-Phasenanteil von 28,8%, bei den behandelten betrug er 56,8%. Dieser hohe Ausgangswert sowie der überproportionale Anstieg sind charakteristisch für FA-positive Zellen.

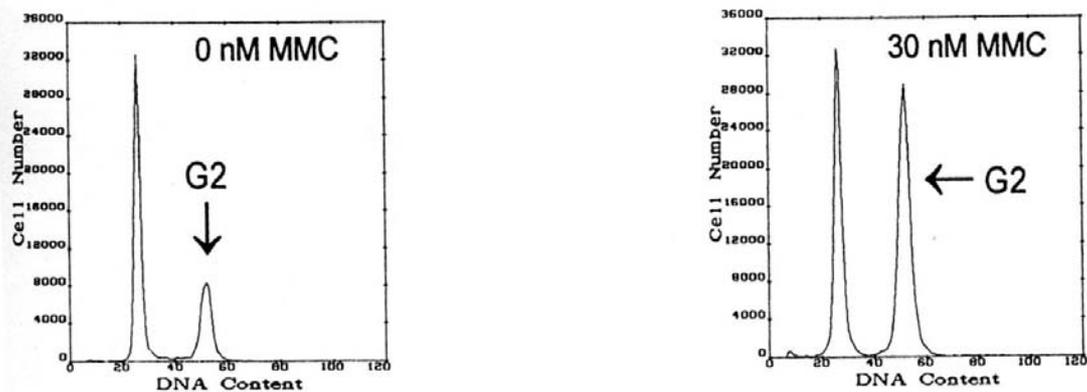


Abbildung 3.51

Als nächstes wurden die Amnionzellen der Komplementationsgruppe G zugeordnet, und zwar wurde nach Transduktion von cDNA des FANCG-Gens die G2-Phasen-Akkumulation der Zellen nach MMC-Behandlung im Durchflußzytometer gemessen. Wie zu erwarten zeigten die Zellen aus diesen Kulturen keine erhöhte G2-Phasenfraktion, im Gegensatz zu Zellen aus Kulturen, welche mit cDNA der anderen FANC-Gene transduziert worden waren. Damit war die Zuordnung zur Komplementationsgruppe G erfolgt. Zur Kontrolle des Transduktionserfolgs wurde zusätzlich zum FANCG-Gen EGFP-kodierende DNA, unter demselben Promotor wie das FANCG-Gen, in die Zellen eines Test-Ansatzes eingebracht. Nur solche Zellen, die das EGFP-Gen aufgenommen hatten, konnten auch das resultierende Protein GFP exprimieren und in der Durchflußzytometrie ein entsprechendes Signal hervorrufen. Es kann davon ausgegangen werden, dass das FANCG-Gen stets mit exprimiert wurde. Das Ergebnis der Komplementationsanalyse ist in Abbildung 3.52 dargestellt.

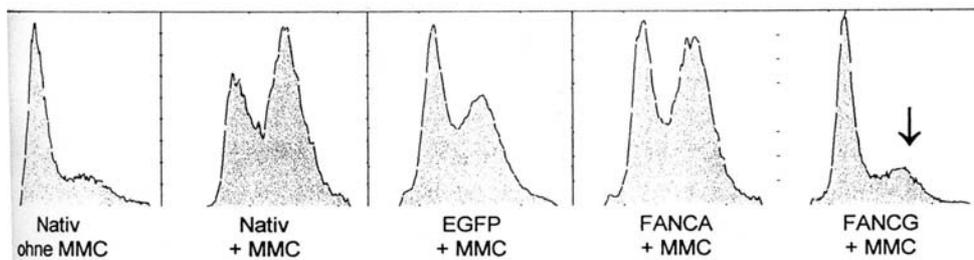


Abbildung 3.52

Zur Diagnosesicherung auf molekularer Ebene wurde ferner der Mutationsnachweis in der Familie A. geführt. Aus Lymphozyten des ersten, erkrankten Kindes wurde genomische DNA isoliert. In dieser wurden alle 14 Exons des FANCG-Gens sequenziert. Dabei fand sich eine 1-Basenpaar-Deletion im Exon 13, 1649delC. Diese Veränderung lag in homozygotem Zustand vor wie erwartet bei Blutsverwandtschaft der Eltern. Die Veränderung 1649delC führt zur Leserasterverschiebung bei der Translation und damit zu einem funktionsunfähigen und instabilen FANCG-Protein. Sie stellt damit eine sichere Mutation dar und wurde als solche auch bei anderen Patienten türkischer Abstammung beschrieben (Demuth et al, Eur J Hum Genet 8:861-868, 2000). Nach Kenntnis der FANCG-Mutationen in der Familie A. wurde der Foetus untersucht. Dazu wurde Amnionzell-DNA genomisch sequenziert, wobei die Mutation 1649delC in homozygotem Zustand nachweisbar war. Das Ergebnis der Mutationsanalyse findet sich im Stammbaum der Abbildung

3.56. Es bestätigte die Diagnose und FA-Komplementationsgruppenzuordnung des Foetus zur Gruppe G auf molekularer Ebene.

Nach Schwangerschaftsunterbrechung erfolgte eine nochmalige Bestätigung des pränatalen Befundes aus Herzblut des Foeten. Die Lymphozyten wurden durchflußzytometrisch vermessen. Hierbei zeigte sich eine verminderte Stimulierbarkeit durch PHA, ein stark erhöhter Zellzerfall aus der G0/G1 Phase, sowie eine spontane Zellzyklusblockierung in der G2-Phase mit nur zwei bis drei Zellzyklen und einer erhöhten $\Sigma G2/GF$. Abbildung 3.53 zeigt die Ergebnisse der Messungen ohne und mit MMC-Zusatz (50 ng/ml). Bereits ohne MMC (Abb. li.) lag die $\Sigma G2/GF$ mit 0,405 im Bereich derer von Patienten mit FA; nach Behandlung mit MMC (Abb. re.) stieg sie auf 0,664 an. Der G2-Phasenanteil der Zellen lag ohne MMC bei 18,9%, nach MMC-Zusatz stieg er auf 34,2% an. Damit konnte die Diagnose FA im Blut des Foeten bestätigt werden.

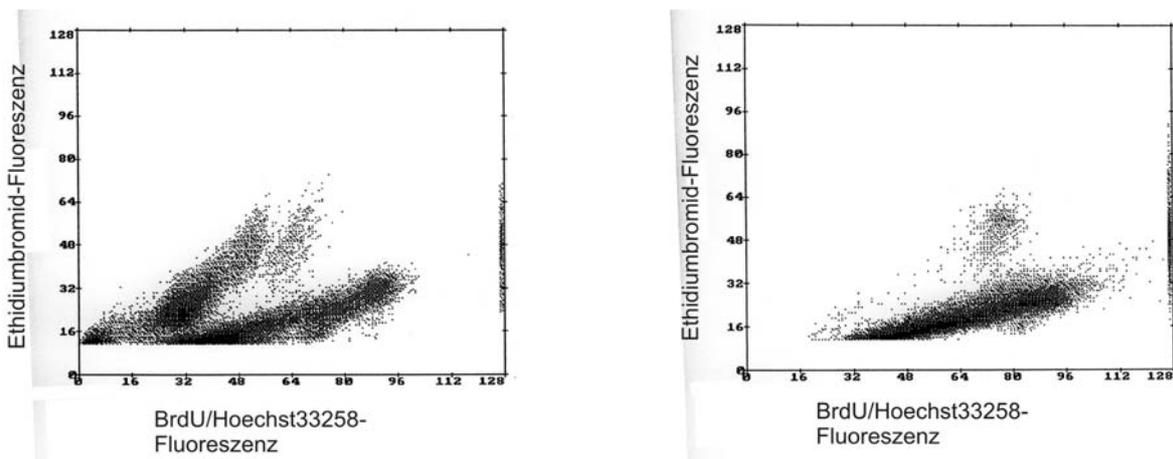


Abbildung 3.53

3.3.6b Kategorie III, Familie 6, drittes Kind:

In der folgenden Schwangerschaft von Frau A. wurde genomische DNA aus Chorionzotten sequenziert. Im Exon 13 des FANCG-Gens erwies sich die foetale DNA als heteroallelisch an FANCG-Position 1649. Neben der Mutation 1649delC war in annähernd gleicher Menge auch die Wildtyp-Sequenz nachweisbar. Aufgrund dieses Ergebnisses war der Foetus als heterozygot für die Mutation 1649delC anzusehen und daher nicht von Fanconi-Anämie betroffen. Dieses Ergebnis ist im Stammbaum der Abbildung 3.56 zu finden.

Postnatal wurden Blutlymphozyten des Kindes durchflußzytometrisch untersucht. Die Ergebnisse der pränatalen Analysen konnten bestätigt werden, da die Zellen auch bei dieser Untersuchung keinerlei Auffälligkeiten aufwiesen. Abbildung 3.54 zeigt die Messungen ohne und mit Zusatz von MMC (50 ng/ml). Eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in den G2-Phasen war ohne MMC (Abb. li.) nicht zu beobachten (3,8 % der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus). Ebenso war die $\Sigma G2/GF$ mit 0,160 gegenüber Negativkontrollen nicht erhöht. Mit MMC (Abb. re.) betrug die $\Sigma G2/GF$ 0,359 und der G2-Phasenanteil 13,8%. Diese Werte liegen im Bereich derer von Negativkontrollen.

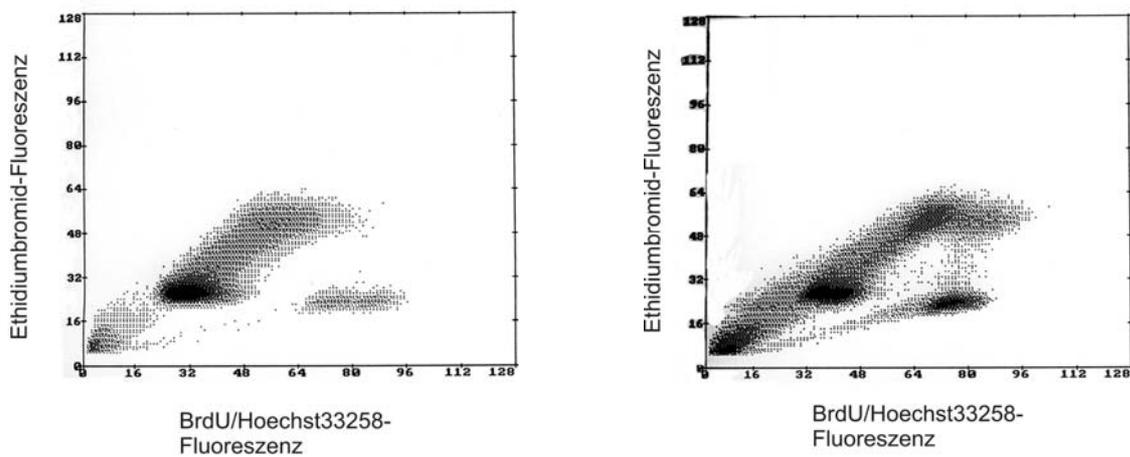


Abbildung 3.54

3.3.6c Kategorie III, Familie 6, viertes Kind:

Die vierte Schwangerschaft von Frau A. endete mit intrauterinem Fruchttod. Das Abortmaterial wurde molekulargenetisch untersucht mit der Fragestellung, ob der Foet an FA erkrankt war. Die direkte Gendiagnostik im Hinblick auf die Deletion in Exon 13 ergab einen positiven Befund, d. h. der Foet erwies sich als homozygot für die Mutation. Somit war er von FA betroffen. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 3.55 dargestellt.

