

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

Einfluß von Alter und Genotyp auf die Zellzyklusverteilung mononukleärer Zellen des
peripheren Blutes nach Kurzzeitkultur und bivariater Durchflusszytometrie

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

vorgelegt von
Bettina Christiane Karin Wuttke
aus Bonn

Würzburg, Januar 2004

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Korreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2004

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zellzyklus	1
1.2	Chromosomenbruchsyndrome.....	1
1.2.1	Fanconi Anämie (FA) und Mosaizismus	2
1.2.2	Ataxia teleangiectasia (AT)	5
1.3	Aplastische Anämie (AA)	7
1.4	Fragestellung	8
2	Material und Methoden	8
2.1	Isolation der mononukleären Zellen.....	8
2.2	Kultivierung der isolierten Zellen	9
2.3	Ernte der Zellen	10
2.4	Zellzyklusanalyse	10
2.4.1	Durchflußzytometrie	10
2.4.1.1	Prinzip	10
2.4.1.2	Fluoreszenzfarbstoffe und Quench-Effekt.....	11
2.4.1.3	Anfärben der DNS	12
2.4.1.4	Durchflußzytometrische Messung	12
2.4.1.5	Analyse der Datenfiles	13
2.4.2	Statistische Verfahren	15

3	Ergebnisse	17
3.1	Alter und Diagnose.....	17
3.2	Alter und Geschlecht.....	17
3.3	Diagnosen-Häufigkeit	17
3.4	Geschlecht und Diagnose	18
3.5	Alter und Geschlecht innerhalb der Diagnosegruppen	18
3.6	Vergleich der Diagnosegruppen in den einzelnen Zellzyklusparametern in Korrelation zum Alter	18
3.6.1	Zellzyklusverteilung bei Patienten mit Fanconi Anämie.....	19
3.6.1.1	G0G1-Phase des 1. Zyklus.....	19
3.6.1.2	S-Phase des 1. Zyklus	20
3.6.1.3	G2-Phase des 1. Zyklus	21
3.6.1.4	G1-Phase des 2. Zyklus	25
3.6.1.5	S-Phase des 2. Zyklus	26
3.6.1.6	G2-Phase des 2. Zyklus	27
3.6.1.7	G1-Phase des 3. Zyklus	28
3.6.1.8	S-Phase des 3. Zyklus	29
3.6.1.9	G2-Phase des 3. Zyklus	30
3.6.2	Zellzyklusverteilung bei Patienten mit Ataxia teleangiectasia.....	31
3.6.2.1	G0G1-Phase des 1.Zyklus.....	31
3.6.2.2	S-Phase des 1.Zyklus	32
3.6.2.3	G2 Phase des 1. Zyklus.....	33
3.6.2.4	G1-Phase des 2. Zyklus	34
3.6.2.5	S-Phase des 2. Zyklus	35
3.6.2.6	G2-Phase des 2. Zyklus	36

3.6.2.7	G1-Phase des 3. Zyklus	37
3.6.2.8	S-Phase des 3. Zyklus	38
3.6.2.9	G2-Phase des 3. Zyklus	39
3.6.3	Zellzyklusverteilung bei Patienten mit Ataxia teleangiectasia nach Bestrahlung der Kulturen.....	40
3.6.3.1	G0G1-Phase des 1. Zyklus.....	40
3.6.3.2	S-Phase des 1. Zyklus	41
3.6.3.3	G2-Phase des 1. Zyklus	42
3.6.3.4	G1-Phase des 2. Zyklus	43
3.6.3.5	S-Phase des 2. Zyklus	44
3.6.3.6	G2-Phase des 2. Zyklus	45
3.6.3.7	G1-Phase des 3. Zyklus	46
3.6.3.8	S-Phase des 3. Zyklus	47
3.6.3.9	G2-Phase des 3. Zyklus	48
3.6.4	Zellzyklusverteilung bei Patienten mit aplastischer Anämie.....	48
3.6.4.1	G0G1-Phase des 1. Zyklus.....	49
3.6.4.2	S-Phase des 1. Zyklus	50
3.6.4.3	G2-Phase des 1. Zyklus	51
3.6.4.4	G1-Phase des 2. Zyklus	52
3.6.4.5	S-Phase des 2. Zyklus	53
3.6.4.6	G2-Phase des 2. Zyklus	54
3.6.4.7	G1-Phase des 3. Zyklus	55
3.6.4.8	S-Phase des 3. Zyklus	56
3.6.4.9	G2-Phase des 3. Zyklus	57

3.6.5 Zellzyklusverteilung bei Patienten mit fraglicher Diagnose aplastische Anämie	57
3.6.5.1 G0G1-Phase des 1. Zyklus.....	58
3.6.5.2 S-Phase des 1. Zyklus	59
3.6.5.3 G2-Phase des 1. Zyklus	60
3.6.5.4 G1-Phase des 2. Zyklus	61
3.6.5.5 S-Phase des 2. Zyklus	62
3.6.5.6 G2-Phase des 2. Zyklus	63
3.6.5.7 G1-Phase des 3. Zyklus	64
3.6.5.8 S-Phase des 3. Zyklus	65
3.6.5.9 G2-Phase des 3. Zyklus	66
4 Diskussion.....	67
4.1 Zellzyklusstörungen bei Fanconi Anämie.....	67
4.2 Mosaik-Konstellation bei Fanconi Anämie.....	69
4.3 Zellzyklusstörungen bei Ataxia teleangiectasia	70
4.4 Zellzyklusstörungen bei aplastischer Anämie.....	71
5 Zusammenfassung	73
6 Literaturverzeichnis	75
7 Abkürzungsverzeichnis.....	83

1 Einleitung

1.1 Zellzyklus

Die Entwicklung neuer Methoden zur spezifischen, quantitativen und automatisierten Analyse des Zellzyklus hat in den letzten Jahren zu einem erheblichen Fortschritt in der diagnostischen Medizin beigetragen.

Der Zellzyklus bezeichnet den Zeitraum und die Vorgänge zwischen zwei Zellteilungen. Man gliedert ihn in eine Teilungs- und eine Interphase. Die Teilungsphase setzt sich aus der Kernteilung (Mitose) und der Teilung des Zytoplasmas (Zytokinese) zusammen. Die Interphase wird unterteilt in die G1-Phase (gap-1-Phase), die S-Phase (Synthese-Phase) und die G2-Phase (gap-2-Phase). Die G0-Phase entspricht der Ruhephase. Die G1-Phase dient der Synthese bestimmter zur DNA-Synthese notwendiger zellulärer Proteine. In der nachfolgenden S-Phase wird die DNA-Menge durch semikonservative Reduplikation vermehrt. Die postsynthetische G2-Phase dient DNA-Reparaturvorgängen. In der nachfolgenden, kurzdauernden Mitose werden die reduplizierten Chromosomen auf zwei Tochterzellen verteilt (Mitchison, 1971).

Die Dauer eines Zellzyklus variiert abhängig vom jeweiligen Zelltypus. Innerhalb einer Zellpopulation jedoch findet sich eine Variabilität in der Länge einer Zellzyklusphase fast ausschließlich in der G1-Phase (Smith und Martin, 1973).

Störungen des Zellzyklus können sowohl aufgrund exogener als auch endogener Schädigung des genetischen Materials verursacht werden (Friedberg, 1985).

1.2 Chromosomenbruchsindrome

Chromosomenbruchsindrome werden durch autosomal rezessiv vererbte Mutationen bedingt. Die gemeinsamen zytogenetischen Manifestationen sind ein vermindertes Zellwachstum in vitro sowie eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit, welche zur gemeinsamen Klassifikation dieser klinisch zum Teil unterschiedlich imponieren-

den Krankheiten geführt hat (Übersichten bei Cohen und Levy, 1989; Gordon-Smith und Rutherford 1991; Llerena Jr und Murer-Orlando, 1991).

Unter den hereditären Erkrankungen weisen Chromosomenbruchs Syndrome ein erhöhtes und verfrühtes Neoplasie-Risiko sowie eine sehr variable progeroide Symptomatik auf. Es wird vermutet, dass Zellen mit erhöhter chromosomaler Fragilität sich leichter zur Tumorzelle entwickeln können als genetisch stabile Zellen, da bekannt ist, dass multiple Veränderungen am genetischen Material der Kanzerogenese vorausgehen (Vogelstein et al., 1989). Chromosomenbruchs Syndrome weisen dementsprechend einen kausalen, bisher im Detail jedoch ungeklärten Zusammenhang von hereditärer Instabilität mit gesteigertem Malignomrisiko auf (Hartwell, 1992). Charakteristisch für Chromosomenbruchs Syndrome ist eine Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Einflüssen wie alkylierenden Substanzen und ionisierender Strahlung. Chromosomenbruchs Syndrome bieten sich daher als Modellsysteme für die Erforschung von DNA-Reparatur-Prozessen an.

Zur Gruppe der Erkrankungen mit chromosomaler Instabilität gehören die Fanconi Anämie (FA), die Ataxia teleangiectasia (AT), das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS), das Bloom-Syndrom (BS) und das Werner-Syndrom (WS). NBS ist ein AT-verwandtes Syndrom, für das eine erhöhte Strahlensensitivität und unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit der Lymphozyten als gemeinsames Merkmal beschrieben ist (Barbi et al., 1991; Seemanova et al., 1985; Weemaes et al., 1981), jedoch klinisch Unterschiede zur klassischen AT aufweist (Taalman et al., 1989).

1.2.1 Fanconi Anämie (FA) und Mosaizismus

Die Fanconi Anämie ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die erstmals im Jahre 1927 von dem Schweizer Kinderarzt Prof. Dr. Guido Fanconi an einer Familie mit drei betroffenen Kindern beschrieben wurde (Fanconi, G., 1927).

Diese weltweit vorkommende und Menschen aus den unterschiedlichsten ethnologischen Abstammungen betreffende Erkrankung zeichnet sich in **klinischer Hinsicht** durch eine meist im Alter von 4-10 Jahren auftretende, für die FA

pathognomische progrediente Knochenmarkaplasie aus. Weitere klinische Merkmale für die FA sind verschiedenartige nicht obligate kongenitale Manifestationen wie Skelettfehlbildungen (besonders häufig sind Daumen- und Radiushypoplasie bzw. Radiusaplasie, Minderwuchs und Microcephalie), Malformationen besonders des urogenitalen und des gastrointestinalen Systems, Pigmentationsanomalien und eine ausgeprägte Prädisposition zur Neoplasie. Dazu gehören insbesondere die akute myeloische Leukämie (AML), aber auch gastrointestinale Neoplasien und solche der weiblichen Geschlechtsorgane (Buchwald et al., 1997; Liu et al., 1994; Young und Alter, 1994). Im Gegensatz zur nachfolgend beschriebenen AT gibt es jedoch kein typisches Erscheinungsbild für FA. 25% der FA-Patienten zeigen keine körperlich auffälligen Symptome (Glanz und Fraser, 1982).

In **zellkinetischer Hinsicht** dominiert eine Hypersensitivität in Form von dosisabhängigen Chromosomenbruchraten gegenüber alkylierenden Substanzen wie Mitomycin C (MMC) und Diepoxybutan (DEB) (Auerbach, 1993; Young und Alter, 1994, Kapitel 14). Behandelte sowie unbehandelte FA-Fibroblasten und -Lymphozyten zeigen Anomalien hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens (Dutrillaux et al., 1982). Kubbies und Mitarbeiter beschrieben 1985 erstmals eine Möglichkeit, die FA von anderen hämatologischen Erkrankungen durch die Zellzyklusanalyse peripherer Blutlymphozyten mittels der 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU)/-Hoechst 33258 Ethidiumbromid (EB) Durchflußzytometrie zu unterscheiden. Dabei kann die Lymphozytenproliferation nach Stimulierung mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) bis zu 4 konsekutive Zellzyklen verfolgt und der Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzykluskompartimenten bestimmt werden. Mit diesem Verfahren konnte eine verzögerte Zellzykluspassage in Form einer G2-Phase-Verlängerung präzise dargestellt werden. Da die typische G2-Phasen-Verlängerung mit dem durch MMC induzierten Chromosomenbruchraten korreliert (Berger et al., 1993; Seyschab et al., 1995), kann mit dieser Methode zwischen FA-Patienten und kindlicher AA unterschieden werden. Davon ausgenommen sind Mosaik-Patienten, präleukämische und leukämische Patienten, die aufgrund der erhöhten Proliferationsrate keine G2-Phase-Verlängerung mehr aufweisen. Ferner finden sich unter den FA-Zellen auch solche, bei denen keine chromosomale Instabilität aufgefallen ist und ein kleinerer Anteil zeigte sich

resistent gegenüber verschiedenen Reagenzien, die zur Induktion von Chromosomenbrüchen verwendet werden.

Die weltweite Prävalenz dieser Erkrankung liegt zwischen einem und fünf FA-Patienten pro 1.000.000 Einwohner. Die Heterozygoten-Frequenz wird auf 0,3% - 1% geschätzt (Joenje et al., 2001). Mindestens acht Komplementationsgruppen (A-H) wurden bis heute erfasst, wobei die Gruppe A mit einem Anteil von 65% in Europa die häufigste darstellt. Die einzige kausale Therapie der FA besteht derzeit in einer Knochenmarktransplantation.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass der Krankheitsverlauf weniger durch die Komplementationsgruppe als vielmehr durch die Art der zugrunde liegenden Mutation und die mögliche Entstehung eines somatischen Mosaikes in hämatologischen Zellen bestimmt wird (Faivre et al., 2000; Lo ten Foe et al., 1997). **Mosaizismus** beschreibt die gleichzeitige Existenz von funktionell defekten und funktionell intakten Zellen. Ursache des Mosaikstatus ist die Selbstkorrektur eines der beiden defekten Allele des Patienten. Diagnostisches Kriterium ist der normale Phänotyp der Lymphozyten (keine G2-Phase-Verlängerung) bei simultanem FA-Phänotyp von Fibroblasten (Sensitivität gegenüber Klastogenen). Mosaikereignisse treten durch ungleiches crossing over häufiger bei compound-heterozygoten Patienten auf. Besonders das FANCA-Gen zeigt replikative und transkriptionelle Störungen, die dazu führen, dass es über eine Mutationskorrektur bzw. über eine weitere Mutation zu einer Kompensation der Erkrankung kommen kann (Waisfisz et al., 1999). Dieser Sachverhalt dient als Hinweis auf den prinzipiell möglichen Erfolg eines therapeutischen Gentransfers. Trotz Reversionen einer ursprünglichen Mutation bleibt allerdings die Neigung zur Entwicklung von Neoplasien bestehen.

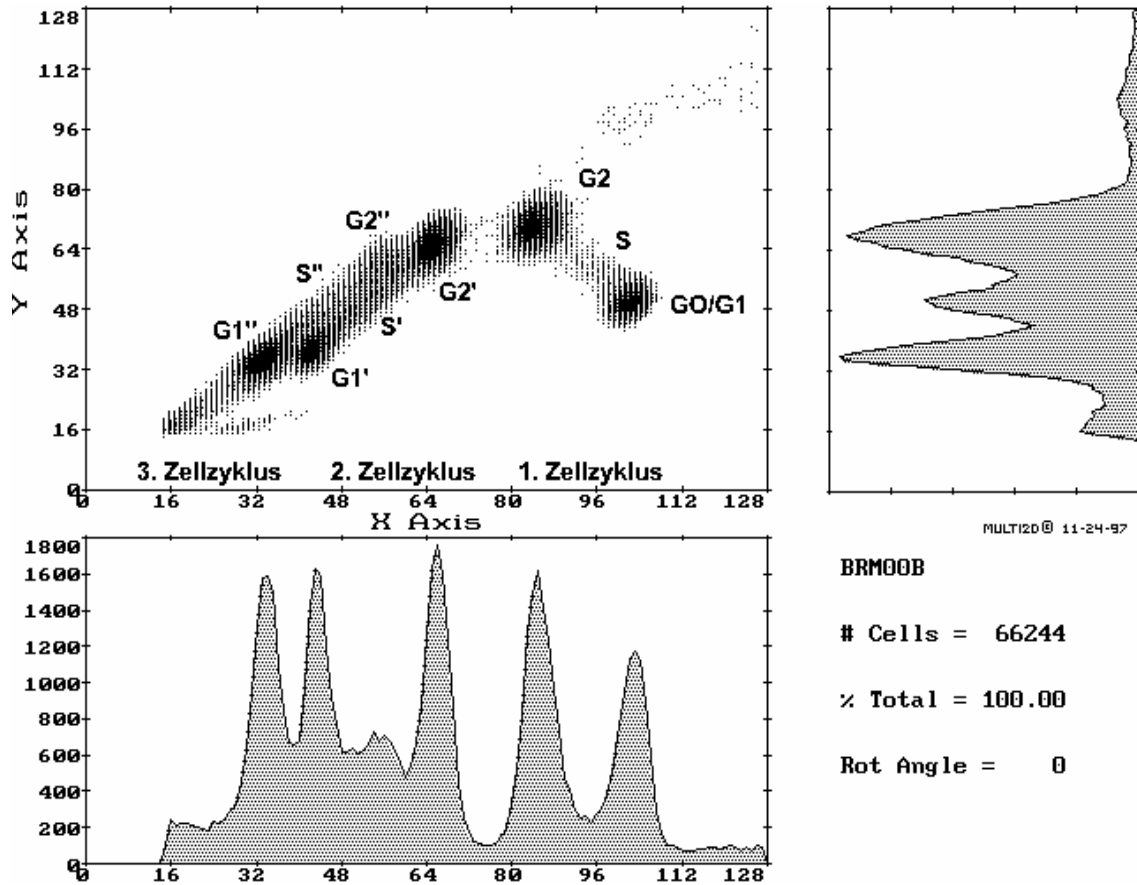


Abb. 1: Zweidimensionales BrdU/Hoechst-EB Histogramm mit den für FA typischen Zellzyklusdefekt bei einem achtjährigen Patienten.: Die nicht-proliferierenden G0/G1-Fraktionen sind mit Kontrollpersonen (Abb. 2, Seite 17) vergleichbar. Die proliferierenden Zellen durchlaufen drei bis vier vollständige Zellzyklen. Auffällig ist die Erhöhung der G2-Phasen. Die X-Achse repräsentiert die BrdU/Hoechst Fluoreszenz, die Y-Achse die Ethidumbromid Fluoreszenz.

1.2.2 Ataxia teleangiectasia (AT)

Die **klinischen Merkmale** für AT sind Ataxie und Teleangiectasien. Ursächlich für die Ataxie ist eine progressive cerebelläre Degeneration, die bei initial normaler Intelligenz zur zunehmenden geistigen und auch körperlichen Behinderung führt. Meist fallen die

Patienten im Kleinkindesalter bei den ersten Gehversuchen durch ataktische Bewegungen auf. Teleangiectasien treten häufig zwischen dem 2. und 8. Lebensjahr und meist am deutlichsten an den Konjunktiven sowie allgemein im Kopfbereich und an Arm- und Kniebeugen auf. Weitere Symptome sind eine Wachstumsretardierung und die Infertilität. Die Patienten versterben häufig an pulmonalen Infekten aufgrund einer Immundefizienz, welche sowohl auf zellulärer Ebene bei Thymushypoplasie als auch auf humoraler Ebene bei Immunglobulinmangel besteht. Auch bei diesem Krankheitsbild besteht eine Prädisposition zur Neoplasie, insbesondere des lymphoretikulären Systems hauptsächlich in Form von Non-Hodgkin-Lymphomen und Leukämien. Die beiden letzten Symptome stellen die häufigsten Todesursachen dar. Bereits vor Auftreten von Symptomen kann sich eine Erhöhung des Serumspiegels von Alpha1-Fetoprotein zeigen.

Als **zytogenetische Merkmale** zeigen AT-Patienten meist eine erhöhte spontane Chromosomenbruchrate in kultivierten Lymphozyten und Fibroblasten (Aurias et al., 1980; Hecht et al., 1966; Kohn et al., 1982; Taylor et al., 1981) sowie häufig klonale Chromosomenaberrationen, die Chromosom 14 und 7 betreffen (Aurias et al., 1980, 1986; Aurias und Dutrillaux 1986; Taylor, 1982). Allerdings sind immer wieder Zellen ohne erhöhte spontane chromosomale Fragilität aufgefallen (Kohn et al., 1982; Taylor et al., 1981), so dass ein unauffälliger zytogenetischer Befund bei deutlichen klinischen Hinweisen durch eine zellkinetische Untersuchung abgeklärt werden muss. Ein weiteres Kriterium für das Vorliegen einer AT ist die erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen (Edwards et al., 1981; Taylor et al., 1975) sowie Radiomimetika wie Bleomycin (Taylor et al.; 1979). Hierfür wurden verschiedene diagnostische Testsysteme an kultivierten AT-Zellen etabliert. Die Chromosomenbruchrate von bestrahlten AT-Zellen ist gegenüber Kontrollen erhöht (Cohen et al., 1981; Shaham et al., 1983; Taylor et al., 1976). Weiterhin wird die Koloniebildung von Fibroblasten (Taylor et al., 1975) bzw. Lymphozyten (Henderson et al., 1985) nach Bestrahlung der Zellen untersucht.

Das sogenannte Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) ist ein AT-verwandtes Syndrom, welches zwar nicht die namensgebenden klinischen Symptome von klassischer AT aufweist, jedoch Gemeinsamkeiten in Form von Immundefizienz, erhöhter spontaner

Chromosomeninstabilität sowie gesteigerter Strahlensensitivität aufweist (Seemanova et al., 1985; Taalman et al., 1989).

Da die Prävalenz der AT nur 1:40.000 bis 1:100.000 beträgt (Bridges et al., 1985) und die klinischen Symptome verzögert auftreten können, werden die Betroffenen in bislang unauffälligen Familien häufig erst nach einigen Lebensjahren diagnostiziert.

1.3 Aplastische Anämie (AA)

Die Diagnose aplastische Anämie bezeichnet im Gegensatz zu den genetisch bedingten aplastischen Syndromen eine erworbene Störung der Hämatopoese.

Die Pathogenese ist weitgehend ungeklärt. Zumeist handelt es sich um ein idiopathisches Geschehen, das heißt auslösende Faktoren wie Arzneimittel, Infektionen oder Bestrahlung sind nur selten nachweisbar.

Die mit einer Inzidenz von zwei bis sechs zu 1.000.000 Menschen pro Jahr weltweit seltene Erkrankung (Young und Alter 1994, Kapitel 2) ist gekennzeichnet durch eine Reduktion oder ein Ausbleiben der Bildung von 2 oder 3 Zellreihen (Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten) der normalen Hämatopoese des Knochenmarks. Die Pathogenese ist weitgehend ungeklärt. Man vermutet, dass es verschiedene Mechanismen des KM-Versagens gibt (Young und Alter, 1994, Kapitel 4 und 6).

Die Diagnosesicherung erfolgt durch Knochenmarkanalyse nach Stanzbiopsie. Als Therapie stehen derzeit die Knochenmarktransplantation und die Immunsuppression zur Verfügung (Führer et al., 1994).

Die "Erworbene aplastische Anämie" ist die häufigste Differentialdiagnose zur FA. Diese nicht vererbte Form der "schweren aplastischen Anämie" kommt wesentlich häufiger in der Bevölkerung vor. Die Abgrenzung dieser beiden Krankheitsbilder ist wichtig hinsichtlich der Therapieplanung und speziell für Familien mit weiterem Kinderwunsch.

1.4 Fragestellung

In einer retrospektiven Studie wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von drei konsekutiven Zellzyklen das Proliferationsmuster PHA-stimulierter Lymphozyten bei FA, AT und AA mittels BrdU/Hoechst 33258 EB Durchflußzytometrie untersucht. Die Aufgabe bestand darin, Zellzyklusdaten als Funktion von Probandenalter und klinischer Diagnose darzustellen, da bekannt ist, dass das Spenderalter einen Einfluß auf die Zellaktivierung hat (Kubbies et al., 1985b; Schindler et al., 1988).

2 Material und Methoden

2.1 Isolation der mononukleären Zellen

Für die hochauflösende Analyse von Zellzyklusstörungen erwies sich das System der natürlicherweise synchron vorliegenden mononukleären Zellen des menschlichen Blutes als besonders geeignet. PHA-stimulierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden aufgrund dieser Ergebnisse als Testsystem eingesetzt.

