

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

**Genotyp-Phänotyp Korrelation  
bei Fanconi Anämie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Katharina Höhn  
aus Schmalkalden

Würzburg, 2009

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Koreferent: Prof. Dr. med. D. Schindler

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.08.2009

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1	Klinik der Fanconi Anämie .....	1
1.2	Genetik der Fanconi Anämie .. .....	3
1.3	Diagnostik der Fanconi Anämie .....	6
	1.3.1 Chromosomenbruchanalyse .....	6
	1.3.1 Durchflusszytometrie .....	6
	1.3.3 Komplementationsgruppen-Analyse .....	7
	1.3.4 Mutationsanalyse .....	7
1.4	Fragestellung .....	8

## 2. Material und Methoden

2.1	Retrovirale Komplementationsgruppenbestimmung .....	10
2.2	Mutationsanalyse .....	12
	2.2.1 DNA-Isolierung und PCR .....	12
	2.2.2 DNA-Sequenzierung .....	13
	2.2.3 Multiplex ligation dependent probe amplifikation (MLPA) .....	14

## 3. Ergebnisse

3.1	Komplementationsgruppen und Mutationen .....	17
3.2	Beispielhafte Kasuistiken .....	20
	3.2.1 Komplementationsgruppe FA-A .....	21
	3.2.2 Komplementationsgruppe FA-B .....	29
	3.2.3 Komplementationsgruppe FA-C .....	31
	3.2.4 Komplementationsgruppe FA-D2 .....	35
	3.2.5 Komplementationsgruppe FA-G .....	37

## 4. Diskussion

4.1	Klassische Genotyp-Phänotyp Korrelationen .....	42
4.2	Mögliche molekulare Mechanismen der phänotypischen Heterogenität .....	45
4.3	Diskussion spezifischer Kasuistiken .....	47

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>51</b>
---------------------------------	-----------

<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>52</b>
--------------------------------------	-----------

## 1. Einleitung

Im Jahr 1927 beschrieb der Schweizer Pädiater Guido Fanconi (1892-1979) erstmals eine familiäre Form von aplastischer Anämie bei drei Brüdern, die neben der Panzytopenie bestimmte körperliche Besonderheiten wie Hyperpigmentierung der Haut, Mikrozephalie und Hypogonadismus präsentierten (Fanconi, 1927).

Die nach dem Erstbeschreiber benannte Fanconi Anämie (FA) ist eine seltene autosomal-rezessiv und in wenigen Fällen X-chromosomal vererbte Erkrankung. Die Prävalenz wird auf 1-5 : 1 Mio geschätzt, die Frequenz der heterozygoten Träger auf 1 : 300 (Alter, 2003; Auerbach et al., 2001). Die FA ist gekennzeichnet durch progressives Knochenmarkversagen, angeborene Fehlbildungen und einer Prädisposition zu malignen Erkrankungen. Charakteristisch sind chromosomale Instabilität und Überempfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Agentien wie Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB) (Auerbach et al., 1976).

### 1.1 Klinik der Fanconi Anämie

In der klinischen Manifestation zeigt die FA eine hohe Heterogenität und umfasst Fehlbildungen in jedem großen Organsystem.

Zu den häufigsten phänotypischen Auffälligkeiten zählen Minderwuchs, Hyper-, Hypopigmentierung oder Café-au-lait-Flecken der Haut sowie Skelettanomalien, insbesondere Hypo- oder Aplasie der Daumen und Radii (Alter et al., 2003). Mikrocephalus, Mikrophthalmie, Hörstörungen und Entwicklungsverzögerungen werden häufig beobachtet. Ein Drittel der Patienten zeigt Fehlbildungen der Nieren (z.B. Hypo-, Aplasie, Hufeisennieren). Seltener Anomalien sind gastrointestinale Defekte wie Ösophagus- oder Duodenalatresien, tracheoösophageale Fisteln, Fehlbildungen des Herzens (persistierendes

Foramen ovale, Ventrikelseptumdefekt, Pulmonal-, Aortenstenose) oder Hydrocephalus. Aufgrund von Hypogonadismus ist die Fertilität eingeschränkt. Eine geistige Retardierung ist sehr selten zu beobachten (De Kerviler et al., 2000; Auerbach et al., 1999; Young et al., 1994). Über 80% der Patienten sind von Endokrinopathien wie Hyperinsulinämie, Wachstumshormoninsuffizienz oder Hypothyreose betroffen (Wajnrajch et al., 2001).

Charakteristisch für die FA ist die hämatologische Manifestation, in dessen Mittelpunkt das zunehmende Knochenmarkversagen steht. Die Inzidenzen für aplastische Anämie, myelodysplastisches Syndrom (MDS) und akute myeloische Leukämie (AML) sind außerordentlich erhöht. Makrozytäre Erythrozyten zeigen sich oft als erste Auffälligkeit, gefolgt von Thrombozytopenie und Neutropenie. Eine Panzytopenie tritt üblicherweise zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr auf (Auerbach et al., 1991; Butturini et al., 1994), teilweise auch postnatal und in seltenen Fällen sogar erst im Alter von 40 Jahren (Young et al., 1994). Die Patienten berichten von auffallend häufigen Hämatomen und Blutungen, wiederkehrenden und schlecht behandelbaren Infekten, oft der oberen und unteren Atemwege, Müdigkeit, Schwäche und Blässe.

Neben dem gehäuften Auftreten von hämatologischen Tumoren (AML) kommt es bei erwachsenen Patienten oft zu einer vorzeitigen Entstehung solider Neoplasien. Hierbei stehen Lebertumoren, Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches sowie Karzinome des Ösophagus, Oropharynx und der Vulva im Vordergrund (Alter, 1996 und 2003; Carvalho et al., 2002).

Das klinische Bild der FA ist höchst variabel. Selbst innerhalb von Familien mit identischer Mutation zeigt sich eine große Bandbreite an Anzahl und Schwere der Veränderungen (Koc et al., 1999). Etwa ein Drittel der Betroffenen besitzt keine kongenitalen Auffälligkeiten. In diesen Fällen wird die Diagnose erst mit Einsetzen der hämatologischen Probleme oder aufgrund der Anwesenheit eines betroffenen Geschwisterkindes gestellt (Giampietro et al., 1997).

Die mittlere Überlebenszeit der FA-Patienten beträgt 24 Jahre (Kutler et al., 2003).

## 1.2 Genetik der Fanconi Anämie

Neben der großen phänotypischen Variabilität ist die Fanconi Anämie auch eines der genetisch heterogensten Krankheitsbilder.

Bis heute konnten 13 verschiedene Komplementationsgruppen (FA-A, FA-B, FA-C, FA-D1, FA-D2, FA-E, FA-F, FA-G, FA-I, FA-J, FA-L, FA-M und FA-N) und deren jeweiligen Gene (FANCA – FANCN) identifiziert werden (Wang, 2007, Reid et al., 2007, Meetei et al., 2005, Levitus et al., 2004). Die Komplementationsgruppe FA-H wurde im Nachhinein als zu der Komplementationsgruppe FA-A gehörig identifiziert (Joenje et al., 2000) und fehlt somit als eigenständige Gruppe. Eine Übersicht über die Komplementationsgruppen zeigt die Tabelle 1.

Nach dem International Fanconi Anemia Registry (IFAR) gehören die meisten Patienten der Komplementationsgruppe FA-A an (65%), gefolgt von den Gruppen FA-C (15%) und FA-G (10%) (Kutler et al., 2003).

Die Fanconi Anämie gehört ebenso wie u.a. Ataxia telangiectasia, Nijmegen-Breakage-Syndrom, Bloom-Syndrom und Werner-Syndrom zu den genetischen Instabilitätssyndromen. Verursacht wird die überwiegend rezessiv vererbte Erkrankung durch biallelische Mutationen in den FANC-Genen (Ausnahme ist hierbei die seltene Komplementationsgruppe FA-B mit X-chromosomalem Erbgang), die, wie auch die Gene ATM, NBS, BLM und WRN, zur Gruppe der „Caretaker“-Gene zählen (Joenje et al., 2001; Levran et al., 1997). Caretaker-Gene sorgen in geschicktem Zusammenspiel durch Erkennung und Behebung von DNA-Schäden für die genetische Stabilität unserer Körperzellen (Kienzler et al., 1997).

Als Reaktion auf eine Schädigung der DNA durch endogene (z.B. Temperatur, Sauerstoffradikale) oder exogene Faktoren (z.B. ionisierende Strahlung, klastogene Substanzen) wird aus acht FA-Proteinen (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL und FANCM) ein Kernkomplex gebildet, der die Proteine FANCD2 und FANCI durch Monoubiquitinierung aktiviert (Garcia-Higuera et al., 2001; Taniguchi et al., 2006; Sims et al., 2007; D'Andrea et al., 2003). Der entstandene FANCI-FANCD2 (ID)-Komplex bildet zusammen mit

BRCA1, FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCI/BRIP1, RAD51 und anderen Proteinen nukleare Foci, die eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Läsionen spielen (Xia et al., 2006; Wang et al., 2004).

Mutationen in den FA-Genen führen zu Störungen des FA/BRCA-Pathway. Durch mangelhaftes Reparieren beschädigter DNA kommt es zu genetischer Instabilität. Die Folgen zeigen sich in gesteigerten Mutationsraten und den bereits erwähnten klinischen Manifestationen der Fanconi Anämie (frühzeitiges und vermehrtes Auftreten von Krebserkrankungen, vorzeitige Alterungserscheinungen, wie z.B. Knochenmarkinsuffizienz) (Vogelstein et al., 2004).

**Tab. 1:** Komplementationsgruppen der Fanconi Anämie

Gruppe	Gen	Lokalisation	Voraussetzung für FANCD2 Monoubiquitinierung	Aufgabe des Proteins
FA-A	FANCA	16q24.3	+	FA core complex
FA-B	FANCB (FAAP95)	Xp22.31	+	FA core complex
FA-C	FANCC	9q22.3	+	FA core complex
FA-D1	FANCD1/BRCA2	13q12-13	-	RAD51 recruitment
FA-D2	FANCD2	3p25.3	+	monoubiquitylated protein
FA-E	FANCE	6p21-22	+	FA core complex
FA-F	FANCF	11p15	+	FA core complex
FA-G	FANCG/XRCC9	9p13	+	FA core complex
FA-I	FANCI	15q25-26	+	monoubiquitylated protein
FA-J	FANCI/BACH1/BRIP1	17q22	-	5'→3' DNA helicase/ATPase
FA-L	FANCL/PHF9/POG (FAAP43)	2p16.1	+	FA core complex, ubiquitin ligase
FA-M	FANCM/Hef	14q21.3	+	FA core complex, ATPase/translocase
FA-N	FANCN/PALB2	16p12	-	regulation of BRCA2 localization

nach Taniguchi et al., 2006

+ Gen wird für die Monoubiquitinierung von FANCD2 benötigt

- Gen wird für die Monoubiquitinierung von FANCD2 nicht benötigt

Klinisch lassen sich die Patienten der einzelnen Komplementationsgruppen nicht sicher voneinander abgrenzen. Die phänotypischen Ähnlichkeiten sind trotz unterschiedlicher genetischer Defekte groß. Dennoch gibt es Komplementationsgruppen, die sich in ihrer klinischen Ausprägung hervorheben und sich in gewissen Aspekten von denen anderer FA-Gene unterscheiden. Eine Ausnahme bilden z.B. Betroffene der Komplementationsgruppen FA-D1 und FA-N. Die Phänotypen dieser beiden Gruppen ähneln sich in ihrem extrem schweren klinischen Verlauf, der gekennzeichnet ist durch schon im frühen Kindesalter auftretende lebensbedrohliche Neoplasien. Damit unterscheiden sie sich deutlich von den anderen bisher bekannten FA-Gruppen. Die große Mehrzahl der biallelischen Mutationen im FANCD1/BRCA2-Gen ist beim Menschen bereits im Embryonalstadium letal. Lebensfähig sind biallelische Mutationsträger offensichtlich nur, wenn eine Restfunktion des BRCA2-Proteins erhalten bleibt (Howlett et al., 2002). Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass nur relativ wenige Patienten der Gruppe FA-D1 bekannt sind.

Innerhalb eines jeden FA-Gens existiert ein großes, heterogenes Spektrum an Mutationen. Die meisten FA-Patienten tragen sogenannte „private“ Mutationen in compound heterozygoter Form, d.h. die Mutationen im maternalen und paternalen Allel sind nicht identisch. Einige Mutationen, die in größeren Teilen der Bevölkerung bzw. innerhalb bestimmter ethnischer Gruppen gehäuft auftreten, gehen auf Founder („Gründer“)-Effekte zurück. Dies trifft z.B. auf die Nonsense-Mutation 313G>T (E105X) zu, die bei 44% der deutschen FA-G-Patienten gefunden wurde (Demuth et al., 2000). Im FANCC-Gen kann man bei einem Großteil der Ashkenazi-jüdischen Patienten die Spleiß-Mutation IVS4+4A>T finden (Verlander et al., 1994), die mit einem deutlich schwereren Verlauf assoziiert ist als die im selben Gen lokalisierte kleine Deletion c.67delG (früher 322delG), die in den Niederlanden und Deutschland weit verbreitet ist und zur Ausprägung eines mildereren Phänotyps führt (Gillio et al., 1997). Nach bisherigen Untersuchungen hat die Art der Mutation einen größeren Einfluss auf das klinische Erscheinungsbild eines Patienten als die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Komplementationsgruppe (Yamashita et al., 1996; Faivre et al., 2000).



## **1.3 Diagnostik der Fanconi Anämie**

### **1.3.1 Chromosomenbruchanalyse**

Typischerweise zeigen kultivierte Lymphozyten von FA-Patienten eine schon spontan auftretende Chromosomeninstabilität. Es kommt zu einem gehäuften Auftreten von charakteristischen Chromatidbrüchen und Reunionsfiguren (Schroeder et al., 1964).

Nach einer Behandlung der FA-Zellen mit alkylierenden, DNA-vernetzenden Agentien wie Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB) erhöht sich die Häufigkeit von Zellen mit Chromosomenbrüchen (Sasaki et al., 1973; Auerbach, 1993), was die Empfindlichkeit von FA-Zellen gegenüber diesen klastogenen Substanzen bestätigt.

### **1.3.2 Durchflusszytometrie**

Neben der erhöhten Chromosomenbrüchigkeit und Klastogensensitivität kommt es bei FA-Zellen zu Zellzyklus-Störungen (Dutrillaux et al., 1982; Kubbies et al., 1985), die sowohl die S- als auch die G2-Phase betreffen. Die Zellzyklusveränderungen werden als Manifestation von DNA-Schäden interpretiert (Berger et al., 1993; Seyschab et al., 1993), deren Reparatur und Replikation im Verlauf der S-Phase nicht regelrecht abgeschlossen wird (Akkari et al., 2001).

Mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierte mononukleäre Blutzellen (Lymphozyten) werden für 72 Stunden kultiviert, anschließend angefärbt, die Zellkerne durchflusszytometrisch vermessen und die so erhaltenen Zellzyklusverteilungen elektronisch analysiert. Im Vergleich zu gesunden Individuen kommt es bei FA-Patienten aufgrund unzureichend reparierter DNA-Schäden zu einer typischen G2-Phasen-Akkumulation von Zellen (Miglierina et al., 1991).

Der Verdacht auf einen Mosaikstatus, d.h. die gleichzeitige Existenz von funktionell defekten als auch intakten Zellen im Körper des Betroffenen, besteht bei anhaltender Diskrepanz zwischen zytogenetischen und klinischen Befunden.

Durch somatische Reversion eines der beiden mutierten Allele entstehen bei homozygoten oder compound heterozygoten Patienten Zellen mit klassischer Heterozygotie. Diese korrigierten Zellen verhalten sich funktionell (z.B. MMC-Sensitivität, Zellzyklus-Verhalten, Chromosomenbrüchigkeit) wie die Zellen klinisch unauffälliger Individuen (Lo Ten Foe et al., 1997). Bei kompletter Mosaikbildung (100% korrigierte Zellen) werden im Blut überhaupt keine MMC-sensitiven Zellen mehr gefunden, was die Diagnose einer Fanconi Anämie anhand von Blutzellen unmöglich macht. In diesen Fällen muß die klinische Verdachtsdiagnose durch Untersuchung der MMC-Sensitivität von Hautfibroblasten der Patienten bestätigt werden (Joenje et al. 1998).

### **1.3.3 Komplementationsgruppen-Analyse**

Es gibt zwei Methoden, um einen Patienten der entsprechenden Komplementationsgruppe zuzuordnen: Zum einen die Fusion und anschließende Selektion somatischer Zellen (Zakrezewski et al., 1980; Joenje et al., 1995, 2000), ein jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendiges Verfahren. Zum anderen, und für die Routine-Labordiagnostik geeigneter, die Komplementationsanalyse durch in vitro Transduktion (Hanenberg et al., 2002). Hierbei wird getestet, ob das jeweilige, durch einen retroviralen Vektor übertragene FA-Gen in der Lage ist, das mutierte Gen zu komplementieren und die Überempfindlichkeit der Zelle gegenüber DNA-schädigenden Substanzen (z.B. MMC) zu korrigieren.

### **1.3.4 Mutationsanalyse**

Für den Verlauf und die Prognose der Fanconi Anämie ist weniger die Zuordnung zu einer Komplementationsgruppe von Bedeutung als vielmehr die Art der zugrunde liegenden Mutation des jeweiligen Patienten sowie das Entstehen oder Ausbleiben eines somatischen Mosaiks in hämatopoetischen Zellen (Gillio et al., 1997; Faivre et al., 2000). Mutationsanalysen sind somit hilfreich bei der Beratung und medizinischen Betreuung von FA-Patienten und deren Familien, um Voraussagen bezüglich des Krankheitsverlaufs und des Wiederholungsrisikos machen zu können.

Auch ist eine Mutationsanalyse hilfreich im Rahmen der pränatalen Diagnostik, die durch die Kenntnis der genauen Gendefekte bei betroffenen Familienmitgliedern erleichtert und beschleunigt wird.