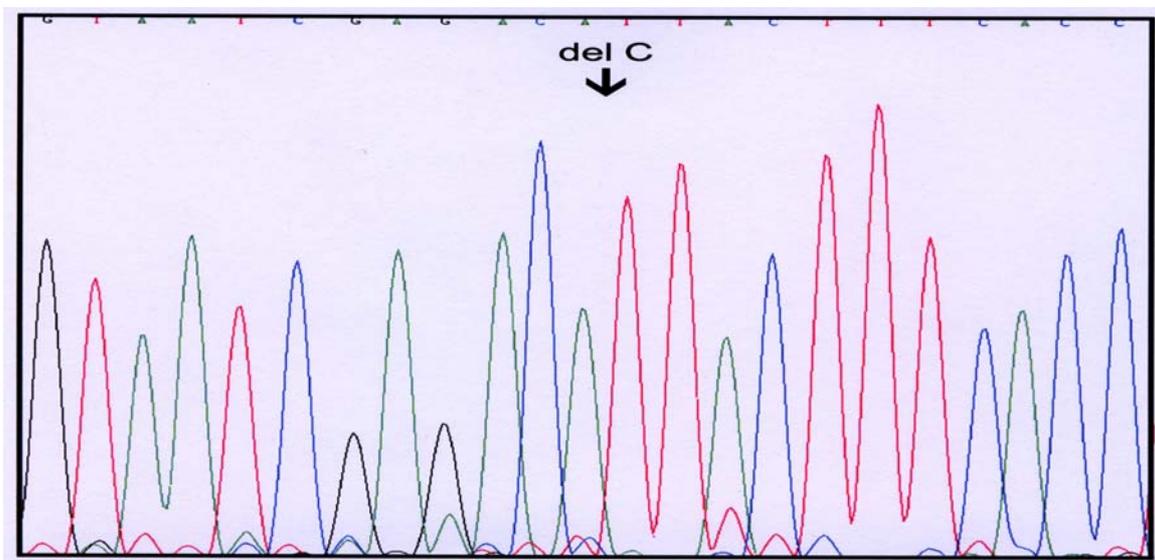


Abbildung 3.55

Die Abbildung 3.56 fasst in einem Stammbaum sämtliche Ergebnisse der direkten pränatalen Gendiagnostik der Familie A. in multiplen Schwangerschaften zusammen. Neben dem ersten Kind mit FA gibt es nun ein weiteres lebendes Kind, welches nicht betroffen ist, da es sich pränatal als heterozygot für die Deletion in Exon 13 erwies. Die Foeten der beiden anderen Schwangerschaften waren von FA betroffen.

FANCG Exon 13 1649delC

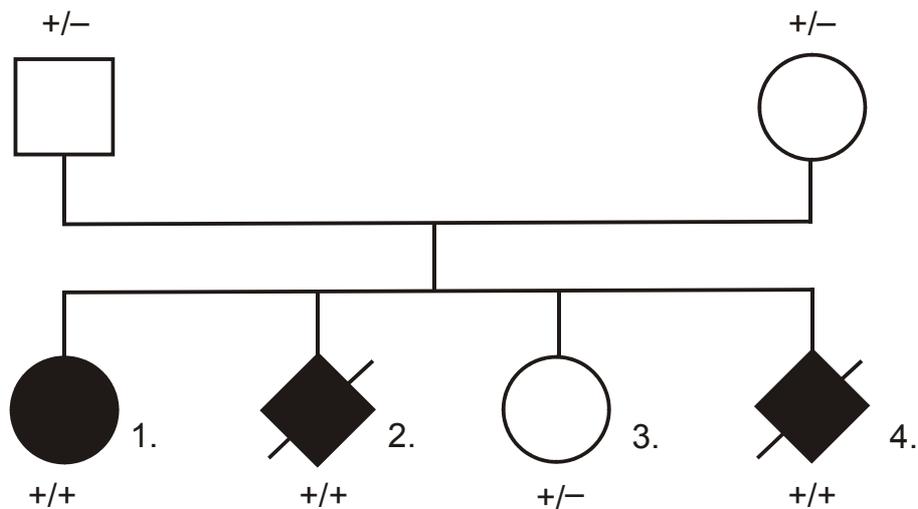


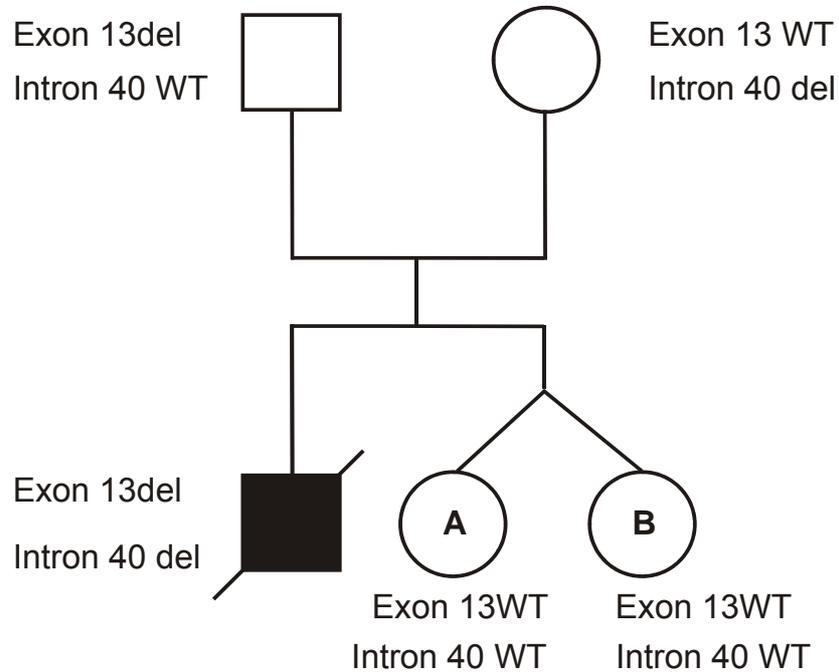
Abbildung 3.56

3.3.7 Kategorie III, Familie 7:

Das erste Kind der Familie V. hatte FA und ist bereits verstorben. Eine Komplementationsgruppenzuordnung war bislang nicht erfolgt. Für die 2. Schwangerschaft (Zwillingschwangerschaft mit zweieiigen Zwillingen) erbaten die Eltern pränatale Diagnostik. In diesem Rahmen erfolgte sowohl die Bestimmung der Komplementationsgruppe des betroffenen Kindes als auch die Mutationsanalyse: Es wurden von der Patienten-DNA alle 43 Exons des FANCA-Gens sequenziert und dabei folgende sicher pathogene Mutationen gefunden: eine Frameshift-Mutation 1164-1165del, d.h. eine 2-bp-Deletion in Exon 13, sowie eine Spleißstellen-Mutation 4010delG+18, d.h. eine 18-bp-Deletion des Splice-Donors in Intron 40. Letztere führt auf RNA/cDNA-Ebene zum Skipping von Exon 40. Der Patient war also compound heterozygot für diese beiden Mutationen. Als nächstes erfolgte die Untersuchung der Eltern-DNA. Beim Vater konnte die 2-bp-Deletion in Exon 13 gefunden werden, was beweist, dass das verstorbene Kind diese vom Vater geerbt hat. Die Intron-40-Deletion hingegen war beim Vater nicht nachweisbar, jedoch bei der Mutter. Also hatte das betroffene erste Kind diese Mutation von der Mutter geerbt. Die 2-bp-Deletion in Exon 13 konnte wiederum bei der Mutter nicht gefunden werden. In der Chorionzotten-DNA von Zwilling A war keine der beiden Mutationen nachweisbar, ebensowenig in der DNA von Zwilling B. Beide ungeborene Kinder erwiesen sich damit als homozygot für den Wildtyp des FANCA-Gens. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind dem Stammbaum in Abbildung 3.57 zu entnehmen.

FANCA

Exon 13 1164-1165del und Intron 40 4010delG+18



WT = Wildtyp

Abbildung 3.57

Um auszuschließen, dass bei den zweieiigen Zwillingen versehentlich zweimal dasselbe Chorion punktiert wurde, wurden zusätzlich insgesamt sieben polymorphe DNA-Marker untersucht. Hierbei wurden sowohl autosomale als auch x-chromosomale Marker herangezogen (s. Abbildung 3.58). Die Zwillinge unterschieden sich in sechs der sieben Marker, so dass eine Fehlpunktion ausgeschlossen werden konnte. Somit ergab sich, dass Frau V. zweieiige Zwillinge (beides Mädchen), beide ohne jede der beiden elterlichen FANCA-Mutationen und damit nicht von FA betroffen, erwartete. Die Ergebnisse der Markeruntersuchungen sind in Abbildung 3.58 dargestellt.