Als Untersuchungsmaterial diente heparinisiertes Vollblut von Patienten mit der klinischen Diagnose Fanconi Anämie, aplastische Anämie, Ataxia teleangiectasia und AT-verwandter Syndrome sowie Kontrollwerte gesunder Probanden. 5-10ml venöses Vollblut wurde mit 50-150 I.E./ml Heparin Novo steril entnommen und innerhalb von 24 Stunden bearbeitet. Aufbewahrung und Versand der Blutproben erfolgte bei Raumtemperatur (RT).

Die Isolierung der mononukleären Zellen erfolgte mittels der Ficoll-Paque-Technik. Das Blut wurde in ein spitzen 15-ml Falcon-Zentrifugenröhrchen gegeben und bei RT und 1200 U/min für 10 Min. zentrifugiert, um die Zellen vom Serum zu trennen. Das autologe Serum (AS) wurde abgenommen und als Kulturzusatz steril aufbewahrt. Das Volumen des AS wurde mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) bei RT ersetzt, und das so erhaltene Gemisch nochmals im Verhältnis 1:1 mit HBSS verdünnt. Für die Dichtegradienten wurde ein Volumen von jeweils vier bis max. 10ml sehr vorsichtig mit einer Pipette auf 3ml Ficoll-Lösung (Ficoll-Paque, Pharmacia) geschichtet und bei

4°C mit 2100 U/Min. für mindestens 30 Min. zentrifugiert. Die durch das Ficoll verklumpten Erythrozyten sedimentieren bei der Zentrifugation, während die Lymphozyten sich in einer weißlichen Interphaseschicht anreichern. Anschließend wurde der HBSS-Serum-Überstand abgenommen und verworfen, die Interphase mit einer Pasteurpipette entnommen und in HBSS bei RT suspendiert (maximal 2 Gradienten in 10 ml HBSS). Es folgte zweimaliges Waschen mit HBSS bei RT durch Zentrifugation für jeweils 15 Min. bei 2100 U/Min. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet nach dem ersten Waschschrift in 10ml HBSS suspendiert und nach dem zweiten Waschschrift in 3ml RPMI 1640 (Gibco, Karlsruhe) resuspendiert.

Nach der Isolation der Lymphozyten wurde die Anzahl der Zellen in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Zellzählung erfolgte nach Behandlung mit einprozentiger Essigsäure (Merck, Darmstadt) im Verhältnis 1:1 zur Lyse verbliebener Erythrozyten und Färbung mit 0,2%-iger Trypanblaulösung (Gibco, Karlsruhe) zur Kontrolle der Vitalität der Zellen. Die Zellsuspension wurde auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

2.2 Kultivierung der isolierten Zellen

Als Standardkultur wurden ein 5ml Zellkulturmedium angelegt. Dieses bestand aus RPMI 1640, supplementiert mit 1% AS, 15% fötalem Kälberserum (FCS, Gibco; hitzeinaktiviert), $1 \cdot 10^{-4}$ M BrdU als Thymidin-Basenalogon, $1 \cdot 10^{-4}$ M Desoxycytidin (DC), $2 \cdot 10^{-5}$ M α -Monothioglycerol und 1,2 μ g/ml Phytohämagglutinin (PHA, Wellcome) als polyklonales Mitogen.

Für die Ansätze der Zellzyklusanalyse wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml (0,5 ml der eingestellten Zellsuspension) in 50 ml-Zellkulturflaschen (ZKF) eingesät. Pro Proband wurden dabei jeweils zwei Kulturen angesetzt. Da in die DNA inkorporiertes BrdU bei direkter Lichteinstrahlung Photoreaktionen vermittelt, wurden die ZKF sorgfältig in Aluminiumfolie eingewickelt. Die Kulturen wurden schließlich für 72 Stunden in 5% CO₂- und 20% O₂-begasten Brutschränken bei 37,5°C und gesättigter Wasserdampfatmosphäre

inkubiert. Für die Fragestellung der Ataxia Teleangiectasia wurden die Zellen bereits nach der Supplementierung mit 1% AS eingesät, und die Kulturen anschließend sofort mit der diagnostisch relevanten Dosis von 1,5 Gy bestrahlt. Parallel muß eine Kontrolle ohne Bestrahlung mitgeführt werden. Die Bestrahlung erfolgt mit einer Dosisrate von 1,0 Gy/min (110 kV, 10 mA, 5 mm Aluminiumfilter). Nach der Bestrahlung werden innerhalb eines Zeitraumes von bis zu 30 Minuten die übrigen Kulturzusätze dazugegeben.

2.3 Ernte der Zellen

Die nachfolgenden Schritte erfolgten bei Abdunkelung und Rotlicht (>550nm), um die Zellen vor kurzwelligem Licht zu schützen.

Zum Ernten wurden die Zellen in 15 ml-Falcon-Röhrchen pipettiert, bei RT und 900 U/Min. für 15 Min. abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Einfriermedium (80% RPMI, 10%FCS, 10%DMSO) resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Messung bei -20°C lichtgeschützt aufbewahrt.

2.4 Zellzyklusanalyse

2.4.1 Durchflußzytometrie

2.4.1.1 Prinzip

Die zweidimensionale BrdU/Hoechst 33258-Ethidiumbromid Durchflußzytometrie ermöglicht die Erfassung der Zellzyklusverteilung über drei bis vier sukzessive Zellzyklen, die quantitative Analyse der jeweiligen G1-, S- und G2-Phasen sowie der nicht-proliferierenden G0-G1-Fraktion.

Es können zwischen 1.000 und 10.000 Partikel einer Suspension pro Sekunde auf deren Fluoreszenzeigenschaften hinsichtlich Größe und Menge charakterisiert werden.

Durch den kontinuierlichen Einbau von BrdU in die DNS während der Kulturdauer und der anschließenden Anfärbung mit Hoechst 33258 kann nicht nur der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt werden, sondern zusätzlich das Fluoreszenz-Quenching und damit der zeitliche Ablauf des BrdU-Einbaus und die Anzahl der Zellteilungen dargestellt werden.

Hierfür werden die zu untersuchenden Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch kurzwelliges Licht angeregt, emittieren sie selbst Fluoreszenzlicht einer längeren Wellenlänge, welches durch ein optisches System erfasst, gebündelt und auf Photodetektoren umgeleitet wird.

Der Lichtimpuls jeder Einzelzelle wird seiner Intensität nach in ein elektrisches Signal umgewandelt und auf einem Kathodenstrahloszilloskop dargestellt. Nach Digitalisierung können die Signale auf PC übertragen und ausgewertet werden.

Dadurch, dass unterschiedliche Oberflächenmerkmale und Zellinhaltsstoffe selektiv angefärbt werden können, ist es auch möglich, Zellparameter wie Proteingehalt, Enzymaktivitäten, Rezeptoren und Antigene zu bestimmen. Daher wird die Durchflußzytometrie in zahlreichen Laboruntersuchungen eingesetzt.

2.4.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe und Quench-Effekt

Im Rahmen dieser Arbeit werden zur Doppelfärbung der DNA die Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiumbromid (EB, Sigma, Deisenhofen) und Hoechst 33258 (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

EB interkaliert basenunspezifisch in doppelsträngige DNS, wobei es zum größten Teil durch das von Hoechst 33258 emittierte Licht angeregt wird. Das Absorptionsmaximum und die Fluoreszenzintensität liegen bei 520 nm bzw. 610 nm.

Hoechst 33258 bindet vorzugsweise nicht interkalierend über Wasserstoffbrücken an AT-reiche DNA-Regionen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 356 nm und die Fluoreszenz-Emission bei 460 nm, also in der Nähe des Absorptionsmaximums von EB, wobei die Fluoreszenzintensität proportional zum AT-Gehalt zunimmt.

Erfolgt die Kultivierung der Zellen mit BrdU, einem Thymidinanalogon, das während der S-Phase in die DNA inkorporiert wird, kann Hoechst 33258 Farbstoff an den entsprechenden Abschnitten nicht binden. Diese durch das BrdU bedingte Reduktion der Fluoreszenz wird als Quench-Effekt bezeichnet. Da dieser sich proportional zum pro Zellzyklus eingelagerten BrdU verhält, wird eine genaue Unterscheidung und Quantifizierung der einzelnen Zellzyklen (Hoechst) und ihrer Kompartimente (EB) möglich.

2.4.1.3 Anfärben der DNS

Die Färbung der Zellproben wurde wegen der Empfindlichkeit des BrdU auf kurzwelliges Licht bei indirektem Licht durchgeführt. Die eingefrorenen Lymphozyten wurden im Wasserbad bei RT aufgetaut und für 6 Min. mit 460*g bei RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen wurde, wurde das Pellet in 1,2 ug/ml Hoechst 33258 Färbepuffer (4°C) so resuspendiert, dass eine Zelldichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml erreicht wurde. Der Färbepuffer bestand aus 0,1 M Tris-HCL (pH 7,4), 0,154 M NaCl, 0,5 mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 0,1% NP40 und 0,2% BSA (Bovine Serum Albumin). Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. bei 4°C im Dunkeln, erfolgte die Färbung mit EB durch Zugabe in einer Endkonzentration von 1,5 ul/ml. Im Anschluss an eine weitere Inkubation unter gleichen Bedingungen erfolgte die Messung.

2.4.1.4 Durchflußzytometrische Messung

Das System zur quantitativen Erfassung der fluoreszierenden DNA setzt sich zusammen aus einem Impulszytometer mit Quecksilberhochdrucklampe PARTEC mit integrierter Datenverarbeitung.

Der Zelltransport zur Messstelle erfolgte mittels einer Kapillare, die die Zellsuspension aus dem Probenmeßröhrchen ansaugt. Durch einen schneller fließenden Hüllstrom aus destilliertem Wasser wurde die Flussbahn soweit zentriert, dass die Zellen die Messkammer 'perlschnurartig' aneinandergereiht passierten (hydrodynamische

Fokussierung). Die Zellen durchlaufen die Messkammer mit einer Geschwindigkeit von bis zu 3m/sec. bzw. 150-200 Zellen/sec., und werden anschließend in einem Auffanggefäß gesammelt.

In der Messkammer wurden die Zellen vom Anregungslicht der Quecksilberhochdrucklampe (HBO 100, Osram, Spektrum 300-800) getroffen. Dieses Licht wurde mittels einer Köhlerlinse parallelisiert, durch ein System hintereinandergeschalteter Anregungsfilter (UV-Glasfilter UG 1, Buntglasfilter BG 38, Schott; Graufilter, Durchlässigkeit 1%) auf den UV- Bereich begrenzt und schließlich durch einen dichroitischen Spiegel (Farbteiler FT 450) in Richtung Messkammer gebrochen. Durchfluss einer angefärbte Zelle den Tiefenschärfbereich des Objektivs, wurden beide eingesetzten Fluorochrome angeregt und emittierten Fluoreszenzsignale ihrer charakteristischen Wellenlänge. Der Gesamtlichtimpuls beider Fluorochrome wurde durch mehrere Farbteiler und Sperrfilter (Farbteiler KF 450 und FT 510, Bandpass K 45 und K65) so auf zwei Photomultiplier übertragen, dass die beiden unterschiedlichen Fluoreszenzsignale getrennt aber simultan aufgezeichnet werden konnten. Dort wurden die Lichtimpulse in elektrische Signale umgewandelt, verstärkt und einem Analog/Digital-Wandler im Impulshöhenanalysator 2103 zugeführt. Als digitale Signale konnten sie nun auf einem Kathodenstrahloszilloskop dargestellt und mittels PC ausgewertet werden. Es wurden jeweils $5 \cdot 10^4$ Zellen analysiert, um statistische Schwankungen zu reduzieren. Auf dem Computerbildschirm wurde die laufende Messung als Punktwolken in einem bivariaten Histogramm wiedergegeben, in dem die Fluoreszenzintensität des Hoechst 33258 auf der X-Achse und diejenige des EB auf der Y-Achse gezeigt wurde. Die Daten wurden schließlich mit Hilfe der Software Ahrens ACAS Zytometriesystem (Ahrens, Bargteheide) in einem Datenfile abgespeichert und analysiert.

2.4.1.5 Analyse der Datenfiles

Die Auswertung der zweidimensionalen Datenfiles erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes MULTI2D (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA). Damit wurden die einzelnen Zellzyklen mausgesteuert eingerahmt und auf eine Achse als ein-

dimensionales DNA-Verteilungshistogramm projiziert. Mit einem weiteren Mausgesteuerten Software- Programm MYCLE (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA) konnten die G1-, S- und G2-Phasenanteile berechnet werden.

Die auf diese Weise erhaltenen Daten über Zellzahl (MULTI2D) und Zellverteilung (MYCLE) wurden in das Software-Programm 2DAGE (Friedl, Universität Würzburg) für jeden Zellzyklus eingegeben. Um eine Vergleichbarkeit der Messungen untereinander zu erreichen, wurde damit die ursprüngliche Ausgangspopulation zurückberechnet, die wiederum Auskunft gab über die Zellzyklusverteilung der Zellen im Verhältnis zu Originalzellen in G0/G1, S, G2 des ersten Zellzyklus, bzw. G1, S, G2 der folgenden drei Zellzyklen.

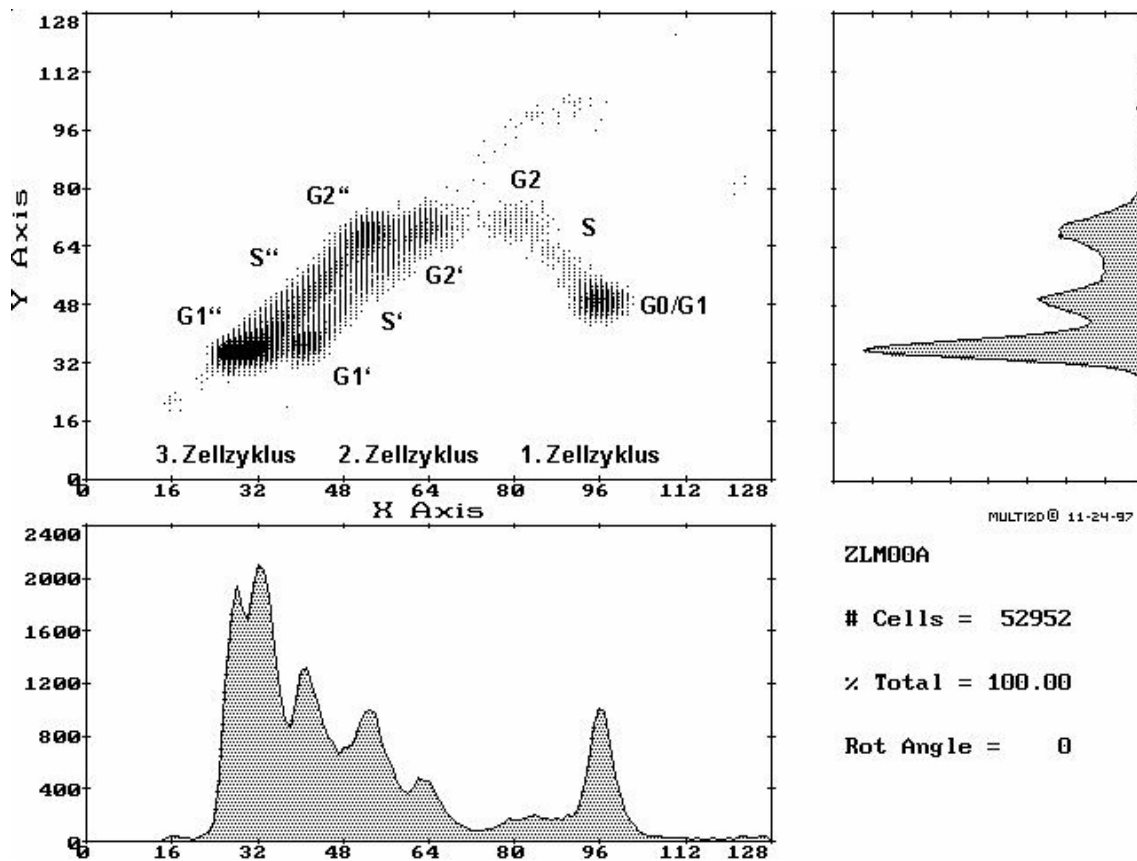


Abb. 2: Beispiel eines zweidimensionalen BrdU/Hoechst-EB Histogrammes der Zellzyklusanalyse peripherer Blutlymphozyten eines 25-jährigen gesunden Probanden. Die X-Achse repräsentiert die BrdU/Hoechst Fluoreszenz, die Y-Achse die Ethidiumbromid Fluoreszenz. Über die Akkumulation in einzelnen Phasenanteilen kann das Ausscheiden von Zellen aus dem Zellzyklus detektiert werden.

2.4.2 Statistische Verfahren

Für die vorliegende Arbeit wurden alle durchflußzytometrischen Messergebnisse mit beurteilungsfähigen Messwerten peripherer Blutlymphozyten von Januar 1993 bis Dezember 1997 von insgesamt 469 Patienten mit der Fragestellung FA, AT, AT-verbundener Syndrome und AA zusammengestellt und als Diagramme in Bezug zum Alter dargestellt.

Folgende Berechnungen wurden mit SPSS (Superior Performing Software Systems), einem Programm zur statistischen und graphischen Datenverarbeitung angewendet:

1. Deskriptive Statistiken:

Häufigkeiten, arithmetischer Mittelwert (MW), Streuung (SD)

2. Graphische Darstellung:

Einfache Tabellen, Häufigkeitstabellen, Streudiagramme

3. Parametrische Tests:

a) Test auf Varianzhomogenität nach Levene

Beim Vorliegen einer unabhängigen Variablen prüft dieser Test, ob die Residuen mit zunehmenden Werten dieser eine größere Streuung aufweisen.

b) T-Test bei unverbundenen Stichproben

Dieser Test überprüft, ob zwei unabhängige Stichproben aus Populationen mit demselben MW stammen.

c) Bivariate Korrelation nach Pearson

Die bivariate Korrelation nach Pearson ist ein Maß für die Güte der Anpassung der Regression an die Daten. Diese Korrelation misst den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen. Zur vergleichenden Quantifizierung der Testergebnisse wurden p-Werte berechnet: p-Werte unter 0,05 entsprechen einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% und wurden als signifikant bezeichnet; p-Werte unter 0,01 entsprechen einer

Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1% und wurden als hochsignifikant bezeichnet.

4. Nicht-parametrische Tests:

a) Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

Dieser Test prüft, ob Stichproben kleineren und mittleren Umfanges aus einer normalverteilten Population stammen.

b) Kruskal-Wallis-Test

Auf Rängen basierender Test bei drei oder mehr unabhängigen Stichproben, welcher die Verteilung einer Variablen in einer oder mehr Gruppen vergleicht.

5. Lineare Regression:

Hiermit wurde die Beziehung zwischen einer abhängigen (y , Zellzahl) und einer unabhängigen Variablen (x , Alter) untersucht und der Zusammenhang zwischen der Einflußvariablen x und der Zielvariablen y in Form einer mathematischen Gleichung dargestellt: $y = a \pm b \cdot x$: hierbei bezeichnet a den Achsenabschnitt auf der Ordinate und b den Steigungsparameter der linearen Regressionsfunktion. Da die Regressionsgerade ein minimales durchschnittliches Abstandsquadrat der Messpunkte aufweist, kann sie die Punktwolke optimal repräsentieren.

6. Bestimmtheitsmaß:

Das Bestimmtheitsmaß R^2 misst den Anteil der Variabilität, der durch die Regressionsgerade erklärt wird. Der Wertebereich erstreckt sich zwischen 0 und 1, wobei ein Maß nahe Null eine unbefriedigende Anpassung, eine große Maßzahl nahe Eins hingegen eine gute lineare Anpassung bedeutet. R^2 ist gleichbedeutend mit dem Quadrat der Korrelation nach Pearson.

3 Ergebnisse

3.1 Alter und Diagnose

Um Probandengruppen miteinander vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Altersverteilungen geprüft. FA-Patienten waren zum Zeitpunkt der Zellzyklusanalyse im Durchschnitt älter als alle anderen Probanden. FA-Patienten waren im Mittel 15,2 Jahre alt, bei AT-Patienten lag der Mittelwert bei 8,4 Jahre, bei AA-Patienten 9,7 Jahre und bei den Kontrollpersonen 12,0 Jahre. Die Mittelwerte des Alters der verschiedenen Diagnosegruppen zeigten im Vergleich jedoch keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,11$).

3.2 Alter und Geschlecht

Unter den 469 Probanden waren 238 weiblich (50,7%) und 231 männlich (49,2%). Die Probanden waren bis zu 73,1 Jahre alt, wobei das mittlere Alter bei 11,86 Jahren lag, die Streuung betrug 11,36 Jahre. Hinsichtlich der Geschlechtsverteilung über das Alter ließen sich innerhalb der Altersklassen für alle Probanden keine signifikanten Unterschiede ausmachen (M: MW = 11,15, SD = 10,10; W: MW = 12,53, SD = 12,43).

3.3 Diagnosen-Häufigkeit

Bei 81 Patienten (17,3% aller Probanden) war die Diagnose einer FA gestellt worden. 35 Patienten (7,5%) hatten eine AT. Bei 25 Patienten (5,3%) wurde eine AA festgestellt und bei 58 Patienten (12,4%) konnte die Verdachtsdiagnose AA noch nicht gesichert werden.

Die Kontrollgruppe (219 Personen) machte 46,7% aus. Die verbliebene Diagnosegruppe (51 Personen) setzte sich zusammen aus: 3 Patienten (0,6%), bei denen die Diagnose NBS gestellt wurde, einer Patientin (0,2%), bei der während der statistischen Auswertung der Verdacht auf NBS bestand, 3 Patienten (0,6%), bei denen eine AT noch nicht gesichert werden konnte, 9 Patienten (1,9%), bei denen man Kontrollen vermutete,

2 Patienten (0,4%), die sicher keine AT hatten, und ein Patient, der sicher keine FA (0,2%) hatte. Bei weiteren 32 Patienten (6,8 %) konnte keine Diagnose eruiert werden.

3.4 Geschlecht und Diagnose

In der Vergleichsgruppe waren 140 Probanden weiblich und 130 Probanden männlich. Das Verhältnis weiblich zu männlich betrug in der Gruppe der FA-Patienten 45:36, bei den AT-Patienten 15:20, bei den AA-Patienten 14:11 und bei den Patienten mit fraglicher AA (AA?) 24:33. Beim Vergleich dieser Diagnosegruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Geschlechterverteilung.

3.5 Alter und Geschlecht innerhalb der Diagnosegruppen

Weibliche FA-Patienten wurden mit einem mittleren Alter von 16,2 Jahren (SD = 14,34) nicht signifikant älter als männliche FA-Patienten ($p = 0,46$), deren mittleres Alter bei 13,8 Jahren lag (SD = 12,3). Auch unter den AA-Patienten erreichten die Mädchen kein signifikant ($p = 0,55$) höheres Alter (MW = 10,75; SD = 11,19) als die Jungen (MW = 8,53; SD = 5,16). Unter den AT-Patienten gab es keine geschlechtsabhängigen Altersunterschiede ($p = 0,94$). Männliche AT-Patienten in dieser Gruppe wurden durchschnittlich 8,49 Jahre alt (SD = 5,5), weibliche 8,36 Jahre (SD = 4,8).