## 1.4 Fragestellung

Eines der ungelösten Probleme der medizinischen Genetik ist die Frage der Genotyp-Phänotyp Korrelation. Nach der Entdeckung von Mutationen als Ursache monogener Erkrankungen ging man zunächst davon aus, dass die Art der genetischen Veränderung in jedem Fall auch Krankheitsentstehung und -verlauf bestimmen würde. Beispiele solcher kausaler und linearer Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp waren z.B. die Krankheiten Muskeldystrophie Duchenne, die Phenylketonurie, die Zystische Fibrose oder auch die durch Mutationen in den BRCA-Genen bedingten familiären Brust- und Eierstockkrebserkrankungen. Im weiteren Verlauf der molekulargenetischen Definition von Genveränderungen wurde offensichtlich, dass sich für eine Vielzahl von Erkrankungen strikte Genotyp-Phänotyp Korrelationen nicht nachweisen ließen.

Grundsätzlich können Variationen in der phänotypischen Ausprägung einer Krankheit oder eines Krankheitsverlaufes durch stochastische Phänomene, unterschiedliche Umweltbedingungen sowie durch verschiedene Arten von genetischer Variation bedingt sein. Hierzu gehören das Phänomen der allelischen Heterogenität ebenso wie mögliche Lokus-Heterogenität oder die Möglichkeit der Beeinflussung durch andere Gene („modifier genes“).

Die Fanconi Anämie stellt ein extremes Beispiel für genetische Variabilität dar. Mutationen in bisher 13 bekannten Genen können das Krankheitsbild auslösen, wobei sich unterschiedliche phänotypische Manifestationen mit wenigen Ausnahmen in der Regel nicht einzelnen Genen zuordnen lassen. Die Art der jeweiligen Mutation scheint hinsichtlich des jeweiligen Phänotyps wichtiger zu sein als die Art des betroffenen Gens. Dies entspricht der Erfahrung, dass z.B.

Missense-Mutationen weniger schwerwiegende Auswirkungen haben als Nonsense-Mutationen. Ob und in welchem Maße noch Restprotein gebildet wird und funktionsfähig ist, wird sich entscheidend auf den resultierenden Phänotyp auswirken. Hinzu kommt das Phänomen der compound Heterozygotie, wobei z.B. ein Allel eine Null-Mutation, das andere Allel z.B. jedoch eine Missense- oder Spleiß-Mutation tragen kann, so dass die schädlichen Auswirkungen der Null-Mutation zumindest abgemildert bzw. teilweise kompensiert werden können.

Bisher ist es nur in wenigen Konstellationen möglich, nach der molekulargenetischen Definition von bestimmten Mutationen hinreichend verlässliche Angaben über die zu erwartende Schwere und den Verlauf der Fanconi Anämie zu machen. Das überwiegende Fehlen von verlässlichen Prognosen erschwert die optimale Betreuung der betroffenen Patienten sowohl für deren Ärzte als auch für die Familien. Insofern ist es von größter praktischer Bedeutung, die bei einzelnen Patienten beobachteten genetischen Veränderungen mit der jeweiligen Krankheitsausprägung und dem jeweiligen Krankheitsverlauf zu korrelieren. Dies erfolgt zunächst im Rahmen einzelner Kasuistiken, die nach Art des betroffenen Gens geordnet werden. Bei einer ausreichend großen Anzahl von den jeweiligen Genen zugeordneten Patienten, bei denen auch die jeweiligen Mutationen eindeutig definiert sind, sollte es letztlich möglich sein, valide prognostische Aussagen zu machen.

Die vorliegende Arbeit hat daher zum Ziel, die Grundlagen für eine zukünftig extensive und klinisch verwertbare Genotyp-Phänotyp Korrelation (einschließlich deren Abweichungen) für Patienten mit Fanconi Anämie zu etablieren. Dies geschieht durch die retrospektive Analyse exemplarischer Krankheitsverläufe, welche mit den jeweiligen diagnostischen Befunden auf Zell- und Genebene korreliert werden.

## **2. Material und Methoden**

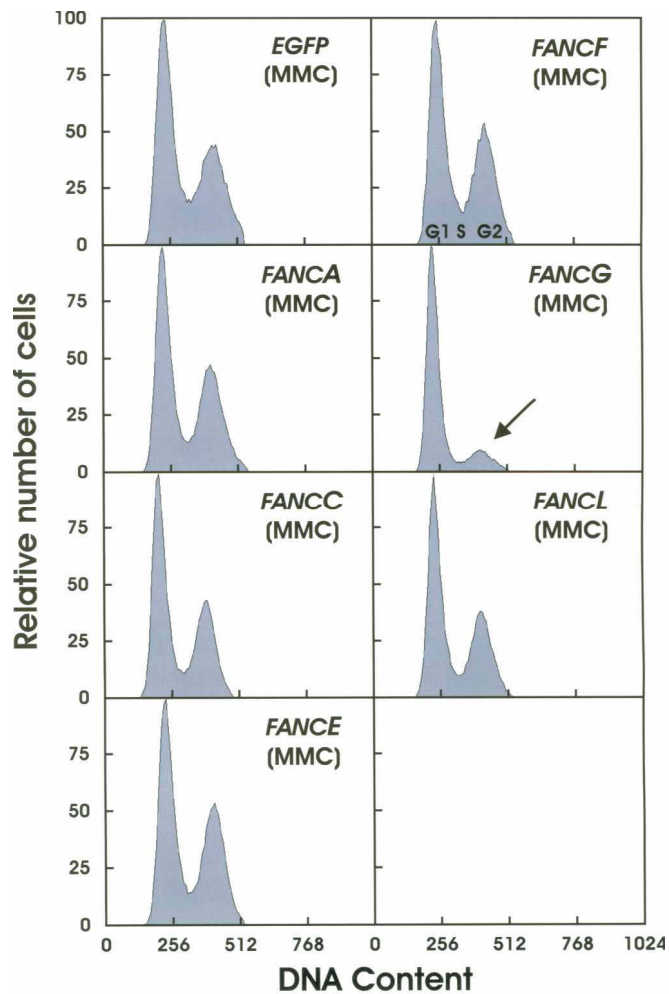
### **2.1 Retrovirale Komplementationsgruppenbestimmung**

Die Zuordnung eines Patienten zu einer Komplementationsgruppe erfolgt durch die Transduktion der Patientenzelle mit gentechnisch veränderten retroviralen Vektoren, welche jeweils eines der bisher bekannten FA-Gene beinhalten.

Im Unterschied zur Komplementationsanalyse durch Zellfusion, bei der immer alle FA-Gene außer einem übertragen werden und nach dem aussagekräftigen negativen Fall gesucht wird, bei dem durch den Fusionspartner keine Komplementation vermittelt wird, wird bei der retroviralen Komplementationsanalyse immer nur ein FA-Gen pro Ansatz übertragen. Es wird der positive Fall gesucht, in dem der retrovirale Vektor mit intakter Kopie dieses einen FA-Gens, das in der Zelle defekt ist, eine Komplementation vermittelt, d.h. die FA-typische Überempfindlichkeit der Zellen gegen DNA-schädigende Substanzen, wie z.B. MMC, korrigiert (siehe Abbildung 1). Zur schnelleren Prüfung der MMC-Überempfindlichkeit wird als automatisiertes Analyseverfahren oft die Durchflusszytometrie angewandt (Schindler et al., 2005).

Die retrovirale Komplementationsanalyse kann an Lymphozyten (T-Zellen) durchgeführt werden, die direkt aus einer Blutprobe des Patienten isoliert werden können. Ebenso können Zellen einer lymphoblastoiden B-Zelllinie verwendet werden.

Komplementationsanalysen lassen sich auch mit CD34-positiven (CD34+) Zellen aus dem Knochenmark oder nach deren Mobilisation mit G-CSF aus dem peripheren Blut durchführen. In die isolierten CD34+ Zellen können mittels retroviraler Vektoren die einzelnen FA-Gene eingebracht werden. Anschließend wird in Kultur getestet, ob eines der FA-Gene die Kolonienbildung der CD34+ Zellen in Gegenwart von MMC überhaupt ermöglicht bzw. vergleichbar macht mit den von gesunden Personen gewonnenen CD34+ Zellen.



**Abb. 1:** Komplementationsgruppenbestimmung bei Patient G2

Die Zellen des Patienten werden mit Hilfe von retroviralen Vektoren einzeln mit den Genen FANCA, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG und FANCL transduziert.

Im vorliegenden Fall wird die für die FA charakteristische Überempfindlichkeit der Zellen gegenüber Mitomycin C durch den Gentransfer des FANCG-Gens korrigiert (siehe Pfeil) und die Akkumulation von Zellen in der G2-Phase normalisiert. Der Patient G2 kann somit der Komplementationsgruppe FA-G zugeordnet werden.

Weiterhin ist eine retrovirale Komplementationsanalyse an Fibroblasten aus Kulturen einer Hautbiopsie sowie an Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus dem Knochenmark oder pränatal aus der Amnionflüssigkeit möglich. Anhand der Untersuchung von Fibroblasten wird eine Komplementationsanalyse insbesondere auch bei Fanconi Anämie-Patienten möglich, die sich in der

Vergangenheit erfolgreich einer Knochenmarktransplantation unterzogen haben und deren Blutzellen unauffällig sind.

Auch bei Patienten, bei denen ein komplettes Mosaik vorliegt, kann mittels retroviraler Komplementationsanalyse die Komplementationsgruppe aus Hautfibroblasten bestimmt werden.

## **2.2 Mutationsanalyse**

### **2.2.1 DNA-Isolierung und PCR**

Die genomische DNA (gDNA) kann sowohl aus Blut als auch aus lymphoblastoiden Zellen oder Fibroblasten isoliert werden.

Zur Präparation der gDNA aus dem Blut wird eine Aussalzungsmethode verwendet. Dazu wird EDTA- oder Heparin-Blut mit einem Lysispuffer versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch zentrifugiert und zweimal mit Lysispuffer gewaschen. Zur Degradation der Proteine wird die Lösung mit dem proteolytischen Enzym Pronase und SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) versetzt. Nach einer Inkubation über Nacht gibt man SE-Puffer sowie NaCl-Lösung zur Suspension und mischt das Ganze, bis eine milchige Färbung eintritt. Im Anschluss wird die Flüssigkeit, in der die genomische DNA in gelöster Form vorliegt, durch Zentrifugation von den festen Zellbestandteilen befreit. Durch Zugabe des doppelten Volumens an 100%igem Ethanol (EtOH) kommt es zum Ausfällen der als weißer Faden sichtbaren DNA. Zur Entfernung von Salzresten wird diese in 70% EtOH kurz gewaschen (Kalb, 2002).

Die photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration gibt durch das Verhältnis der Adsorption bei 260nm und 280nm Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA. Ein ermittelter  $A_{260}/A_{280}$ -Quotient von 1,8-1,9 entspricht reiner DNA; Verunreinigungen führen zu einem niedrigeren Wert.

Mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) können spezifische, durch Primer begrenzte DNA-Fragmente in vitro amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

Die PCR besteht aus einer repetitiven Abfolge (30-35 Zyklen) folgender Schritte:

- Denaturierung des DNA-Matritzenstranges bei ca. 95°C,
- Hybridisierung der Primer an ihre komplementäre Zielsequenz auf dem Matritzenstrang („annealing-Phase“) bei 54-68°C,
- Elongation der DNA-Kette durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase bei ca. 72°C.

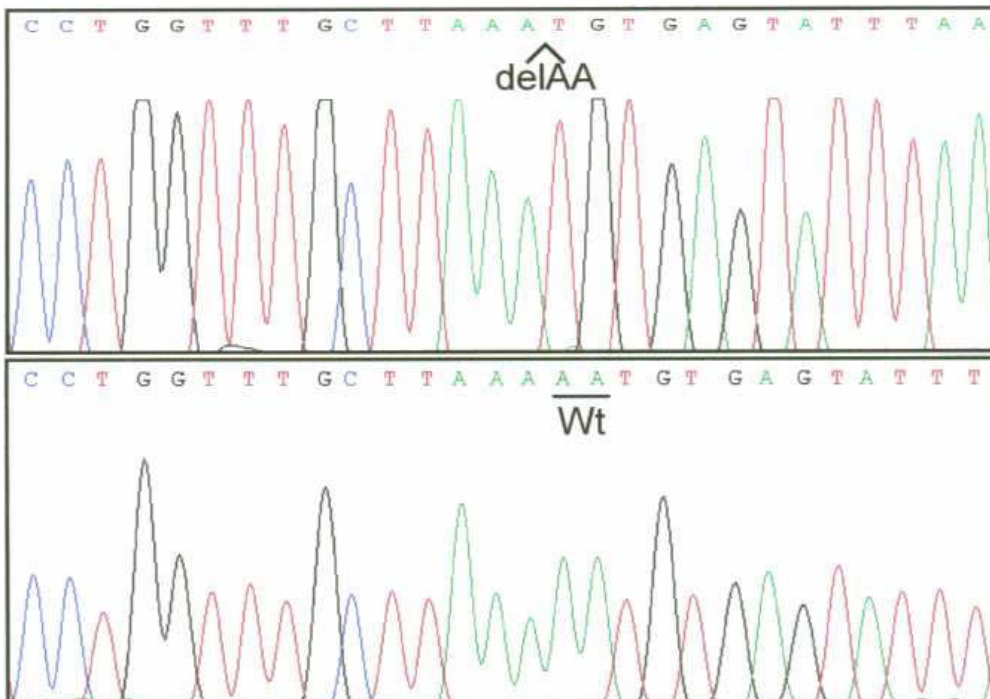
### **2.2.2 DNA-Sequenzierung**

Zur Sequenzierung der DNA wird die Didesoxy-Methode nach Sanger et al. (1977) angewandt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf dem basenspezifischen Abbruch der DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase. Neben den gewöhnlich eingesetzten 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) werden zusätzlich fluoreszenzmarkierte 2'3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP) eingesetzt, wobei jedes der vier ddNTPs an einen unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt ist. Diesen ddNTPs fehlt die 3'-OH-Gruppe, so dass die DNA-Polymerase das nächste Nukleotid nicht mehr ankondensieren kann und die Synthese beendet. Wird die Reaktion mit einem Gemisch aus dNTP und markiertem ddNTP durchgeführt, kann statistisch gesehen an jeder Nukleotidposition ein Kettenabbruch erfolgen, wodurch DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen, die an ihrem Ende jeweils eine Fluoreszenzmarkierung tragen.

Die automatische Sequenzierung erfolgt im ABI PRISM 310 Genetic Analyser durch Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese und darauf folgender Detektion des Emissionsspektrums der jeweiligen terminalen fluoreszenzmarkierten Base.

In Abbildung 2 ist das Chromatogramm des Patienten C6 im Vergleich mit der Wildtyp-Sequenz dargestellt.





**Abb. 2:** Mutationanalyse des Patienten C6 (oben) im Vergleich mit der Wildtyp-Sequenz (unten).

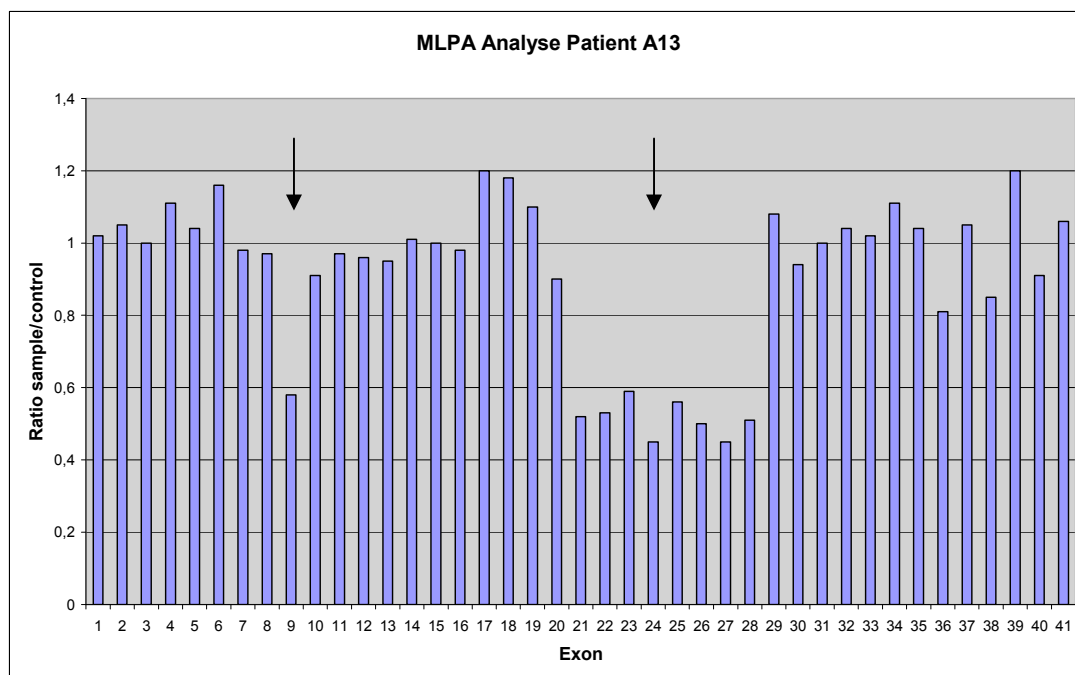
Es wurde im FANCC-Gen die homozygote Mutation c.454\_455delAA in Exon 4 gefunden, die zu einer Leserasterverschiebung und prämaturnen Termination der Translation (p.V152fsX159) führt.

### 2.2.3 Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)

Um größere genomische Rearrangements wie Deletionen oder Duplikationen ganzer Exone nachzuweisen, die durch die klassische Sequenzierung nicht detektiert werden können, verwendet man das semiquantitative Verfahren MLPA, welches die Verminderung eines PCR-Produkts im Vergleich zu Kontrollen anzeigt (Schouten et al., 2002).