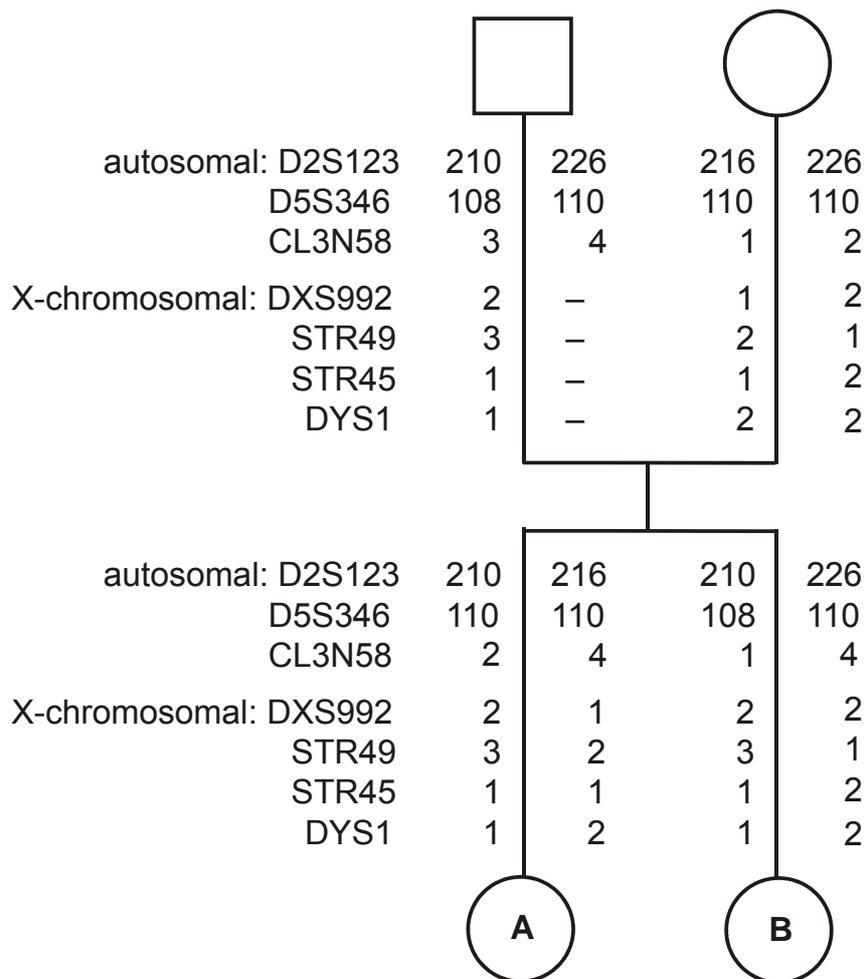


Abbildung 3.58

3.3.8 Kategorie III, Familie 8:

Familie I. hat bereits ein Kind mit FA, welches der Komplementationsgruppe FANCC angehört. Für den Foetus der zweiten Schwangerschaft wünschten die Eltern pränatale Diagnostik. Hierfür wurde an genomischer DNA aus Knochenmarkszellen des erkrankten ersten Kindes mit Hilfe von Exon Scanning Sequencing eine Mutationsanalyse im gesamten FANCC-Gen durchgeführt. Dabei fand sich in homozygoter Form die Mutation 454_455delAA in Exon 4, welche zu einer Leserasterverschiebung und prämaturer Termination der Translation sieben Kodons dahinter führt; die Konsequenz der Mutation ist V152fsX159. Es handelt sich um eine sichere Mutation, die bereits zuvor bei einem türkischen Patienten gefunden wurde. Nun konnte DNA aus Chorionzottenzellen des Foeten analysiert werden. Auch hier fand sich die oben beschriebene 2-bp-Deletion in Exon 4 des FANCC-Gens,

ebenfalls in homozygoter Form wie bei dem erkrankten ersten Kind. Damit musste der Foetus auch als betroffen angesehen werden. Beide Elternteile erwiesen sich als heterozygote Träger der genannten Mutation. Die Ergebnisse der direkten Gendiagnostik sind der Abbildung 3.59 zu entnehmen. Dabei ist im oberen Teil die Sequenz des ersten erkrankten Kindes dargestellt, während die des Foeten im unteren Teil zu sehen ist. In beiden Fällen findet sich die Deletion in homozygoter Form.

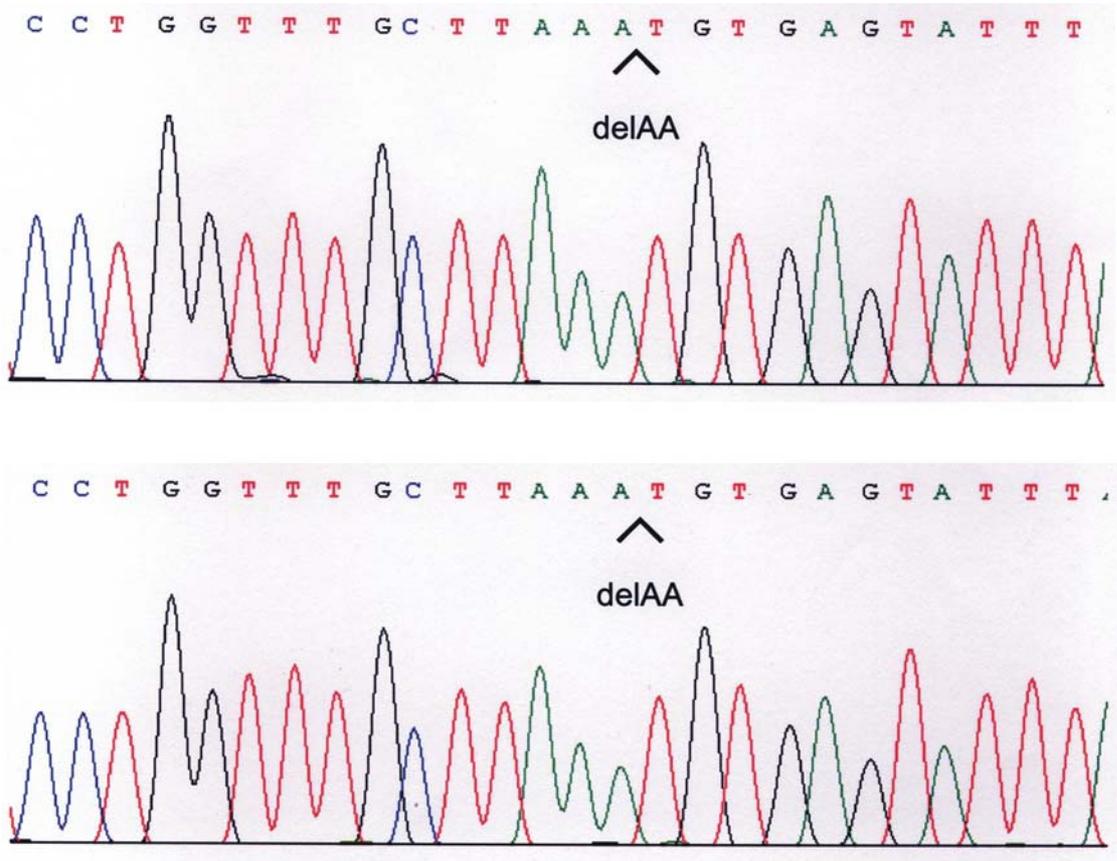


Abbildung 3.59

4. DISKUSSION

4.1 Historische Entwicklung der Pränataldiagnostik bei Fanconi-Anämie

Die erste pränatale Diagnostik an Amnionzellen wurde 1981 von Auerbach et al beschrieben. Dabei wurden sowohl Blutlymphozyten als auch Amnionzellen mit Diepoxybutan (DEB) behandelt und jeweils im Vergleich mit den unbehandelten Zellen sowie Negativkontrollen auf Chromosomenbrüchigkeit hin untersucht. Die deutlich erhöhte Bruchrate der Zellen von Betroffenen ermöglichte eine Unterscheidung zwischen Homozygoten und Heterozygoten sowie Gesunden. In einem Fall (Voss et al, 1981) konnte die Diagnose postnatal durch anatomische Auffälligkeiten und zytogenetische Befunde bestätigt werden. Auerbach et al untersuchten in der Folge 30 Foeten aus Risikoschwangerschaften anhand von Amnionzellen (Auerbach et al, 1985). Hierbei wurden die pränatal gestellten Diagnosen, wenn möglich, postnatal durch Chromosomenbruchanalyse oder morphologische Untersuchungen verifiziert. Es ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen prä- und postnatalen Befunden. Das Verfahren der Chromosomenbruchanalyse wurde auch für foetale Blutzellen etabliert (Shipley et al, 1984). Als Klastogen wurde dabei Mitomycin C (MMC) eingesetzt. Blutkulturen von FA-Heterozygoten und Gesunden wurden mit denen eines mutmaßlich betroffenen Foetus verglichen, wobei im Fall des Indexfoeten eine hohe spontane als auch durch MMC-induzierbare Brüchigkeit bestand. Dalapiccola et al beschrieben im Jahre 1985 die erste pränatale FA-Diagnostik an Chorionzotten-Material (Dallapiccola et al, 1985). Dabei wurden Trophoblastenzellen präpariert und untersucht. Die erste pränatale Diagnose in Südafrika wurde anhand von Fruchtwasserzelluntersuchungen mit DEB gestellt, wobei der Foetus als homozygot betroffen diagnostiziert werden musste (Marx et al, 1982). Nach Beendigung der Schwangerschaft konnte dieses Ergebnis durch anatomische Auffälligkeiten und eine Untersuchung von Fibroblasten bestätigt werden. Eine französische Arbeitsgruppe beschrieb eine Familie mit drei betroffenen Kindern, von denen zwei für FA-typische Auffälligkeiten zeigten; das dritte Kind wurde pränatal mittels Chromosomenbruchanalyse diagnostiziert und die Diagnose postnatal durch Lymphozytenanalyse bestätigt (Bonnet-Gajdos et al, 1985). In diesem Artikel findet sich bereits der erste Hinweis auf die Bedeutung der

pränatalen Diagnostik für Paare mit erkrankten Kindern ohne passende KM-Spender, die bei weiteren gesunden Kindern eine Knochenmarkspende in Erwägung ziehen könnten. Im Jahre 1993 beschrieben Murer-Orlando et al die erste DNA- und RNA-Analyse von Chorionzottenzellen eines von FA betroffenen Foeten, wobei die zytogenetisch gestellte pränatale Diagnose durch die molekulargenetischen Untersuchungen bestätigt wurde (Murer-Orlando et al, 1993). Es konnten zwei Mutationen im FANCC-Gen durch Mismatch-Analyse identifiziert werden, nachdem die Komplementationsgruppe bekannt war. So bestand nun die Möglichkeit der molekularen Untersuchung bei weiteren Schwangerschaften in dieser Familie. Die Autoren heben hervor, dass in einem solchen Fall die Molekulargenetik den Vorteil hat, dass die Analytik schnell und zuverlässig Ergebnisse bringen kann, während die Chromosomenbruchanalyse an kultivierten Amnionzellen in ihrer Qualität und Aussagekraft variieren kann.