3.6 Vergleich der Diagnosegruppen in den einzelnen Zellzyklusparametern in Korrelation zum Alter

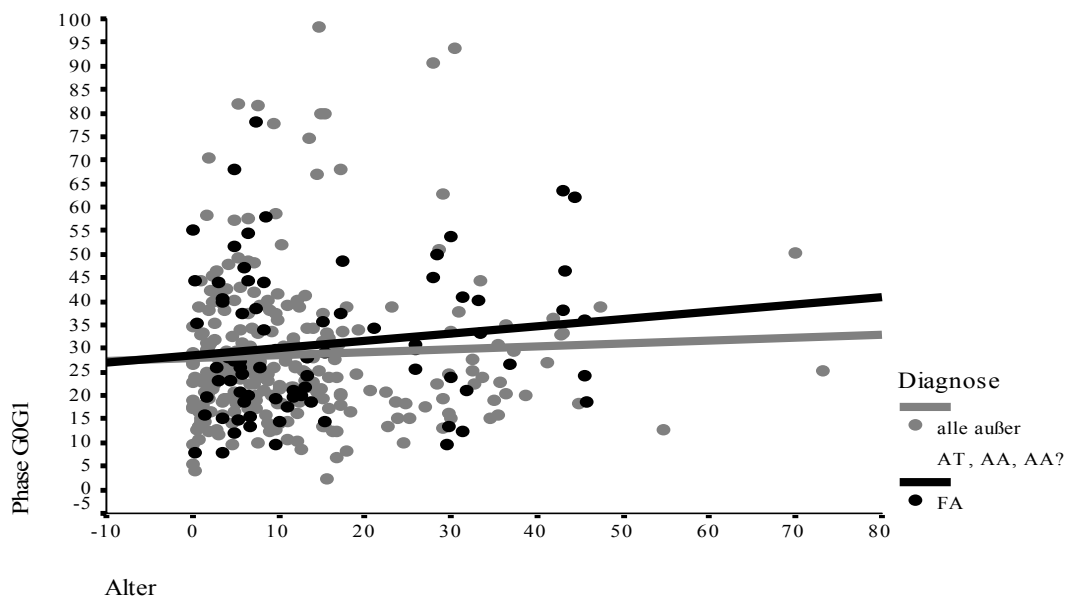
Ein Vergleich der durch Zellzyklusanalyse von 72-Stunden-Kulturen ermittelten Werte eines Kollektives aus 81 FA-Patienten, 35 AT-Patienten, 25 AA-Patienten und 58 Patienten mit fraglicher AA mit jeweils einer Vergleichsgruppe aus 219 Kontrollprobanden und 51 Personen aller übrigen Diagnosegruppen (siehe Gliederungspunkt 3.3) zeigt, wie sich FA-, AT-, AA- und Kontrolllymphozyten bei

unterschiedlichem Alter auf die jeweiligen Zellzykluskompartimente verteilt. Im Folgenden werden die Messungen des Labors der letzten 5 Jahre zusammengestellt.

3.6.1 Zellzyklusverteilung bei Patienten mit Fanconi Anämie

Bei dieser Gegenüberstellung wurden 353 Patienten (74,9%) erfasst. 81 Patienten (17,2%) mit der Diagnose FA und 270 Patienten (57,7%) in der Vergleichsgruppe (219 Kontrollprobanden und 51 Personen der übrigen Diagnosegruppen). Das Alter bei FA-Patienten war mit einem MW von 15,16 (SD = 13,4) höher als bei der Vergleichsgruppe (MW = 12,23; SD = 12,12).

3.6.1.1 G0G1-Phase des 1. Zyklus

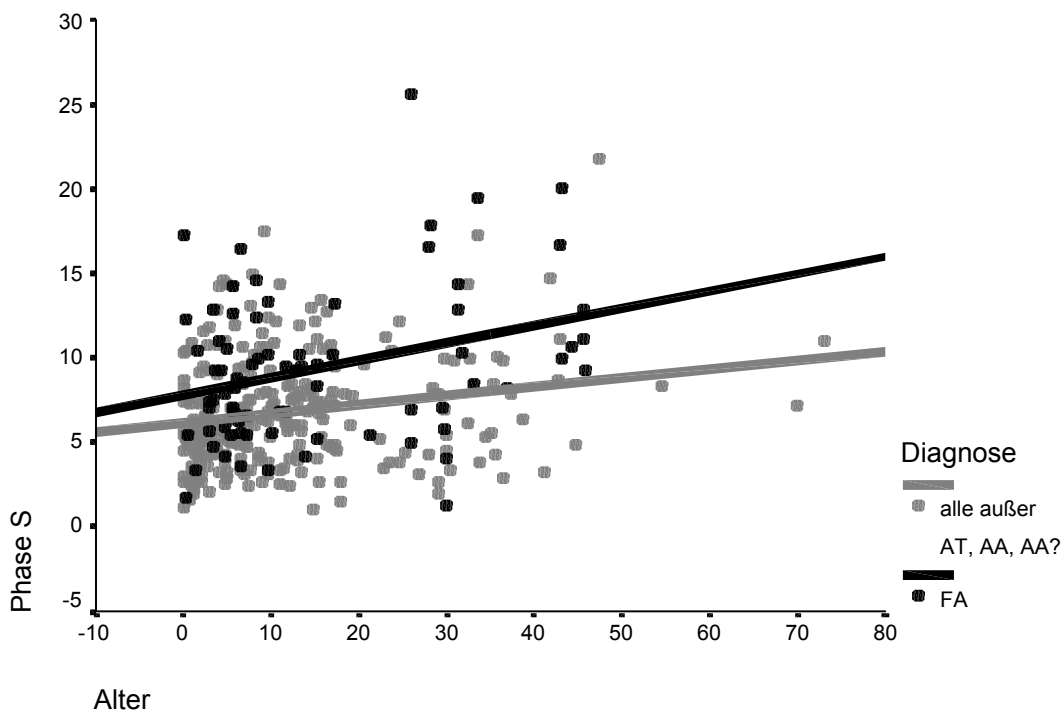


Für die G0G1-Phase des 1. Zyklus ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. In der Ruhephase befanden sich ein annähernd gleichgroßer Zellanteil bei Patienten und Kontrollen. Für FA-Patienten lag der Mittelwert bei 31,26 (SD = 15,23). Somit ließen sich 68,74% der Zellen stimulieren. Die Kontrollgruppe und alle anderen Diagnosegruppen außer AT, AA und fraglicher AA hatten einen Mittelwert von 28,63

(SD = 15,80). Hier ließen sich entsprechend 71,37% Zellen stimulieren. Bezüglich des Anteils arretierter Zellen bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,412$). Die Aktivierung aus der G0/G1-Ruhephase war demnach bei Lymphozyten von FA-Patienten nicht beeinträchtigt.

Die Korrelation des Alters zu G0G1 zeigte sich sowohl bei FA-Patienten ($y = 28,66 + 0,154 x$; $p = 0,237$) als auch bei der Vergleichsgruppe ($y = 27,82 + 0,063 x$; $p = 0,448$) als nicht signifikant. Die Streuung der Messwerte war sowohl bei FA-Patienten ($R^2 = 0,018$) als auch bei der Vergleichsgruppe ($R^2 = 0,002$) zu groß, um die Regression zu erklären.

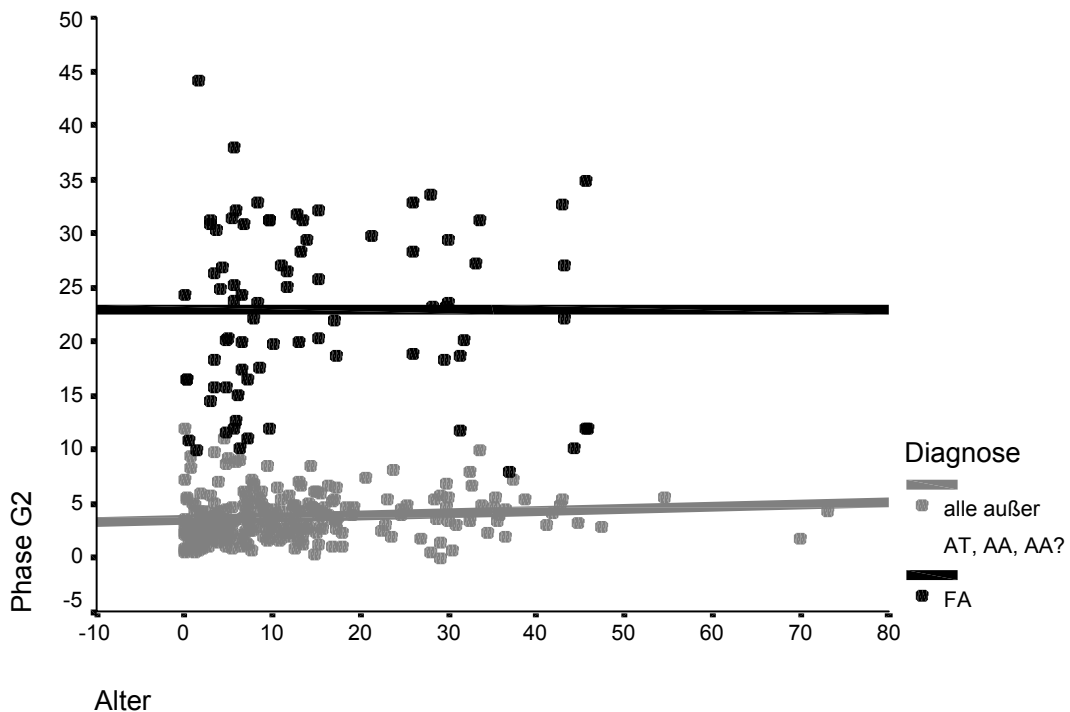
3.6.1.2 S-Phase des 1. Zyklus



In diesem Kompartiment zeigt sich eine auffällige Arrestfraktion bei FA-Patienten. Der MW der FA-Patienten in der Phase S des 1. Zyklus lag bei 9,31 (SD = 4,46). Der MW der anderen Gruppen war mit 6,81 (SD = 3,34) niedriger. Es bestand ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Diagnosegruppen ($p < 0,001$).

Die Korrelation zwischen der Phase S und dem Alter war bei beiden Diagnosegruppen ebenfalls signifikant. Die positive Steigung beider Regressionsgeraden verdeutlicht, dass mehr Zellen von Kulturen älterer Patienten und Probanden diese Phase durchliefen. Die Korrelation zum Alter war bei FA-Patienten auf der Ebene $p = 0,006$ signifikant. Die Gleichung der Regressionsgeraden bei FA-Patienten lautet $y = 7,75 + 0,103 x$. Immerhin 9,6% der Streuung der Zellzahlwerte sind über die Korrelation mit dem Alter erklärbar ($R^2 = 0,096$). Es zeigte sich bei der gegenübergestellten Diagnosegruppe gleichfalls eine hoch signifikante Korrelation von $p = 0,002$. Die Regressionsgerade zeigte entsprechend dem Diagramm eine geringere Steigung auf: $y = 6,15 + 0,053 x$. Hier waren lediglich 3,7% der Varianz der Zellzahlen durch die Altersregression erklärbar ($R^2 = 0,037$).

3.6.1.3 G2-Phase des 1. Zyklus



In der G2-Phase des 1. Zyklus fallen deutlich ausgeprägte Cluster auf, die in der Y-Achsen-Projektion als erhöhte Amplituden der G2-Phase-Peaks ausschließlich bei FA-Patienten sichtbar sind. So befanden sich 23,01% der Zellen bei den FA-Patienten (MW = 23,01; SD = 7,83) im Unterschied zu 3,81% aus den gegenübergestellten Diagnosegruppen (MW = 3,81; SD = 2,18) in der G2-Phase des 1. Zyklus. Diese Differenz erwies sich mit $p < 0,001$ als hochsignifikant.

Die zellkinetische Analyse zeigte für alle Patienten einen erhöhten $\Sigma G2/GF$ -Wert (Summe aller G2-Phasen/Growth Fraction). FA-Patienten erreichten einen Mittelwert von 0,49 (SD = 0,11), wohingegen der Mittelwert bei der Vergleichsgruppe bei 0,20 lag (SD = 0,05). Dieser Unterschied erwies sich nach dem Levene-Test der Varianzgleichheit als hoch signifikant ($p < 0,001$).

Die Korrelation bei FA-Patienten zwischen der Phase und dem Alter war nicht signifikant (Regressionsgleichung: $y = 22,90 + 0,001 x$; $p = 0,98$; $R^2 < 0,001$). Dies galt ebenso bei den gegenübergestellten Patienten/Probanden (Regressionsgleichung: $y = 3,49 + 0,020 x$; $p = 0,07$; $R^2 = 0,013$).

Nachfolgende Tabelle zeigt eine detaillierte Aufstellung aller Probanden, deren G2-Phase Werte zwischen 7 und 14,5 lagen. Angegeben werden zum einen jeweils die klinische Verdachtsdiagnose, mit der die Blutproben untersucht wurden, zum anderen die Flow-Diagnose, unter der sie im obigen Diagramm verzeichnet sind und die vorläufige Diagnose auf Grund des Zellzyklusbefundes.

Innerhalb dieser Gruppe von insgesamt 39 Probanden befanden sich fünf Patienten mit zytogenetisch nachgewiesenem Mosaik, drei Patienten mit fraglichem Mosaik, eine Patientin mit bekannter AA und fraglichem Mosaik, eine Patientin mit fraglich korrigiertem Mosaik, weitere fünf Patienten mit FA, vier Patienten mit AT, eine weitere Patientin mit AA, bei drei Patienten handelte es sich um FA-heterozygote Kontrollprobanden. Bei den übrigen 16 Patienten blieb die Diagnose unklar. Drei Patienten sind wiederholt gemessen worden, ein Patient ein drittes Mal. Im G2-Phase-Bereich zwischen 10 und 14,5 finden sich sieben gesicherte und zwei fragliche FA-Mosaik.

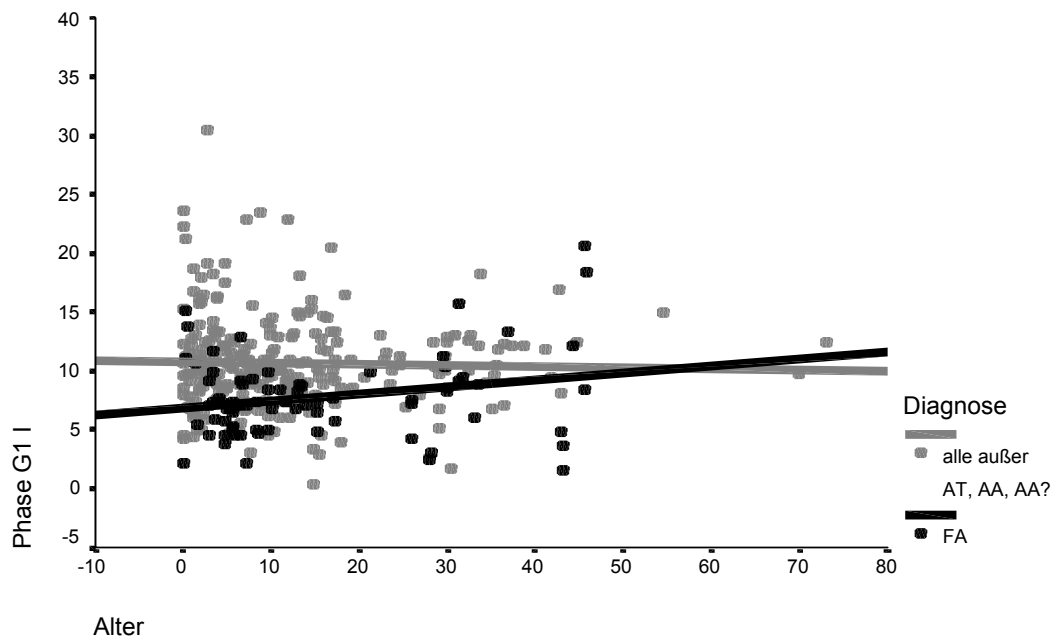
Phase G2	klinische Verdachtsdiagnose	Flow-Diagnose	vorläufige Diagnose
7,0	AA	AA	AA
7,0	FA	CON	unbekannt nicht FA
7,1	FA	CON	FA-Mosaik? Borderline-FA
7,2	FA	CON	unbekannt nicht FA FA-Mosaik? AA?
7,2	AT	CON	unbekannt nicht AT
7,2	CON	CON	
7,4	AT	CON	unbekannt
7,5	FA	CON	AA?
7,9	FA	CON	FA-Mosaik
7,9	FA	CON	CON (FA-heterozygot)
8,0	FA	CON	CON (FA-heterozygot)
8,1	AT	AT	AT
8,2	CON	CON	
8,3	FA	CON	unbekannt
8,4	AT	CON	unbekannt
8,4	FA	CON	unbekannt FA-Mosaik?

8,6	FA	CON	unbekannt
8,8	FA	CON	unbekannt nicht FA
9,1	FA	CON	CON (FA-heterozygot)
9,1	AT	AT	AT
9,1	AT	CON	unbekannt
9,2	AT	CON	unbekannt
9,3	FA	FA	FA
9,4	AT	AT	AT
9,7	AT	AT	AT
9,8	FA	CON	Korrigiertes FA-Mosaik?
10,0	FA	FA	FA
10,0	FA	CON	nicht FA
10,1	FA	AA	FA-Mosaik
10,2	FA	FA	FA-Mosaik
10,8	FA	FA	FA
11,0	FA	FA	FA-Mosaik?
11,1	AA	CON	AA FA-Mosaik ?
11,5	FA	FA	FA
11,8	FA	CON	FA-Mosaik
11,9	FA	FA	FA-Mosaik

11,9	FA	CON	FA- Mosaik
12,0	FA	FA	FA
12,0	FA	CON	FA-Mosaik
12,0	AT	CON	unbekannt
12,6	FA	FA	FA
13,4	FA	CON	nicht FA
14,5	FA	FA	FA-Mosaik

Auflistung aller Patienten mit G2-Phase-Werten zwischen 7 und 14,5

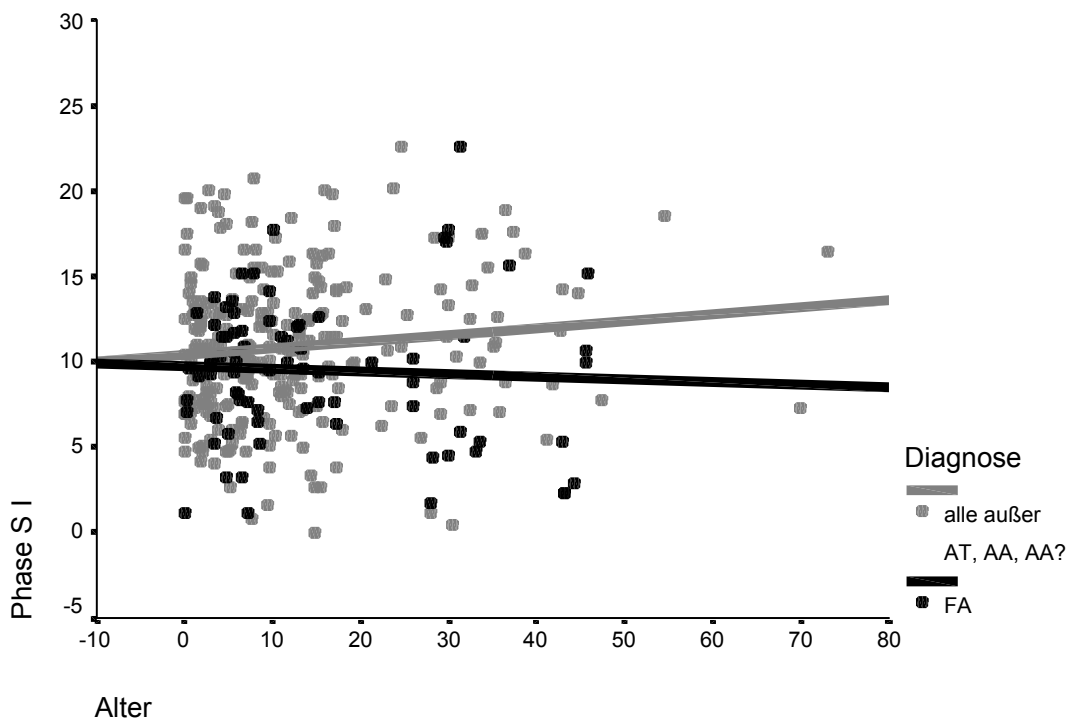
3.6.1.4 G1-Phase des 2. Zyklus



An die Erhöhung der G2-Phase-Werte schließt sich eine Erniedrigung der nachfolgenden G1-Phase-Werte. FA-Patienten erreichten in dieser Phase einen Mittelwert von 7,75 (SD = 3,40). Die Vergleichsgruppe hingegen erreichte mit 10,72 einen höheren Wert als in der vorangegangenen G2-Phase des 1. Zyklus (SD = 4,00). Die Differenz dieser beiden Gruppen erwies sich als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Das Alter spielte in dieser Phase keine signifikante Rolle (FA-Patienten: Regressionsgleichung: $y = 6,89 + 0,059 x$; $p = 0,43$; $R^2 = 0,053$; Vergleichsgruppe: Regressionsgleichung: $y = 10,83 - 0,011 x$; $p = 0,58$; $R^2 < 0,001$).

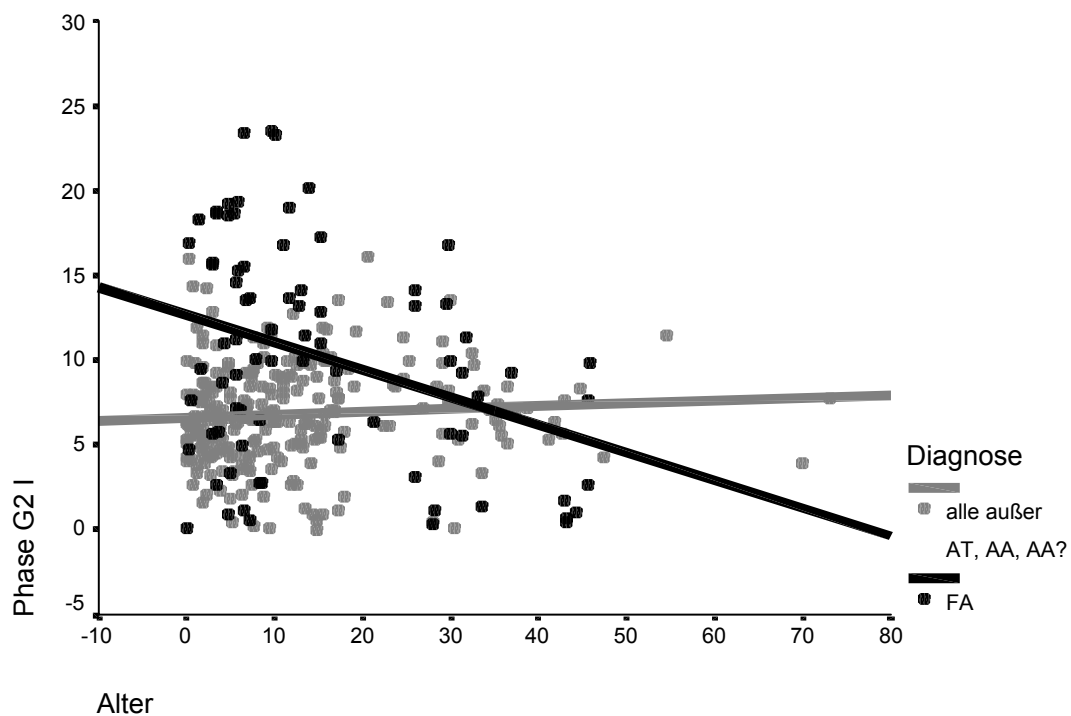
3.6.1.5 S-Phase des 2. Zyklus



Wie in der vorangegangenen Phase durchliefen auch die S-Phase des 2. Zyklus wesentlich weniger Lymphozyten der FA-Patienten. Diese Gruppe hatte einen Mittelwert von 9,39 (SD = 4,24). Der Mittelwert bei der Vergleichsgruppe lag bei 10,89 (SD = 4,35) und war somit signifikant höher ($p = 0,014$).

Die Korrelation zum Alter erwies sich bei den FA-Patienten als nicht signifikant (Regressionsgleichung: $y = 9,72 - 0,015 x$; $p = 0,68$; $R^2 = 0,002$), zeigt aber im Gegensatz zur Vergleichsgruppe durch ihre negative Steigung, dass weniger Zellen von älteren FA-Patienten den 2. Zellzyklus erreichen. Die Werte der Vergleichsgruppe zeigten ebenfalls keine Korrelation zum Alter (Regressionsgleichung: $y = 10,39 + 0,04 x$; $p = 0,075$; $R^2 = 0,012$).