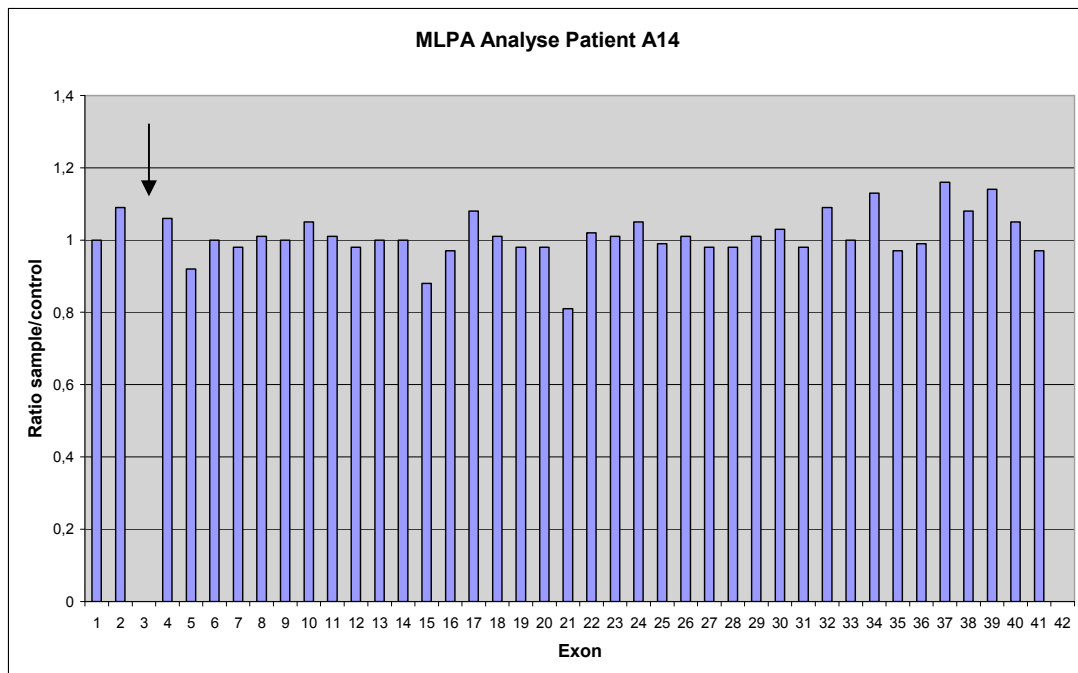
Die MLPA-Methode basiert auf zwei Sonden (DNA-Bindungssequenz oder target spezifische Sequenz), die an die Zielsequenz binden (Hybridisierung), wenn diese vorhanden ist. Anschließend werden die beiden DNA-Bindungssequenzen durch eine hitzestabile Ligase miteinander verknüpft (Ligation). Alle Ligationsprodukte haben jeweils identische Sequenzen an ihren

Enden (Primerbindungssequenz) und können deshalb mit einem universellen Primerpaar amplifiziert werden. Das variable Längenfragment der zweiten Sonde erlaubt die größenmäßige Zuordnung der einzelnen Amplifikationsprodukte nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung. Dosisunterschiede sind durch Reduktion oder Vergrößerung der Peakhöhen und Peakflächen erkennbar (siehe Abbildungen 3 und 4). Fehlt im Rahmen einer Deletion die Zielsequenz auf einem Chromosom, so ist die Peakhöhe des Fragments im Vergleich zur Kontrolle um ca. 50 % verringert. Eine Duplikation wird durch eine 50% Zunahme dieses Abschnittes in der Elektrophorese sichtbar.



**Abb. 3:** MLPA-Analyse Patient A13.

Es fanden sich zwei große Deletionen im FANCA-Gen (ex9del und ex21-28del), für die der Patient compound-heterozygot ist.



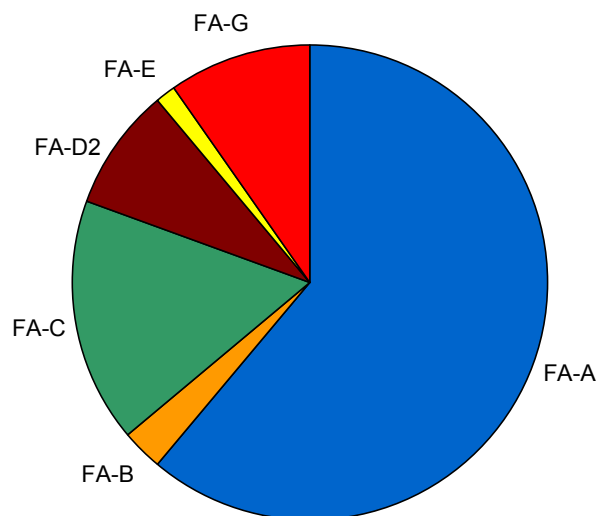
**Abb. 4:** MLPA-Analyse Patient A14.  
Das Exon 3 des FANCA-Gens ließ sich nicht amplifizieren. Es liegt somit eine homozygote Deletion von Exon 3 vor.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Komplementationsgruppen und Mutationen

Es wurden die Akten der Fanconi Anämie-Patienten des Humangenetischen Instituts Würzburg ausgewertet. Dabei wurden 72 Patienten gefunden, die erfolgreich einer Komplementationsgruppe zugeordnet wurden. Die Klassifikation ergab, dass 44 Patienten der Gruppe FA-A (61%) angehören, 2 Patienten der Gruppe FA-B (3%), 12 Patienten der Gruppe FA-C (17%), 6 Patienten der Gruppe FA-D2 (8%), 1 Patient der Gruppe FA-E (2%) sowie 7 Patienten der Gruppe FA-G (10%).

Abbildung 5 zeigt die mengenmäßige Verteilung der Komplementationsgruppen.



**Abb. 5:** Verteilung der Komplementationsgruppen

Bei insgesamt 45 Patienten (darunter 22 x FA-A, 2 x FA-B, 12 x FA-C, 4 x FA-D2, 1 x FA-E und 4 x FA-G) konnte mindestens eine der zugrunde liegenden Mutationen identifiziert werden. Dies entspricht 63% der untersuchten Patienten. Dabei fand sich in den Komplementationsgruppen FA-A und FA-C jeweils ein Geschwisterpaar (A11+A12, C1+C2). Bei zwei Patienten der Komplementationsgruppe FA-A (A1 und A20) wurde bislang nur die Mutation

eines Allels entdeckt. Alle ermittelten Mutationen und deren Auswirkung auf Proteinebene sind in Tabelle 2 aufgelistet. Bei 20 Patienten lag eine homozygote Mutation vor; 25 Patienten waren compound heterozygot.

**Tab. 2:** Identifizierte Mutationen innerhalb der 72 FA-Patienten und deren Effekte

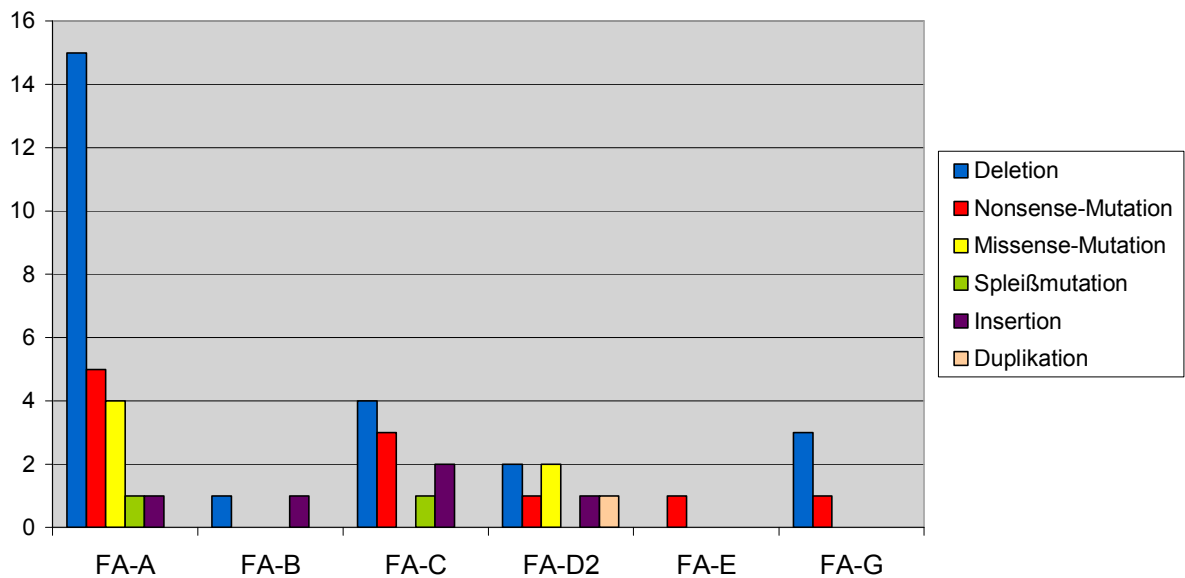
Gruppe/ Patient	Mutation	Konsequenz der Mutation	Literatur
<b>FANCA</b>			
A1	ex43del NF	Deletion	÷
A7	c.3788_3790delTCT c.3788_3790delTCT	p.F1263del p.F1263del	Levrant et al. (1997) Levrant et al. (1997)
A8	ex16_17del c.3788_3790delTCT	Deletion p.F1263del	FAB Consortium (1996) Levrant et al. (1997)
A9	c.2894_2895delCT c.2894_2895delCT	p.P965RfsX998 p.P695RfsX998	÷ ÷
A11	c.1360_1826del467 c.3788_3790delTCT	Deletion p.F1263del	÷ Levrant et al. (1997)
A12	c.1360_1826del467 c.3788_3790delTCT	Deletion p.F1263del	÷ Levrant et al. (1997)
A13	ex9del ex21_28del	Deletion Deletion	÷ ÷
A14	ex3del ex3del	Deletion Deletion	÷ ÷
A15	ex22_30del ex22_30del	Deletion Deletion	÷ ÷
A17	c.3791_3793delCCT c.3919C>T	p.S1264del p.Q1306	÷ ÷
A19	c.1267C>T c.1267C>T	p.Q423X p.Q423X	÷ ÷
A20	c.2840C>G NF	p.S947X	Levrant et al. (1997)
A21	c.2982_3066del c.2982_3066del	Deletion Deletion	Wijker et al. (1998) Wijker et al. (1998)
A22	c.1115_1118delTTGG ex16_17del	Frameshift Deletion	FAB Consortium (1996) FAB Consortium (1996)
A26	c.3788_3790delTCT c.3490C>T	p.F1263del p.P1164S	Levrant et al. (1997) ÷
A27	c.1115_1118delTTGG ex19_21del	Frameshift Deletion	FAB Consortium (1996) ÷
A28	c.4199G>C IVS 23+2insG	p.R1400P Spleißmutation	÷ ÷
A30	c.2787C>A ex4_5del	p.Y929X Deletion	÷ Ameziane et al. (2008)
A31	c.3239G>A c.3348+1G>A	p.R1080Q Spleißmutation	÷ ÷
A34	ex1_2del ex1_2del	Deletion Deletion	÷ ÷
A39	ex1_2del ex1_2del	Deletion Deletion	÷ ÷
A40	c.1230G>A c.1549C>T	p.W410X p.R517W	Huck et al. (2006) Huck et al. (2006)

Tab. 2: Fortsetzung der Tabelle

Gruppe/ Patient	Mutation	Konsequenz der Mutation	Literatur
<b>FANCB</b>			
B1	c.1497-3insC	Frameshift	÷
B2	c.246_247delGT	p.S83CfsX13	÷
<b>FANCC</b>			
C1	c.165+1G>T (IVS1+1G>T) c.165+1G>T (IVS1+1G>T)	Spleißmutation Spleißmutation	÷ ÷
C2	c.165+1G>T (IVS1+1G>T) c.165+1G>T (IVS1+1G>T)	Spleißmutation Spleißmutation	÷ ÷
C3	c.377_378delGA c.377_378delGA	p.R126lfsX1 p.R126lfsX1	÷ ÷
C4	c.553C>T c.1642C>T	p.R185X p.R548X	Gibson et al. (1993) Murer-Orlando et al. (1993)
C5	c.67delG c.67delG	p.D23lfsX45 p.D23lfsX45	Strathdee et al. (1992) Strathdee et al. (1992)
C6	c.454_455delAA c.454_455delAA	p.V152fsX159 p.V152fsX159	÷ ÷
C7	c.67delG c.456insA	p.D23lfsX45 p.N152X	Strathdee et al. (1992) ÷
C8	c.67delG c.470T>A	p.D23lfsX45 p.L157X	Strathdee et al. (1992) ÷
C9	c.1642C>T c.1642C>T	p.R548X p.R548X	Murer-Orlando et al. (1993) Murer-Orlando et al. (1993)
C10	c.67delG c.1387_1388delTC	p.D23lfsX45 p.P464fsX516	Strathdee et al. (1992) ÷
C11	c.67delG c.67delG	p.D23lfsX45 p.D23lfsX45	Strathdee et al. (1992) Strathdee et al. (1992)
C12	c.67delG c.727insCT	p.D23lfsX45	Strathdee et al. (1992)
<b>FANCD2</b>			
D21	c.2975A>G c.2975A>G	Exon 30 skip Exon 30 skip	÷
D22	c.3707G>A c.2835dupC	p.H1229EfsX7 p.D947RfsX3	Timmers et al. (2001) Kalb et al. (2007)
D23	c.3453_3456delCAA c.274-57_-56insinvAluYb8nt36_319 +dup c.274-69_-57	p.N1151KfsX46 p.I92YfsX7	Kalb et al. (2007) Kalb et al. (2007)
D24	c.1948-6C>A (IVS21-6C>A) c.2775_2776CC>TT	p.E650X p.R926X	Kalb et al. (2007) Kalb et al. (2007)
<b>FANCE</b>			
E1	c.265C>T c.265C>T	p.R89X p.R89X	÷ ÷
<b>FANCG</b>			
G1	c.1649delC c.1649delC	p.T550I+7X p.T550I+7X	Demuth et al. (2000) Demuth et al. (2000)
G2	c.620delT c.620delT	p.L207PfsX1 p.L207PfsX1	Ameziane et al. (2008) Ameziane et al. (2008)
G4	c.313G>T c.1473delA	p.E105X p.E492NfsX517	de Winter et al. (1998) ÷
G7	c.313G>T c.313G>T	p.E105X p.E105X	de Winter et al. (1998) de Winter et al. (1998)

NF = Mutation nicht gefunden; ÷ = Mutation bisher nirgends erwähnt

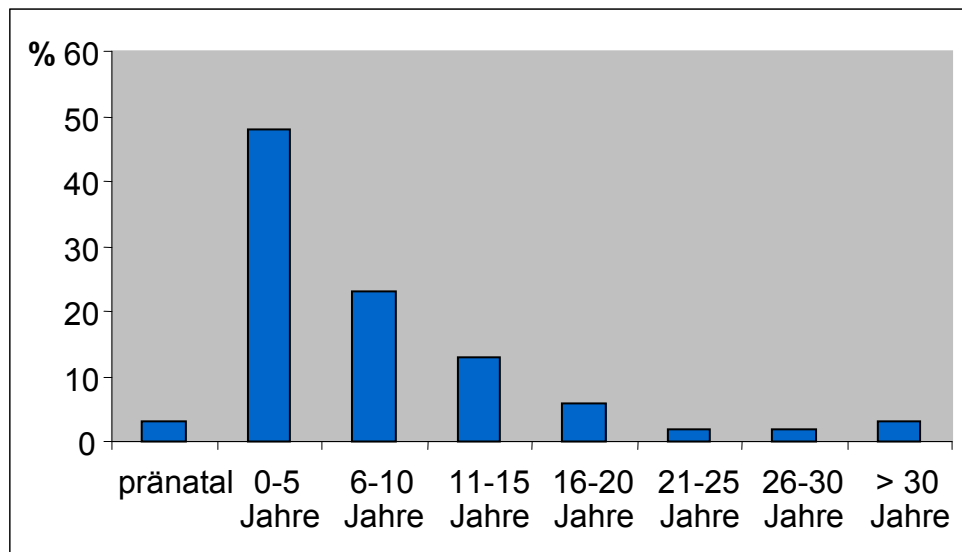
Es konnten insgesamt 50 verschiedene Mutationen identifiziert werden, von denen 20 Mutationen bereits in der Literatur erwähnt wurden. Im FANCA-Gen wurden 26 verschiedene Mutationen gefunden, 2 in FANCB, 10 in FANCC, 7 in FANCD2, 1 in FANCE und 4 in FANCG. Dabei können die Mutationen in sechs Gruppen unterteilt werden: Deletion, Nonsense-Mutation, Missense-Mutation, Spleißmutation, Insertion und Duplikation. Die Häufigkeit der verschiedenen Mutationen innerhalb der einzelnen Komplementationsgruppen ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abb. 6:** Verteilung der Mutationen innerhalb der Komplementationsgruppen

### 3.2 Beispielhafte Kasuistiken

Die Geschlechtsverteilung der untersuchten Patienten ergab 31 (43%) weibliche und 41 (57%) männliche Patienten. Das Alter bei der Erstdiagnose der Fanconi Anämie lag zwischen 19 Schwangerschaftswochen (SSW) und 49 Jahren. Bei fast der Hälfte der Patienten (48%) wurde die FA in den ersten 5 Lebensjahren diagnostiziert (siehe Abbildung 7).



**Abb.7:** Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

Im Folgenden sind exemplarisch die Krankheitsverläufe einiger Patienten dargestellt, welche den jeweiligen Komplementationsgruppen zugeordnet wurden und bei denen zum Großteil die ursächlichen Mutationen definiert werden konnten.

Kriterien der Zuordnung zu einem leichten oder schweren Verlauf der Erkrankung beruhen vor allem auf dem Alter der Patienten beim Auftreten einer aplastischen Anämie, der Lebenserwartung nach dem Zeitpunkt der Diagnosestellung, sowie auf dem Zeitpunkt und der Häufigkeit des Auftretens von MDS und/oder AML.