Neben der klassischen Methode der Chromosomenbruchanalyse existiert mit der Durchflußzytometrie ein weiteres schnelles und kostengünstiges Verfahren, welches mit relativ wenigen Zellen auskommt und somit auch für Fälle geeignet ist, in denen Zellen nicht optimal wachsen (Schindler and Hoehn, 1999). Wie die Chromosomenbruchanalyse gehört die durchflußzytometrische Analyse zum Bereich der indirekten, funktionellen Gendiagnostik. Getestet werden die Manifestationen des zugrunde liegenden Gendefektes auf der Ebene der Zellfunktion (Zellzyklus-Progression; MMC-Sensitivität). Zellen mit nicht reparierten DNA-Schäden werden in den S- und G2-Phasen des Zellzyklus arretiert. Die Größe der G2-Phasen-Fractionen reflektiert also den Grad der DNA-Schädigung (Seyschab et al, 1993). In dieser Arbeit wird die pränatale Anwendung der durchflußzytometrischen Funktionsdiagnostik zum Ausschluss oder zur Bestätigung eines Verdachtes auf Fanconi-Anämie erstmals umfassend beschrieben.

4.2 Bewertung der Ergebnisse der funktionellen Pränataldiagnostik

4.2.1 Zweiparametrische Zellzyklusdiagnostik an kultivierten Fruchtwasserzellen

Für die postnatale Diagnostik der FA ist die zweiparametrische Messung Standard, da sie sich im Vergleich mit der einparametrischen als überlegen gezeigt hat.

Einparametrische Messungen sind hier nicht zuverlässig genug. Bei der pränatalen Diagnostik hingegen ist es genau umgekehrt: Die einparametrische Messung bietet in diesem Fall eine deutlich größere Zuverlässigkeit, während die zweiparametrische weit weniger verlässliche Ergebnisse liefert.

Die Abbildung 4.1 zeigt die $\Sigma G2/GF$ Einzelwerte aller 10 ohne vorherige MMC-Behandlung durchgeführten zweiparametrischen FW-Zellmessungen. Sechs der Werte liegen unterhalb, 4 liegen oberhalb der gestrichelt eingezeichneten Trennlinie von 0.3. Diese Trennlinie wurde in entsprechenden Untersuchungen von peripheren Blutzellen als Trennlinie zwischen von FA Betroffenen und von FA nicht betroffenen Individuen ermittelt (Schindler u. Mitarbeiter, 2002). Demnach sollten 4 der untersuchten Kulturen von FA, und 6 der untersuchten Kulturen nicht von FA betroffen sein. Tatsächlich konnte die Diagnose FA nur bei 2 der 10 getesteten Kulturen definitiv etabliert werden (Pfeile in Abbildung 4.1). Darüber hinaus liegen die $\Sigma G2/GF$ Werte dieser beiden betroffenen Foeten nicht oberhalb, sondern unterhalb der 0.3-Trennlinie. In beiden Fällen handelt es sich also um falsch-negative Werte. Umgekehrt konnte die Diagnose FA bei keiner der 4 Amnionzellkulturen bestätigt werden, deren $\Sigma G2/GF$ Werte sich in der Abbildung 4.1 oberhalb der 0,3-Trennlinie befinden. Die Werte dieser 4 Untersuchungen müssen daher als falsch-positiv eingestuft werden. Das Fazit aus dieser Zusammenstellung ist eindeutig: 6 der 10 getesteten FW-Zellkulturen erwiesen sich als falsch-negativ oder falsch-positiv. In einem Fall (solider Pfeil in Abbildung 4.1) wurde auf Grund des FW-Zellbefundes ein nicht betroffenes Kind vorausgesagt, was sich postnatal jedoch als betroffen herausstellte. Damit erscheint die bivariate durchflußzytometrische FW-Zellanalyse ohne vorherige MMC-Exposition nicht zur pränatalen FA-Diagnostik geeignet. Als Erklärung der falsch-negativen Werte könnte postuliert werden, dass frühe pränatale Zellen noch keine so hohe Schädigungsrate aufweisen wie postnatale Zellen, so dass es nur zu einer geringfügigen und diagnostisch nicht verwertbaren G2-Phasen Akkumulation kommt. Als Ursache für die falsch-positiven Werte kommen BrdU-Toxizität sowie ein hoher endogener Anteil an tetraploiden Zellen in Frage, der eine Blockierung von Zellen in der G2/M Phase vortäuschen kann.

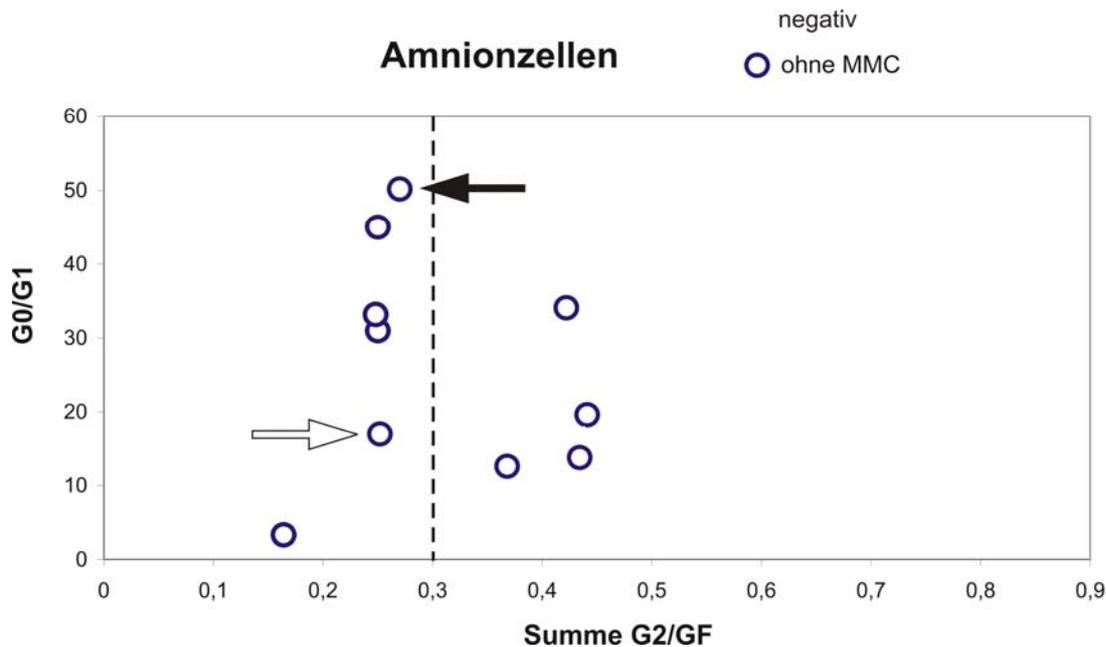


Abbildung 4.1

Auch die vorherige Behandlung mit MMC trägt nicht wesentlich zur Verbesserung der diagnostischen Zuverlässigkeit der durchflußzytometrischen FW-Zellanalyse bei. Die Abbildung 4.2 zeigt alle Werte der Amnionzelluntersuchungen ohne und mit Zusatz von 10 ng/ml MMC. Während der Wert der $\sum G2/GF$ von der FW-Kultur des einen von FA betroffenen Foetus nach MMC-Behandlung erwartungsgemäß stark ansteigt (offene Pfeile), kommt es bei dem anderen betroffenen Foetus nur zu einem sehr geringfügigen Anstieg (solide Pfeile). Die gleiche Variabilität gilt auch für die als nicht von FA betroffen diagnostizierten FW-Zellkulturen, bei denen einige eine starke und andere eine nur geringfügige Zunahme des $\sum G2/GF$ -Wertes zeigen. Im Fall der positiven Diagnose liegt der Nullwert zwar noch im Bereich der Kontrollwerte (unter 0,3); der Wert nach MMC-Zugabe steigt jedoch auf 0,696 deutlich an. Die Werte des Kindes von Familie G. hingegen weisen nicht darauf hin, dass eine FA vorliegen könnte ($\sum G2/GF$ nach MMC-Zusatz 0,328).