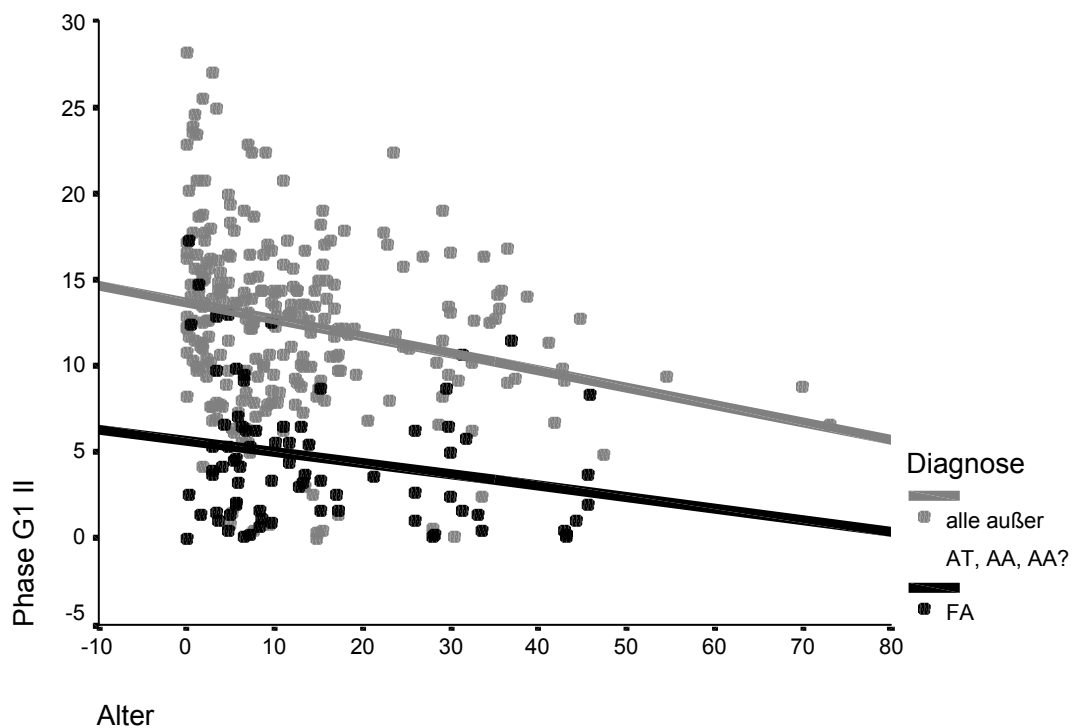
3.6.1.6 G2-Phase des 2. Zyklus



Nachdem die zwei letzten Phasen von weniger Lymphozyten aus der FA-Gruppe als aus der Vergleichsgruppe durchlaufen wurden, lag der Anteil der Zellen von FA-Patienten in der G2-Phase des 2. Zyklus wie zuletzt in der G2-Phase des 1. Zyklus signifikant höher als bei der Vergleichsgruppe. Der Mittelwert lag bei 9,98 (SD = 6,39), während der Mittelwert der Vergleichsgruppe hochsignifikant niedriger ($p < 0,001$) bei 6,76 lag (SD = 2,9).

In der G2-Phase des 2. Zyklus fällt bei der Gruppe der FA-Patienten eine starke Altersregression auf, die sich in der statistischen Analyse mit $p = 0,002$ als hoch signifikant erwies. Die zugehörige Regressionsgerade $y = 12,65 - 0,163 x$ zeigt durch ihre negative Steigung mit 11,7% dass gerade Lymphozyten älterer FA-Patienten über eine relativ geringere Proliferationskapazität verfügen. Die Korrelation mit dem Alter erklärt dabei 11,7% der Streuung der Zellzahlenwerte ($R^2 = 0,117$), Innerhalb der Vergleichsgruppe bestand keine Korrelation zum Alter (Regressionsgerade: $y = 6,58 + 0,017 x$; $p = 0,225$; $R^2 = 0,005$).

3.6.1.7 G1-Phase des 3. Zyklus

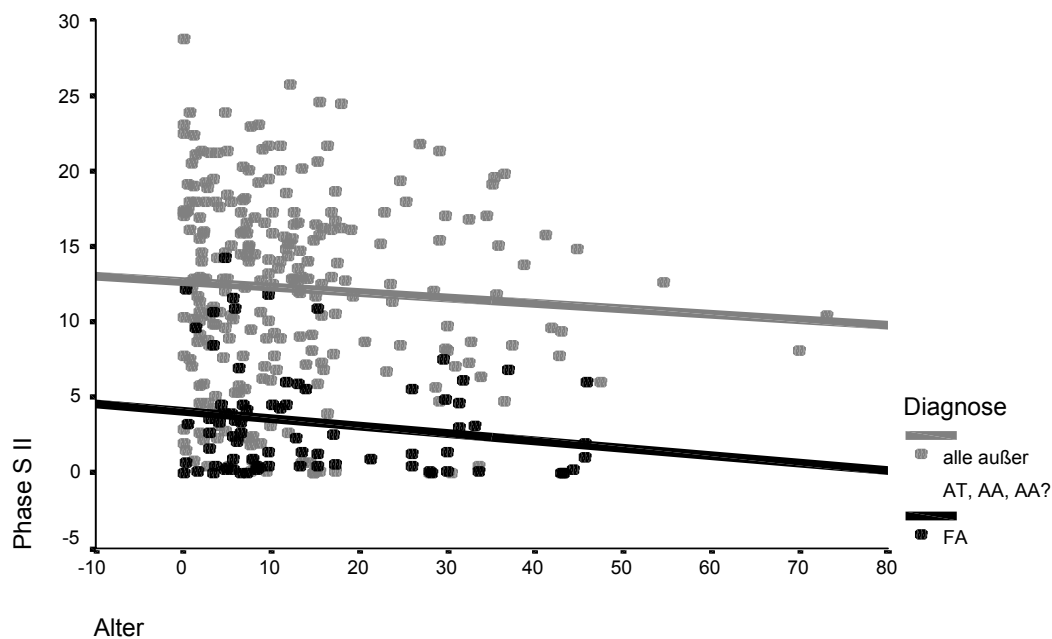


Die Majorität der Lymphozyten von FA-Patienten konnte nur zwei Zellzyklen vollenden. Es zeigten sich dadurch im 3. Zellzyklus signifikante Abweichungen vom zellkinetischen Bild normaler Kontrollpersonen. FA-Patienten erreichten in dieser Phase im Mittel nur noch einen Wert von 4,55 (SD = 3,89). Wie in den beiden Phasen zuvor erreichten den 3. Zellzyklus auch hier weniger Lymphozyten von älteren als von

jüngeren FA-Patienten. Die Vergleichsgruppe wies wesentlich höhere Werte auf. Der Mittelwert lag bei 12,34 (SD = 5,05) und war somit hochsignifikant größer zur Gruppe der FA-Patienten ($p < 0,001$).

Die Altersregression $y = 5,641 - 0,065 x$ bei den FA-Patienten ist mit $p = 0,048$ signifikant, 5% der Varianz wird durch die Altersregression erklärt ($R^2 = 0,05$). Die Korrelation zum Alter war innerhalb der Vergleichsgruppe mit $p < 0,001$ ebenfalls hoch signifikant. 5,7% der Streuung ($R^2 = 0,057$) waren durch die ebenfalls negative Regressionsgerade $y = 13,66 - 0,1 x$ erklärbar.

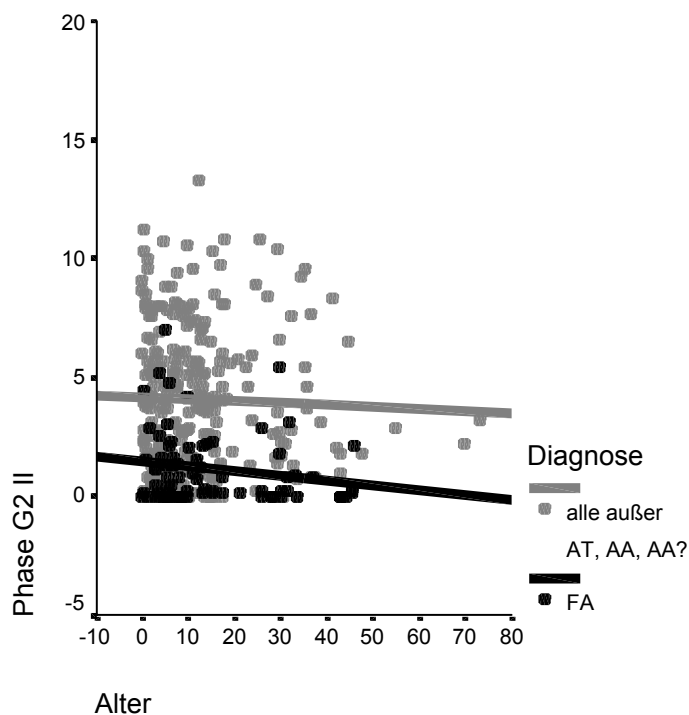
3.6.1.8 S-Phase des 3. Zyklus



Diese Phase wurde nur noch von wenigen Lymphozyten der FA-Patienten durchlaufen. Der Mittelwert bei dieser Gruppe war in der 3. S-Phase auf einen Wert von 3,22 gesunken (SD = 3,50). Die Vergleichsgruppe erreichte im Mittel 12,17 (SD = 6,29) und war damit hochsignifikant unterschiedlich zum MW bei FA-Patienten ($p < 0,001$).

Die Korrelation zum Alter war weder bei den FA-Patienten (Regressionsgerade: $y = 4,05 - 0,049 x$; $p = 0,10$; $R^2 = 0,035$) noch bei der Vergleichsgruppe (Regressionsgerade: $y = 12,68 - 0,036 x$; $p = 0,26$; $R^2 = 0,005$) signifikant.

3.6.1.9 G2-Phase des 3. Zyklus



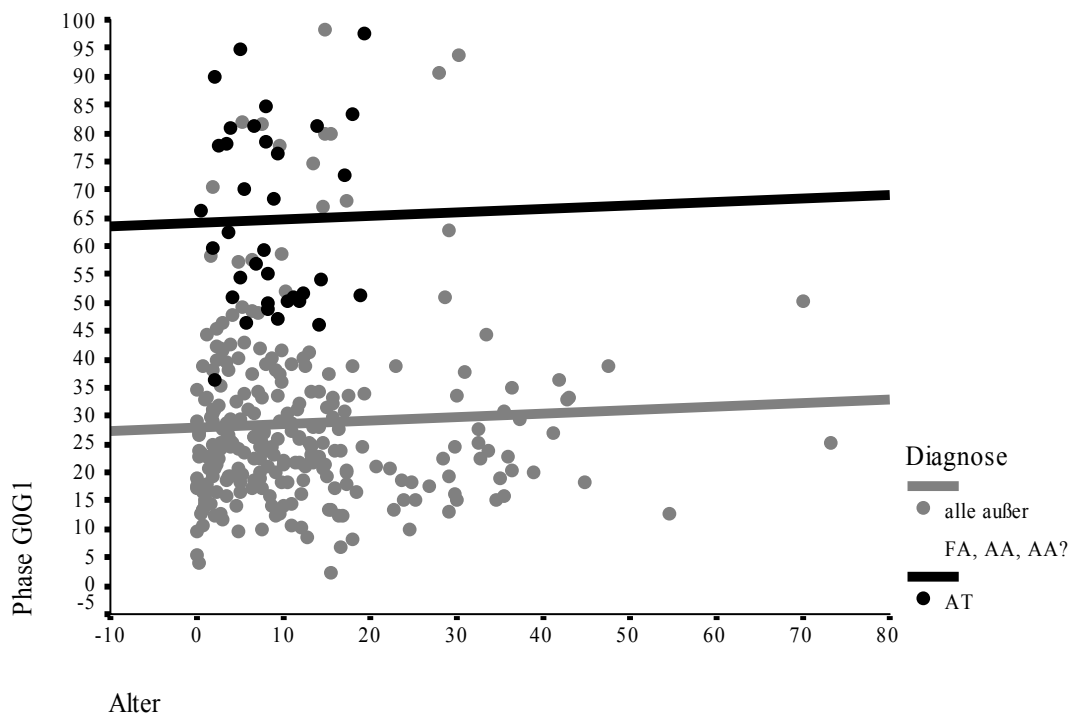
Die letzte Phase des 3. Zellzyklus erreichten nach 72 Stunden im Gegensatz zu 4,04 % (SD = 3,02) der Zellen der Vergleichsgruppe nur 1,1 % (SD = 1,45) der FA-Zellen

Die Korrelation zum Alter zeigte sich sowohl innerhalb der FA-Gruppe (Regressionsgerade: $y = 1,425 - 0,02 x$; $p = 0,11$; $R^2 = 0,03$), als auch innerhalb der gegenübergestellten Gruppe als nicht signifikant (Regressionsgerade: $y = 4,166 - 0,009 x$; $p = 0,58$; $R^2 = 0,01$). Die Anzahl der Zellen älterer FA-Patienten war in dieser Phase deutlich geringer als bei der Vergleichsgruppe.

3.6.2 Zellzyklusverteilung bei Patienten mit Ataxia teleangiectasia

Bei dieser Gegenüberstellung wurden 307 Patienten (65,2%) erfasst. 35 Patienten (7,4%) mit der Diagnose AT und 270 Patienten (57,7%) aus der Vergleichsgruppe (219 Kontrollprobanden und 51 Personen der übrigen Diagnosegruppen). AT-Patienten waren mit 8,43 (SD = 5,12) Jahren im Durchschnitt jünger als die Personen der Vergleichsgruppe (MW = 12,23; SD = 12,12).

3.6.2.1 G0G1-Phase des 1.Zyklus

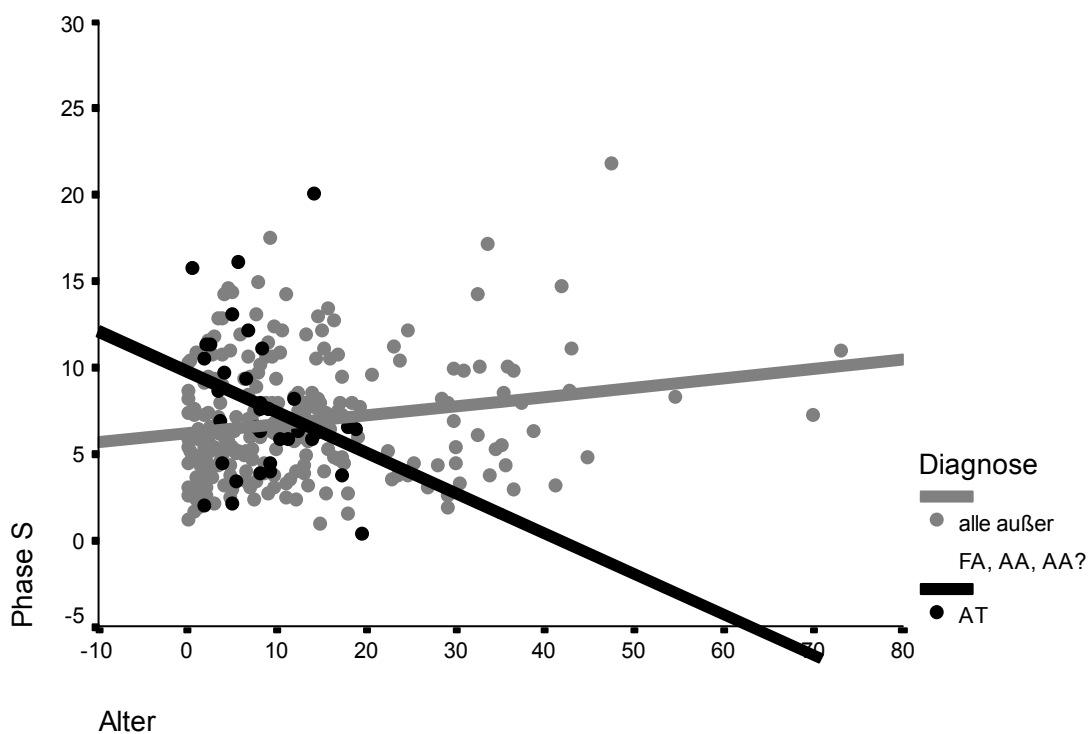


Innerhalb dieses Kompartimentes ergaben sich hochsignifikante Unterschiede zwischen der Diagnosegruppe und der Vergleichsgruppe: Ein Vergleich der unbestrahlten 72-Stunden-Kulturen zeigt bei AT-Patienten eine auffällig hohe, nicht proliferierende G0G1-Fraktion. Diese deutlich reduzierte Aktivierung von AT-Lymphozyten in vitro wird im Diagramm als gut voneinander getrennte Cluster sichtbar. Im Vergleich zu den

Kontrollen befanden sich mehr Zellen in der G0/G1-Phase und besaßen somit den geringsten Anteil proliferierender Zellen. Dementsprechend ergab die statistische Analyse bei den AT-Patienten einen relativ hohen Mittelwert von 64,69 (SD = 16,05) während die Vergleichsgruppe einen geringen Mittelwert von 28,63 (SD = 15,80) mit einer Signifikanz auf der Ebene $p < 0,001$ aufwies.

Es bestand bei beiden Diagnosegruppen keine Korrelation zum Alter (AT-Patienten: Regressionsgerade: $y = 64,175 + 0,062 x$; $p = 0,91$; $R^2 < 0,001$; Vergleichsgruppe: Regressionsgerade: $y = 27,815 + 0,063 x$; $p = 0,45$; $R^2 = 0,002$).

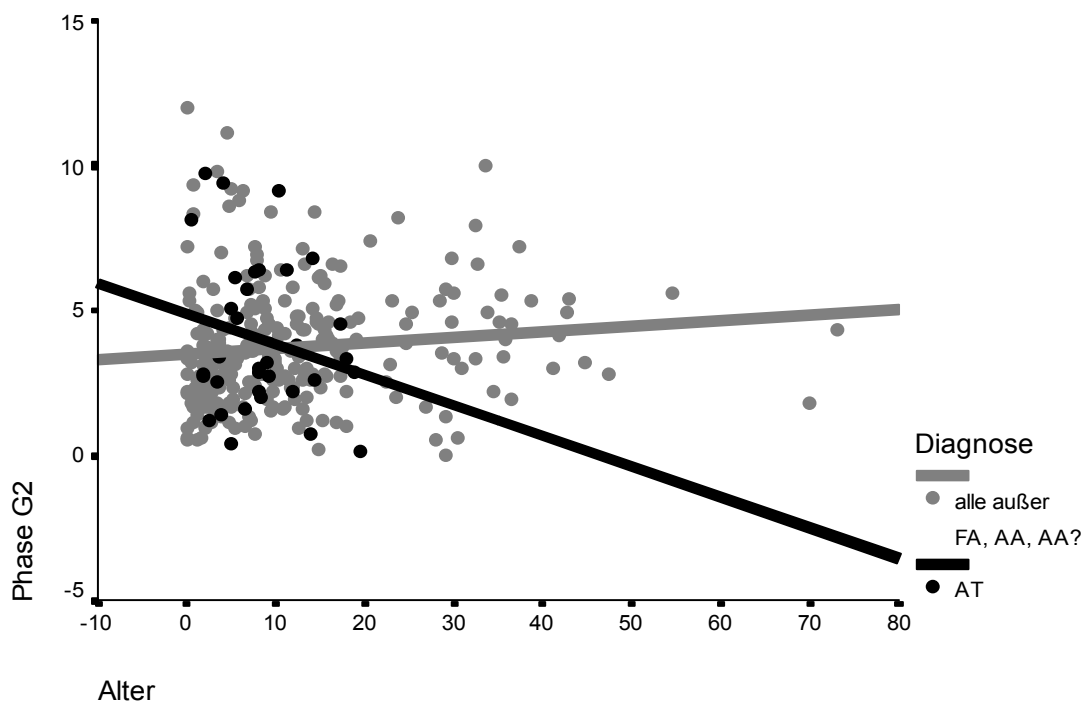
3.6.2.2 S-Phase des 1.Zyklus



Dieses Kompartiment zeigt eine unauffällige Zellzyklusverteilung. Der Anteil der Zellen in der S-Phase des 1. Zyklus lag bei den AT-Patienten nicht signifikant höher als bei der Vergleichsgruppe. Die Lymphozyten der AT-Patienten erreichten einen Mittelwert von 7,76 (SD = 4,25). Die Vergleichsgruppe wies einen Mittelwert von 6,91 auf (SD = 3,41), wobei sich die Mittelwerte nicht signifikant unterschieden ($p = 0,059$).

Auffallend ist hier die negative Steigung der Altersregressionsgeraden bei AT-Patienten ($y = 9,742 - 0,235 x$), welche sich als nicht signifikant erwies ($p = 0,1$; $R^2 = 0,08$). Die Regressionsgerade $y = 6,154 + 0,053 x$ war mit $p = 0,02$ signifikant. 3,7% waren mit ihr erklärbar ($R^2 = 0,037$).

3.6.2.3 G2 Phase des 1. Zyklus

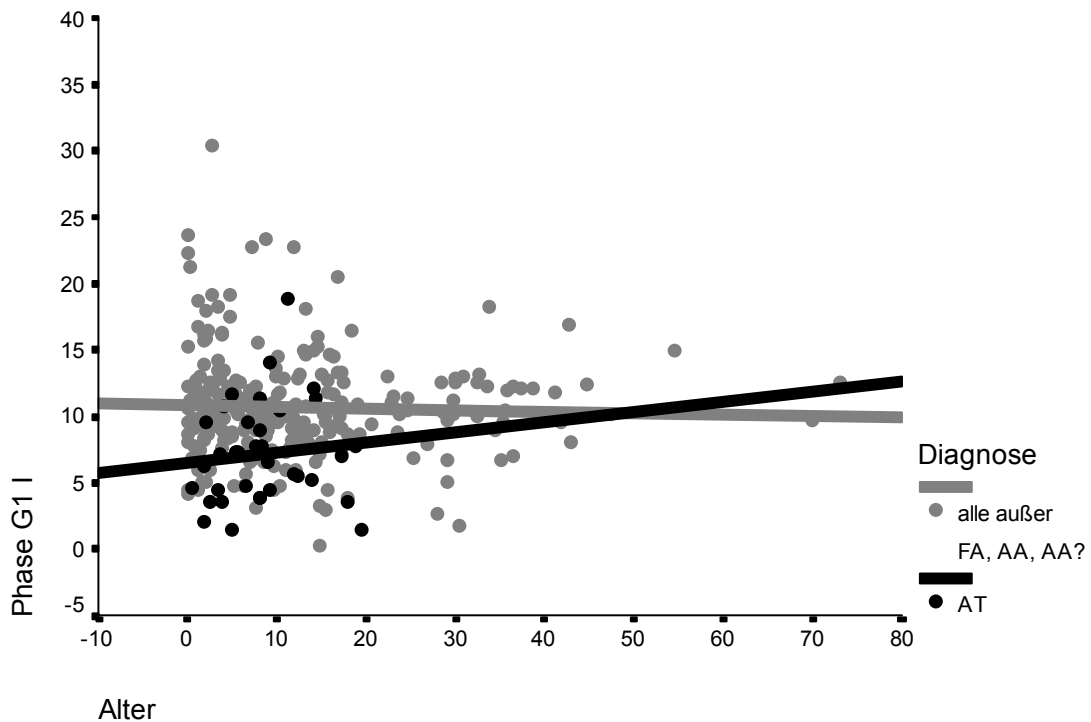


Eine geringe Anzahl von Zellen in der G2-Phase des 1. Zyklus war den Kulturen von AT-Patienten und denen aus der Vergleichsgruppe gemeinsam. Der Mittelwert für AT-Patienten lag in dieser Phase bei 3,99 (SD = 2,56). Die Vergleichsgruppe erreichte einen Mittelwert von 3,81 (SD = 2,18). Folgerichtig bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,278$).

Das Alter wies wie in der vorangegangenen Phase innerhalb der Gruppe der AT-Patienten eine relativ starke negative Regression auf. Innerhalb der AT-Gruppe sind 4,5% der Streuung der Zellzahlenwerte über die Alterskorrelation erklärbar ($y = 4,883 -$

0,105 x; $p = 0,22$; $R^2 = 0,045$) während bei der Vergleichsgruppe der Wert 1,3 % betrug ($y = 3,49 + 0,02 x$; $p = 0,069$; $R^2 = 0,013$).