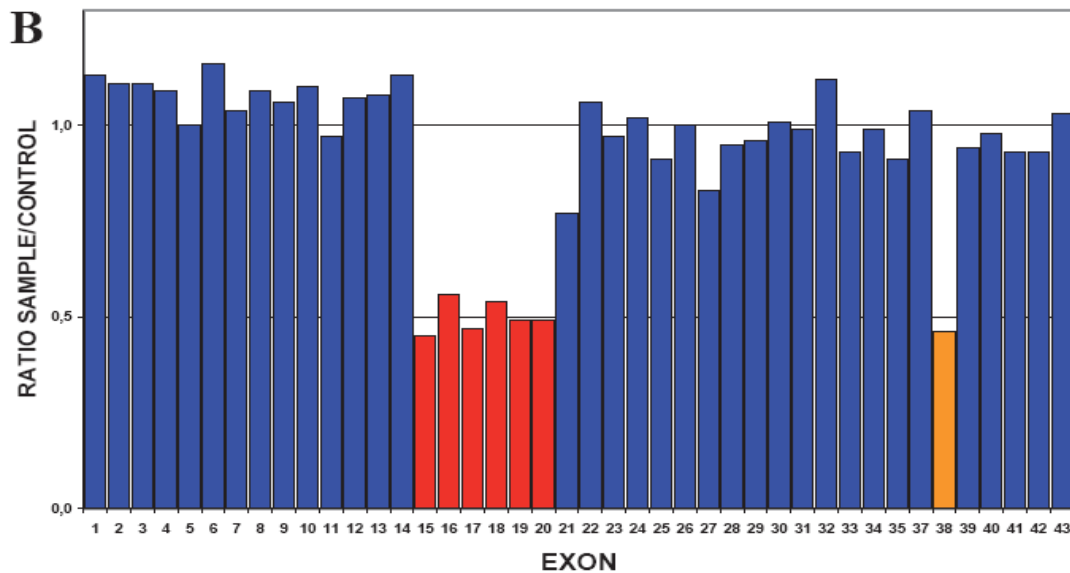
### 3.2.1 Komplementationsgruppe FA-A

#### Patientinnen A11 und A12

Bei den Patientinnen A11 und A12 handelt es sich um Schwestern nicht-konsanguiner Eltern. Sie gehörten beide der Komplementationsgruppe FA-A an und waren compound heterozygote Träger der Mutationen c.1360\_1826del467 in Exon 15-20 und c.3788\_3790delTCT (p.F1263del) in Exon 38 (siehe Abbildung 8).



Beide Schwestern wurden mit ähnlichem Gewicht (2.500g und 2.200g), Größe (46cm und 47cm) und Kopfumfang (32,5cm und 31cm) geboren. Insgesamt war der Phänotyp der Schwestern mit Minderwuchs, moderatem Mikrocephalus, Daumenhypoplasie und Café-au-lait-Flecken relativ mild ausgeprägt.



**Abb. 8:** MLPA-Analyse der Patientinnen A11 und A12  
Es fanden sich Deletionen in Exon 15-20 (c.1360\_1826del467) und Exon 38 (c.3788\_3790delTCT)

Der Krankheitsverlauf der Patientin A11 war schwer und geprägt von wiederholten lebensbedrohlichen Episoden mit Nasenbluten, einer sehr schweren Panzytopenie, die frühzeitig zu lebenslanger Transfusionsabhängigkeit führte sowie rezidivierenden Infektionen, die Antibiotika-Therapien und eine ab dem 15. Lebensjahr regelmäßige Behandlung mit G-CSF bedurften. Im Alter von 5 ½ Jahren entwickelte sich eine aplastische Anämie mit Panzytopenie. Eine dreimonatige Corticosteroid-Monotherapie zeigte nur einen partiellen Effekt, der ausschließlich die Granulopoese betraf. Man begann mit der Gabe von Erythrozytenkonzentraten (EK). Mit 7 Jahren wurde mittels Chromosomenbruchanalyse die FA diagnostiziert. Ein halbes Jahr später begann man eine Behandlung mit Androgenen, zunächst als Monotherapie, nach einigen Monaten in Kombination mit niedrig dosierten Corticosteroiden. Unter dieser Therapie kam es zu einem partiellen Ansprechen aller Zellreihen, so dass für 12 Monate kein Transfusionsbedarf bestand. Nach einer

Windpockeninfektion im Alter von 9 Jahren kam es zu einem Einbruch der Hämatopoese und erneuter Notwendigkeit für Transfusionen. Da sich unter der Androgentherapie eine Vielzahl von Leberadenomen entwickelt hatte, musste diese auf eine Minimaldosis reduziert werden. Mit 15 Jahren begann man, bei Neutrophilen-Werten  $< 500/\mu\text{l}$ , zusätzlich mit der Gabe von G-CSF. Seit dieser Zeit waren in den Knochenmarkpunktionen zytogenetische Aberrationen nachweisbar. Es zeigte sich das Bild eines MDS vom Subtyp der RARS (refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten). Im Alter von 19 Jahren kam es vorübergehend zu einer spontanen Stabilisierung der Erythropoese, so dass für 1 ½ Jahre keine Transfusionen erforderlich waren. In der Folge kam es wieder zu einer deutlichen hämatologischen Verschlechterung mit Hepatosplenomegalie, Fieber, LDH-Anstieg und einer fraglichen Hämolyse. Insgesamt erhielt die Patientin mehr als 700 Transfusionen, davon ca. 300 Erythrozyten- und 400 Thrombozytenkonzentrate (TK). Im Alter von 21 Jahren starb die Patientin an Multiorganversagen infolge der irreversiblen Panzytopenie.

Die jüngere Schwester, Patientin A12, zeigte einen viel milderen Verlauf. Aufgrund der bei der Schwester diagnostizierten Erkrankung, wurde hier im Alter von 2 Jahren ebenfalls eine zellanalytische Untersuchung durchgeführt und eine FA festgestellt. Mit 8 Jahren, ehe eine Transfusionsbedürftigkeit einsetzte, begann man eine Androgentherapie. Nach 2 Jahren wurde das Oxymetholon schrittweise über einen Zeitraum von mehreren Jahren bis auf eine Erhaltungsdosis von 0,1mg/kg/d reduziert. Außer einer Virilinisierung traten keine schweren Komplikationen (v.a. Leberadenome) auf. Eine bis zum 19. Lebensjahr suffiziente Knochenmarkfunktion ließ die Patientin ein normales und aktives Leben führen. Schwere Blutungen und Infektionen traten nur vereinzelt auf. Mit 19 Jahren verschlechterten sich die Blutwerte und führten schließlich zu einer Transfusionsabhängigkeit für Erythrozyten. Es wurden insgesamt ca. 15 EK verabreicht. Zur gleichen Zeit stellte man im Knochenmark zytogenetische Aberrationen im Sinne einer Monosomie 7 fest. Man entschloss sich zu einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT). Im Alter von 20 Jahren

erlag die Patientin den Komplikationen (schwere Infektionen und Hirnblutung) der Fremdspendertransplantation (Dietrich et al., 2007).

### **Patientin A40**

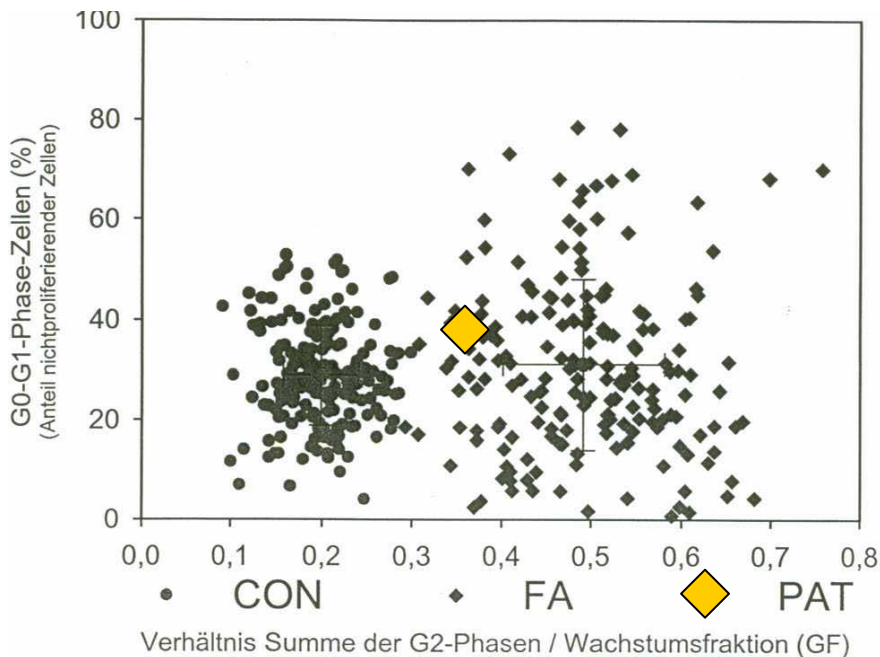
Die 155cm große Patientin hatte keinerlei Fehlbildungen. In der Familienanamnese fielen vermehrte Tumorerkrankungen auf: Ihre Mutter starb an einem Ösophaguskarzinom; bei ihrer Tochter wurde im Alter von 5 Jahren ein Medulloblastom diagnostiziert.

Nachdem Kindheit und Jugend unauffällig verliefen, wurde bei der Patientin im Alter von 23 Jahren erstmals eine Leukozytopenie mit Werten von 1.600-2.400/ $\mu$ l festgestellt (vgl. Tabelle 3). Sie zeigte eine vermehrte Infektanfälligkeit des oberen und unteren Respirationstrakts, die gelegentlich eine antibiotische Therapie erforderlich machte. 10 Jahre später kam es zusätzlich zu einer Thrombozytopenie. Die darauf folgende Untersuchung des Knochenmarks blieb unauffällig. Im Alter von 37 Jahren erkrankte die Patientin an einem rechtsseitigen Mammakarzinom. Die operative Entfernung des Tumors und adjuvante Bestrahlung mit 60 Gy verkräftete sie mit stabilen, wenn auch erniedrigten Leuko- und Thrombozytenzahlen. Mit 45 Jahren kam es zur Diagnose eines Mammakarzinoms der linken Brust. In Anbetracht der reduzierten Blutwerte wurde abermals eine Knochenmarkbiopsie durchgeführt. Diese zeigte uncharakteristische reaktive Veränderungen, die nicht als Kontraindikation für eine Chemotherapie gewertet wurden. Nach dem ersten Zyklus der Therapie mit Cyclophosphamid, Methotrexal und 5-Fluorouracil reagierte die Patientin mit einer schweren Organtoxizität und einer lang anhaltenden aplastischen Anämie. Über einen Zeitraum von fünf Monaten wurde sie mit G-CSF-Transfusionen und Thrombozytenkonzentraten behandelt, bis sich ihre Blutwerte wieder stabilisiert hatten (Thrombozyten  $>20.000/\mu$ l, Leukozyten  $>2.000/\mu$ l). Anschließend erfolgte eine Bestrahlung des Brustgewebes. Nach 13 Jahren persistierender, jedoch nicht transfusionsbedürftiger Zytopenie kam es mit 49 Jahren zu einer auffallenden Verschlechterung des Blutbildes mit stetig sinkenden Zellzahlen.

**Tab. 3:** Blutwerte der Patientin A40

	Hb (g/dl)	Leukozyten (/ $\mu$ l)	Thrombozyten (/ $\mu$ l)
1977 (23 Jahre)		1.600-2.400	
15.04.2004 (49 J.)	8,6	700	17.000
27.04.2004 (49 J.)	11,1	700	15.000
28.06.2004 (49 J.)	9,5	1.000	11.000

Eine erneute Knochenmarkbiopsie zeigte ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) vom Typ RAEB II mit Monosomie 7. Angesichts der lang bestehenden Leuko- und Thrombozytopenie, des bilateralen Auftretens eines Mammakarzinoms, der Überempfindlichkeit gegenüber der Chemotherapie und der Entwicklung eines MDS wurden weiterführende genetische Tests in Würzburg eingeleitet. Das Ergebnis der zellanalytischen Untersuchung, dargestellt in Abbildung 9, bestätigte die klinische Verdachtsdiagnose Fanconi Anämie.

**Abb. 9:** Zellzyklusanalyse der Patientin A40

Die proliferierenden Zellen zeigen eine gesteigerte spontane G2-Phasen-Akkumulation (orange Markierung). Die Auswertung der Ratio  $\sum G2/GF$  (Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion) ergab mit 0,35 einen Wert im unteren Bereich anderer Personen mit Fanconi Anämie.

Die Patientin konnte der Komplementationsgruppe FA-A zugeordnet werden. Die Mutationsanalyse zeigte die Nonsense-Mutation c.1230G>A (p.W410X) in Exon 14 sowie die Missense-Mutation c.1549C>T (p.R517W) in Exon 16.

Einige Wochen nach der Diagnosestellung entwickelte die Patientin eine sekundäre AML. Nach umfassenden Überlegungen entschied sie sich für eine hämatopoetische Stammzelltransplantation. Hierbei kam es im weiteren Verlauf zu verschiedenen Komplikationen, wie eine GvHD III° des Gastrointestinaltraktes, venöse Verschlüsse der Leber, mehrere Polioma-Virus-Infektionen der Harnblase, Blutungen aufgrund HLA-Antikörper gegen Thrombozyten (entstanden durch frühere, vor der Transplantation durchgeführte Transfusionen). 58 Tage nach der Transplantation verstarb die Patientin infolge einer beiderseitigen Pneumonie und intrazerebralen Läsionen (verdächtig auf Aspergillus-Infiltrationen) (Huck et al., 2006).

### **Patient A43**

Der Patient A43 war das zweite Kind konsanguiner türkisch-stämmiger Eltern (Vetter und Cousine 2.Grades). Neben einer 4 Jahre älteren gesunden Schwester, gab es eine 2 Jahre jüngere Schwester, die ebenfalls an FA litt.

Im Alter von 3 Jahren fiel der Junge erstmals durch eine Thrombozytopenie im Rahmen einer Sepsis auf. Zwei Jahre später wurde mittels Chromosomenbruchanalyse die Diagnose FA bestätigt. Die Bestimmung der Komplementationsgruppe ergab die Zugehörigkeit zu der Gruppe FA-A. Außer einer Mikrophthalmie und Hyperpigmentierungen fand man keine weiteren FA-typischen klinischen Merkmale. Aufgrund der hämatopoetischen Verschlechterung wurde im 6. Lebensjahr mit einer Oxymetholon-Therapie begonnen. Der Junge sprach nur partiell auf die Androgenbehandlung an: Die Retikulozyten stiegen deutlich an, mit einem stabilen Hb um 10 g/dl, die Neutrophilen lagen zwischen 600 - 1.500/µl, die Thrombozyten um 10.000 – 20.000/µl (vgl. Tab.4). Neben einer vorzeitigen Pubertätsentwicklung führte die Oxymetholon-Therapie zur Entwicklung von Leberadenomen, so dass das Medikament nach 4 ½ Jahren abgesetzt werden musste. Die Adenome bildeten sich weitgehend zurück. Es kam jedoch zu einer erneuten Verschlechterung der

Hämatopoese und zu einem Transfusionsbedarf für Erythrozyten. Insgesamt wurden etwa 5 EK verabreicht. Im Alter von 11 Jahren kam es zu einer spontanen Stabilisierung der Hämatopoese. Trotz einer eingeschränkten Stammzellqualität und -quantität und nachgewiesenen zytogenetischen Aberrationen wurde in dieser Zeit eine Asservierung von autologen Stammzellen vorgenommen, um bei einer zu erwartenden Verschlechterung Zellen zur Retransfusion zur Verfügung zu haben. Mit 13 Jahren, also 3 Jahre nach Absetzen der Androgentherapie und 1 ½ Jahre nach der Knochenmarkentnahme, fielen die Thrombozyten im Rahmen eines Infektes unter 10.000/ $\mu$ l, so dass die Gabe von mehreren Thrombozyten- sowie Erythrozytenkonzentraten nötig wurde. Unter einer erneuten Androgentherapie stabilisierte sich die Hämatopoese für etwa 6 Monate. Im Alter von 14 Jahren kam es zu einer erneuten trilineären Verschlechterung. Erstmals fanden sich ca. 10% blastenverdächtige Zellen im peripheren Blut. Eine erneute Knochenmarkpunktion zeigte eine weitere Zunahme der Hypoplasie, eine deutliche Dysplasie der Resthämatopoese und einen Blastenanteil < 30% im Sinne einer RAEB-T (refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation). Die zytogenetischen Veränderungen hatten ebenfalls deutlich zugenommen.

**Tab. 4:** Blutwerte des Patienten A43

	Hb (g/dl)	Leukozyten (/ $\mu$ l)	Neutrophile (/ $\mu$ l)	Thrombozyten (/ $\mu$ l)
1988 (3 J.)				68.000
1990 (5 J.)	9,0	3.200		10.000
1991 (6 J.)	~ 10,0		600 – 1.500	10.000 – 20.000
Mai 1996 (11 J.)	~14.0	2.000 – 3.000	500 – 1.000	> 40.000
Sep. 1998 (13 J.)			< 500	< 10.000
Juni 1999 (14 J.)	8,4 (nach EK)		300	47.000 (nach TK)
Aug. 1999 (14 J.)			< 100	< 10.000
Aug. 1999 (14 J.)	8,6	560	92	4.000
Sep. 1999 (14 J.)		600	70	< 10.000
Feb. 2000 (14 J., nach PBSCT)	14,2	5.800	2.700	128.000

Aufgrund dieser Befunde wurde im Einverständnis der Eltern eine Spendersuche eingeleitet. Da sich erneut eine ausgeprägte Adenomatose der Leber entwickelt hatte, musste die Androgentherapie beendet werden. Trotz therapeutischer Versuche mit Corticosteroiden und G-CSF kam es daraufhin zu einer anhaltenden Verschlechterung der Panzytopenie mit Polytransfusionsbedarf. Unter den Steroiden entwickelte sich eine diabetische Stoffwechsellage. Der 14jährige Patient zeigte nun eine deutliche hämorrhagische Diathese an Haut und Schleimhäuten, septische Zeichen und schmerzhaft Analfissuren. Der Junge war in einem lebensbedrohlich septischen Zustand, so dass, trotz der prinzipiellen Dringlichkeit für eine Transplantation, die Behandlung zunächst aus einer Schmerz- und Antibiotikatherapie, lokaler Versorgung der Analfissuren sowie Kreislaufstabilisierung und Bluts substitution bestand. Bei diabetischer Stoffwechsellage und fehlender hämatopoetischer Wirksamkeit wurden die Steroide abgesetzt, die G-CSF-Gabe aber zunächst beibehalten. Eine erneute Knochenmarkbiopsie ergab ein hypoplastisches MDS mit Übergang in eine AML. Man entschied sich zunächst für die Rücktransfusion der kryokonservierten autologen Knochenmarkzellen. Da es nach der autologen Transplantation immer wieder zu hochfieberhaften Temperaturen kam, wurden zusätzlich insgesamt 5 Transfusionen mit G-CSF-mobilisierten Granulozytenkonzentraten durchgeführt, die zu einem Anstieg der Leuko-, Granulo-, und Monozyten führten. Zur Vorbereitung auf die allogene, unverwandte periphere Blutstammzelltransplantation (PBSCT) wurde ein „low-risk“ Konditionierungsschema gewählt. Post transplantationem traten kaum Komplikationen auf. Die hämatopoetische Regeneration verlief zügig. Es kam sehr schnell zu einem kompletten Spenderchimärismus und zum Verschwinden des FA-Phänotyps sowie der malignen klonalen Entwicklung. Zwei Monate nach der Transplantation kam es zu einer graduellen Verschlechterung von Granulo- und Thrombopoese, die retrospektiv durch eine Zytomegalie-Reaktivierung erklärt wurde. Sehr verzögert kam es zu einer akuten GvH-Reaktion I°. Eine milde, 4 Monate nach der Transplantation einsetzende, chronische GvH-Reaktion führte zu einer nochmaligen Gabe von Corticosteroiden. Der Patient konnte letztlich nach 5 Monaten in bestem Zustand aus der stationären Behandlung entlassen werden.