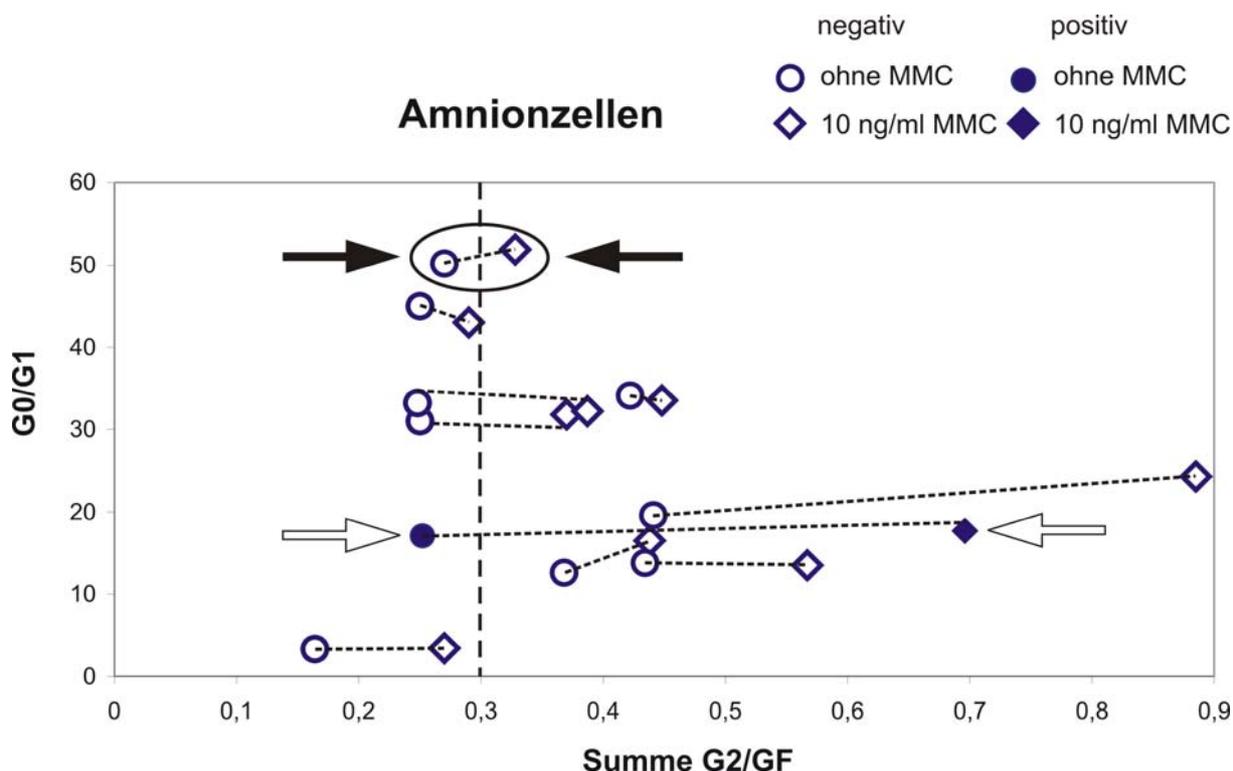


Abbildung 4.2

4.2.2 Einparametrische Zellzyklusdiagnostik an kultivierten Fruchtwasserzellen

Im Gegensatz zu den zweiparametrischen Zellzyklusanalysen ist die diagnostische Wertigkeit der in dieser Serie durchgeführten einparametrischen durchflußzytometrischen Analysen durchweg höher anzusetzen. Von den insgesamt 11 durchgeführten einparametrischen Zellzyklusanalysen erwies sich keine einzige als falsch-negativ. Nur in einem Fall zeigte sich eine erhöhte MMC-Sensitivität bei einem niedrigen Ausgangswert der einparametrischen Messung (Familie 1; B. aus der Kategorie I). In diesem Fall wurde nach MMC-Exposition eine erhöhte G2-Phasenfraktion gefunden. Im entsprechenden eindimensionalen DNA-Histogramm sprach jedoch die niedrige S-Phase dafür, dass die G2-Phasen Akkumulation eher durch tetraploide Zellen bedingt wurde. In zwei Fällen ergaben sich Hinweise auf eine stark erhöhte MMC-Sensitivität. Beide Fälle konnten als FA-positiv bestätigt werden (Familie 3 aus Kategorie II und Familie 6 aus Kategorie III). Der G2-Phasenwert ohne MMC-Zusatz des Foeten von Familie II/3 liegt zwar im Bereich der Werte von FA-negativen Personen und würde daher für sich genommen nicht auf die Diagnose hinweisen. Der Wert nach MMC-Zusatz jedoch liegt deutlich im Bereich

derer von FA-Patienten. Im Falle des Foeten von Familie III/6 liegen beide Werte eindeutig im positiven Bereich. Der hohe Prozentsatz von Zellen in der G2-Phase bereits ohne MMC-Behandlung sowie der starke Anstieg nach MMC-Zusatz sind hier besonders deutlich. Die im Vergleich weniger zuverlässigen Ergebnisse der zweiparametrischen Messungen sind möglicherweise durch die BrdU-Sensitivität der Fruchtwasserzellen zu erklären. Die Ergebnisse der einparametrischen Messungen sind in der Grafik von Abbildung 4.3 dargestellt.

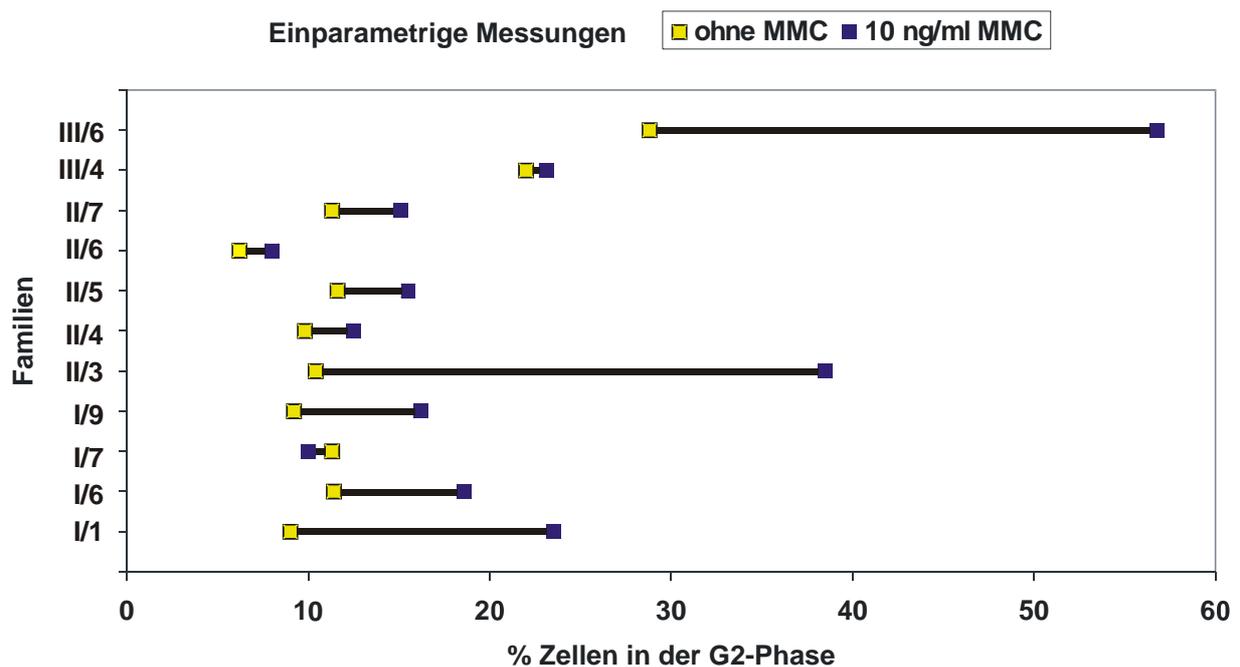


Abbildung 4.3

4.2.3 Zellzyklusdiagnostik an Nabelschnurblut

Wegen der offensichtlichen Limitationen der FW-Zelluntersuchungen wurde, wo immer möglich, eine zusätzliche Untersuchung von Nabelschnurblut durchgeführt. Die Nullwerte der Nabelschnurblutzellanalyse der entsprechend getesteten Familien sind in der Abbildung 4.4 zu finden. Es fällt nur ein Wert als positiv auf, und zwar ist dies der des zweiten Kindes von Familie C. (Kat. II, Fam. 1, Kind 2). Alle anderen Werte liegen im Bereich der Negativkontrollen. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Wachstumsanalysen der Amnionzellen (im Fall des zweiten Kindes der Familie C.), einparametrischen Messungen, postnatalen Befunden bzw. Mutationsanalysen oder Chromosomenbruchanalysen. Die diagnostische Wertigkeit

der durchflußzytometrische Analytik von Nabelschnurblutzellen ist also sehr viel höher anzusetzen als die entsprechende Analytik der kultivierten FW-Zellen.

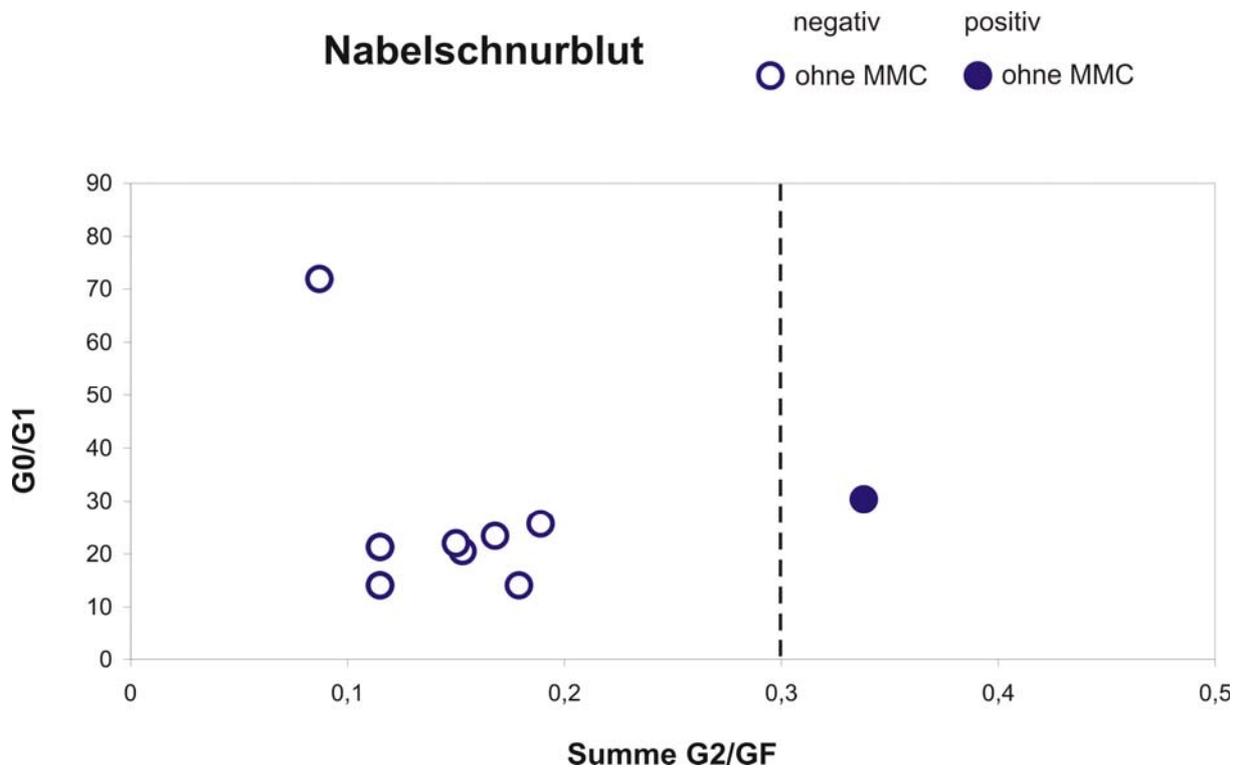


Abbildung 4.4

Der zusätzliche Einsatz von MMC bestätigt die diagnostische Aussagekraft der NS-Blutzellanalyse (vgl. Abb. 4.5). Es fällt wiederum nur der Wert des zweiten Kindes von Familie C. (Kat. 2, Fam. 1, Kind 2) als FA-positiv auf. In den positiven Bereich fallen zwei weitere Werte der $\Sigma G2/GF$, jedoch nur nach Zusatz von 50 ng/ml MMC. Bei keinem dieser beiden Foeten bestätigte sich die Diagnose FA. Die Behandlung der NS-Blutzellen mit MMC scheint daher die diagnostische Wertigkeit der Untersuchung nicht wesentlich zu erhöhen.