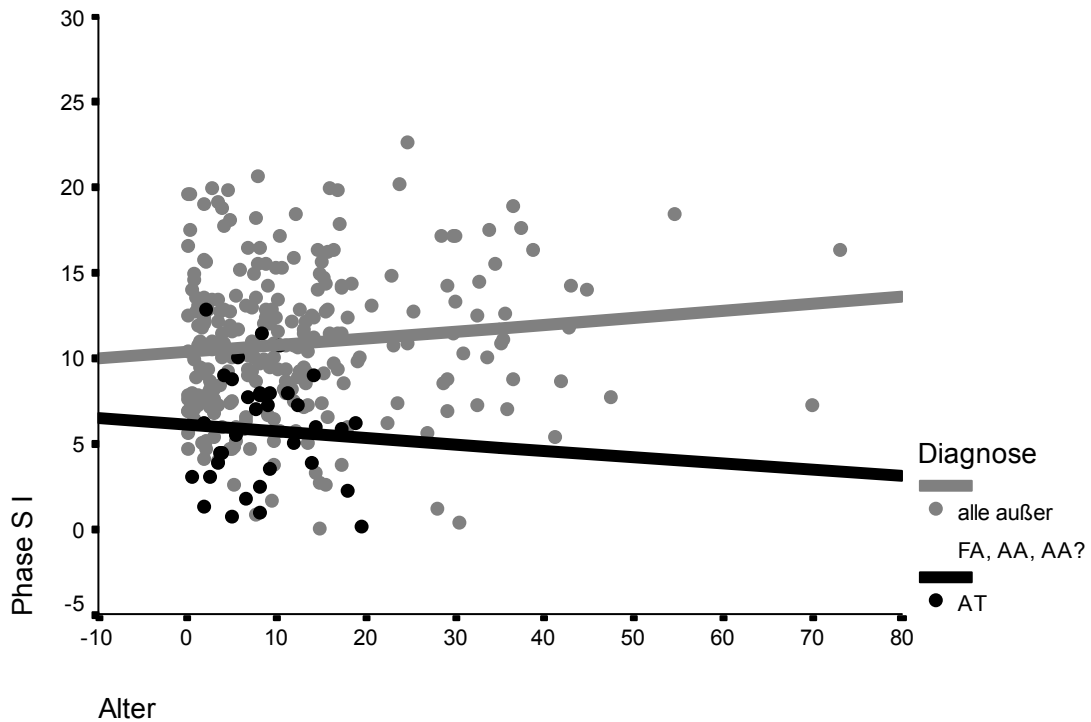
3.6.2.4 G1-Phase des 2. Zyklus



Dieses Kompartiment zeigt eine auffällige Zellverteilung. 7,16% (SD = 3,81) der Lymphozyten von AT-Patienten im Gegensatz zu 10,72% (SD = 4,00) aus der Vergleichsgruppe konnten diese Phase durchlaufen. Dieser Unterschied ist auf der Ebene $p < 0,001$ hochsignifikant und wird im Diagramm anhand zweier Cluster deutlich.

Die übrige Analyse ergab keine eindeutigen Signifikanzen. Es bestand weder bei AT-Patienten (Regressionsgerade: $y = 6,52 + 0,076 x$; $p = 0,561$; $R^2 = 0,01$) noch bei der Vergleichsgruppe eine signifikante Korrelation zum Alter (Regressionsgleichung: $y = 10,83 - 0,01 x$; $p = 0,59$; $R^2 = 0,001$).

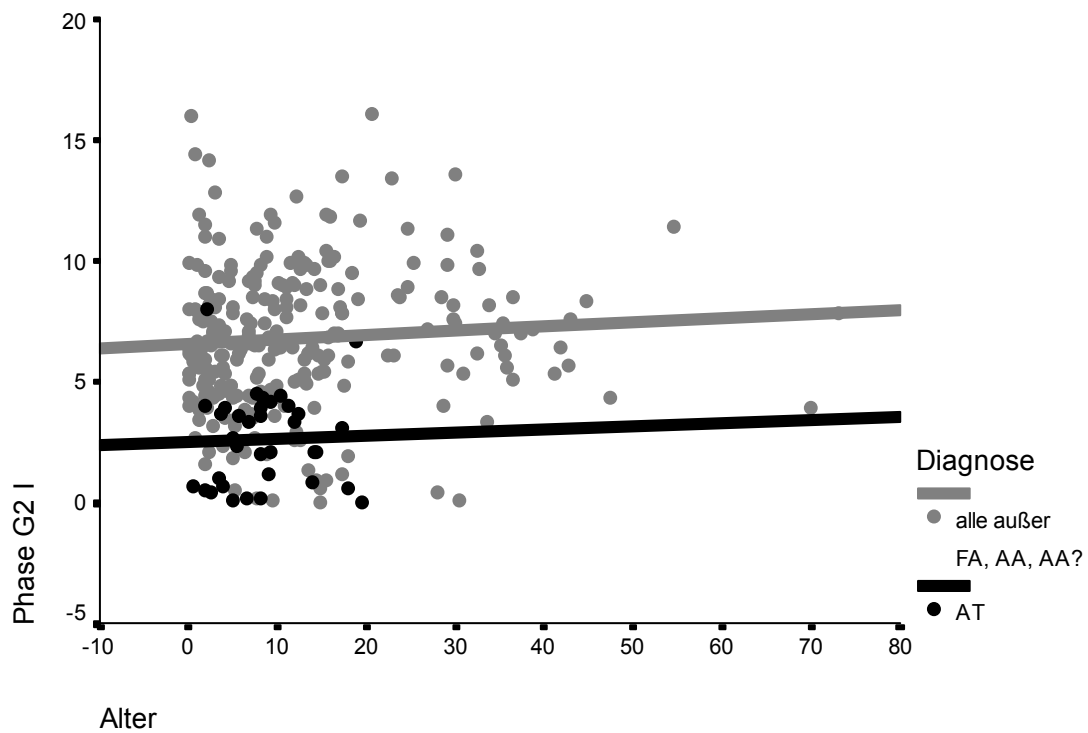
3.6.2.5 S-Phase des 2. Zyklus



Die in der vorangegangenen Phase beschriebene Clusterbildung verstärkte sich in der S-Phase des 2. Zyklus ($p < 0,001$). So lagen AT-Patienten hier im Mittel nur noch bei 5,80 (SD = 3,22). Die Vergleichsgruppe erreichte hingegen im Mittel 10,88 (SD = 4,35) und damit ähnlich hohe Werte wie in der G1-Phase des 2. Zyklus.

Das Alter hatte in dieser Phase keinen Einfluss auf das Zellzyklusverhalten. Die Werte für AT-Patienten ergaben keine signifikante Korrelation zum Alter (Regressionsgerade: $y = 6,126 - 0,038 x$; $p = 0,74$; $R^2 = 0,004$). Dieses Resultat traf auch auf die Vergleichsgruppe zu (Regressionsgerade $y = 10,385 + 0,04 x$; $p = 0,075$; $R^2 = 0,0012$).

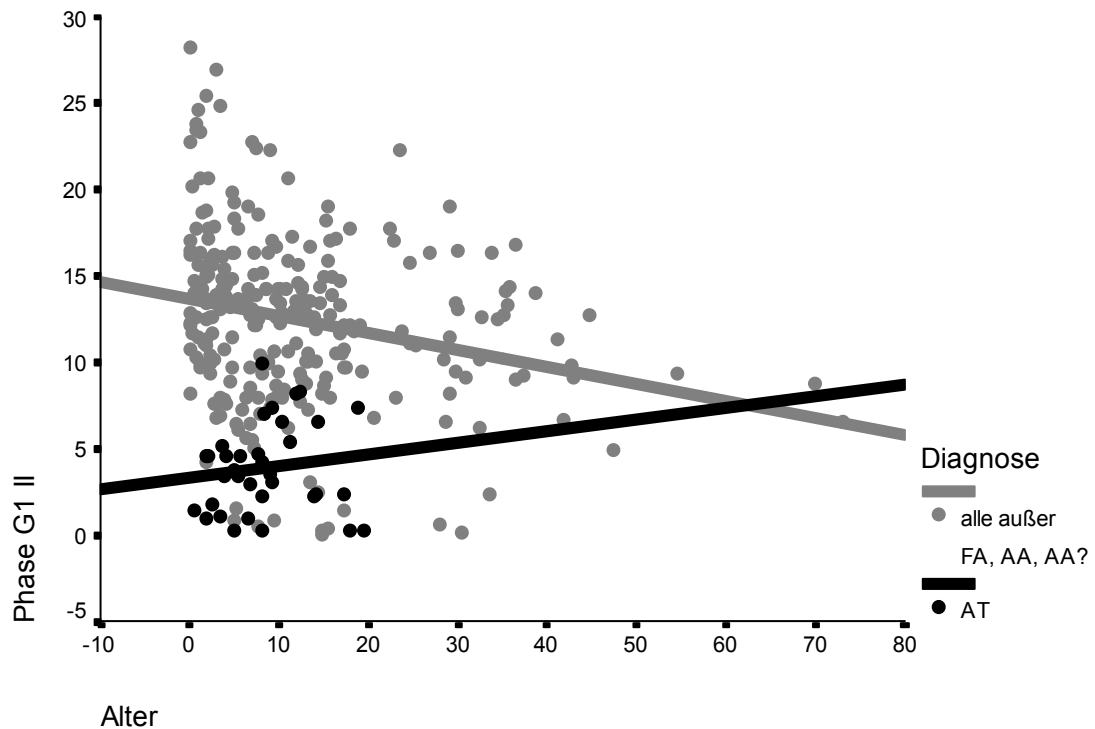
3.6.2.6 G2-Phase des 2. Zyklus



Die Anzahl der diese Zellzyklusphase durchlaufenden Zellen sank im Vergleich zu den beiden vorherigen Phasen weiter auf 2,63% (SD = 1,92) gegenüber 6,78% (SD = 2,90) bei der Vergleichsgruppe. Dieser Unterschied war auf der Ebene $p = 0,001$ hochsignifikant.

Die statistische Analyse ergab sowohl für AT-Patienten (Regressionsgerade: $y = 2,514 + 0,013 x$; $p = 0,84$; $R^2 = 0,001$) als auch für die Vergleichsgruppe keine signifikante Alterskorrelation (Regressionsgerade: $y = 6,58 + 0,017 x$; $p = 0,225$; $R^2 = 0,005$).

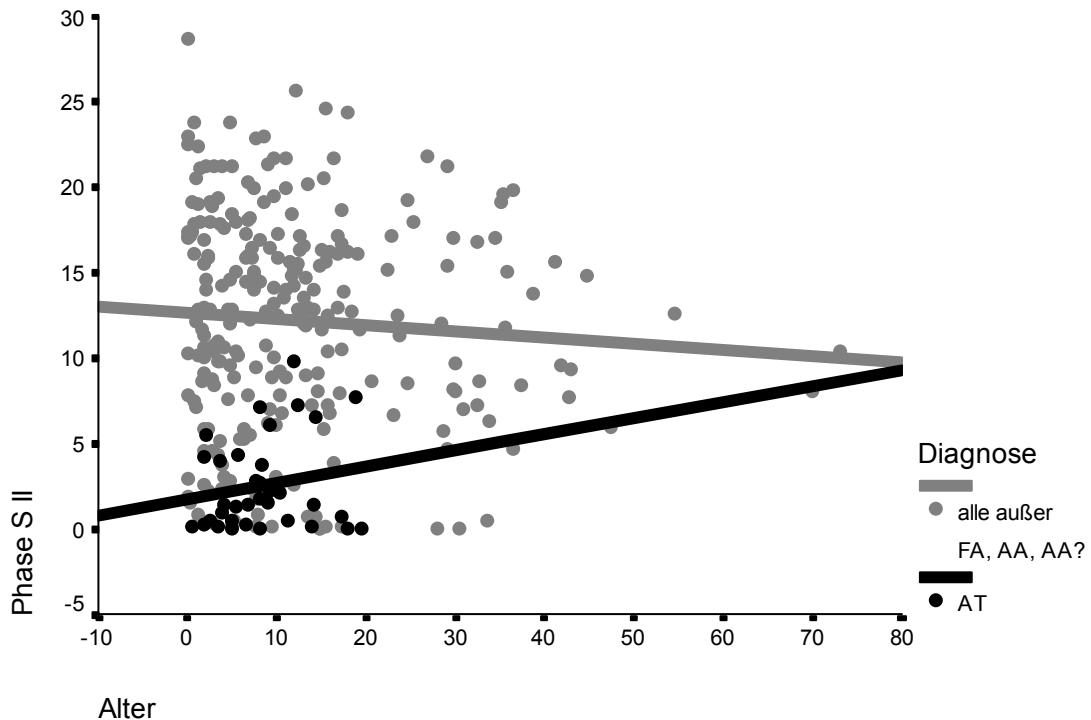
3.6.2.7 G1-Phase des 3. Zyklus



Den dritten Zellzyklus erreichten nur noch wenige Lymphozyten der AT-Patienten. Während die Diagnosegruppe AT im Mittel nur noch bei 3,87 (SD = 2,59) lag, erreichte die Vergleichsgruppe einen Mittelwert von 12,34 (SD = 5,05).

Im Gegensatz zur hochsignifikanten Alterskorrelation innerhalb der Vergleichsgruppe ($y = 13,66 - 0,099 x$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,057$), erwies sich die Korrelation zum Alter mit ihrer positiven Steigung bei AT-Patienten als nicht signifikant (Regressionsgerade: $y = 3,31 + 0,068 x$; $p = 0,44$; $R^2 = 0,018$).

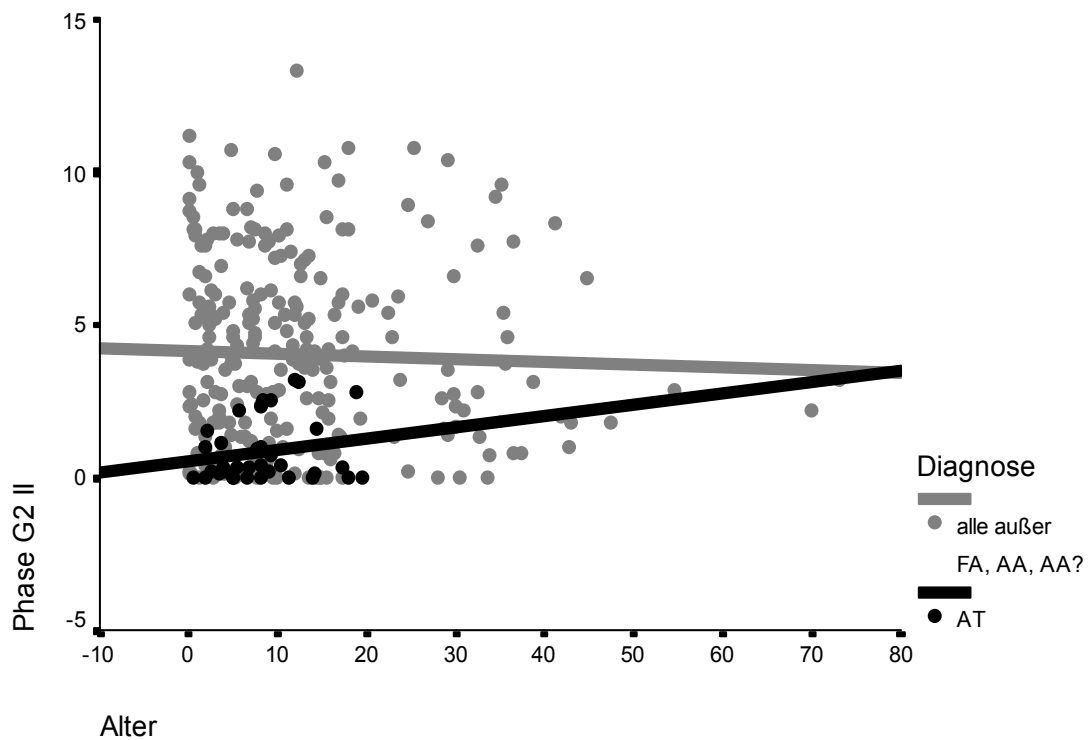
3.6.2.8 S-Phase des 3. Zyklus



Die Differenz ($p < 0,001$) der ermittelten Werte von AT-Patienten und der Vergleichsgruppe stieg in der S-Phase des 3. Zyklus weiter an. In dieser Phase lag der Mittelwert der AT-Patienten nur noch bei 2,54 (SD = 2,71), gegenüber einem Mittelwert von 12,17 (SD = 6,29) der Vergleichsgruppe. Diese Differenz war auf dem Niveau $p < 0,001$ hochsignifikant.

Die statistische Analyse hinsichtlich der Alterskorrelation führte bei AT-Patienten zu keinen signifikanten Ergebnissen (Regressionsgerade: $y = 1,74 + 0,094 x$; $p = 0,306$; $R^2 = 0,032$). Die anderen Diagnosegruppen zeigten ebenfalls keine signifikante Korrelation zum Alter auf (Regressionsgerade: $y = 12,68 - 0,036 x$; $p = 0,261$; $R^2 = 0,005$). Wie in der vorangegangenen Phase besitzen die Regressionsgeraden gegensätzliche Steigungen.

3.6.2.9 G2-Phase des 3. Zyklus



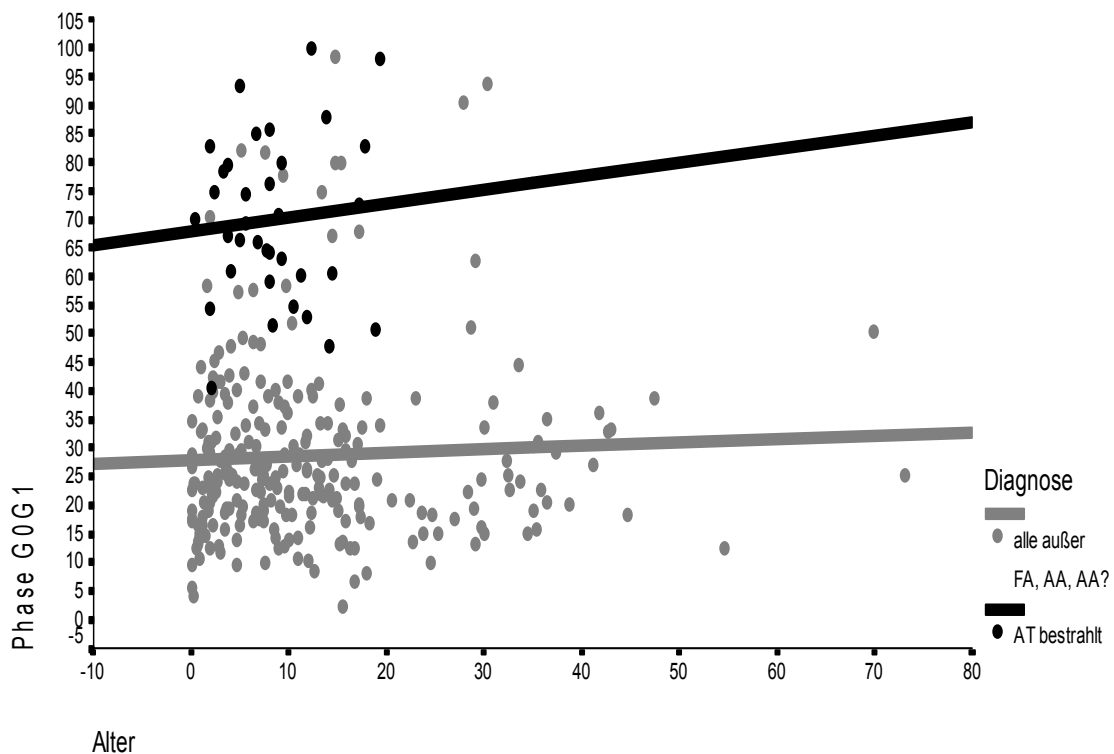
Den 3. Zellzyklus haben nur noch 0,83% (SD = 1,03) Lymphozyten der AT-Patienten bis zum Ende durchlaufen. Der Mittelwert der Vergleichsgruppe lag mit 4,04 (SD = 3,02) signifikant höher ($p < 0,001$).

Wie in allen Phasen zuvor hatte das Alter keinen signifikanten Einfluss auf das Zyklusverhalten der Lymphozyten von AT-Patienten. Innerhalb des 3. Zellzyklus wies jedoch die Altersregression der AT-Patienten im Gegensatz zur Kontrollgruppe stets eine positive Steigung auf (AT-Patienten: Regressionsgleichung: $y = 0,52 + 0,037 x$; $p = 0,29$; $R^2 = 0,034$; Vergleichsgruppe: Regressionsgleichung: $y = 4,17 - 0,009 x$; $p = 0,58$; $R^2 = 0,001$).

3.6.3 Zellzyklusverteilung bei Patienten mit Ataxia teleangiectasia nach Bestrahlung der Kulturen

Im Folgenden sind die Daten der mit 1,5 Gy bestrahlten Lymphozyten von AT-Patienten gegen die Vergleichsgruppe (alle Patienten außer FA, AA und fraglicher AA) aufgetragen. Diese Berechnungen führen zu sinngemäßen Ergebnissen, sofern keine weiteren Einflussgrößen bei der 2. Messung auftreten. Das war hier der Fall, da es sich um das gleiche Blut der Patienten handelte. Statistische Informationen über das Patientenkollektiv finden sich unter Gliederungspunkt 3.5.2. Die zellkinetischen Effekte von Röntgenstrahlen auf Lymphozyten der Vergleichsgruppe müssen nun in direktem Zusammenhang mit den Ergebnissen gesehen werden, die für AT gewonnen wurden. Um die erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber diesem Klastogen zellkinetisch zu charakterisieren, wurden die Zellen der Patienten mit ionisierender Strahlung behandelt.

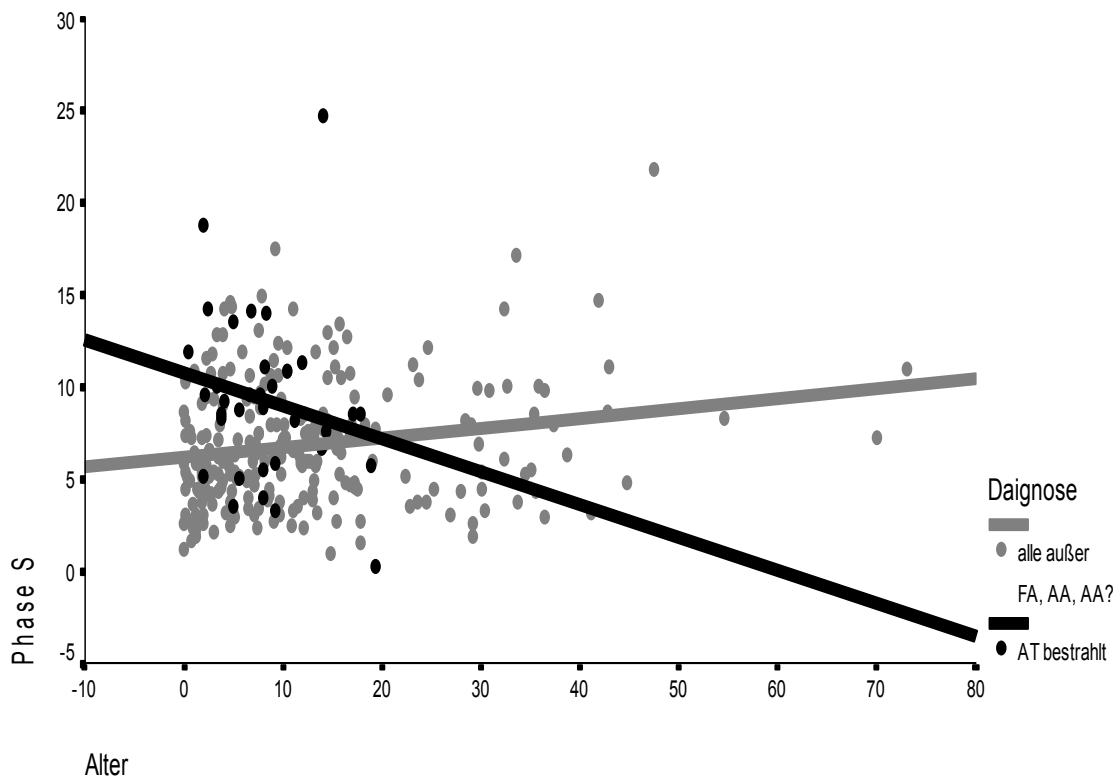
3.6.3.1 G0G1-Phase des 1. Zyklus



Im Vergleich der bestrahlten 72-Stunden-Kulturen fiel bei AT-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe wiederum eine hohe nicht-proliferierende G0G1-Fraktion auf. Es wurden weniger Zellen stimuliert als bei den Kulturen ohne Bestrahlung. Die Punktwolke der Daten bestrahlter Lymphozyten von AT-Patienten lag mit einem Mittelwert von 69,89 (SD = 14,41) etwas höher als bei den unbestrahlten Kulturen. Für die Vergleichsgruppe wurde in dieser Phase ein Mittelwert von 28,63 (SD = 15,80) berechnet. Im Diagramm erkennt man entsprechend gut voneinander getrennte Cluster, welche eine Signifikanz von $p < 0,001$ aufwiesen.