### 3.2.2 Komplementationsgruppe FA-B

#### Patient B2

B2 war das zweite Kind einer Geminigravidität. Aufgrund auffälliger Ultraschallbefunde während der Schwangerschaft, bei dem sich ein Zwilling normotroph und ohne weitere Auffälligkeiten darstellte, der andere Zwilling jedoch symmetrisch im Wachstum retardiert erschien und eine radio-ulnare Meromelie zeigte, wurde eine Amniozentese durchgeführt. Die Mutter berichtete zusätzlich, dass eine Tante mütterlicherseits ein Kind (männlich) verloren habe, bei dem eine Fanconi Anämie diagnostiziert worden sei.

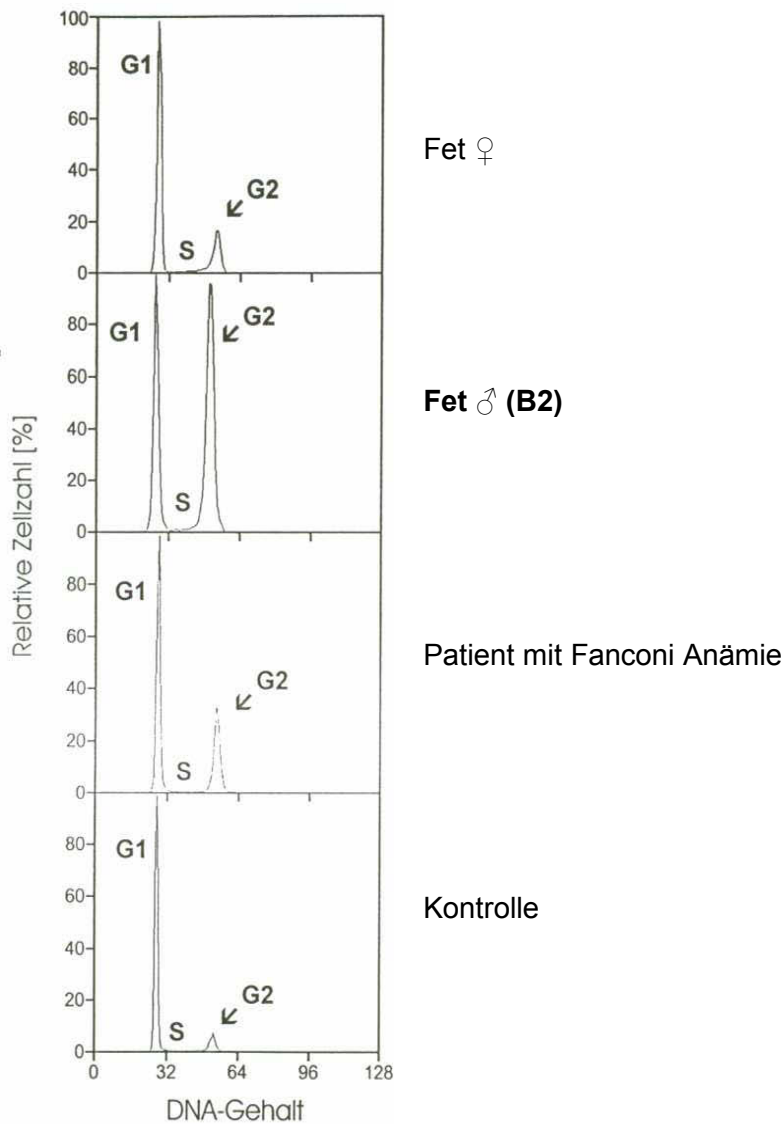
Die genetische Untersuchung der Amnionzellkulturen, dargestellt in Tab.5 und Abb.10, ergab einen normalen Befund des weiblichen Zwillings und eine eindeutige Zuordnung zum zellulären FA-Phänotyp des männlichen Zwillings, was die Verdachtsdiagnose Fanconi Anämie bestätigte. Durch retrovirale Vektoranalyse konnte man B2 der Komplementationsgruppe FA-B zuordnen. Dies stand im Einklang mit dem X-chromosomalen Erbgang in dieser Familie. In der Mutationsanalyse fand man im Exon 3 die Duplikation c.246\_247dupTG (p.S83CfsX13).

In Anbetracht eines steigenden CRP-Wertes bei der Mutter und Verdacht auf eine Amnioninfektion wurde in der 26+4 SSW eine Sectio caesarea durchgeführt. Bei der Geburt wog der betroffene Zwillingsjunge nur 400 g bei einer Größe von 29 cm und einem Kopfumfang von 21 cm. Der APGAR lag bei 3/4/4, mit einer Herzfrequenz <100/min und fehlender Spontanatmung. Das Kind war hypoton und bewegungslos und wies eine große Anzahl von Fehlbildungen auf. Der Untersuchungsbefund ergab eine Dysmelie (die distalen 2/3 der Unterarme fehlten) mit rudimentärer Anlage beider Hände und beiderseits kontrakten Oberarmanlagen. Des Weiteren zeigte sich eine dysmorphe Rachen- und Gaumenanlage sowie jeweils beidseitig eine Choanalatresie, Anotie und rudimentär angelegte Ohrmuscheln. Epiglottis und Glottis konnten nicht dargestellt werden. Die Nabelarterie war nur singulär angelegt. Darüber hinaus waren Mikrocephalie, Retrognathie sowie eine retrahierte Zunge auffällig. Die untere Körperhälfte war deutlich hypotroph.



**Tab. 5:** Durchflusszytometrie des Patienten B2

Zellen		G1-Phase	S-Phase	G2/M-Phase
Kontrolle	mit MMC	87,1%	1,7%	11,2%
Fet ♀	mit MMC	73,2%	8,0%	18,8%
<b>Fet ♂ (B2)</b>	<b>mit MMC</b>	<b>37,0%</b>	<b>6,7%</b>	<b>56,3%</b>
FA-Patient	mit MMC	60,5%	6,6%	32,9%



**Abb. 10:** Durchflusszytometrie des Patienten B2

Es findet sich eine überproportional starke G2-Phasenzunahme bei der Kultur des männlichen Feten B2. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Fanconi Anämie.

Für die Amnionzellkultur des weiblichen Feten zeigt sich das Ergebnis einer normalen Kontrollkultur. Zum Vergleich ist das typische Ergebnis einer normalen Kontrollkultur und eines FA-Patienten gezeigt.

In der Abdomen-Sonographie waren retrovesikal keine Ureteren darstellbar, rechts bestand eine Nierenagenesie, die Leber zeigte echoreiche, kleinfleckige Veränderungen. In der sonographischen Untersuchung des Schädels waren eine beidseits symmetrische Ventrikulomegalie wie auch kommunizierende Seitenventrikel im Vorderhornbereich und eine Balkenagenesie zu sehen. Eine Gyrierung war nicht darstellbar. Die Messung der Parenchyndicke ergab einen Wert  $<1\text{cm}$ . In der Gesamtheit passte der cerebrale Befund zur Diagnose einer Holoprosenzephalie. Die Echokardiographie zeigte ein großes persistierendes Foramen ovale (PFO).

Da aufgrund der ausgeprägten orofacialen Fehlbildungen keine Intubation durchgeführt werden konnte und die komplexen Anomalien mit einem Überleben nicht vereinbar waren, entschieden sich Eltern und Ärzte für eine palliative Versorgung des Kindes mit ausreichender Analgesie und Sauerstoffgabe. Im Beisein der Eltern wurde eine Nottaufe durchgeführt. Der Junge verstarb im Alter von 2 Stunden an Herz-Kreislaufversagen.

### **3.2.3 Komplementationsgruppe FA-C**

#### **Patient C3**

Nach einer normalen Schwangerschaft wurde der Patient C3 in der 36. SSW mit einem Geburtsgewicht von 1.955 g, einer Länge von 54 cm und einem Kopfumfang von 30,4 cm geboren. Der APGAR war 8/9/10. Bis auf rezidivierende Otitiden und häufigere Infekte der oberen Luftwege war der Junge gesund und entwickelte sich altersentsprechend. An besonderen körperlichen Merkmalen zeigte er Kleinwuchs, Mikrocephalie, multiple Café-au-lait-Flecken, einen Sinus pilonidalis sowie einen beiderseitigen Kryptorchismus. Im Alter von knapp 5 Jahren fielen bei mehrmaligen Blutbildkontrollen im Rahmen einer beidseitigen Otitis media, die unter antibiotischer Therapie nur zögerlich rückläufig war, eine Leuko- und Thrombozytopenie auf. Aufgrund der besonderen Familienanamnese, die die Konsanguinität der Eltern (Cousin-Cousinen-Ehe) wie auch zwei an akuter Leukämie im Alter von 2 und 5 Jahren

verstorbene Geschwister beinhaltete, bestand der Verdacht auf eine familiäre hämatologische Erkrankung. Es wurde eine Knochenmarkpunktion veranlasst. Hierbei ergab sich das Bild einer refraktären Anämie mit Blastenexzess an der Grenze zur Transformation. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchung konnte die Diagnose FA bestätigt und der Patient anschließend der Komplementationsgruppe FA-C zugeordnet werden. Es fand sich im Exon 4 homozygot die Mutation c.377\_378delGA, die zu einer Verschiebung des Leserasters und vorzeitiger Termination der Translation führt (p.R125IfsX1). Da bei dem Jungen die Indikation zu einer allogenen Blutstammzelltransplantation gegeben war und in der Familie kein passender Spender zur Verfügung stand, wurde eine Fremdspendersuche initiiert.

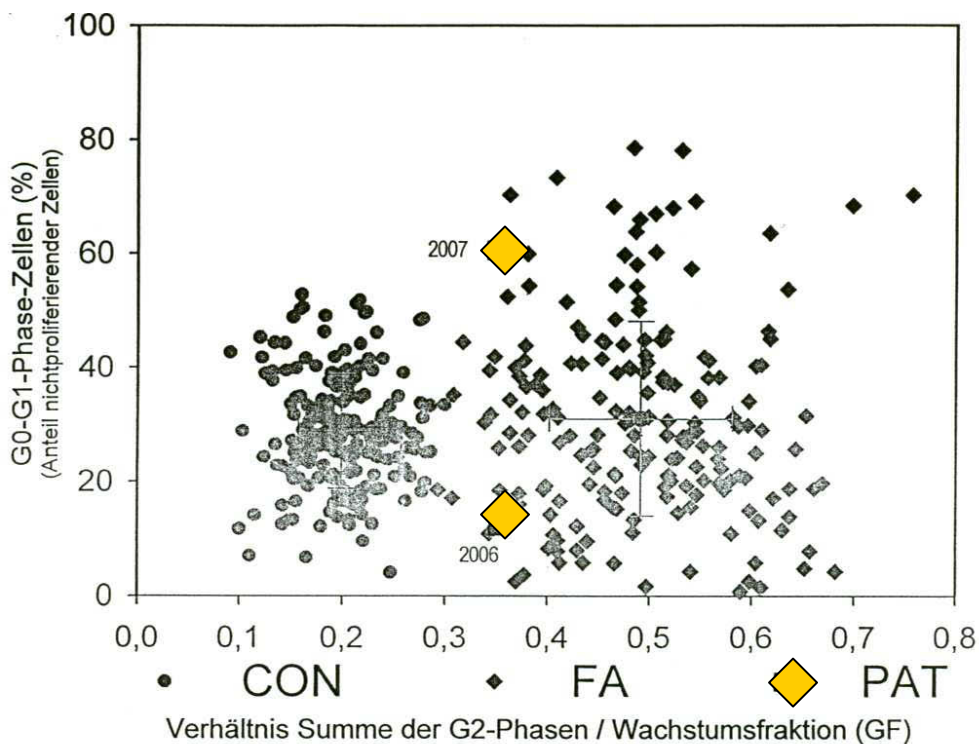
### Patientin C7

Die Patientin C7 war das einzige Kind einer aus Russland stammenden Familie. Sie kam als Frühgeborenes in der 32. SSW durch Spontangeburt mit einem Geburtsgewicht von 1.800 g zur Welt. Die postnatale und weitere Entwicklung verlief ohne Komplikationen und altersentsprechend. Bereits im Alter von 5 Jahren war eine Thrombozytopenie aufgefallen. Eine Knochenmarkzytologie zeigte eine deutlich verminderte Megakaryozytenzahl. Dies bestätigte sich bei einer erneuten, 3 Jahre später durchgeführten Knochenmarkpunktion, worauf die Diagnose einer kongenitalen hereditären Thrombozytopenie gestellt wurde. Die seitdem regelmäßig erfolgten Blutbildkontrollen zeigten Thrombozytenwerte um 30.000/ $\mu$ l. Ein Maximum von 69.000/ $\mu$ l wurde im Alter von 9 Jahren gemessen. Im übrigen Blutbild ergaben sich stets unauffällige Werte (vgl. Tab. 6).

**Tab. 6:** Blutwerte der Patientin C7

	Hb g/dl	Leukozyten (/ $\mu$ l)	Thrombozyten (/ $\mu$ l)
2000 (9 Jahre)			69.000
08.12.2005 (14 J.)	11,6	3.500	45.000
09.01.2006 (14 J.)	11,9	4.500	31.000
25.01.2006 (14 J.)	11,4	3.900	43.000
28.03.2006 (14 J.)	11,5	3.700	28.000

Die physische Belastbarkeit war nicht eingeschränkt; die Patientin zeigte weder eine erhöhte Infektanfälligkeit noch Blutungen. Besondere phänotypische Merkmale waren die geringe Körpergröße (< 3. Perzentile), Pigmentierungsstörungen mit zahlreichen Café-au-lait-Flecken und axillärem Freckling sowie eine Beckenriere auf der linken Seite. Zur Abklärung der isolierten Thrombozytopenie stellte sich die Patientin im Alter von 14 Jahren in der Universitätsklinik Münster vor, wo man aufgrund der oben genannten Begleitsymptome die Verdachtsdiagnose Fanconi Anämie stellte. Diese konnte mit Hilfe einer zellanalytischen Untersuchung (siehe Abb. 11) bestätigt werden.



**Abb. 11:** Zellzyklusanalyse der Patientin C7

Sowohl im Jahr 2006 als auch bei der Verlaufsuntersuchung 2007 zeigte sich eine spontane Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase. Die Ratio  $\sum G2/GF$  ergibt mit 0,35 einen Wert im unteren Bereich anderer FA-Patienten. Es liegt kein Hinweis auf eine Mosaikbildung im hämatopoetischen System vor.

Es erfolgte die Zuordnung zur Komplementationsgruppe FA-C, sowie die Identifizierung der zugrunde liegenden Mutationen c.67delG (p.D23IfsX45) und c.456insA (p.N152X).

**Patient C11**

Mit Ausnahme eines Asthma bronchiale, das seit dem 5. Lebensjahr durchgängig mit Cortison behandelt wurde, verlief die frühe Kindheit des Patienten C11 unauffällig. Der Junge zeigte bis auf eine Hufeisenniere keinerlei körperliche Fehlbildungen. Im Alter von 10 Jahren entwickelte sich eine refraktäre transfusionsabhängige Zytopenie, woraufhin die Verdachtsdiagnose MDS gestellt wurde. Eine gleichzeitig durchgeführte zellanalytische Untersuchung revidierte diesen Verdacht und bestätigte das Vorliegen einer Fanconi Anämie. Durch retrovirale Komplementation konnte der Patient der Gruppe FA-C zugeordnet werden. Als zugrunde liegende Mutation fand sich homozygot die 1-bp-Deletion c.67delG (p.D23IfsX45).

Unter einer Androgen-Therapie mit Oxymetholon verbesserte sich die Transfusionsabhängigkeit, bis schließlich bei einer Dosierung von 3x50 mg keine weiteren Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate notwendig waren. Im Verlauf konnte die Medikation reduziert werden. Eine Reduktion auf 50-0-25 mg musste jedoch rückgängig gemacht werden, nachdem es zu einer Thrombozytopenie von 38.000/ $\mu$ l kam. Die Blutwerte stabilisierten sich schließlich wie in der Tabelle 7 dargestellt.