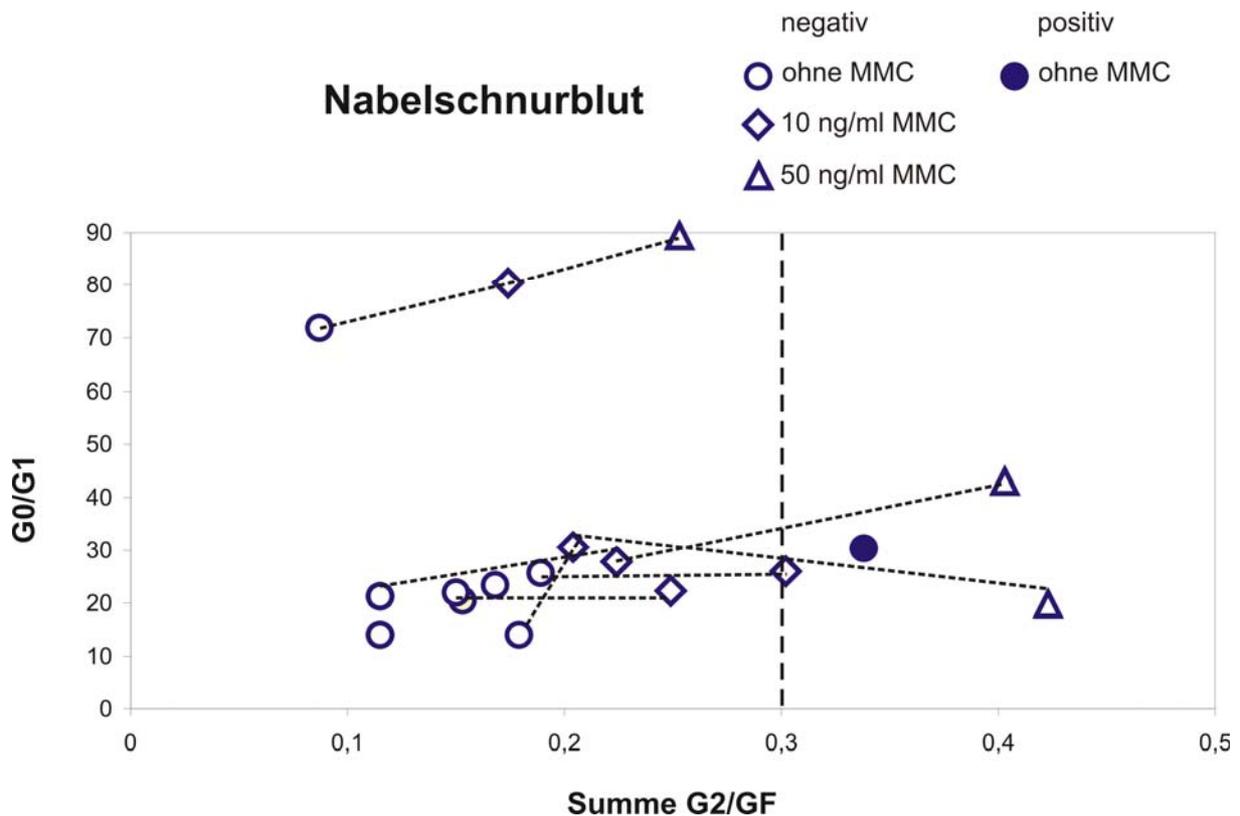


Abbildung 4.5

4.2.4 Bestimmung der MMC-Sensitivität des FW-Zellwachstums als Alternative zur Zellzyklusmessung

Am Beispiel der Familie 1 aus Kategorie II kann gezeigt werden, dass die einfache Wachstumsanalyse der Amnionzellen mit und ohne MMC, wie sie hier beim dritten Kind erfolgte, zuverlässigere Ergebnisse erbringen kann als die Zellzyklusanalyse derselben Zellart, wie sie beim zweiten Kind durchgeführt wurde (s. Ergebnisteil). Beim zweiten Kind hätte die Zellzyklusanalyse, ohne die zusätzliche Kontrolluntersuchung von Nabelschnurblutzellen, zur Diagnose FA geführt, obwohl sich der Foetus als nicht betroffen herausstellte. Im Falle des dritten Kindes konnte die Diagnose anhand der Wachstumsuntersuchung ebenso eindeutig gestellt und wiederum durch Nabelschnurblutzellanalyse bestätigt werden. Auch das zweite Beispiel der Bestimmung der MMC-Sensitivität der FW-Zellen auf dem einfachen Weg der Zellwachstumsanalyse (Kategorie III, Familie 5) erbrachte ein zuverlässiges Ergebnis. Die technisch sehr einfache Methode der Messung des Zellwachstums mit

und ohne MMC sollte daher als Alternative zur Zellzyklusmessung bei der pränatalen Diagnostik der Fanconi-Anämie bevorzugt zum Einsatz kommen.

4.3 Erkenntnisse aus den Ergebnissen der funktionellen Zelldiagnostik in Familien der Kategorien I und II

4.3.1. Die hier ausgewerteten Daten zeigen, dass die a priori Wahrscheinlichkeit einer FA-Diagnose in Kategorie I relativ gering ist. In 9 von 9 Fällen mit der alleinigen (sonographischen) Indikation „Radialstrahlaplasie“, die in dieser Arbeit beschrieben werden, konnte eine FA definitiv ausgeschlossen werden. Die Methode der Durchflußzytometrie kann daher zum klinischen Einsatz bei der differentialdiagnostischen Abklärung von auffälligen Ultraschallbefunden (im Sinne von Radialstrahldefekten) empfohlen werden. Wenn FA auf diese Weise relativ einfach und schnell ausgeschlossen werden kann, bringt dies den Eltern den Vorteil, die Gewissheit zu haben, dass ihr Kind zumindest nicht an dieser lebensbedrohlichen Erkrankung leidet.

4.3.2 Die Zellzyklusdiagnostik an kultivierten Fruchtwasserzellen ist hinsichtlich der zweiparametrischen Messungen teilweise problematisch: Bereits ohne Behandlung mit MMC zeigen sich in vielen Fällen erhöhte G2-Phasen Anteile, welche durch die Anwesenheit tetraploider Zellen in FW-Zellkulturen bedingt sind und zur falsch-positiven Bewertung des Messergebnisses beitragen. Umgekehrt beruhte die einzige Fehldiagnose in den hier vorgestellten Familien auf einer falsch-negativen FW-Zell Messung, bei der die G2-Phasen-Zellakkumulation im Normalbereich lag. Es ist daher denkbar, dass FW-Zellen von betroffenen Foeten aus frühen Stadien der Schwangerschaft noch keine so hohen DNS-Schädigungsraten (und damit Erhöhungen der G2-Phasenfraktionen) aufweisen wie postnatale Zellen. Generell liefern einparametrische Messungen im Vergleich zu den zweiparametrischen meist bessere Ergebnisse.

4.3.3 Da die durchflußzytometrische Diagnosestellung an Fruchtwasserzellen nicht in allen Fällen eindeutige Ergebnisse erbringt, sollte zusätzlich die MMC-Sensitivität der FW-Zellen mit Hilfe eines einfachen Zellwachstumstests durchgeführt werden.

Darüber hinaus ist eine Bestätigung der FW-Zellanalytik durch Untersuchung von Nabelschnurblutzellen erforderlich.

4.3.4 Ein prinzipielles Problem der pränatalen Diagnostik zeigte sich bei den Familien der Kategorie 1: In zwei Fällen wurde die Schwangerschaft abgebrochen, ohne die Diagnose abzuwarten. Die Foeten waren jedoch jeweils mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht von FA betroffen, so dass eine Abruption im Nachhinein nicht indiziert war. Die Angst vor einer Erkrankung ist hier offenbar so groß, dass die Diagnose nicht abgewartet wird, selbst wenn hiermit ein Schwangerschaftsabbruch vermieden werden könnte. Diese Beispiele zeigen, dass eine pränatale Diagnostik in Familien mit Fanconi-Anämie nur in Verbindung mit einer vorherigen genetischen Beratung durchgeführt werden sollte.

4.4 Erkenntnisse aus den Ergebnissen der molekulargenetischen Diagnostik in Familien der Kategorie III

4.4.1 Die direkte und indirekte Gendiagnostik hat den Vorteil, dass sie an DNA einer Chorionzottenbiopsie bereits zwischen der 10 und 12. Woche der Schwangerschaft durchgeführt werden kann. Sie ist jedoch zeitaufwendig und kostenintensiv. Wie die indirekte Gendiagnostik im Fall der Familie G. zeigt, können Polymorphismen hinsichtlich der Frage der Zuordnung zu bestimmten Allelen teilweise nicht informativ sein. Wenn, wie hier, z. B. Mutter und Foetus für alle Polymorphismen homozygot sind und die beiden mütterlichen Allele eine hohe Homogenität aufweisen (was in konsanguinen Familien der Fall sein kann), ist es unmöglich zu sagen, welches Allel dem Foetus vererbt wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass derartige Schwierigkeiten bei der indirekten Gendiagnostik eine Restunsicherheit bergen, welche jedoch durch die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen verringert werden kann. Der Aufwand hierfür ist allerdings beträchtlich.

4.4.2 Bei der direkten Gendiagnostik kann insbesondere im Falle des FAND2-Gens die Existenz von Pseudogenen bei der Amplifikation von DNA-Abschnitten mit der putativen Mutation dazu führen, dass die relevante Mutation nicht amplifiziert wird, sondern stattdessen Abschnitte des Pseudogens. Die diagnostische Sicherheit ist in diesen Fällen eingeschränkt. Eine weitere Schwierigkeit stellen mögliche

Spleißmutationen dar: Im Fall der Familie G. hätte die homozygote DNA-Veränderung der betroffenen Kinder für sich allein betrachtet theoretisch auch lediglich Ausdruck alternativen Spleissens sein können. Da sie jedoch bei den Eltern heterozygot vorliegt und darüber hinaus bei anderen türkischen Patienten gefunden wurde, ist es wahrscheinlich, dass es sich um eine echte Spleiß-Mutation handelt. Durch Vergleiche der Patienten-DNA mit jener der Eltern sowie durch Suche nach anderen Patienten mit derselben Mutation kann also auf eine relevante Mutation geschlossen werden. Im engen zeitlichen Rahmen einer pränatalen Diagnostik wird es vor allem bei großen und komplizierten Genen wie FANCA oder FANCD2 nicht immer gelingen, die krankheitsverursachenden Mutationen bei Eltern und Foetus zu diagnostizieren. Die bisherigen Erfahrungen mit dieser Art von Diagnostik zeigen sehr eindrücklich, dass die krankheitsverursachenden Mutationen bereits vor Beginn der pränatalen Diagnostik identifiziert und bekannt sein sollten. Bei vorheriger Kenntnis der Komplementationsgruppe und der beiden Defektallele ist die Mutationsanalyse in der DNA von Chorionzotten oder FW-Zellen zweifellos die Methode der Wahl zur pränatalen Diagnostik der Fanconi-Anämie. FA-Familien mit weiterem Kinderwunsch, welche die Option einer pränatalen Diagnostik in Betracht ziehen, sollten daher veranlasst werden, die Art des betroffenen Gens und die Art der Mutation bei dem bereits betroffenen Kind so bald wie möglich aufklären zu lassen.