Wie auch bei den unbestrahlten Kulturen und der Vergleichsgruppe bestand keine signifikante Korrelation zum Alter (AT-Patienten: Regressionsgleichung: $y = 67,88 + 0,24 x$; $p = 0,628$, $R^2 = 0,007$; Vergleichsgruppe: Regressionsgleichung: $y = 27,82 + 0,063 x$; $p = 0,45$; $R^2 = 0,002$).

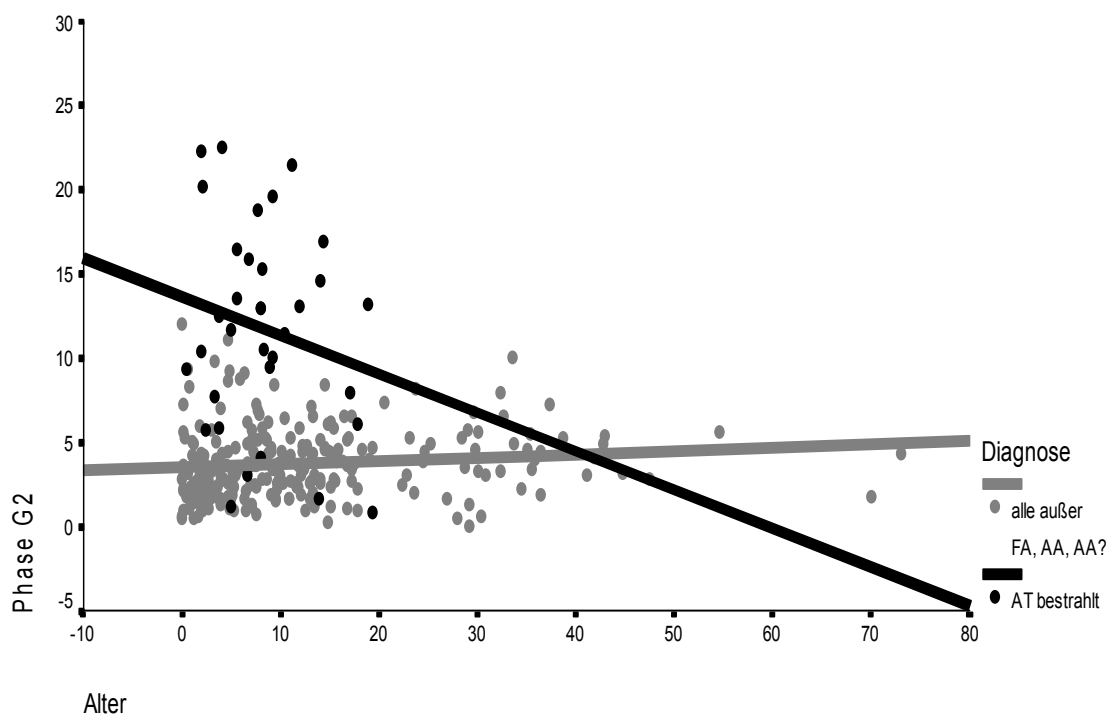
3.6.3.2 S-Phase des 1. Zyklus



Im Kompartiment der S-Phase des 1. Zyklus zeigt sich ein auffällig unterschiedliches Zellzyklusverhalten bestrahlter und unbestrahlter Kulturen von AT-Patienten. Der Anteil der Zellen lag bei den bestrahlten Kulturen (MW = 9,27; SD = 4,62) signifikant ($p < 0,001$) höher als bei der Vergleichsgruppe (MW = 6,91; SD = 3,41).

Die Altersregression erwies sich im Gegensatz zur Vergleichsgruppe als nicht signifikant ($y = 10,75 - 0,18 x$; $p = 0,258$; $R^2 = 0,04$; Vergleichsgruppe: Regressionsgerade: $y = 6,15 + 0,053 x$, $p = 0,002$; $R^2 = 0,037$). Wie bei den unbestrahlten Kulturen durchliefen weniger Zellen der älteren AT-Patienten diese Phase.

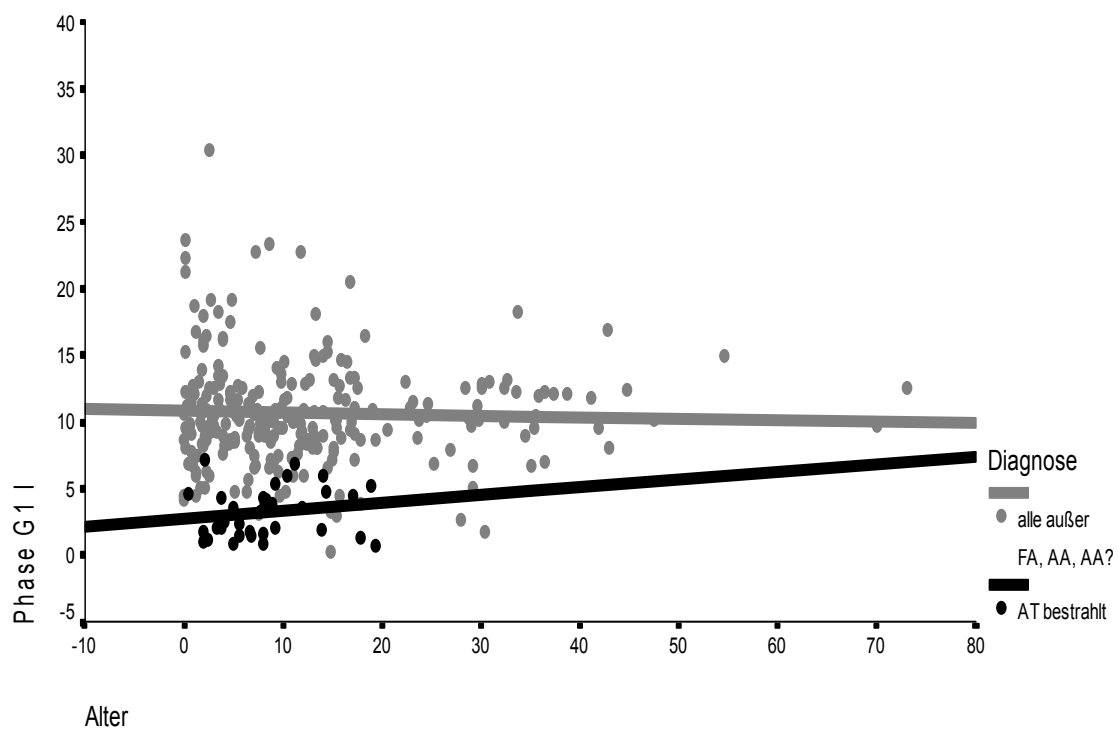
3.6.3.3 G2-Phase des 1. Zyklus



Das Diagramm der G2-Phase des 1. Zyklus zeigt eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Akkumulation von Zellen der AT-Patienten. Nach Bestrahlung der Lymphozyten mit 1.5 Gy wurde ein massiver Anstieg der Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus bei den AT-Patienten beobachtet (AT-Patienten nach Bestrahlung: MW = 11,75; SD = 6,08; Vergleichsgruppe: MW = 3,81; SD = 2,18). Im Gegensatz zu FA zeigte sich die G2-Phase-Störung nur bei bestrahlten Lymphozyten.

Die Korrelation zum Alter war wie bei den unbestrahlten Kulturen und der Vergleichsgruppe nicht signifikant (Regressionsgerade: $y = 13,67 - 0,23 x$; $p = 0,27$; $R^2 = 0,037$; Vergleichsgruppe: Regressionsgerade: $y = 3,49 + 0,02 x$; $p = 0,069$; $R^2 = 0,013$). Allerdings besaßen die Regressionsgeraden wie in der vorangegangenen Phase eine auffällig negative Steigung.

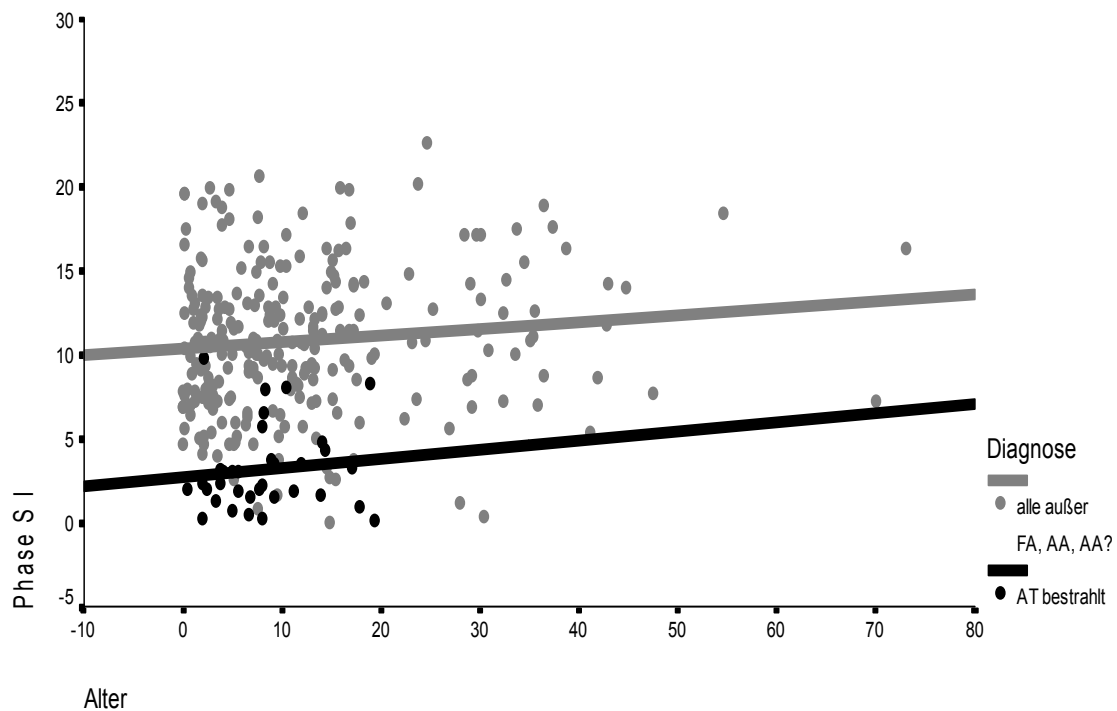
3.6.3.4 G1-Phase des 2. Zyklus



In der G1-Phase des 2. Zyklus entspricht das zellkinetische Bild weitgehend dem der Kulturen von FA-Patienten. Nach einer erhöhten G2-Phase folgte eine kompensatorisch erniedrigte G1-Phase. Im Vergleich zu den unbestrahlten Lymphozyten (MW = 10,72; SD = 4,00) durchliefen diese Phase wesentlich weniger Lymphozyten der bestrahlten Kulturen (MW = 3,17; SD = 1,85). Die Differenz der Mittelwerte der bestrahlten Kulturen und der Vergleichsgruppe erwies sich dabei als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Die Altersregression war wie bei den unbestrahlten Kulturen nicht signifikant ($y = 2,67 + 0,06 x$; $p = 0,35$; $R^2 = 0,028$). Gleiches gilt für die Vergleichsgruppe (Regressionsgerade: $y = 10,83 - 0,01 x$; $p = 0,59$; $R^2 = 0,001$).

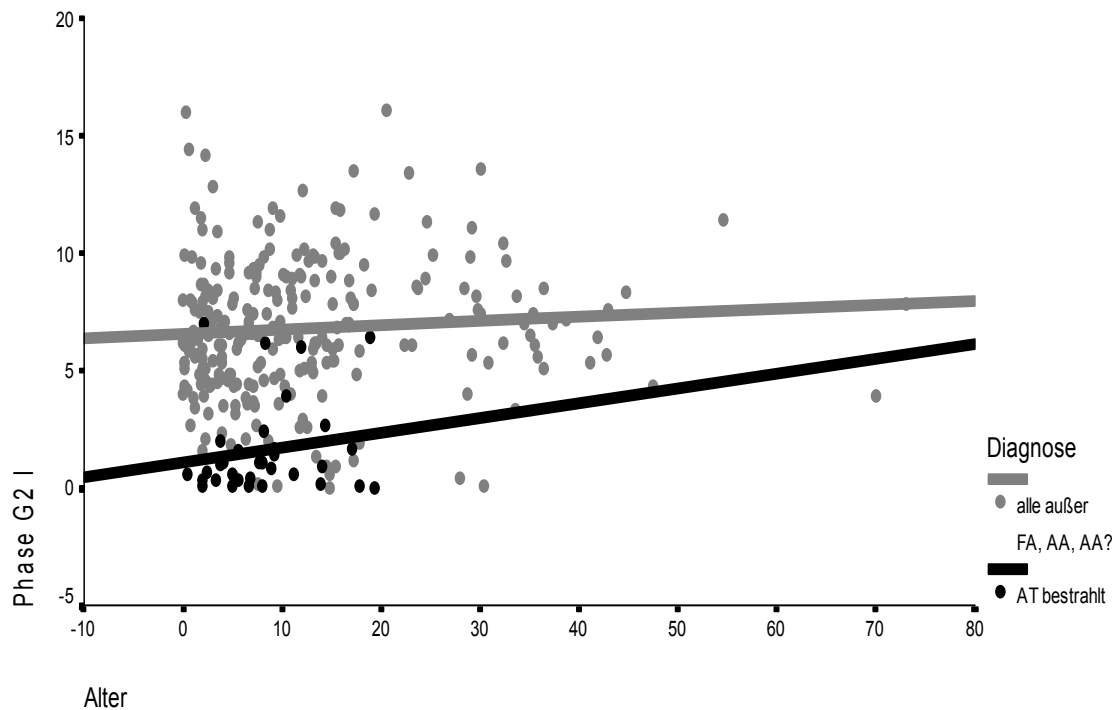
3.6.3.5 S-Phase des 2. Zyklus



Wie in der vorangegangenen Phase war auch in der S-Phase des 2. Zyklus der Anteil der Zellen bestrahlter Kulturen (MW = 3,16; SD = 2,49) hochsignifikant niedriger ($p < 0,001$) als bei den unbehandelten Kulturen (Vergleichsgruppe: MW = 10,88; SD = 4,35).

Hinsichtlich des Alters bestand jedoch wie in der unbestrahlten Gruppe und der Vergleichsgruppe keine signifikanten Korrelationen (Regressionsgerade: $y = 2,71 + 0,054 x$; $p = 0,53$; $R^2 = 0,012$; Vergleichsgruppe: Regressionsgerade: $y = 10,39 + 0,04 x$; $p = 0,075$; $R^2 = 0,0012$).

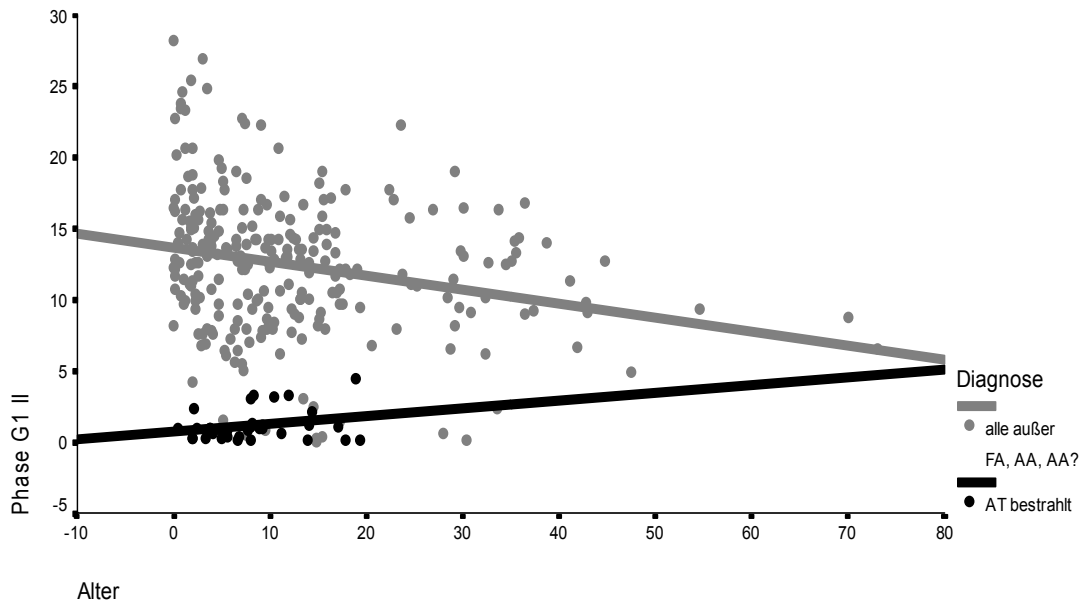
3.6.3.6 G2-Phase des 2. Zyklus



Die G2-Phase des 2. Zyklus wurde von hochsignifikant ($p < 0,001$) weniger Lymphozyten von bestrahlten Kulturen (MW = 1,61; SD = 1,98) durchlaufen als dies bei der Vergleichsgruppe der Fall war (MW = 6,78; SD = 2,90).

Das Alter hatte wie bei den unbestrahlten Kulturen und der Vergleichsgruppe keinen signifikanten Einfluss (Regressionsgerade: $y = 1,08 + 0,0633 x$; $p = 0,35$; $R^2 = 0,027$; Vergleichsgruppe: Regressionsgerade: $y = 6,58 + 0,017 x$; $p = 0,225$; $R^2 = 0,005$).

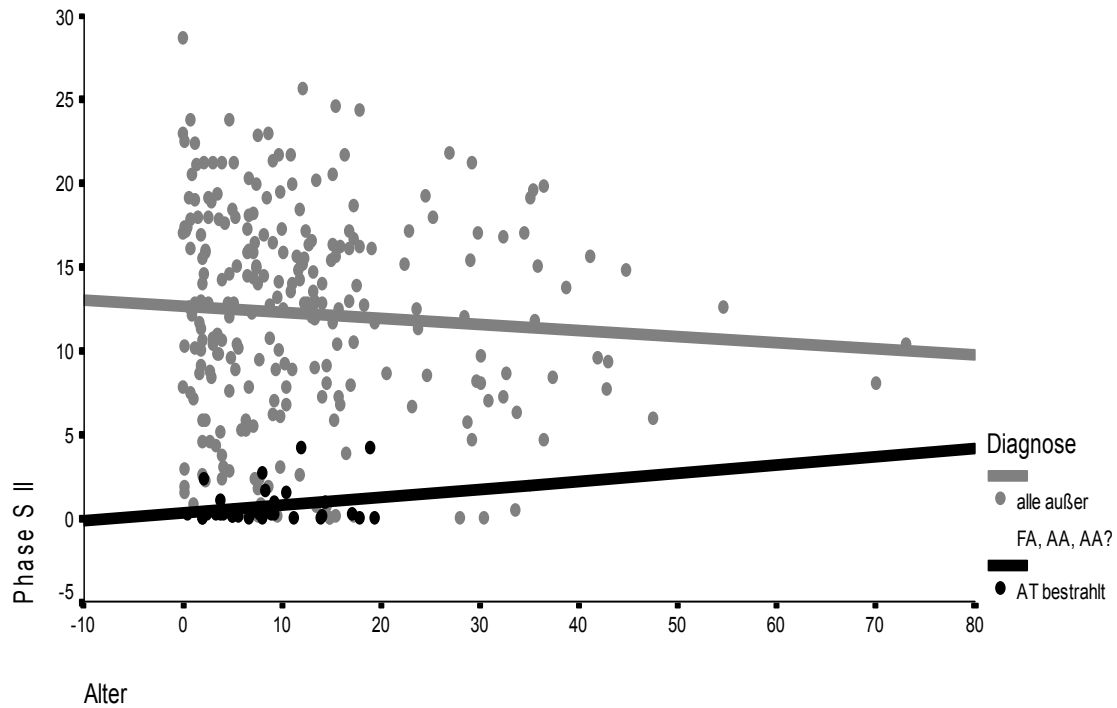
3.6.3.7 G1-Phase des 3. Zyklus



Den dritten Zyklus erreichten im Gegensatz ($p < 0,001$) zur Vergleichsgruppe (MW = 12,34; SD = 5,05) kaum noch Lymphozyten von bestrahlten Kulturen (MW = 1,16; SD = 1,13).

Die Altersregression war entsprechend den unbestrahlten Kulturen nicht signifikant und besaß eine positive Steigung (Regressionsgerade: $y = 0,67 + 0,055 x$; $p = 0,15$; $R^2 = 0,064$). Die Korrelation zum Alter verhielt sich hingegen bei der Vergleichsgruppe gegensätzlich (Regressionsgerade: $y = 13,66 - 0,099 x$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,057$).

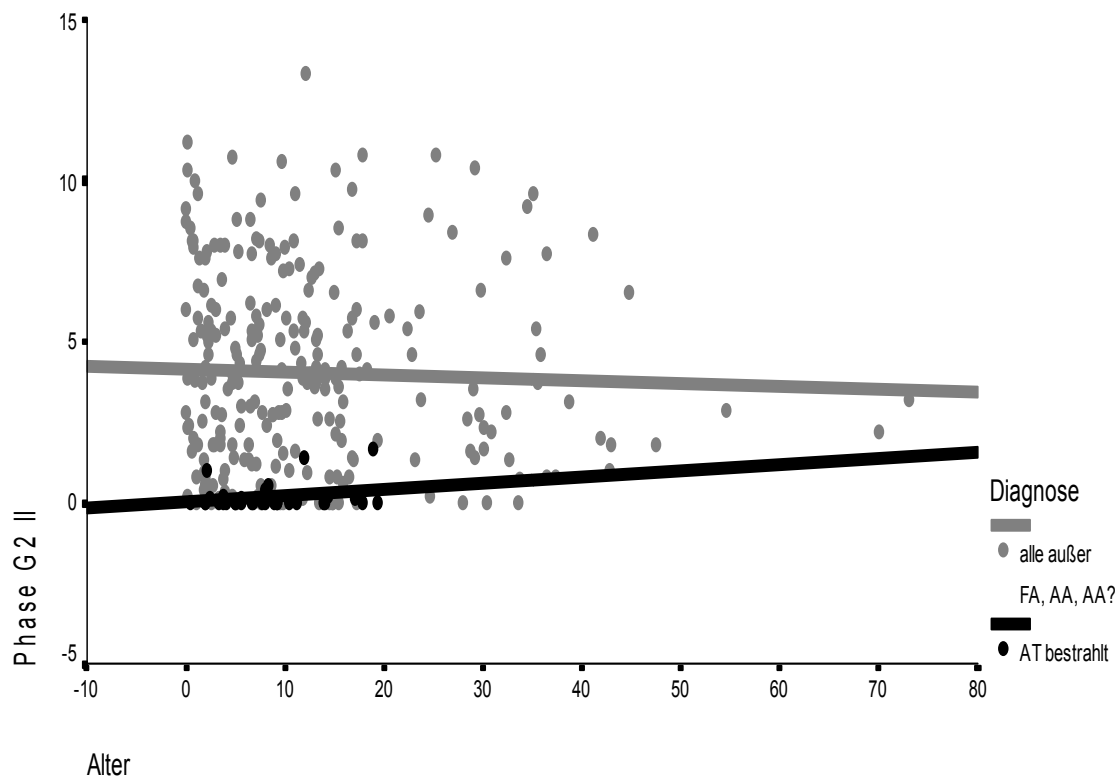
3.6.3.8 S-Phase des 3. Zyklus



Die Anzahl der die S-Phase des 3. Zyklus durchlaufenen Lymphozyten der bestrahlten Kultur sank im Vergleich zu den vorangegangenen vier Zellzyklen weiter auf 0,69% (SD = 1,11). Im Gegensatz dazu erreichten 12,17 % (SD = 6,29) der Zellen der Vergleichsgruppe diesen Zyklus ($p < 0,001$).