**Tab. 7:** Blutwerte des Patienten C11

	Hb (g/dl)	Leukozyten (/ $\mu$ l)	Thrombozyten (/ $\mu$ l)
Mai 2006 (10 J.)	6,5	2.900	<15.000
21.08.2006 (10 J.)	11,0	2.400	38.000
24.10.2006 (10 J.)	13,5	2.600	39.000
06.03.2007 (10 J.)	12,9	3.700	49.000
02.08.2007 (11 J.)	16,1	4.200	73.000
22.08.2007 (11 J.)			38.000
15.05.2008 (12 J.)	15,1	4.500	86.000

Aufgrund einer erhöhten Infektanfälligkeit der oberen Luftwege benötigte der Junge in den Wintermonaten wiederholt antibiotische Behandlungen. Zum heutigen Zeitpunkt ergab sich erfreulicherweise noch keine Indikation zur

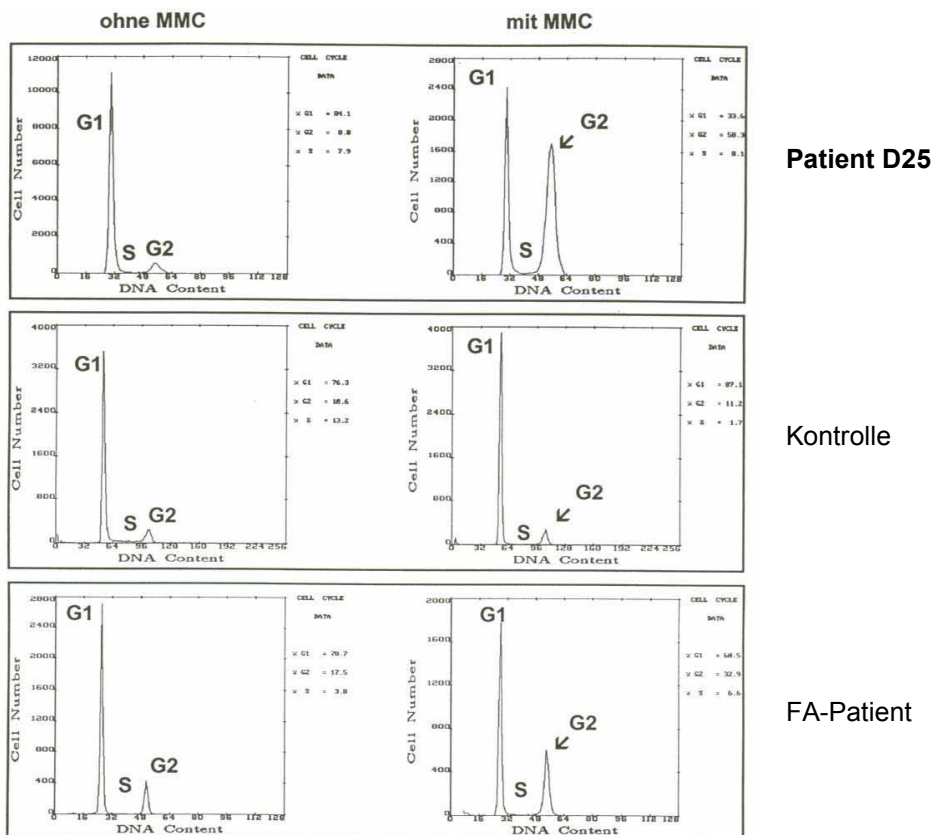
Knochenmarktransplantation. Aktuelle Knochenmarkuntersuchungen zeigten eine zellarme Struktur mit vollständiger Ausreifung zur Erythro-, Granulo- und Megakaryopoese ohne Hinweise auf myeloische oder lymphatische Blasten. Zytogenetische Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf klonale Aberrationen in den Knochenmarkzellen bzw. den mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Als Nebenwirkung der Hormontherapie kam es zu einem akzelerierten Knochenwachstum. Mit einer Körperlänge von 1,65 m liegt der 12jährige Junge über der 97. Perzentile. Die Endkörpergröße wird derzeit auf 188,6 cm prognostiziert. Es besteht außerdem eine ausgeprägte Adipositas (BMI 30,4 kg/m<sup>2</sup>), was für Patienten mit Fanconi Anämie eher ungewöhnlich ist.

### **3.2.4 Komplementationsgruppe FA-D2**

#### **Patient D25**

Der Patient D25 zeigte eine Vielzahl phänotypischer Merkmale. Neben Kleinwüchsigkeit (156 cm im Erwachsenenalter) und Mikrocephalie traten besonders die Fehlbildungen der oberen Extremität hervor. Der Patient zeigte eine beidseitige Daumenaplasie sowie rechts einen aplastischen Radius, aufgrund dessen die rechte Hand in Flexions-Pronationsstellung fixiert war. Auf beiden Seiten bestand eine kongenitale Otosklerose. Des Weiteren eine Nierenaplasie links und eine Beckennierte rechts. Die Testes waren beidseits atrophisch, die Sexualhormone grenzwertig tief. Im Alter von 25 Jahren stellte man eine Cholestase unklarer Genese fest. Eine durchgeführte Leberbiopsie ergab vereinzelte Gallengangsläsionen, eine Cholestase sowie eine Parenchymverfettung unklarer Ätiologie. Mit 32 Jahren wurde eine passagere diabetische Stoffwechsellaage diagnostiziert. Daneben zeigte sich eine Kardiomyopathie unklarer Genese mit diffusen Repolarisationsstörungen und ein, in der transthorakalen Echokardiographie (TTE) sichtbarer, kleiner linker Ventrikel bei ansonsten normaler Anatomie des Herzens. Im selben Jahr entdeckte man am Oberkiefer rechts ein Plattenepithelkarzinom, welches chirurgisch entfernt wurde. In der körperlichen Untersuchung fielen

teleangiektatische Veränderungen sowie trockene, schuppige Haut an Stirn und Gesicht auf. Der mittlerweile 33jährige Patient zeigte eine ausgeprägte BWS-Kyphose und LWS-Lordose. Eine Chromosomenanalyse ergab einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY. Da die Kombination von Fehlbildungen und Entwicklungsstörungen typisch für eine Fanconi Anämie waren, der Patient bisher jedoch keinerlei hämatologische Auffälligkeiten zeigte (Hb 14,5 g/dl, Thrombozyten 258.000/ $\mu$ l, Leukozyten 3.800/ $\mu$ l), konnte von einem Mosaikstatus des Patienten ausgegangen werden. Es wurde eine Diagnostik an einer Fibroblastenkultur (entnommen im Bereich des medialen Oberarms) durchgeführt. Die Zellzyklusverteilungen wurden durchflusszytometrisch bestimmt und ergaben das in Abbildung 12 dargestellte Bild, welches die Verdachtsdiagnose FA bestätigte. Der Patient konnte der Komplementationsgruppe FA-D2 zugeordnet werden.

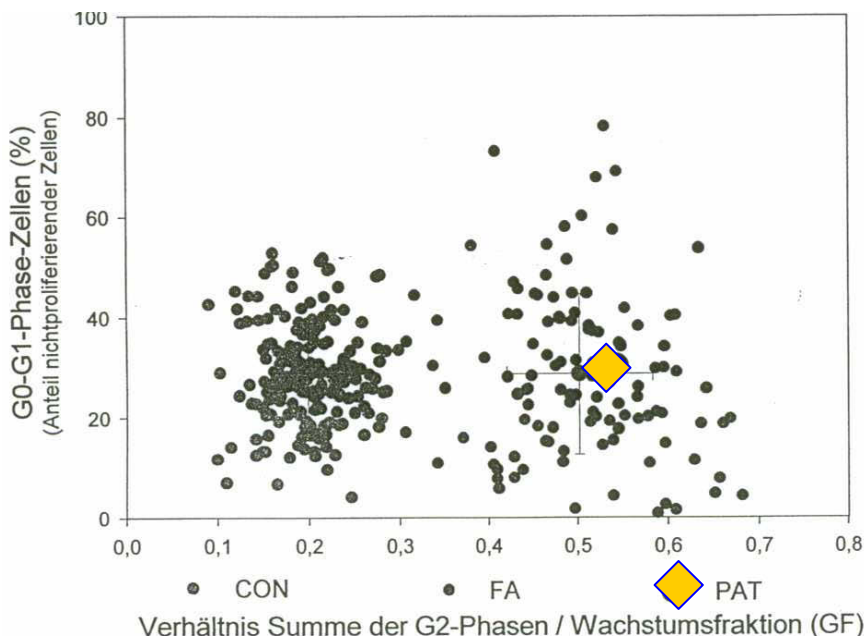


**Abb. 12:** Durchflusszytometrie des Patienten D25  
Die überproportional starke G2-Phasenzunahme der Fibroblastenkultur des Patienten D25 bestätigt die Verdachtsdiagnose FA.

### 3.2.5 Komplementationsgruppe FA-G

#### Patientin G1

Als erstes Kind konsanguiner türkisch-stämmiger Eltern (Cousin/Cousine 1. Grades) wurde die Patientin G1 eine Woche vor dem errechneten Termin mit einem Geburtsgewicht von 2.730 g und einer Körperlänge von 48 cm geboren. Die frühkindliche Entwicklung des Mädchens verlief regelrecht. Nachdem im Alter von fast 4 Jahren gehäuft Hämatome auftraten und das Blutbild eine Thrombozytopenie zeigte, wurde zunächst die Diagnose einer idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP) gestellt. Eine Untersuchung des Knochenmarks zeigte das zellmorphologische Bild eines MDS im Sinne einer refraktären Anämie. Im Alter von 5 ½ Jahren erfolgte mit Hilfe der Zellzyklusanalyse die Erstdiagnose Fanconi Anämie (vgl. Abb.13). Die Komplementationsgruppenbestimmung ergab eine Zuordnung zu der Gruppe FA-G. Es konnte die homozygot vorliegende Deletion c.1649delC (p.T550I+7X) in Exon 13 beschrieben werden.



**Abb. 13:** Zellzyklusanalyse der Patientin G1

Es zeigt sich eine deutliche G2-Phasen-Blockierung der stimulierten Lymphozyten. Die Auswertung der Ratio  $\sum G2/GF$  ergibt mit 0,52 einen Wert im mittleren Bereich anderer FA-Patienten.



Im klinischen Erscheinungsbild fielen nur wenige charakteristische Merkmale auf. Neben einer Daumenhypoplasie und relativer Mikrocephalie zeigte das Mädchen typische Hyperpigmentierungen insbesondere im Halsbereich, sowie Café-au-lait-Flecken am Rücken und linken Arm.

Seit dem 5. Lebensjahr wurden regelmäßige Transfusionen mit Thrombozytenkonzentraten notwendig. Unter einer Androgen-Behandlung mit Oxymetholon kam es nach 6 Monaten zu einer vorübergehenden Stabilisierung der Granulo- und Thrombopoese, so dass für ein halbes Jahr keine Thrombozytengaben notwendig waren. Danach fielen die Thrombozyten- und Granulozytenzahlen erneut ab, was wieder eine Infusionsgabe im Abstand von 1-2 Wochen erforderlich machte. Demgegenüber blieb die Erythropoese mit Hämoglobinwerten von 9-10g/dl relativ stabil. Insgesamt wurden 50 TK verabreicht, während der Erythrozytenbedarf sich lediglich auf ein Konzentrat beschränkte. Wiederholt durchgeführte Knochenmarkuntersuchungen zeigten ein hypoplastisches Mark ohne morphologischen Anhalt für ein myelodysplastisches Syndrom. Nachdem sich die Hämatopoese weiterhin verschlechterte und ein regelmäßiger Transfusionsbedarf bestand, wurde im Alter von 7 Jahren die Indikation zur Knochenmarktransplantation gestellt. Da kein passender Familienspender zur Verfügung stand, wurde eine Fremdspendersuche initiiert und ein kompatibler Spender im nationalen italienischen Register gefunden. Mit 7 ½ Jahren wurde die allogene Stammzelltransplantation durchgeführt. Die Zeit post transplantationem verlief komplikationsarm; es traten lediglich ein flüchtiges, nicht therapiepflichtiges Exanthem im Sinne einer akuten GvHD I°, sowie eine EBV-Infektion mit febrilen Temperaturen und Tonsillitis auf. Nach einem halben Jahr wurde die Patientin mit stabilen Blutwerten und in gutem gesundheitlichen Zustand entlassen.

Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Entwicklung der Blutwerte der Patientin G1.

**Tab. 8:** Blutwerte der Patientin G1

	Hb (g/dl)	Leukozyten (/ $\mu$ l)	Thrombozyten (/ $\mu$ l)
Januar 1999 (3 ½ Jahre)			55.000-65.000
Mai-Dezember 2001 (6 J.)			20.000-30.000
27.08.2002 (7 ½ J.) (vor KMT)	8,6	2.580	<20.000
26.03.2003 (nach KMT)	13,2	5.200	138.000

**Patient G7**

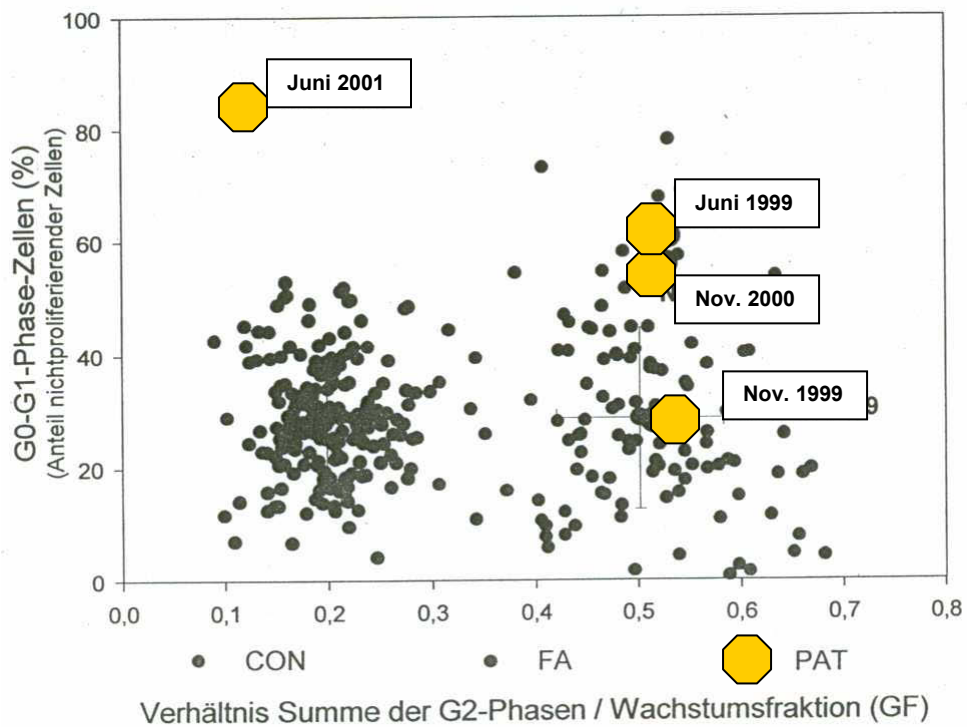
Der Patient G7 wurde in der 37. SSW mit einem Gewicht von 3.060 g und einer Größe von 51 cm geboren. Der Junge zeigte diverse klinische Besonderheiten wie Strabismus konvergens, Mikrophthalmie, eine relative Mikrocephalie, ausgeprägte Pigmentanomalien mit multiplen Café-au-lait-Flecken, eine Hypoplasie des rechten Daumens sowie beidseitige Klinodaktylie und Sandalenfurchen, eine linksseitige Nierenagenesie und rechtsseitig eine Doppelniere. Ein Pankreas anulare, das eine Duodenalstenose verursachte, wurde am 2. Lebenstag chirurgisch korrigiert. Im Alter von 2 ½ Jahren wurde aufgrund der genannten Fehlbildungen die Diagnose Fanconi Anämie gestellt. Ein Jahr später kam es im Rahmen einer Angina zu ersten hämatologischen Auffälligkeiten. Durch die Behandlung mit Androgenen (Primobolan, Oxymetholon) konnte sich die Granulo- und Erythropoese einigermaßen stabilisieren. Dennoch mussten innerhalb eines Jahres 3 Thrombozytenkonzentrate verabreicht werden. Die virilisierenden Nebenwirkungen der Androgentherapie waren erheblich, so dass die Oxymetholon-Dosis schließlich reduziert wurde. In der Folge kam es zu einem regelmäßigen Substitutionsbedarf von Thrombozyten ca. alle 9 Tage. Zusätzlich waren seit diesem Zeitpunkt auch Erythrozytengaben erforderlich. Trotz erneuter Dosissteigerung des Androgens kam es zu keiner Verbesserung der Blutwerte. Ab dem 5. Lebensjahr wurde das Knochenmark zunehmend dysplastisch im Sinne einer hypoplastischen refraktären Anämie mit Nachweis einer zytogenetischen Aberration und ca. 4% Blasten, worauf schließlich die Suche

nach einem Knochenmarkspender eingeleitet wurde. Der Transfusionsbedarf lag zuletzt bei wöchentlichen TK- und 2-3-wöchigen EK-Gaben. Insgesamt wurden ca. 20 Erythrozyten- und ca. 50 Thrombozytenkonzentrate verabreicht. Die im gleichen Zeitraum durchgeführte Bestimmung der Komplementationsgruppe ergab die Zugehörigkeit zu der Gruppe FA-G mit der homozygoten Nonsense-Mutation c.313G>T (p.E105X). Im Alter von 6 ½ Jahren wurde eine PBSCT durchgeführt. Es kam zu einer guten hämatopoetischen Regeneration mit einem kompletten Spenderchimärismus und Remission des MDS. An Komplikationen zeigte sich eine akute GvH-Reaktion I° der Haut, die mit Corticosteroiden behandelt wurde. Des Weiteren kam es zu einer ausgeprägten EBV-Infektion, die überwiegend als Mononukleose mit ausgeprägten zervikalen Lymphknotenschwellungen verlief. Als Nebenwirkung der insgesamt dreimonatigen antiviralen Therapie mit 4 Virusstatika trat eine passagere Niereninsuffizienz auf, die unter einer Modifizierung der Therapie rückläufig war. Sechs Monate nach der Transplantation zeigte sich der Junge gut erholt und mit normalisierter Hämatopoese (vgl. Tabelle 9).

**Tab. 9:** Blutwerte des Patienten G7

	Hb (g/dl)	Leukozyten (/µl)	Thrombozyten (/µl)
Nov. 2000 (6 ½ J., vor PBSCT)	8,71	1.590	16.400 (unter Transfusion)
Feb. 2001 (nach PBSCT)	10,7	5.200	86.000
Juni 2001 (7 J.)	12,0	8.900	275.000

Die zellanalytische Untersuchung ergab eine vollständige funktionelle Reversion des früheren FA-Phänotyps (siehe Abbildung 14).



**Abb. 14:** Zellzyklusanalysen des Patienten G7

Die erhöhte Ratio  $\sum G2/GF$  der Untersuchungen 07/99, 11/99 und 11/00 steht im Einklang zur Diagnose Fanconi Anämie. Im Juni 2001 ergibt die Ratio  $\sum G2/GF$  mit 0,124 einen Wert im Bereich der Kontrollen und entspricht dem Zustand nach erfolgreicher PBSCT. Die Diagnose FA ist aus den Blutlymphozyten nicht mehr ersichtlic.