4.5. Präimplantationsdiagnostik (PID) als Alternative zur konventionellen PD?

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist eine Heilung der Fanconi-Anämie nicht möglich. Einzig die Knochenmarkstransplantation kann helfen, die hämatologischen Probleme der Patienten zu beheben und Leukämien zu vermeiden; das Risiko für solide Tumoren jedoch kann damit weiterhin nicht verringert werden, da die transplantierten Zellen nur jene im Knochenmark ersetzen, nicht jedoch z. B. die Epithelzellen der Haut. Mit der pränatalen Diagnostik bietet sich betroffenen Familien die Möglichkeit, bei weiteren Schwangerschaften relativ frühzeitig über eine Erkrankung informiert zu werden bzw. FA ausschließen zu können und je nach Entscheidung eventuell den weiteren Verlauf der Schwangerschaft zu beeinflussen.

Bei sonographischem Verdacht können daher die funktionellen Methoden und die Gendiagnostik je nach Ausgangssituation Klarheit bringen. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, ist es jedoch gerade bei im Ultraschall auffälligen Foeten enorm wichtig, ob bereits ein Kind in der Familie sicher mit FA diagnostiziert wurde und daher die teilweise eher unspezifischen Ultraschallauffälligkeiten sehr wahrscheinlich erneut mit FA in Zusammenhang gebracht werden können. Dabei kann neben den häufig beschriebenen Skelettanomalien z. B. auch die erhöhte Nackentransluzenz in Kombination mit einer vergrößerten Cisterna magna, Herzfehlern sowie Dysmorphiezeichen hinweisend sein (Tercanli et al, 2001).

Wenn für das erkrankte Kind kein passender Knochenmarkspender zur Verfügung steht, gibt es seit 2002 bei weiterem Kinderwunsch der Eltern prinzipiell die Möglichkeit zur Präimplantationsdiagnostik (PID). Diese ist jedoch in Deutschland bisher nicht zugelassen. In anderen Ländern allerdings können Paare Embryos nach *In-vitro*-Fertilisation (IVF) bezüglich passender HLA-Merkmale selektionieren lassen. Wenn diese nicht homozygot FA-Mutationsträger sind, kann deren Nabelschnurblut bei der Geburt zur Gewinnung von HLA-identischen hämatopoietischen Stammzellen dienen. Die Stammzellen können dann dem erkrankten Geschwister transfundiert werden, woraufhin sich nach einiger Zeit das in seiner Funktion eingeschränkte Knochenmark des Patienten durch die Vermehrung der gesunden Spenderzellen regeneriert. Die erste erfolgreiche Transplantation dieser Art wurde im Jahre 2004 aus den USA berichtet (Grewal et al, 2004). Dabei bekam ein sechsjähriges an FA erkranktes Mädchen im Jahre 2002 die hämatopoietischen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut eines durch IVF gezeugten und mit PID ausgewählten Geschwisters. Nach Gabe der Stammzellen besserte sich der Zustand des erkrankten Mädchens bis in diesem Jahr dramatisch und nachhaltig durch die sich normalisierende Hämatopoiese. Ein Vorteil der PID besteht darin, dass Paare hierbei im Gegensatz zur pränatalen Diagnostik nicht mit der Entscheidung für oder gegen einen Schwangerschaftsabbruch konfrontiert werden. Nachteile sind jedoch gesundheitliche Risiken für die Frau, der erhebliche, auch finanzielle Aufwand sowie viele ungeklärte ethische Fragen, die sich aus der Tatsache, dass ein Kind nicht spontan gezeugt wird und Eltern bzw. Ärzte teilweise Einfluß auf die Auswahl von Kindern mit dem Vorhandensein bestimmter Merkmale nehmen können, ergeben. Neben der elterlichen Motivation für eine PID sind hierbei auch Aspekte wie die

Frage nach der Selektion weiterer Merkmale neben den HLA-bestimmenden oder die Chancengleichheit hinsichtlich des Zugangs zu diesem Verfahren (finanzieller und damit sozioökonomischer Aspekt) von Belang. Antworten auf diese Fragen können jeweils im Einzelfall unterschiedlich ausfallen, sollten jedoch insgesamt sowohl von Fachleuten als auch innerhalb der Gesellschaft diskutiert werden.

Die zum Teil sehr langwierige und für die Frau psychisch wie physisch belastende Prozedur kann gesundheitliche Risiken bergen, während die Erfolgsrate bisher insgesamt noch unbekannt ist. Da häufig mehrere Versuche nötig sind, schlägt sich der beträchtliche Aufwand auch finanziell nieder. Schließlich stellen sich verschiedene ethische Fragen wie z. B. ob Eltern das weitere Kind als in ihrer Familie erwünscht betrachten, es genauso lieben und so „normal“ behandeln, als wäre es auch spontan gezeugt, oder ob sie es nur in seiner Funktion als Organspender für das kranke Kind sehen und es möglicherweise gar nicht adäquat großziehen möchten oder sogar die Schwangerschaft vorzeitig nach Ernte der hämatopoietischen Stammzellen aus der Leber beenden wollen. Die elterliche Motivation kann also im Einzelfall möglicherweise sehr unterschiedlich sein. Ebenso stellt sich die Frage, ob Eltern dem durch PID selektionierten Kind eine eventuelle Knochenmarkspende mit den damit verbundenen Risiken in den ersten Lebensmonaten zumuten wollen, falls die Nabelschnurblutspende nicht erfolgreich war. Die Interessen des Spender- und die des Empfängerkindes müssen also gegeneinander abgewogen werden, was für Eltern sehr belastend sein kann. Im Zusammenhang mit der in der Literatur beschriebenen erfolgreichen Transplantation hatten weitere betroffene Eltern einige Anfragen gestellt, so z. B. nach der Spende von Ersatzgameten oder nach der Ernte von hämatopoietischen Stammzellen aus der Leber im Fall eines Spontanaborts. Weiterhin kam die Frage nach der Selektion des Geschlechts des zukünftigen Kindes neben der der passenden HLA-Merkmale auf, ebenso wie die nach der Konservierung HLA-passender Embryos für die potentielle zukünftige Nutzung von embryonalen Stammzellen. Aus all diesen Punkten ergeben sich wiederum neue ethische Fragen, welche sowohl von Ärzten und betroffenen Eltern als auch innerhalb von Politik und Gesellschaft diskutiert werden müssen (Höhn und Schroeder-Kurth, 2003).

4.6 Zusammenfassung

Die Zellzyklusanalyse an kultivierten Fruchtwasserzellen zur pränatalen Diagnostik der Fanconi-Anämie ist nicht hinreichend zuverlässig und sollte aufgrund der teilweisen Verfälschung des Ergebnisses durch tetraploide Zellen und unzureichende Mitogenantwort sowie eventuell einen hohen Anteil nichtstimulierbarer Zellen (sog. noncycling fraction) stets mit einer weiteren Untersuchung an Nabelschnurblutzellen bestätigt werden. Durch eine Kombination von Amnionzell- und NS-Blut-Untersuchung mit Hilfe der Durchflußzytometrie kann die Diagnose FA dann in der Mehrzahl der Fälle sicher ausgeschlossen oder bestätigt werden. Diese funktionelle Testung ist insbesondere für das Screening von Niedrig-Risiko-Schwangerschaften geeignet, bei denen eine pränatale Diagnostik auf Grund eines auffälligen Ultraschallbefundes bei sonst leerer Familienanamnese durchgeführt wird. Indirekte und direkte Gendiagnostik setzen die Kenntnis des betroffenen Gens bzw. beider krankheitsverursachender Mutationen voraus. Im engen zeitlichen Fenster der pränatalen Diagnostik können diese nicht immer rechtzeitig bestimmt werden. In den Fällen, in welchen sowohl funktionelle als auch Gendiagnostik durchgeführt wurde, konnte das Ergebnis der funktionellen Diagnostik stets bestätigt werden. Die einzige Fehldiagnose unter den hier vorgestellten Familien beruhte auf der Tatsache, dass in diesem Fall das Ergebnis der Zellzyklustestung an kultivierten Fruchtwasserzellen nicht durch eine Untersuchung von Nabelschnurblut kontrolliert wurde. Werden sowohl Amnionzellen als auch Nabelschnurblut untersucht und wird die Untersuchung der Amnionzellen durch eine einfache Sensitivitätsmessung gegenüber MMC ergänzt, so ist die funktionelle pränatale Diagnostik eine verlässliche Methode zur Bestätigung oder zum Ausschluß der Diagnose Fanconi-Anämie. Die größtmögliche Sicherheit der pränatalen Diagnostik wird jedoch mit molekulargenetischen Methoden erreicht. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn Komplementationsgruppenzugehörigkeit und die Art der krankheitsverursachenden Mutationen vor Beginn der Schwangerschaft bekannt sind.

5. LITERATUR

- Alter B.P. (2003): Diagnostic Evaluation; in: Fanconi Anemia; Standards for Clinical Care, Fanconi Anemia Research Fund (Hrsg.), Oregon 2003.
- Alter B.P. (1993): Annotation, Fanconi's anaemia and its variability; British Journal of Haematology 1993; 85: 9-14
- Auerbach AD., Adler B., Chaganti RS (1981): Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method; Pediatrics 1981 Jan, 67(1): 128-135
- Auerbach AD., Sagi M., Adler B. (1985): Fanconi anemia: prenatal diagnosis in 30 fetuses at risk; Pediatrics 1985 Nov; 76(5): 794-800
- Berger R., Jonveaux P. (1996): Clonal chromosome abnormalities in Fanconi anaemia; Hematol Cell Ther 1996 Aug; 38(4): 291-296
- Bonnet-Gajdos M., Vasmant D., Baruchel S., Mamou JF., Boue J., Lasfargues G. (1985): Diagnostic antenatal de l'anémie de Fanconi; Presse Med 1985 Sept 14;14(30): 1612
- D'Andrea A.D., Grompe M. (1997): Molecular Biology of Fanconi Anaemia: Implications for Diagnosis and Therapy; Blood, 1 Sept 1997; 90(5): 1725-1736
- Dallapiccola B., Doria Lamba Carbone L., Ferranti G., Cristiani ML., Dagna Bricarelli F. (1985): Monitoring of pregnancies at risk for Fanconi's anemia by chorionic villi sampling; Acta Haematol 1985; 73(3): 157-8
- de Kerviler E., Guermazi A., Zagroski A.M. Gluckman E., Fria J. (2000): The Clinical and Radiological Features of Fanconi's Anaemia; Clinical Radiology 2000; 55: 340-345
- Digweed M., Sperling K. (1996): Molecular analysis of Fanconi anaemia; Bio Essays Vol. 18 No 7: 579-585
- Duckworth-Rysiecki G., Cornish K, Clarke C., Buchwald M. (1985): Identification of two complementation groups in Fanconi Anaemia; Som Cell Mol Genet 11: 35-41
- Flowers M., Zanis J., Storb R., et al (1993): Bone marrow transplantation in 32 patients with Fanconi's anemia after conditioning with cyclophosphamide; Blood 82(1): 344a
- German J. (1973): Genetic disorders associated with chromosomal instability and cancer; The Journal of Investigative Dermatology 1973; 60: 427-434
- Gluckman E. (1996): Allogenic bone marrow transplantation in Fanconi anemia; Bone marrow Transplant. 18(3): 33-35
- Gluckman E., Broxmeyer HE., Auerbach AD., Friedman HS., Douglas GW., Devergie A., Esperou H., Thierry D., Socie G., Lehn P., Cooper S., English D., Kurtzberg J., Bard J., Boyse EA. (1989): Hematopoietic reconstruction in a patient with

- Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling; N Engl J Med 321: 1174
- Grewal SS., Kahn JP., MacMillan ML., Ramsay NKC., Wagner JE. (2004): Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis; Blood 1 Feb 2004; 103(3): 1147-1151
- Gross M. (2002): Mutationsanalyse in den Fanconi-Anämie-Genen unter besonderer Berücksichtigung von FANCA; medgen 2002(2): 64-72
- Guardiola P., Socie G., Pasquini R., Dokal I., Ortega JJ., van Weel-Sipman M., Marsh J., Locatelli F., Souillet G., Cahn JY., Ljungman P., Miniero R., Shaw J., Vermylen C., Archimbaud E., Bekassy AN., Kriven G., Di Bartolomeo P., Bacigalupo A., Gluckman E. (1998): Allogenic stem cell transplantation for Fanconi anemia. Severe Aplastic Anaemia Working Party of the EBMT and EUFAR. European Group for Blood and Marrow Transplantation.; Bone Marrow Transplant. Apr. 21 (2): 24-27
- Hanenberg H., Batish S., Pollok K., Vieten L., Verlander P., Leurs C., Cooper R., Götsche K., Haneline L., Clapp D., Lobitz S., Williams D., Auerbach A. (2002): Phenotypic correction of primary Fanconi Anaemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool; Exp Haematol; 30(5): 410-420
- Haynes JL. (1988): Principles of flow cytometry; Cytometry Suppl 1988;3: 7-17
- Höhn H., Schroeder-Kurth T. (2002) Medizinischer Kommentar: Selbstverständliche Nutzung oder Missbrauch der PID?; Z med Ethik 48: 388-91
- Joenje H., Lo Ten Foe J., Oostra A., van Berkel C., Rooimans M., Schroeder-Kurth T., Wegner R., Gille J., Buchwald M., Arwert F. (1995): Classification of Fanconi Anaemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype; Blood 1995 Sept 15;86(6): 2156-2160
- Joenje H., Oostra A., Wijker M., di Summa F., van Berkel C., Rooimans M., Ebell W., van Weel M., Pronk J., Buchwald M. (1997): Evidence for at least eight Fanconi Anaemia genes; Am J Hum Genet; 61(4): 940-944
- Joenje H., Patel K.J. (2001): The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia; Nature Reviews/Genetics Vol 2(6), Jun. 2001: 446-457
- Kubbies M., Schindler D., Hoehn H., Schinzel A., Rabinovich PS. (1985): Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent endomitosis in Fanconi Anaemia cells; Am J Hum Genet 37: 1022-1030
- Kutler D., Singh B., Satagopan J., Batish S., Berwick M., Giampietro P., Hanenberg H., Auerbach A.D. (2003): A 20-year perspective on the International Fanconi Anaemia Registry (IFAR); Blood, 15 Feb 2003; 101(4): 1249-1256
- Levitus M., Rooimans MA., Steltenpool J, Cool NF., Oostra AB., Mathew CG., Hoatlin ME., Waisfisz Q., Arwert F., de Winter JP., Joenje H. (2004): Heterogeneity in

- Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes; *Blood* 2004 Apr 1;103(7): 2498-503. Epub 2003 Nov 20
- Marx MP., Dawson B., Heyns A. Du P. (1982): Prenatal diagnosis of Fanconi's anaemia; *SA Medical Journal* 4 Sept 1982; 62(11): 348
- Murer-Orlando M., Llerena JC. Jr, Birjandi F., Gibson RA., Mathew CG. (1993): FACC gene mutations and early prenatal diagnosis of Fanconi's anaemia; *Lancet* 1993 Sept 11;342(8872): 686
- Otsuki T., Liu JM. (1998): Molecular approaches to the treatment of Fanconi anemia: recent advances; *Keio J Med* 1998 Mar;47(1): 42-4
- Poot M., Hoehn H., Kubbies M., Grossmann A., Chen YC., Rabinovitch PS. (1994): Cell-cycle analysis using continuous BrdU labelling and Hoechst 33258/Ethidium bromide bivariate flow cytometry; *Meth Cell Biol* 1994;41: 327-340
- Popp H., Kalb R., Fischer A., Lobitz S., Kokemohr I., Hanenberg H., Schindler D. (2003): Screening Fanconi anemia lymphoid cell lines of non-A, C, D2, E, F, G subtypes for defects in BRCA2/FANCD1; *Cytogenet Genome Res* 2003;103(1-2): 54-7
- Rabinovitch PS., Kubbies M., Chen YC., Schindler D., Hoehn H. (1988): BrdU-Hoechst Flow Cytometry: A Unique Tool for Quantitative Cell Cycle Analysis; *Experimental Cell Research* 1988 Feb;174(2): 309-318
- Savino M., Ianzano L., Strippoli P., Ramenghi U., Arslanian A., Bagnara GP., Joenje H., Zelante L., Savoia A. (1997): Mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Italian patients; *Am J Hum Genet* 1997 Dec;61(6): 1246-53
- Schindler D., Friedl R., Güthle G., Gross M., Kalb R., Sobock A., Ebell W., Schneider H., Hanenberg H., Höhn H. (2002) : Zellzyklus-Diagnostik bei Fanconi-Anämie; *medgen* 2002(2): 45-52
- Schindler D., Hoehn H. (1988): Fanconi Anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen; *Am J Hum Genet* 43: 429-435
- Schindler D., Hoehn H. (1999): Flow cytometric testing for syndroms with chromosomal instability, aplastic anemia and related hematological disorders; In: R.-D. Wegner (Hrsg.): *Diagnostic Cytogenetics*; Springer Verlag Berlin/Heidelberg: 269-281
- Schroeder TM., Anshütz F., Knopp A. (1964): Spontane Chromosomenabberationen bei familiärer Panmyelopathie; *Humangenetik* 1: 194-196
- Seyschab H., Sun Y., Friedl R., Schindler D., Hoehn H. (1993): G2 phase cell cycle disturbance as a manifestation of genetic cell damage; *Hum Genet* 1993; Aug; 92(1): 61-68
- Shipley J., Rodeck CH., Garrett C., Galbraith J., Giannelli F. (1984): Mitomycin C induced chromosome damage in fetal blood cultures and prenatal diagnosis of Fanconi's anemia; *Prenat Diagn* 1984 May-Jun; 4(3): 217-221

- Southwick PL., Ernst LA., Tauriello EW., Parker SR., Mujumdar RB., Mujumdar SR., Clever HA., Waggoner AS. (1990): Cyanine dye labelling reagents – carboxymethylindocyanine succinimidyl esters; *Cytometry* 1990;11(3): 418-30
- Strathdee C., Gavish H., Shannon W., Buchwald M. (1992): Cloning of cDNAs for Fanconi's Anaemia by functional complementation; *Nature*; 356: 763-767
- Tercanli S., Miny P., Siebert MS., Hösli I., Surbek V., Holzgreve W. (2001): Fanconi anemia associated with increased nuchal translucency detected by first-trimester ultrasound; *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;17: 160-162
- Voss R., Kohn G., Shaham M., Benzur Z., Arnon J., Ornoy A., Yaffe H., Golbus M., Auerbach AD. (1981): Prenatal diagnosis of Fanconi anemia; *Clin Genet* 1981 Sep; 20(3): 185-190
- Wajnrajch M.P., Gertner J.M., Huma Z., Popovic J., Lin K., Verlander P.C., Batish S.D., Giampietro P.F., Davis J.G., New M.I., Auerbach A.D. (2001): Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anaemia Registry; *Pediatrics* 2001; 107: 744-754
- 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., CG Mathew, et al (1999): Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene; *Eur J Hum Genet* 1999 Jan;7(1): 52-9

Dank

Herrn Prof. Dr. med. H. Höhn danke ich für die engagierte Betreuung der Arbeit sowie für die gute Verpflegung, wenn das Essen in der Mensa wieder nicht zum Aushalten war.

Herrn Prof. Dr. med. D. Schindler danke ich für wertvolle Hinweise bei der Konzeption der Arbeit und für die Übernahme des Korreferates. Außerdem danke ich ihm für Gerlindes Betreuung.

Den Mitarbeitern des Schindler-Labors, insbesondere Frau Benni Gottwald, Herrn Richard Friedl und Herrn Reinhard Kalb, sei Dank für ihre Hilfsbereitschaft und ihren Willen, die Akten zeitweilig mit mir zu teilen.

Herrn Dr. rer. nat. Tilman Heinrich sowie seinen beiden Assistenten Siegfried H. und Justus B. bin ich für die geduldige Unterstützung bei der Datenverarbeitung sehr dankbar.

Schließlich danke ich noch Petrus, der es in diesem Sommer nicht zu heiß hat werden lassen, so dass eine vernünftige Arbeit überhaupt möglich wurde.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Astrid Sibylle Bechtold
Geburtsdatum: 16.11.1976
Geburtsort: Wolfenbüttel

Schulbildung

1989-1996 Matthias-Claudius-Gymnasium Gehrden; Abitur

Studium

1997-2000 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg bis zum
2. Staatsexamen
2000-2002 Studiengang Molecular & Cellular Biology an der Universität
Heidelberg, Master`s degree
2002-2005 Wiederaufnahme und Beendigung des Studiums der
Humanmedizin an der Universität Würzburg (3. Staatsexamen
Mai 2005)

Praktisches Jahr:

Humangenetik: Universität Würzburg
Chirurgie: Kantonales Spital Grabs/Schweiz
Innere Medizin: Royal Infirmary of Edinburgh/Schottland