In dieser Phase bestand keine Korrelation zum Alter (Bestrahlte Kulturen: Regressionsgerade: $y = 0,29 + 0,048 x$; $p = 0,21$; $R^2 = 0,049$; Vergleichsgruppe: Regressionsgerade: $y = 12,68 - 0,036 x$; $p = 0,261$; $R^2 = 0,005$).

3.6.3.9 G2-Phase des 3. Zyklus



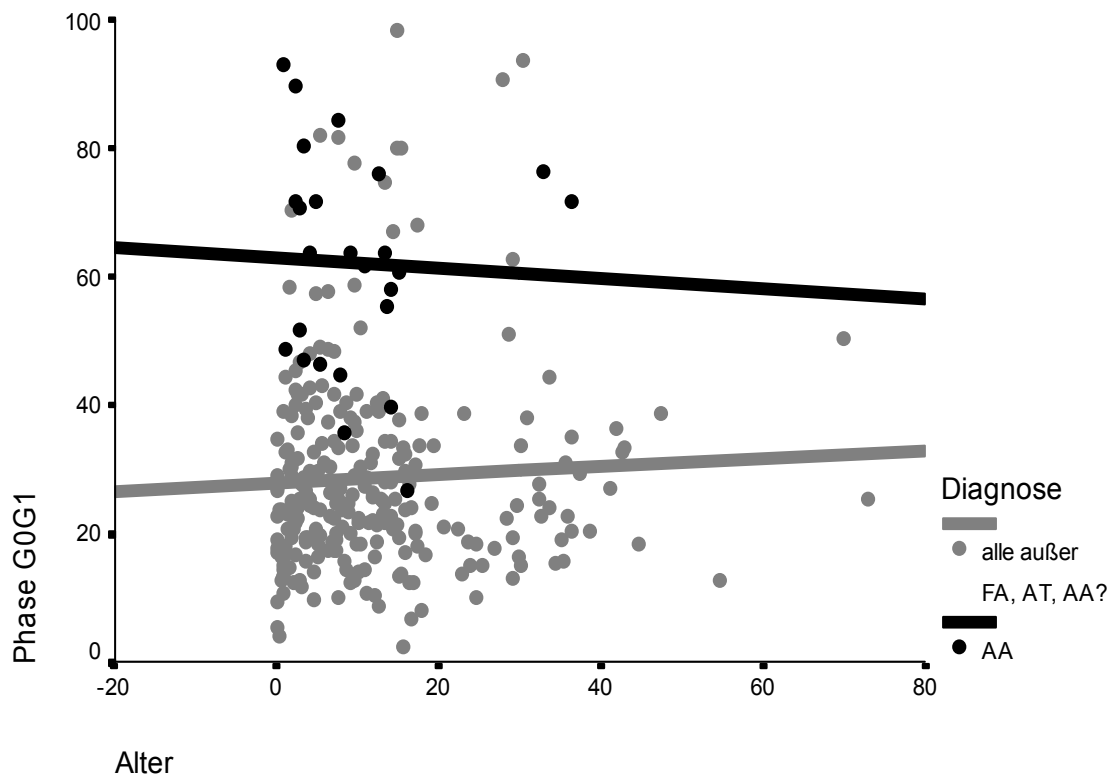
Die G2-Phase des 2. Zyklus erreichten nur noch 0,17% der Zellen von bestrahlten Kulturen (SD = 0,4) im Unterschied zu 4,04% Zellen der Vergleichsgruppe (SD = 3,02; $p < 0,001$).

Wie auch bei den unbestrahlten Kulturen bestanden hinsichtlich des Alters keine Signifikanzen (Altersregression: $y = 0,01 + 0,019 x$; $p = 0,16$; $R^2 = 0,06$). Entsprechendes gilt auch für die Vergleichsgruppe (Altersregression: $y = 4,17 - 0,009 x$; $p = 0,58$; $R^2 = 0,001$).

3.6.4 Zellzyklusverteilung bei Patienten mit aplastischer Anämie

Diese Gegenüberstellung berücksichtigt 297 Patienten (63,1%). AA-Patienten waren mit 9,77 (SD = 8,96) Jahren im Durchschnitt etwas jünger als die Vergleichsgruppe (MW = 12,23; SD = 12,12). Wurde die Diagnosegruppe aus 25 AA-Patienten (5,3%) einzeln mit der Kontrollgruppe (57,7%) verglichen, zeigten sich folgende Unterschiede:

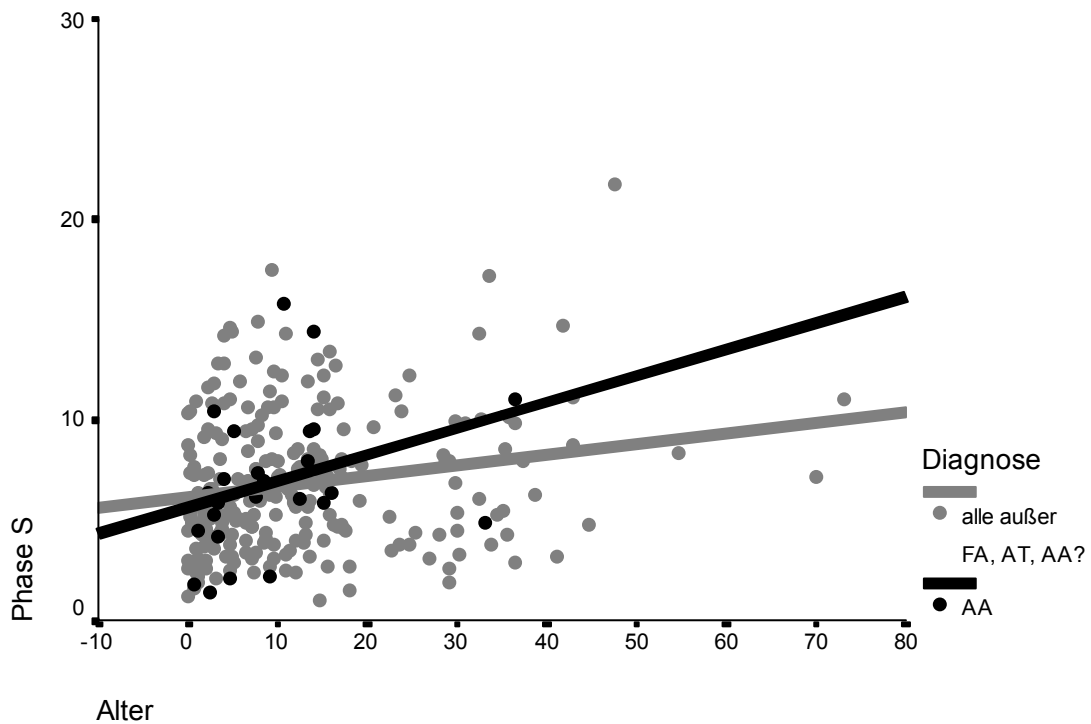
3.6.4.1 G0G1-Phase des 1. Zyklus



Der Anteil der Zellen, die nach 72 Stunden noch nicht stimuliert werden konnten, war bei den Patienten mit AA fast genauso hoch wie bei den AT-Patienten. Die Clusterbildung im Diagramm spiegelt die hohe nicht proliferierende G0G1-Fraktion deutlich wider. Der Mittelwert bei den AA-Patienten betrug 62,07 (SD = 16,97) gegenüber 28,63 (SD = 15,80) der Vergleichsgruppe ($p < 0,001$).

Die statistische Analyse ergab keine Signifikanzen hinsichtlich der Alterskorrelation bei AA-Patienten (Regressionsgerade: $y = 62,86 - 0,081 x$; $p = 0,84$; $R^2 = 0,002$). Die Vergleichsgruppe zeigte ebenfalls keine Signifikanzen hinsichtlich des Alters (Regressionsgerade: $y = 27,82 + 0,063 x$; $p = 0,45$; $R^2 = 0,002$).

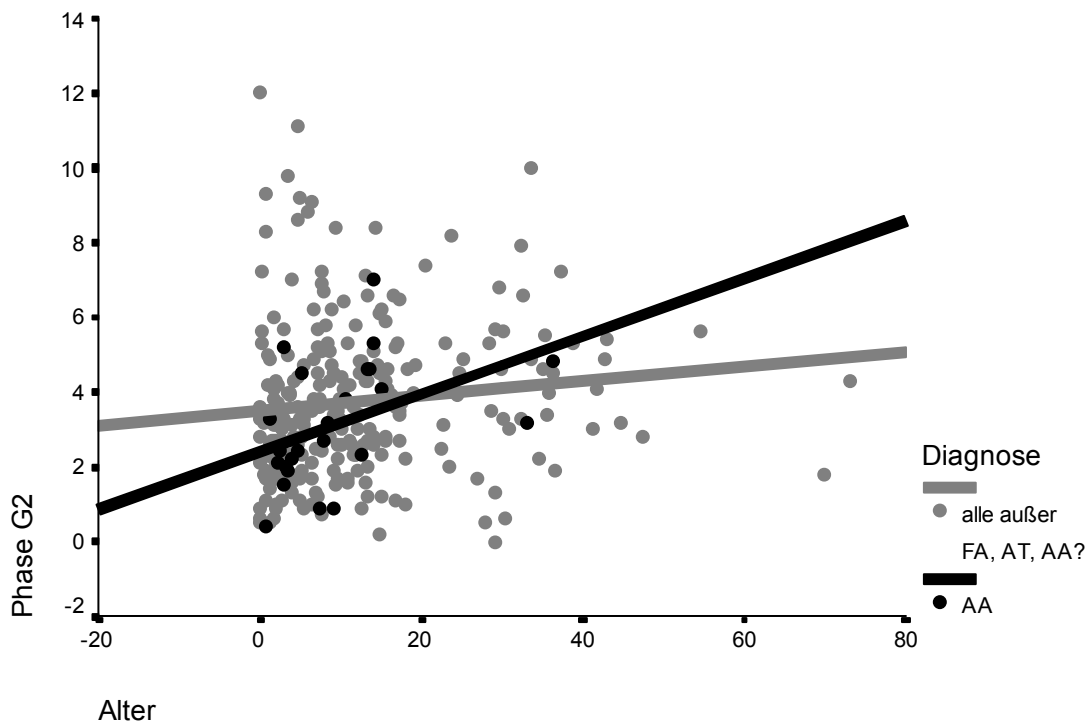
3.6.4.2 S-Phase des 1. Zyklus



Die S-Phase des 1. Zyklus zeigt eine unauffällige Zellverteilung. Der Anteil der Zellen in diesem Kompartiment lag bei den AA-Patienten nicht höher als bei der Vergleichsgruppe ($p = 0,884$). Lymphozyten der AA-Patienten lagen im Durchschnitt bei 6,90 (SD = 3,59) und die der gegenübergestellten Patienten/Probanden bei 6,91 (SD = 3,41).

Das Alter hatte innerhalb der Gruppe der AA-Patienten keinen signifikanten Einfluss (Regressionsgerade: $y = 5,61 + 0,132 x$; $p = 0,11$; $R^2 = 0,109$). Die Vergleichsgruppe hingegen wies mit $p = 0,002$ eine hochsignifikante Regressionsgerade auf ($y = 6,15 + 0,053 x$; $R^2 = 0,037$).

3.6.4.3 G2-Phase des 1. Zyklus

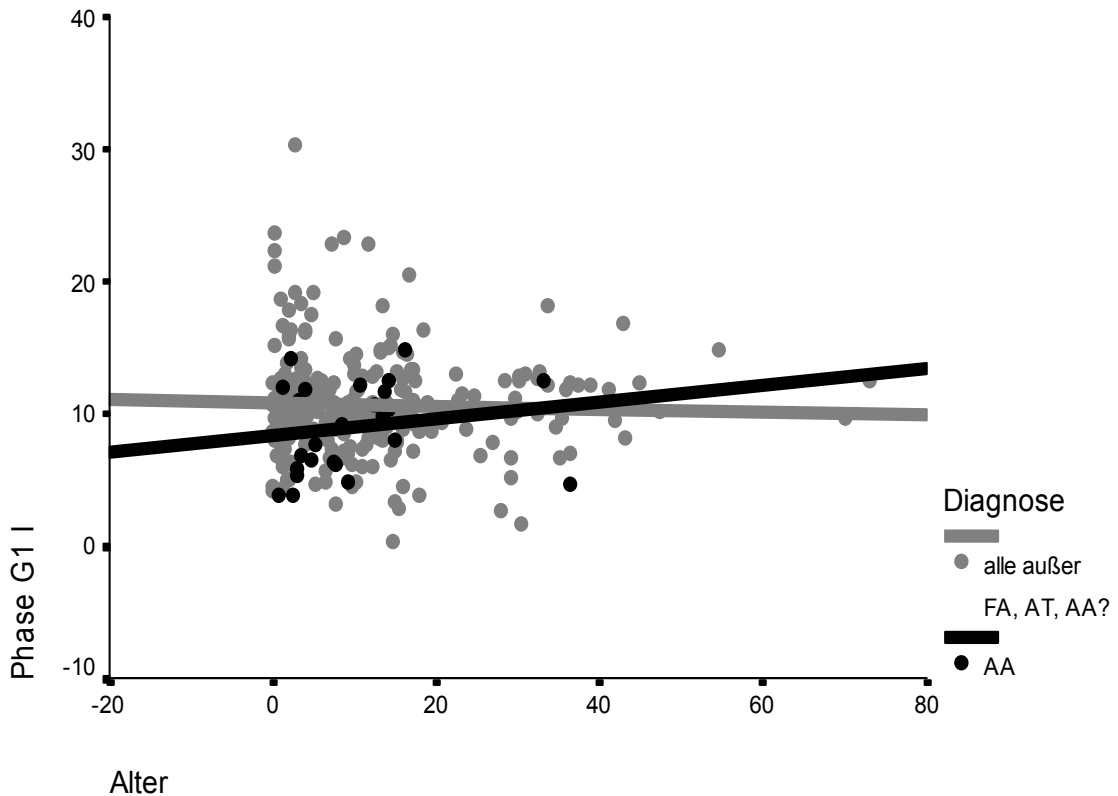


Die G2-Phase des 1. Zyklus zeigt ein unauffälliges Zellverhalten. Eine geringe Anzahl von Zellen in dieser Phase war den Kulturen von AA-Patienten (MW = 3,16; SD = 1,56) und denen aus der Vergleichsgruppe (MW = 3,81; SD = 2,18) gemeinsam ($p = 0,226$).

AA-Patienten wiesen eine signifikante Korrelation zum Alter auf ($p = 0,031$). 18,7% ($R^2 = 0,187$) waren durch die Regressionsgerade $y = 2,41 + 0,077 x$ erklärbar. Die Vergleichsgruppe war in dieser Hinsicht nicht signifikant (Regressionsgerade: $y = 3,49 + 0,02 x$; $p = 0,069$; $R^2 = 0,013$).

$\Sigma G2/GF$ war bei AA-Patienten mit einem Mittelwert von 0,17 (SD = 0,05) gegenüber der Vergleichsgruppe mit einem Mittelwert von 0,2 (SD = 0,05) leicht erniedrigt. Dieser Unterschied erwies sich nach dem T-Test als hoch signifikant ($p = 0,003$). $\Sigma G2/GF$ nahm mit steigendem Lebensalter nur leicht zu (die Korrelation nach Pearson ergab keine signifikanten Werte: $p = 0,59$; $R = 0,113$).

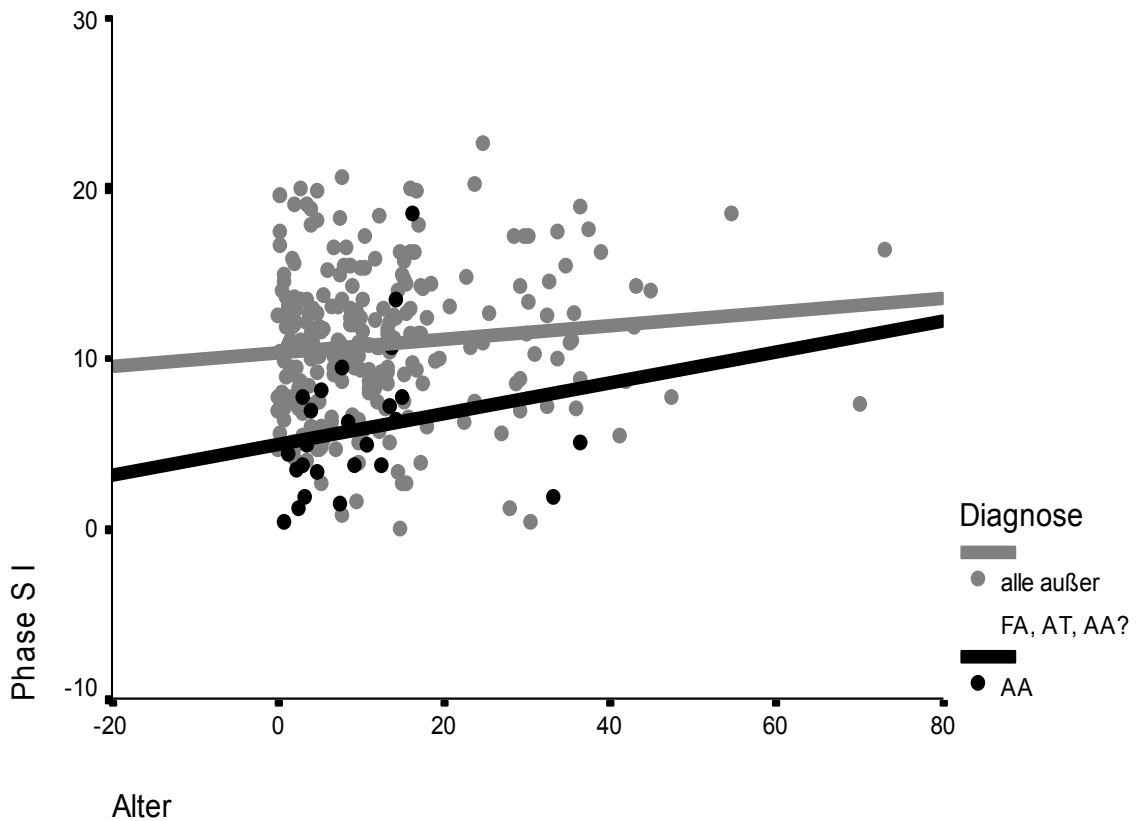
3.6.4.4 G1-Phase des 2. Zyklus



Den 2. Zellzyklus erreichten im Vergleich zur Kontrollgruppe nur relativ wenig Lymphozyten aus der Gruppe der AA-Patienten. Im Mittel lagen sie bei 8,91 (SD = 3,34) gegenüber 10,72 bei der Vergleichsgruppe (SD = 4,00). Diese Differenz erwies sich mit $p = 0,028$ als hochsignifikant.

Die Werte der AA-Patienten wiesen keine signifikante Korrelation zum Alter auf (Regressionsgerade: $y = 8,29 + 0,064 x$; $p = 0,42$; $R^2 = 0,029$). In der Vergleichsgruppe gab es ebenfalls keine signifikante Korrelation zum Alter (Regressionsgerade: $y = 10,83 - 0,011 x$; $p = 0,59$; $R^2 = 0,001$).

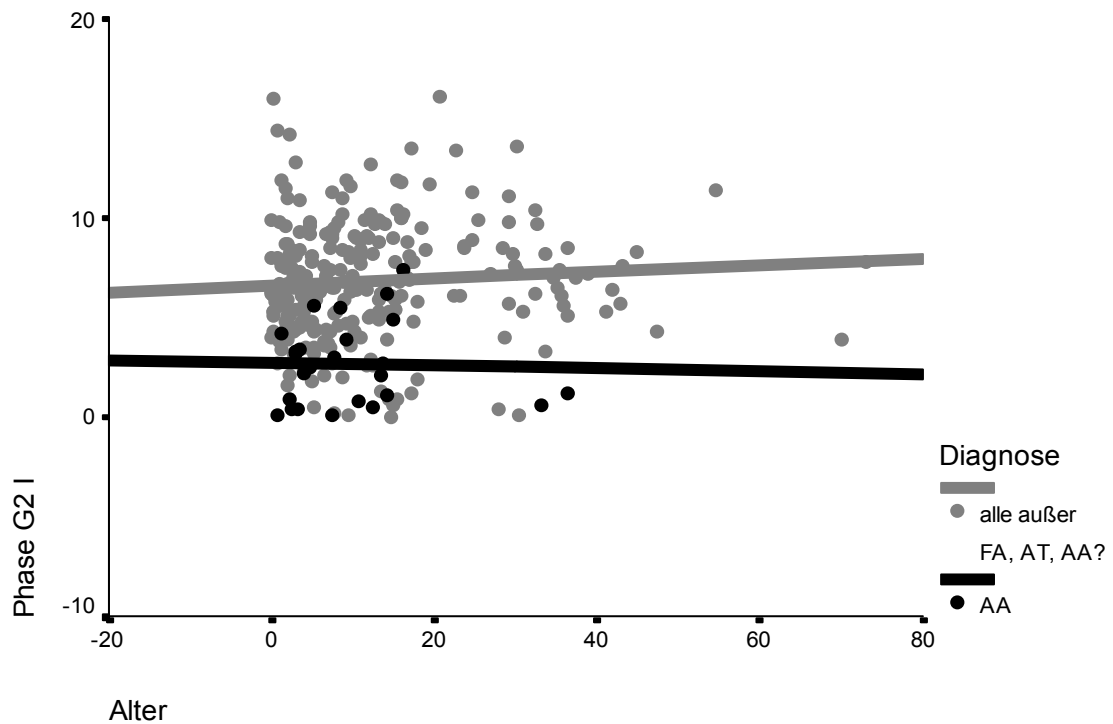
3.6.4.5 S-Phase des 2. Zyklus



Anhand des zur S-Phase des 2. Zyklus gehörigen Diagramms erkennt man, dass die Differenz zwischen der diese Phase erreichenden Zellzahl aus der Gruppe der AA-Patienten (MW = 5,86; SD = 4,10) und derjenigen der Vergleichsgruppe (MW = 10,89; SD = 4,35) nun deutlicher wird ($p < 0,001$).

Die Daten beider Gruppen zeigten das Alter betreffend keine Signifikanz (Gruppe der AA-Patienten: Regressionsgleichung: $y = 4,98 + 0,09 x$; $p = 0,348$; $R^2 = 0,038$; Vergleichsgruppe: Regressionsgleichung: $y = 10,39 + 0,04 x$; $p = 0,075$; $R^2 = 0,012$).