## 4. Diskussion

Das Ziel einer Genotyp-Phänotyp Korrelation besteht darin, die Folgen bzw. Konsequenzen, welche sich aus einer bestimmten genetischen Veränderung für das klinische Bild der Erkrankung ergeben, besser einschätzen zu können. Dies ist sowohl für das allgemeine Verständnis der Fanconi Anämie als auch für die Prognose des einzelnen Patienten von Bedeutung. Das Wissen über die Wirkung bestimmter Mutationen auf den Patienten und den voraussichtlichen Verlauf der Erkrankung erweitert die Möglichkeiten einer gezielten Überwachung der Krankheitsprogression und einer optimalen Therapieplanung, was beispielsweise den bestmöglichen Zeitpunkt einer Knochenmarktransplantation betrifft. Einige wichtige Fragen könnten hierbei sein: Liegt eine Mutation vor, die mit einem milden Krankheitsverlauf assoziiert ist? In welchem Alter wird mit einem Knochenmarkversagen zu rechnen sein? Wie ist die Prädisposition des Patienten für Neoplasien? Wie wahrscheinlich ist das Auftreten einer somatischen Reversion?

### 4.1 Klassische Genotyp-Phänotyp Korrelationen

Bei der Fanconi Anämie sind bislang 13 Komplementationsgruppen und deren ursächlichen Gene bekannt. Eine Korrelation von Patienten einer Komplementationsgruppe zu einem bestimmten Phänotyp ist aufgrund der klinischen Heterogenität der FA oft nicht möglich. Es gibt jedoch einige Komplementationsgruppen, die in bestimmten Bereichen ihrer klinischen Ausprägung im Vergleich mit anderen Gruppen hervorstechen.

In einer vergleichenden Studie von Faivre et al. (2000) wurde beobachtet, dass Patienten der Komplementationsgruppe FA-G einen schwereren hämatologischen Verlauf, gekennzeichnet durch ein früheres Auftreten von MDS und AML, zeigten, als Patienten der Gruppen FA-A und FA-C. Das Ausmaß an kongenitalen Fehlbildungen ähnelte sich in den Komplementationsgruppen FA-A und FA-G; bei FA-C-Patienten fanden sich weniger somatische

Auffälligkeiten. Innerhalb der drei Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Inzidenz für solide Tumoren, deren Anzahl insgesamt gering war.

Die klinischen Daten der Patienten, die der Komplementationsgruppe FA-D2 zugeordnet werden, unterscheiden sich in gewissen Aspekten von denen anderer FA-Gruppen. So zeigen FA-D2-Patienten eine höhere Frequenz kongenitaler Fehlbildungen. Während etwa ein Drittel aller FA-Patienten keine Anomalien und Fehlbildungen aufweist, zeigte in der Arbeit von Kalb et al. (2007) jeder der untersuchten FA-D2-Patienten charakteristische phänotypische Auffälligkeiten. Zusätzlich ist der klinische Verlauf dieser Patienten durch eine durchschnittlich frühere Manifestation des Knochenmarkversagens und einer frühzeitigen Notwendigkeit einer Stammzelltransplantation gekennzeichnet.

Einen zweifellos schweren Verlauf sieht man bei Fanconi Anämie-Patienten der Komplementationsgruppen FA-D1 und FA-N. Das Gen FANCD1 ist identisch mit dem BRCA2 (breast cancer associated protein 2)-Gen (Howlett et al., 2002); FANCN mit dem PALB2 (partner and localizer of BRCA2)-Gen (Reid et al., 2007). Monoallelische Mutationen in diesen Genen prädisponieren die Betroffenen für Mamma-, Ovarial- und Pankreaskarzinome. Biallelische Mutationen im FANCD1/BRCA2-Gen wie auch im FANCN/PALB2-Gen sind mit einem hohen Risiko für bereits im frühen Kindesalter auftretende Neoplasien (Wilms-Tumor, Medulloblastom, akute Leukämie) assoziiert. Die Lebenserwartung dieser Patienten ist deutlich reduziert. Viele von ihnen sterben an ihren Tumorerkrankungen, ehe die für FA typischen hämatologischen Probleme auftreten und werden dadurch nie als Fanconi Anämie-Patienten diagnostiziert (Wagner et al., 2004; Reid et al., 2005, 2007; Alter, 2006).

Heterozygote Mutationen im FANCI/BRIP1 (BRCA1-interacting protein)-Gen führen ebenfalls zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko (Seal et al., 2006). Beim Vorliegen biallelischer Mutationen gehören die Betroffenen der Komplementationsgruppe FA-J an, die, im Gegensatz zu den Gruppen FA-D1 und FA-N, einen klassischen FA-Phänotyp zeigt. Bisher liegen keine Berichte von FA-J-Patienten vor, die in der Kindheit solide Tumoren entwickelt haben (Levitus et al., 2005; Levran et al., 2005).

Auch die Korrelation bestimmter Mutationen mit klinischen Phänotypen erweist sich aufgrund des großen Mutationsspektrums, des privaten Charakters vieler Mutationen und der Tatsache, dass die Mehrzahl der Mutationen in compound heterozygoter Form vorliegen, als schwierig. Ein milder klinischer Verlauf kann durch Mutationen bedingt sein, die einen Teil der Proteinfunktion bewahren (trunkiertes Protein). Die somatische Reversion einer konstitutionellen Mutation, insbesondere bei compound heterozygoten Genträgern, und der daraus möglicherweise entstehende Mosaikstatus kann ebenfalls zu einem milden oder verlängerten Verlauf mit verbesserten Blutwerten führen (Lo Ten Foe et al., 1997). Das Phänomen des Mosaizismus stellt einen zusätzlichen verkomplizierenden Faktor bei Genotyp-Phänotyp Korrelationen der Fanconi Anämie dar.

Die Mutationen im FANCA-Gen zeigen ein sehr heterogenes Bild. Alle Arten von Mutationen sind vertreten, wobei der hohe Anteil an großen Deletionen auffallend ist.

Es existieren kaum Patienten mit identischen Mutationen. Außer wenigen konstanten Mutationen in bestimmten Bevölkerungsgruppen, welche auf offensichtliche Founder-Effekte zurückgehen (Levrán et al., 1997, Tipping et al., 2001), liegen bei der Mehrzahl der FANCA-Patienten compound heterozygote, „private“ Mutationen vor.

Im Gegensatz zum FANCA-Gen sind die Mutationsspektren für FANCC und FANCG weniger breit gefächert. In beiden Genen ist eine Vielzahl von Founder-Mutationen bekannt. Beispiel hierfür ist in FANCG die Stop-Codon-Mutation 313G>T (E105X), die bei 44% der deutschen FA-G-Patienten gefunden wurde (Demuth et al., 2000). Homozygote Träger dieser Mutation entwickelten früher hämatologische Probleme als andere Patienten der Komplementationsgruppe FA-G. Im FANCC-Gen findet man in Exon 1 die kleine Deletion c.67delG (früher 322delG), die in den Niederlanden und in Deutschland weit verbreitet und mit milderen hämatologischen Symptomen sowie einer niedrigeren Rate von Fehlbildungen assoziiert ist, was sich durch die Expression eines trunkierten Proteins mit partieller Aktivität erklären lässt (Yamashita et al., 1996). Ebenfalls in FANCC findet man die Spleiß-Mutation IVS4+4A>T, welche bei den Ashkenazim-Juden als Founder-Mutation mit einer Trägerfrequenz von 1:89 gilt.

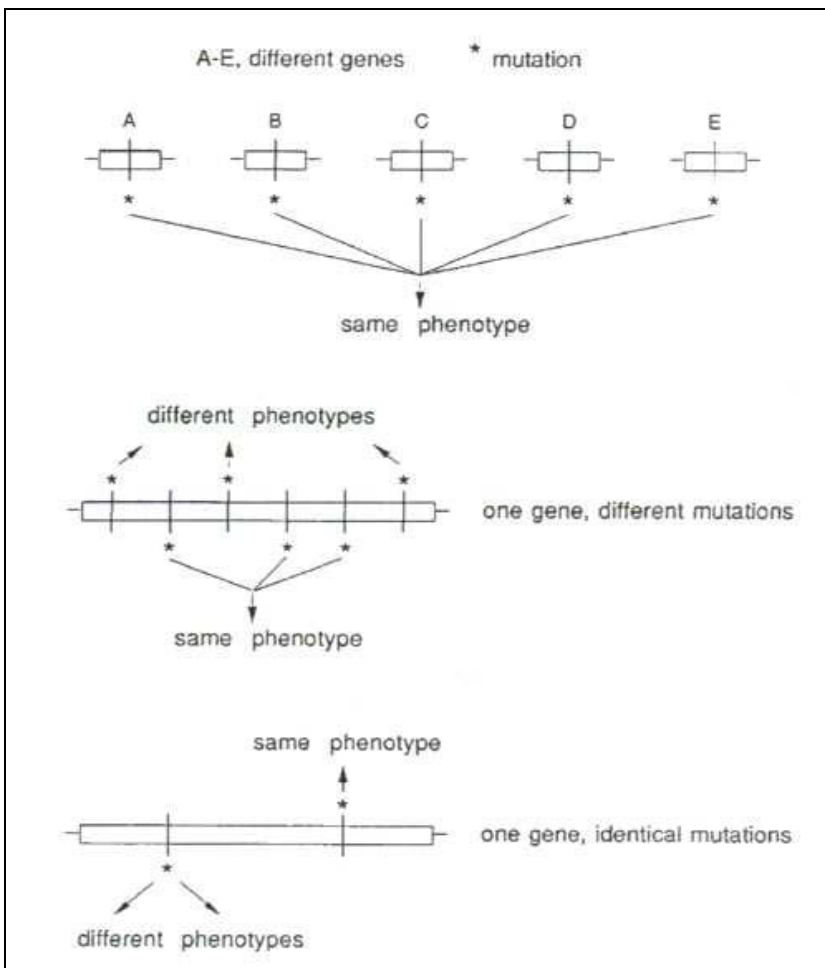
Diese Mutation ist durch einen schweren Verlauf mit multiplen kongenitalen Fehlbildungen und frühem Einsetzen des Knochenmarkversagens charakterisiert. Interessanterweise scheint IVS4+4A>T in der japanischen Bevölkerung, in der sie die am meisten verbreitete FANCC-Mutation ist, keine solch schwerwiegenden Auswirkungen zu haben wie in der jüdischen Bevölkerung. Dies führt zu der Überlegung, dass unterschiedliche genetische Hintergründe oder der Einfluss von Umweltfaktoren die verschiedenen Verläufe bei gleicher Mutation erklären könnten (Futaki et al., 2000).

## **4.2 Mögliche molekulare Mechanismen der phänotypischen Heterogenität**

Unter genetischer Heterogenität versteht man die Tatsache, dass Mutationen in unterschiedlichen Genen (Lokus-Heterogenität) oder unterschiedliche Mutationen im gleichen Gen (allelische Heterogenität) zum gleichen oder zumindest sehr ähnlichen Phänotyp führen können. Der Begriff der phänotypischen Variabilität beschreibt ein Phänomen, bei dem eine Mutation innerhalb eines bestimmten Gens mit der unterschiedlichen Ausprägung einer Krankheit assoziiert sein kann. Hierbei können die Mutationen unterschiedliche Stellen des Gens betreffen oder auch völlig identische genetische Veränderungen darstellen (siehe Abb.15).

Für eine Vielzahl von Erkrankungen lassen sich keine strikten Genotyp-Phänotyp Korrelationen nachweisen. Die Vorgänge, die bei der Ausprägung des klinischen Erscheinungsbildes beteiligt sind, sind multifaktoriell. In der Literatur werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die eine phänotypische Heterogenität bedingen können. So muß beispielsweise der genetische Hintergrund im Allgemeinen berücksichtigt werden. Zusätzliche Sequenzveränderungen im Krankheitsallel können für klinische Unterschiede zwischen Individuen, die identische Mutationen tragen, verantwortlich sein.





**Abb. 15:** Genetische und phänotypische Heterogenität (aus Wolf, 1997)

Weiterhin kann man annehmen, dass ein Teil der phänotypischen Variabilität verschiedener Erkrankungen auf der Interaktion sog. „modifier genes“ mit der entsprechenden pathogenen Mutation basiert. So wurden z.B. bei Untersuchungen verschiedener Phänotypen der Zystischen Fibrose (CF) „modifier genes“ identifiziert, die das Ausmaß der Lungenerkrankung bei CF-Patienten beeinflussten. Es kann außerdem davon ausgegangen werden, dass auch Wechselwirkungen verschiedener, nicht-alleler Gene zur Ausprägung eines bestimmten Phänotyps führen können, wobei das eine Gen die Wirkung des anderen unterdrückt (Epistasie). Darüber hinaus können epigenetische Effekte, wie DNA-Methylierung oder genomisches Imprinting, die Regulation und Expression von Genen verändern und durch diesen Mechanismus das

phänotypische Erscheinungsbild der Mutation beeinflussen. Der Mechanismus der elternspezifischen Prägung spielt bei der Manifestation vieler Krankheiten eine Rolle, wie z.B. Angelmann-Syndrom und Prader-Willi-Syndrom. Schließlich sind auch die genetische Prädisposition, stochastische Phänomene und unterschiedliche Umweltbedingungen bei der klinischen Ausprägung einer Erkrankung zu berücksichtigen (Wolf, 1997).

### **4.3 Diskussion spezifischer Kasuistiken**

Abschließend sollen einige besondere Krankheitsverläufe und wichtige Aspekte der sehr heterogenen klinischen Ausprägung der Fanconi Anämie noch einmal hervorgehoben werden:

- die Variabilität des Phänotyps bei Geschwistern mit identischer genetischer Veränderung,
- ein extrem schwerer Krankheitsverlauf der FA mit komplexen Fehlbildungen im Sinne einer VACTERL-H-Assoziation,
- ein milder Verlauf der Erkrankung mit ungewöhnlich später Diagnosestellung aufgrund einer partiell erhaltenen Proteinfunktion,
- das Fehlen hämatologischer Auffälligkeiten aufgrund eines zugrunde liegenden Mosaizismus.

Das Phänomen, dass es selbst innerhalb von Familien mit identischer Mutation zu einer variablen Ausprägung der Fanconi Anämie mit deutlich unterschiedlichen Krankheitsverläufen kommen kann, kann bei den Geschwistern A11 und A12 beobachtet werden. Beide Schwestern konnten der Komplementationsgruppe FA-A mit den Mutationen c.1360\_1826del467 und c.3788\_3790delTCT (p.F1263del) zugeordnet werden. Die FA-typischen Merkmale waren bei beiden Mädchen insgesamt relativ mild ausgeprägt. Deutlich unterschiedlich gestaltete sich dagegen der Krankheitsverlauf beider Patientinnen. Während die jüngere Schwester (A12) aufgrund einer bis zum 19.

Lebensjahr ausreichenden Knochenmarkfunktion eine normale Kindheit und Jugend erleben konnte, war die Lebensqualität der älteren Schwester (A11) durch die frühzeitige und lebenslange Transfusionsabhängigkeit, die wiederholten massiven Blutungen und schweren Infektionen deutlich reduziert. Dieses Beispiel zeigt, dass eine eindeutige Aussage hinsichtlich des Krankheitsverlaufes der FA sogar trotz eines identischen intrafamiliären Genotyps nicht getroffen werden kann.

Die Kasuistik des Patienten B2 beschreibt einen außerordentlich schweren Verlauf der Fanconi Anämie. Während der Schwangerschaft wurden in den Ultraschalluntersuchungen Auffälligkeiten festgestellt und eine pränatale Diagnostik eingeleitet. Die funktionelle Untersuchung der Amnionzellkulturen bestätigte die Verdachtsdiagnose FA. Es erfolgte die Zuordnung zu der Komplementationsgruppe FA-B mit der zugrunde liegenden Mutation c.246\_247delGT (p.S83CfsX13). Der Junge zeigte komplexe Fehlbildungen aller großen Organsysteme, einschließlich des Gehirns und verstarb im Alter von 2 Stunden an Herzkreislaufversagen. Es ist anzunehmen, dass es sich bei diesem Beispiel um einen VACTERL-H-assoziierten Phänotyp der Fanconi Anämie handelt.

VACTERL bezeichnet eine Gruppe von Fehlbildungen, die gehäuft assoziiert bei einem Patienten auftreten. Das Akronym steht für vertebrale, anale, kardiovaskuläre, tracheo-e(ö)sophageale, renale und limb (Extremitäten-) Fehlbildungen. Die Kombination von mindestens drei der aufgeführten Symptome bei einem Patienten berechtigt zur Einordnung in die Assoziation. Patienten mit typischen VACTERL-Anomalien und zusätzlichem Hydrozephalus (VACTERL-H) bilden eine eigene genetische und phänotypische Gruppe mit autosomal-rezessivem oder X-chromosomalem Erbgang. Einige Fälle von VACTERL-H sind mit einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit assoziiert und führen zu einem sehr schweren Erscheinungsbild der Fanconi Anämie. Als zugrunde liegende Ursache von X-chromosomalen VACTERL-H-Syndromen werden Mutationen im FANCB-Gen beschrieben (Holden et al., 2006). Patienten anderer Komplementationsgruppen zeigten in einigen Fällen ebenfalls eine VACTERL-H-Assoziation. Cox et al. (1997) stellten in ihrer Arbeit

ein Zwillingspaar mit VACTERL-H-assoziiertem Phänotyp vor, bei dem die molekulargenetische Untersuchung die homozygote FANCC-Mutation IVS4+4A>T zeigte.

Ein beeindruckendes Beispiel eines FA-Patienten mit einem sehr milden Verlauf ist in der Krankengeschichte der Patientin A40 dargestellt. Die Patientin zeigte keinerlei körperliche Fehlbildungen. Sie entwickelte erstmals im Alter von 23 Jahren eine Leukozytopenie und wurde schließlich mit 49 Jahren aufgrund der ungewöhnlich schweren Reaktion auf eine Chemotherapie als Fanconi Anämie-Patientin der Gruppe FA-A mit den Mutationen c.1549C>T (p.R517W) und c.1230G>A (p.W410X) diagnostiziert. Die Missense-Mutation stellte eine seltene hypomorphe Mutation dar, die mit einer partiell erhaltenen Proteinfunktion assoziiert zu sein schien, wodurch die schwerwiegenden Auswirkungen der Nonsense-Mutation vermutlich teilweise kompensiert werden konnten, was den milden zellulären Phänotyp und den verzögerten Krankheitsverlauf erklären könnte. Der Fall dieser ungewöhnlichen Patientin macht deutlich, wie wichtig es ist, auch bei Erwachsenen mit unerklärlichen hämatologischen Problemen an eine Form der FA zu denken, die auf eine milde Mutation zurückgeht.

Demgegenüber kann bei Patienten, die keinerlei hämatologische Auffälligkeiten, jedoch körperliche Anomalien zeigen, eine Fanconi Anämie mit zugrunde liegendem Mosaizismus vorliegen, wie im Fall des Patienten D25 beschrieben. Er zeigte multiple Fehlbildungen, vor allem des Skelettsystems, der Ohren und des Urogenitaltraktes. Im Alter von 32 Jahren wurde ein Plattenepithelkarzinom am Oberkiefer entdeckt und entfernt. Aufgrund der Vielzahl der phänotypischen Auffälligkeiten und Entwicklungsstörungen wurde eine FA-Diagnostik eingeleitet. Da bisher keinerlei hämatologische Probleme auftraten, konnte von einem Mosaikstatus ausgegangen werden. Die zellanalytischen Untersuchungen, welche an Fibroblasten-Kulturen durchgeführt wurden, bestätigten die Verdachtsdiagnose Fanconi Anämie. Der Patient konnte der Komplementationsgruppe FA-D2 zugeordnet werden.

Angesichts der begrenzten Zahl von sowohl molekulargenetisch als auch klinisch ausreichend charakterisierten Patienten ist es bisher nur sehr eingeschränkt möglich, allein aufgrund der Patienten-spezifischen Mutation prognostische Aussagen über die voraussichtliche Schwere des Krankheitsbildes und des Krankheitsverlaufes zu machen.

Ein besonders schwerer Krankheitsverlauf, der gekennzeichnet ist durch frühkindliche Tumorerkrankungen, ist nach heutigem Kenntnisstand zu erwarten, wenn biallelische Mutationen in den Genen FANCD1/BRCA2 und FANCN/PALB2 vorliegen. Ein Krankheitsbild mit überwiegend schwerer Ausprägung bietet sich auch bei Mutationen im X-chromosomalen FANCB-Gen. In diesem Fall sind ausschließlich Jungen betroffen, die überdurchschnittlich häufig eine VACTERL Symptomatik aufweisen. Besonders leichte Verläufe mit geringer Fehlbildungstendenz und spätem Knochenmarkversagen wurden in dieser und anderen Studien bei bestimmten Mutationen im FANCA- und FANCC-Gen beobachtet.

Insgesamt bedarf es jedoch einer viel größeren Anzahl von umfassend charakterisierten Patienten, um dem Ziel einer verlässlichen Prognostik aufgrund definitiver Genotyp-Phänotyp Korrelationen näher zu kommen.

## 5. Zusammenfassung

Die Fanconi Anämie (FA) stellt eine sowohl genetisch als auch phänotypisch äußerst heterogene, autosomal rezessiv und X-chromosomal vererbte Erkrankung dar. Sie ist gekennzeichnet durch chromosomale Instabilität, ein chronisch progredientes Knochenmarkversagen, multiple kongenitale Fehlbildungen und eine Prädisposition zu diversen Neoplasien. Auf zellulärer Ebene ist die FA durch eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit sowie einer Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien charakterisiert. Bislang konnten 13 Komplementationsgruppen (FA-A bis FA-N) und ihre jeweiligen Gene identifiziert werden. Die FA-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.

Die breite genetische Heterogenität der Fanconi Anämie und die große Anzahl privater Mutationen, aufgrund derer kaum interindividuelle Vergleiche möglich sind, erschweren eine Genotyp-Phänotyp Korrelation ebenso wie der compound-heterozygote Mutationsstatus vieler FA-Patienten. Bisherige Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Art der jeweiligen Mutation einen größeren Einfluß auf die phänotypische Ausprägung der Erkrankung hat als die Art des betroffenen Gens. Zusätzlich zeichnet die Fanconi Anämie eine große phänotypische Variabilität aus, die sich in höchst unterschiedlichen Krankheitsausprägungen und -verläufen äußert.

Um aussagekräftige Genotyp-Phänotyp Korrelationen etablieren zu können, bedarf es einer ausreichenden Anzahl von FA-Patienten, bei denen sowohl die Komplementationsgruppe als auch die zugrunde liegende Mutation eindeutig definiert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden exemplarisch die Krankheitsverläufe einiger Patienten (4 x FA-A, 1 x FA-B, 3 x FA-C, 1 x FA-D2 und 2 x FA-G) analysiert und mit den jeweiligen molekulargenetischen Befunden korreliert. Im Anschluss daran wurden in der Literatur beschriebene Genotyp-Phänotyp Korrelationen erläutert, verschiedene Mechanismen der phänotypischen Variabilität dargestellt und abschließend prägnante Kasuistiken nochmals hervorgehoben.

## 6. Literatur

1. **Akkari YM, Bateman RL, Reifsteck CA, D'Andrea AD, Olson SB, Grompe M (2001)** The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase. *Mol Genet Metab* 74:403-12
2. **Alter BP (1996)** Fanconi's anemia and malignancies. *Am. J. Hematol* 53:99-110.
3. **Alter BP (2003)** Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer*. 97(2):425-440.
4. **Alter BP (2003)** Inherited bone marrow failure syndromes. In Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood Volume I. 6<sup>th</sup> edition. Edited by: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT, Oski FA. Philadelphia: PA Saunders; 2003: 280-365
5. **Alter BP (2006)** The association between FANCD1/BRCA2 mutations and leukaemia. *Br J Haematol*;133:446-448; author reply 448
6. **Ameziane N, Errami A, Léveillé F, Fontaine C, de Vries Y, van Spaendonk RM, de Winter JP, Pals G, Joenje H (2008)** Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening. *Hum Mutat*. 29(1):159-66.
7. **Auerbach AD (1993)** Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Experimental Hematology*, 21 (6):731-733
8. **Auerbach AD, Allen RG (1991)** Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet Cytogenet* 51:1-12.
9. **Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H (2001)**. Fanconi Anemia. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease Volume I. 8<sup>th</sup> edn* edition. Edited by: Scriver CR, Sly WS, Childs B., Beaudet AL, Valle D, Kinzler KW, Vogelstein B. New York: McGraw-Hill; 2001:753-768
10. **Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H. (1999)** Fanconi anaemia. In: Vogelstein B, Kinzler KW, eds. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw Hill, 317-32.
11. **Auerbach AD, Wolman SR (1976)** Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature* 261:494-6.

12. **Berger R**, Le Condiat M, Gendron MC (**1993**) Fanconi anemia. Chromosome breakage and cell cycle studies. *Canc Genet Cytogenet* 69:13-6
13. **Butturini A**, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD (**1994**) Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 84:1650-5.
14. **Carvalho JP**, Dias ML, Carvalho FM, Del Pilar Estevez Diz M, Petitto JW (**2002**) Squamous cell vulvar carcinoma associated with Fanconi's anemia: a case report. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 12(2):220-222
15. **Cox PM**, Gibson RA, Morgan N, Brueton LA (**1997**) VACTERL with hydrocephalus in twins due to Fanconi anemia (FA): mutation in the FAC gene. *Am J Med Genet.* 68(1):86-90.
16. **D'Andrea AD**, Grompe M (**2003**) The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3:23-34
17. **De Kerviler E**, Guerhazi A, Zagdanski AM, Gluckman E, Frija J (**2000**) The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia. *Clin Radiol* 55:340-5.
18. **de Winter JP**, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H (**1998**) The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet.* 20(3):281-3.
19. **Demuth I**, Wlodarski M, Tipping AJ, Morgan NV, de Winter JP, Thiel M, Grasl S, Schindler D, D'Andrea AD, Altay C., Kayserili H, Zatterale A, Kunze J, Ebell W, Mathew CG, Joenje H, Sperling K, Digweed M (**2000**) Spectrum of mutations in the Fanconi anemia group G gene, FANCG/XRCC9. *Eur J Hum Genet* 8:861-868
20. **Dietrich R**, Velleuer E. (**2007**) Fanconi Anemia: A Disease with Many Faces. In: *Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging.* Monogr Hum Genet. Basel, Karger, vol 15, pp 9-22
21. **Dutrillaux B**, Aurias A, Dutrillaux AM, Buriot D, Prieur M (**1982**) The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum Genet* 62:327-32



22. **Faivre** L, Guardiala P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee ML, van Weel-Sipman M, Havenga C, Morgan N, de Winter J, Digweed M, Savoia A, Pronk J, de Ravel T, Jansen S, Joenje H, Gluckman E, Mathew CG (2000) Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood* 96:4064-70
23. **Fanconi**, G. (1927) Familiäre infantile perniziösartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung*, Wien, 117: 257-280
24. **Futaki** M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, Asano S, Nakahata T (2000) The IVS4 + 4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood*; 95:1493-8
25. **Garcia-Higuera** I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7:249-62
26. **Giampietro** PF, Verlander PC, Davis JG, Auerbach AD (1997) Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an International Fanconi Anemia Registry study. *Am J Med Genet.* 68:58-61.
27. **Gibson** RA, Hajianpour A, Murer-Orlando M, Buchwald M, Mathew CG (1993) A nonsense mutation and exon skipping in the Fanconi anaemia group C gene. *Hum Mol Genet* 2:797-799
28. **Gillio** AP, Verlander PC, Batish SD, Giampietro PF, Auerbach AD (1997) Phenotypic consequences of mutations in the Fanconi anemia FANCC gene: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 90:105-10
29. **Hanenberg** H, Batish SD, Pollok K, Vieten L, Verlander P, Leurs C, Cooper R, Göttische K, Haneline L, Clapp D, Lobitz S, Williams D, Auerbach A (2002) Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol* 30:410-20
30. **Holden** ST, Cox JJ, Kesterton I, Thomas NS, Carr C, Woods CG. (2006) Fanconi anaemia complementation group B presenting as X linked VACTERL with hydrocephalus syndrome. *J Med Genet.* 43(9):750-4. Epub 2006 May 5.

31. **Howlett** NG, Taniguchi T, Olson S et al. (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297:606-9
32. **Huck** K, Hanenberg H, Gudowius S, Fenk R, Kalb R, Neveling K, Betz B, Niederacher D, Haas R, Göbel U, Kobbe G, Schindler D (2006) Delayed diagnosis and complications of Fanconi anaemia at advanced age -- a paradigm. *Br J Haematol.* 133(2):188-97.
33. **Joenje** H, Arwert F, Kwee ML, Madan K, Hoehn H (1998) Confounding factors in the diagnosis of Fanconi anemia. *Am J Med Genet* 79:403-405
34. **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
35. **Joenje** H, Oostra AB, Rooimans MA, van Weel M, Pronk JC, Arwert F (2000) Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. *Am J Hum Genet* 67:759-62
36. **Joenje** H, Patel KJ (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2:446-457
37. **Kalb** R (2002) Diplomarbeit: Genetische und funktionelle Untersuchungen zum Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) und zu verwandten Störungen ("NBS-like-disorders") S.21-30
38. **Kalb** R, Neveling K, Herterich S, Schindler D. (2007) Fanconi Anemia Genes: Structure, Mutations, and Genotype-Phenotype Correlations. in: *Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging. Monogr Hum Genet. Basel, Karger, vol 15, pp 39-58*
39. **Kalb** R, Neveling K, Hoehn H, Schneider H, Linka Y, Batish SD, Hunt C, Berwick M, Callen E, Surralles J, Casado JA, Bueren J, Dasi A, Soulier J, Gluckman E, Zwaan CM, van Spaendonk R, Pals G, de Winter JP, Joenje H, Grompe M, Auerbach AD, Hanenberg H, Schindler D (2007) Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *Am J Hum Genet.* 80(5):895-910
40. **Kinzler** KW, Vogelstein B (1997) Cancer susceptibility genes: gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761-3

41. **Koc A**, Pronk JC, Alikasifoglu M, Joenje H, Altay C (**1999**) Variable pathogenicity of exon 43del (FAA) in four Fanconi anaemia patients within a consanguineous family. *Br J Haematol* 104:127-30.
42. **Kubbies M**, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS (**1985**) Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent endomitosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet* 37:1022-30
43. **Kutler D**, Singh B, Satagopan J, Batish S, Berwick M, Giampietro P, Hanenberg H, Auerbach AD (**2003**) A 20-year perspective on the International Fanconi Anaemia Registry (IFAR); *Blood*, 101(4): 1249-1256
44. **Levitus M**, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, De Winter JP, et al. (**2004**) Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood*, 103(7): 2498-2503
45. **Levitus M**, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, Elghalbzouri-Maghrani E, Steltenpool J, Rooimans MA, Pals G, Arwert F, Mathew CG, Zdzienicka MZ, Hiom K, De Winter JP, Joenje H (**2005**) The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet.*37(9):934-5. Epub 2005 Aug 21.
46. **Levran O**, Attwooll C, Henry RT, Milton KL, Neveling K, Rio P, Batish SD, Kalb R, Velleuer E, Barral S, Ott J, Petrini J, Schindler D, Hanenberg H, Auerbach AD (**2005**) The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet.* 37(9):931-3. Epub 2005 Aug 21.
47. **Levran O**, Erlich T, Magdalena N, Gregory JJ, Batish SD, Verlander PC, Auerbach AD (**1997**) Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:13051-13056
48. **Lo Ten Foe JR**, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Verman AJP, van Weel M, Pauli RM, Shahidi NT, Dokal I, Roberts I, Altay C, Gluckman E, Gibson RA, Mathews CG, Arwert F, Joenje H (**1997**) Somatic mosaicism in Fanconi Anemia: Molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet* 5:137-148

49. **Meetei** AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, et al (2005). A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet*, 37(9): 958-963
50. **Miglierina** R, Le Coniat M, Berger R (1991) A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow cytometry. *Anal Cell Pathos* 3:111-18
51. **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*. 342(8872):686.
52. **Reid** S, Renwick A, Seal S, Baskcomb L, Barfoot R, et al (2005) Biallelic BRCA2 mutations are associated with multiple malignancies in childhood including familial Wilms tumour. *J Med Genet* 2005; 42:147-151
53. **Reid** S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, et al (2007) Biallelic mutations in PALB2, which encodes a BRCA2 interacting protein, cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet*, 39 (2): 162-164
54. **Sanger** F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 992; 24:104-8
55. **Sasaki** MS and Tonomura A (1973) A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross linking agents. *Cancer Res* 33:1829-1836
56. **Schindler** D, Hanenberg H. (2005) Komplementationsgruppenbestimmung bei FA mit Hilfe retroviraler Vektoren. In: *Fanconi Anämie – Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte*, Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V., Unna, S.159-172
57. **Schouten** JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.*30(12):e57.
58. **Schroeder** TM, Anschütz F und Knopp A (1964) Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik* 1:194-196

59. **Seal S**, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K, North B, McGuffog L, Evans DG, Eccles D; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N (2006) Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet.* (11):1239-41. Epub 2006 Oct 8.
60. **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* 92:61-68
61. **Sims AE**, et al. (2007) FANCI is a second mono-ubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 14:564–7
62. **Strathdee CA**, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M (1992) Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 356:763-767
63. **Taniguchi T**, D'Andrea AD (2006) Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* 107: 4223-4233
64. **The Fanconi Anaemia/Breast Cancer (FAB) Consortium (1996)**  
Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nat. Genet.* 14:324-328
65. **Timmers C**, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, et al (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 7:241-248
66. **Tippling AJ**, Pearson T, Morgan NV, Gibson RA, Kruyt LP, Havenga C, Gluckman E, Joenje H, de Ravel T, Jansen S, Mathew CG (2001) Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5734-9
67. **Verlander PC**, Lin JD, Usono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG, Auerbach AD (1994) Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *Am J Hum Genet.* 54(4):595-601.
68. **Vogelstein B**, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:798-799

69. **Wagner** JE, Tolar J, Levrano O, Scholl T, Deffenbaugh A, et al (2004) Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukaemia, and Fanconi anemia. *Blood*. 103:3226-3229
70. **Wajnrajch** MP, Gertner JM, Huma Z, Popovic J, Lin K, Verlander PC, Batish SD, Giampietro PF, Davis JG, New MI, Auerbach AD (2001) Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anaemia Registry. *Pediatr* 107:744-54
71. **Wang** W (2007) Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet*. (10):735-48. Epub 2007 Sep 4. Review.
72. **Wang** X, Andreassen PR, D'Andrea AD (2004) Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol*, 24(13):5850-5862
73. **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*. 7(1):52-9
74. **Wolf** U (1997) Identical mutations and phenotypic variation. *Hum Genet*. 100 (3-4): 305-21.
75. **Xia** B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell*. 22(6): 719-729
76. **Yamashita** T, Wu N, Kupfer G, Corless C, Joenje H, Grompe M, D'Andrea AD. (1996) Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood*. 87:4424-32
77. **Young** NS, Alter BP (1994) Clinical features of Fanconi's anemia. In: *Aplastic anemia, acquired and inherited.*, Saunders: Philadelphia, 275-309
78. **Zakrzewski** S, Sperlin K (1980) Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum Genet* 56:81-4

## **Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. Holger Höhn für die Bereitstellung des Themas, für die aufmerksame und zielgerichtete Betreuung meiner Arbeit und die überaus großzügigen Arbeitsbedingungen.

Frau Dr. Kornelia Neveling danke ich für ihre hilfreichen Erläuterungen und die freundliche Unterstützung bei der Datensuche.

Bei Frau Benni Gottwald bedanke ich mich für ihren geduldig gewährten Einblick in ihre Patientendatei.

Nicht zuletzt ein großes Dankeschön an meine Familie und meine Freunde, die mich durch ihren Zuspruch, ihr unermüdliches Interesse an meiner Arbeit, ihre wohlwollend konstruktive Kritik und technische Hilfestellungen sehr unterstützt haben.