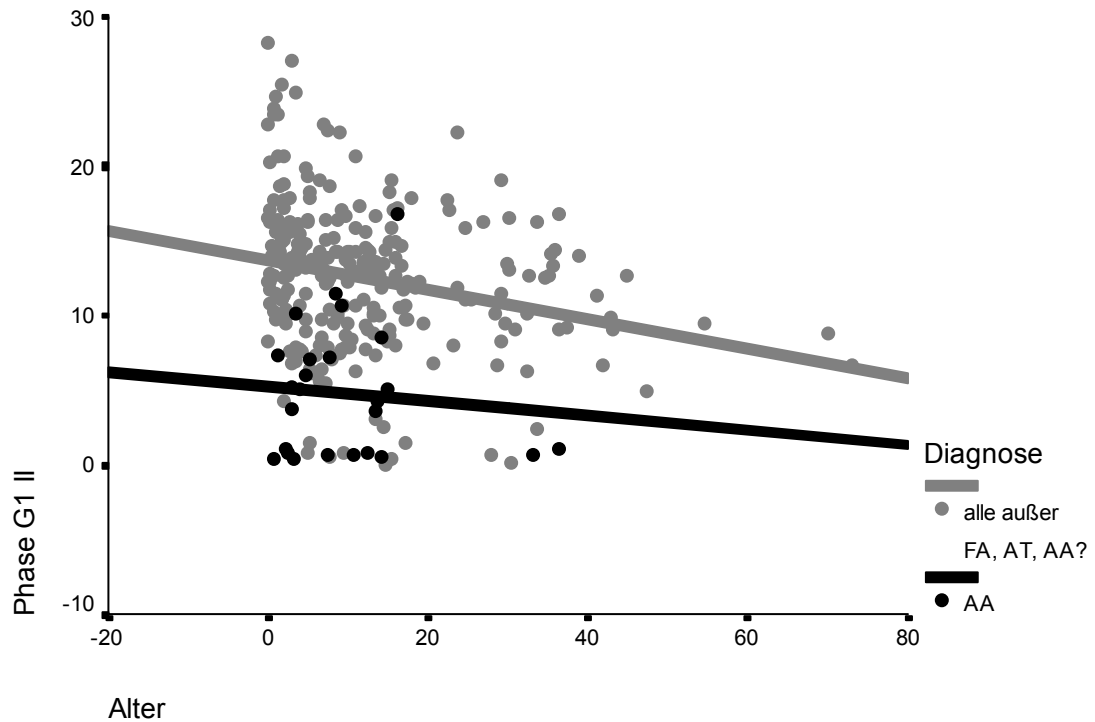
3.6.4.6 G2-Phase des 2. Zyklus



Die Anzahl der Lymphozyten von AA-Patienten ist in der G2- Phase des 2. Zyklus gegenüber der vorausgegangenen Phase sowie der Kontrollgruppe weiter gesunken ($p < 0,001$). Die Gruppe der AA-Patienten erreichte mit einem Mittelwert von 2,65 (SD = 2,10) weniger als das 2,5-fache der Gruppe der Vergleichsgruppe, für die sich ein Wert von 6,76 errechnete (SD = 2,90).

Früher als die Kontrollgruppe schlug die Regressionsgerade der Diagnosegruppe AA in eine negative Steigung um. Die Altersregressionsgleichung ($y = 2,72 - 0,007 x$) war mit $p = 0,88$ nicht signifikant ($R^2 = 0,001$). Ebenso ergab sich in der Vergleichsgruppe keine signifikante Korrelation zum Alter (Regressionsgleichung: $y = 6,58 + 0,017 x$; $p = 0,26$; $R^2 = 0,005$).

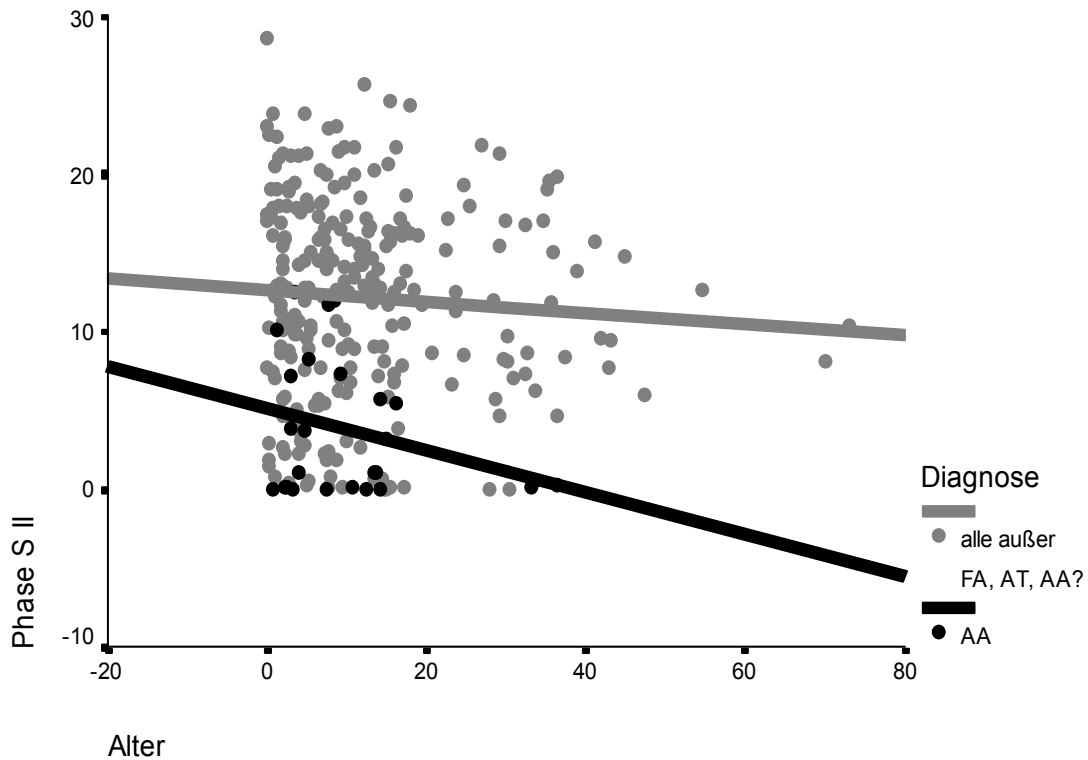
3.6.4.7 G1-Phase des 3. Zyklus



Ein geringer Anteil der Zellen der AA-Patienten erreichte den dritten Zellzyklus. In der G1-Phase des 3. Zyklus lag der Mittelwert bei den AA-Patienten bei 4,77 (SD = 4,37), gegenüber 12,34 (SD = 5,1) bei der Vergleichsgruppe ($p < 0,001$).

Im Hinblick auf das Alter wiesen AA-Patienten keine Signifikanz in der Korrelationsanalyse auf (Regressionsgerade: $y = 5,25 - 0,05 x$; $p = 0,63$; $R^2 = 0,01$). Für die Vergleichsgruppe wurde hingegen eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Alterskorrelation ermittelt (Regressionsgerade: $y = 13,66 - 0,099 x$; $R^2 = 0,057$).

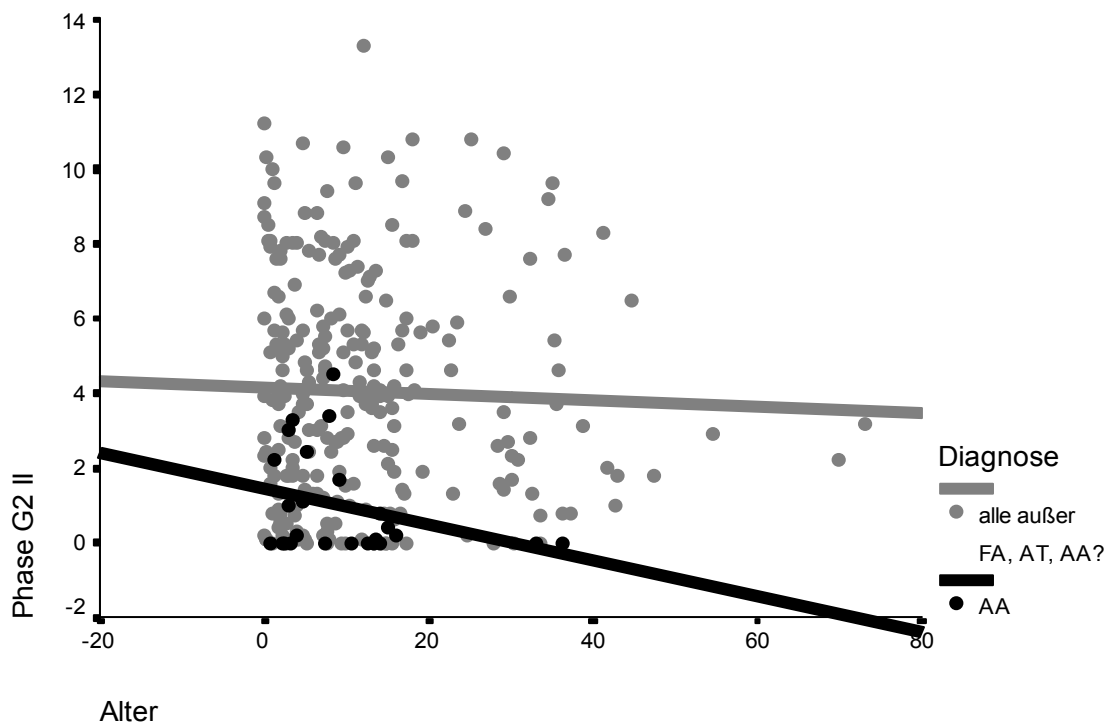
3.6.4.8 S-Phase des 3. Zyklus



Die Zahl der Zellen von AA-Patienten, die die S-Phase des 3. Zyklus erreicht haben, ist im Vergleich zu den vorangegangenen vier Phasen weiter gesunken. Der Mittelwert lag bei 3,79 (SD = 4,37) gegenüber einem mehr als dreifach so hohen Mittelwert von 12,17 (SD = 6,29) bei der Vergleichsgruppe ($p < 0,001$).

AA-Patienten konnte in dieser Phase keine signifikante Korrelation zum Alter nachgewiesen werden ($p = 0,185$). Jedoch zeigt die 7,5% ($R^2 = 0,075$) erklärende Regressionsgerade ($y = 5,1 - 0,134 x$) durch ihre negative Steigung deutlich, dass gerade die Lymphozyten älterer Patienten hier über eine relativ geringe Proliferationskapazität verfügen. Innerhalb der Vergleichsgruppe ergaben sich in der statistischen Analyse keine Auffälligkeiten. Die Korrelation zum Alter war demzufolge nicht signifikant (Regressionsgerade: $y = 12,68 - 0,036 x$; $p = 0,26$; $R^2 = 0,005$).

3.6.4.9 G2-Phase des 3. Zyklus



Die G2-Phase des 3. Zyklus erreichten nur noch 0,97% (SD = 1,36) der Zellen von AA-Patienten im Gegensatz zu 4,04% (SD = 3,02) der Zellen der Vergleichsgruppe. Die Differenz der Mittelwerte erwies sich mit $p < 0,001$ als hochsignifikant.

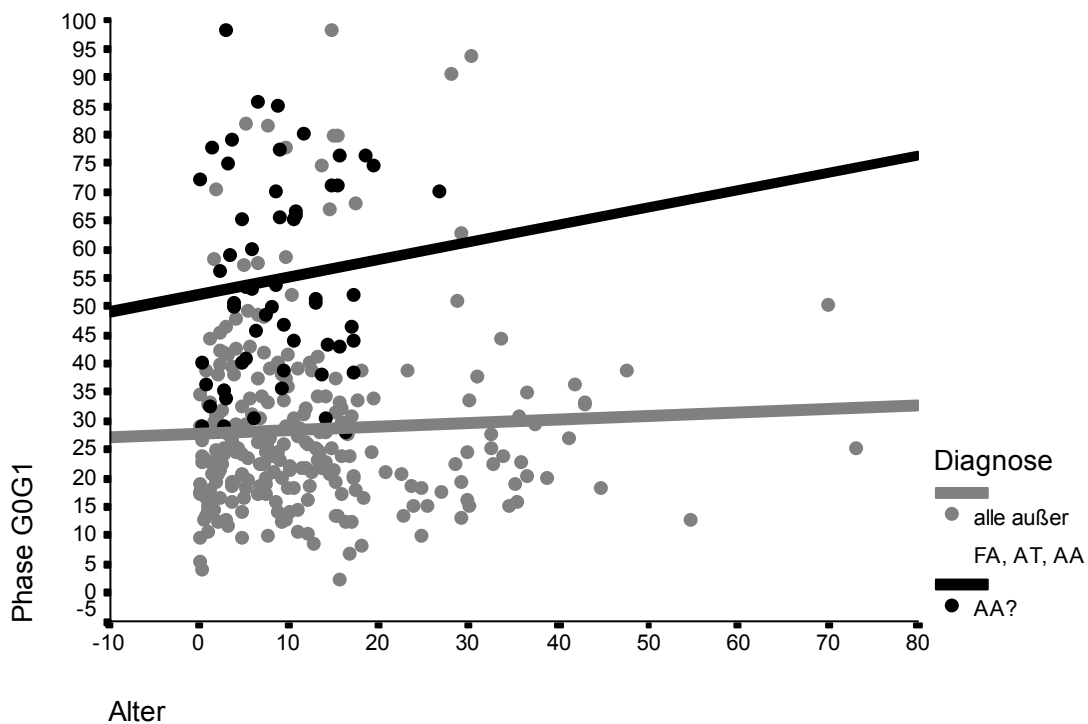
Eine Signifikanz hinsichtlich der Alterskorrelation lag bei AA-Patienten nicht vor ($p = 0,13$). Wie in der Phase zuvor fiel aber die Regressionsgerade ($y = 1,44 - 0,048 x$) durch ihre stark negative Steigung auf und erklärte immerhin 9,8% ($R^2 = 0,098$). Die Altersregression war innerhalb der Kontrollgruppe ebenfalls nicht signifikant (Regressionsgerade: $y = 4,17 - 0,009 x$; $p = 0,58$; $R^2 = 0,001$).

3.6.5 Zellzyklusverteilung bei Patienten mit fraglicher Diagnose aplastische Anämie

Bei dieser Gegenüberstellung wurden 328 Patienten (69,94%) erfaßt. 58 (12,3%) davon, bei denen die Diagnose AA zum Zeitpunkt der statistischen Analyse noch fragwürdig war, wurden im Folgenden 270 Personen (57,7%) aus der Vergleichsgruppe (219

Kontrollprobanden und 51 Personen der übrigen Diagnosegruppen) gegenübergestellt. Auch diese Patienten waren mit durchschnittlich 8,8 (SD = 5,98) Jahren jünger als die Vergleichsgruppe (MW = 12,23; SD = 12,12).

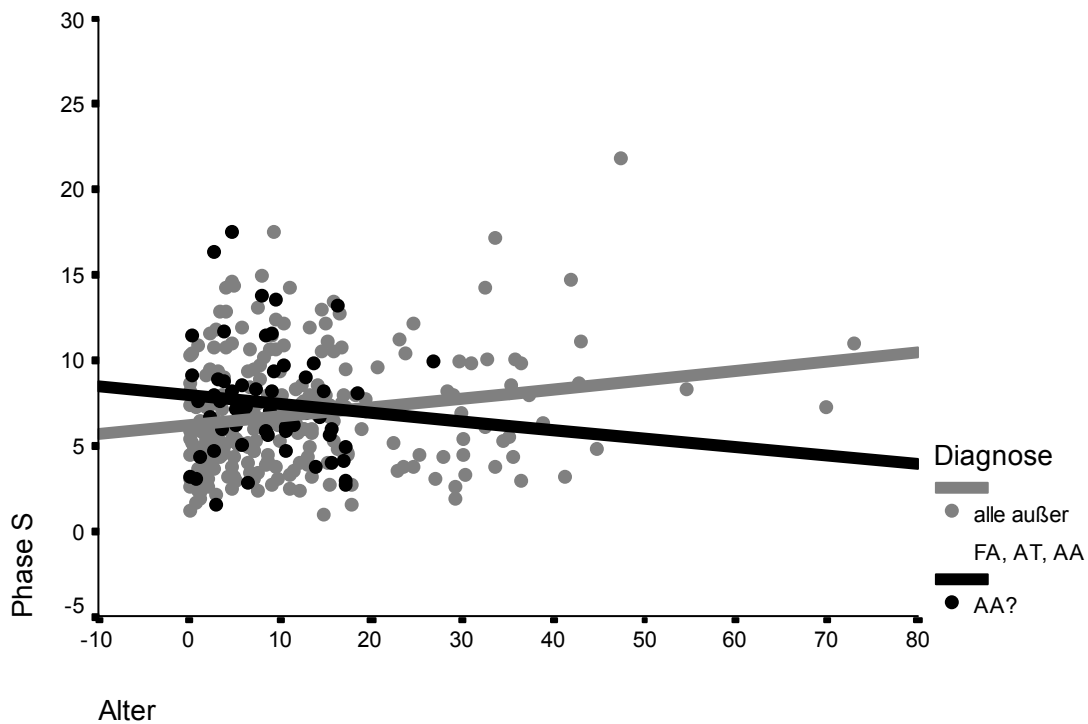
3.6.5.1 G0G1-Phase des 1. Zyklus



Bei der hier untersuchten Diagnosegruppe fiel gegenüber der Vergleichsgruppe (MW = 28,63; SD = 15,80) wieder eine hohe nicht proliferierende G0G1-Fraktion auf (MW = 55,35; SD = 17,73). Im Vergleich zu den Kulturen mit gesicherter AA, war der Anteil der Zellen, die nach 72 Stunden stimuliert werden konnten, allerdings etwas höher. Die Differenz der Mittelwerte der beiden hier gegenübergestellten Gruppen erwies sich als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Wie bei AA-Patienten und Personen/Patienten der Vergleichsgruppe bestand auch bei Patienten mit fraglicher AA keine signifikante Korrelation zum Alter (Gruppe der Patienten mit fraglicher AA: Regressionsgerade: $y = 52,227 + 0,302 x$; $p = 0,45$; $R^2 = 0,011$; Vergleichsgruppe: Regressionsgerade: $y = 27,82 + 0,063 x$; $p = 0,45$; $R^2 = 0,002$).

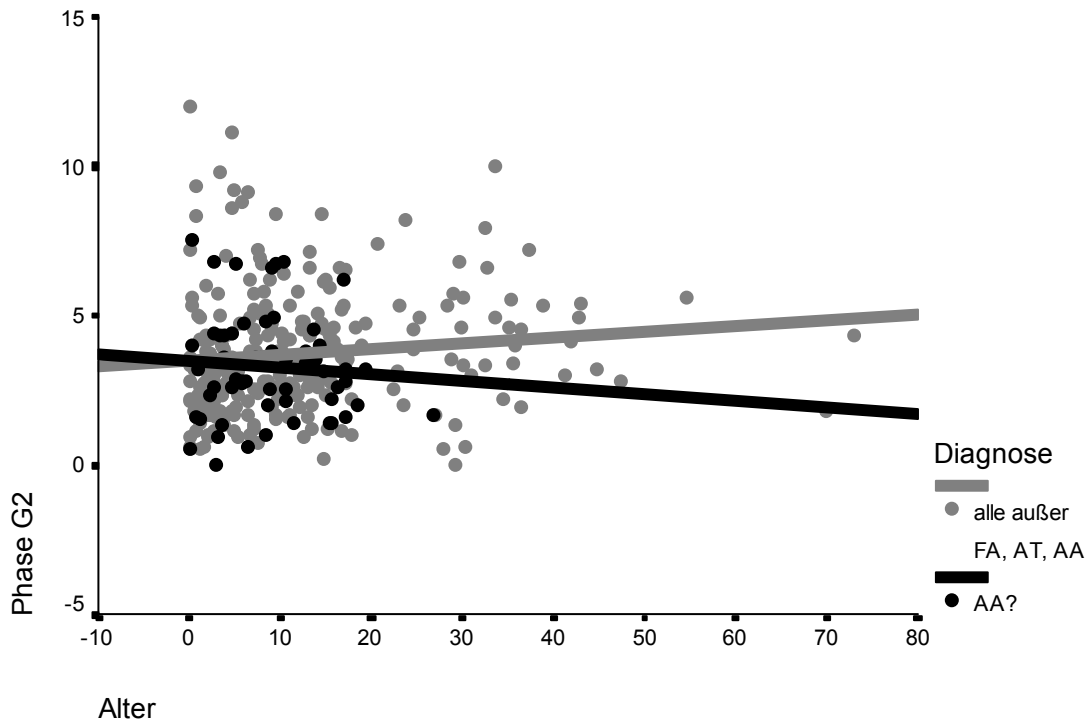
3.6.5.2 S-Phase des 1. Zyklus



Die Lymphozyten der Patienten mit fraglicher AA zeigten wie bei denen mit gesicherter AA in der S-Phase des 1. Zyklus ein unauffälliges Zellzyklusverhalten. Der Mittelwert erreichte in diesem Kompartiment 7,60 (SD = 3,38) und bei der Vergleichsgruppe 6,91 (SD = 3,41). Die Differenz der beiden im Diagramm gegenübergestellten Mittelwerte erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,094$).

Die Altersregression war wie bei den Patienten mit gesicherter Diagnose AA nicht signifikant (Regressionsgerade: $y = 7,96 - 0,051 x$; $p = 0,50$; $R^2 = 0,008$). Die Vergleichsgruppe wies mit $p = 0,002$ eine hochsignifikante Regressionsgerade auf ($y = 6,15 + 0,053 x$; $R^2 = 0,037$).

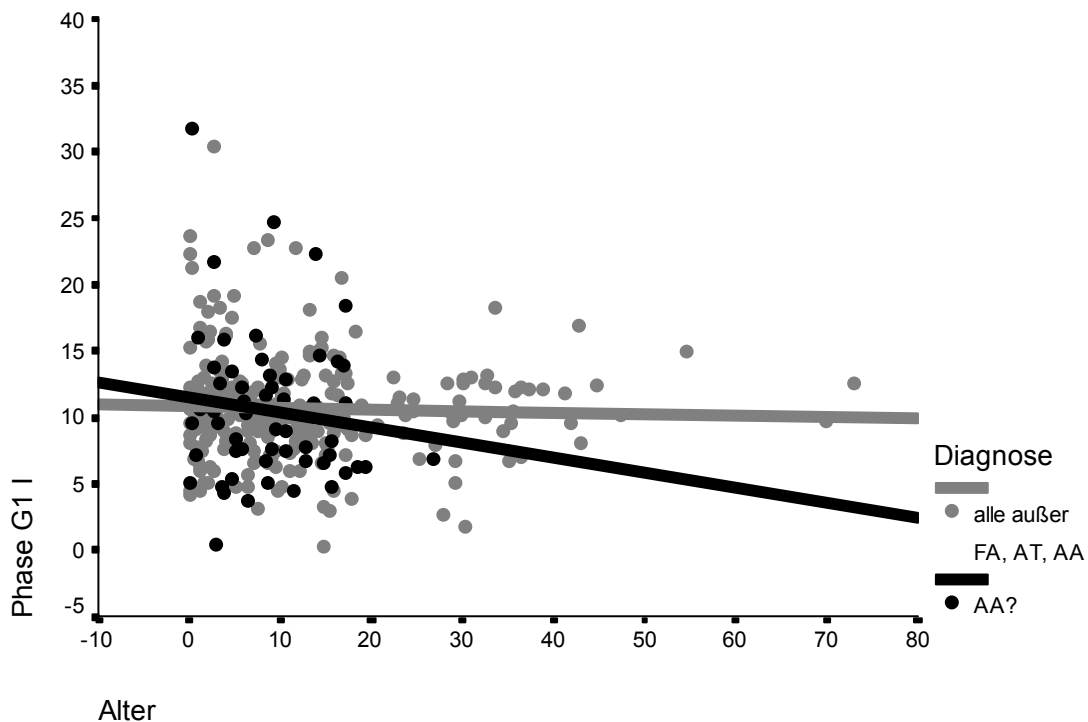
3.6.5.3 G2-Phase des 1. Zyklus



Das zellkinetische Bild entsprach in der G2-Phase des 1. Zyklus weitgehend dem der Patienten mit gesicherter AA. Wie die Kulturen der Vergleichsgruppe erreichten nur wenige Zellen diese Phase. Lymphozyten von Patienten mit fraglicher AA erreichten einem Mittelwert von 3,21 (SD = 1,77) und Kulturen der Vergleichsgruppe einen von 3,81 (SD = 2,18). Die Differenz der Mittelwerte von AA-Patienten und Personen/Patienten der Vergleichsgruppe erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,131$).

Das Alter hatte bei diesen beiden Gruppen im Gegensatz zur Gruppe der Patienten mit gesicherter AA keinen signifikanten Einfluss (AA?-Patienten: Regressionsgerade: $y = 3,45 - 0,022 x$; $p = 0,578$; $R^2 = 0,06$; Vergleichsgruppe: $y = 3,49 + 0,02 x$; $p = 0,069$; $R^2 = 0,013$).

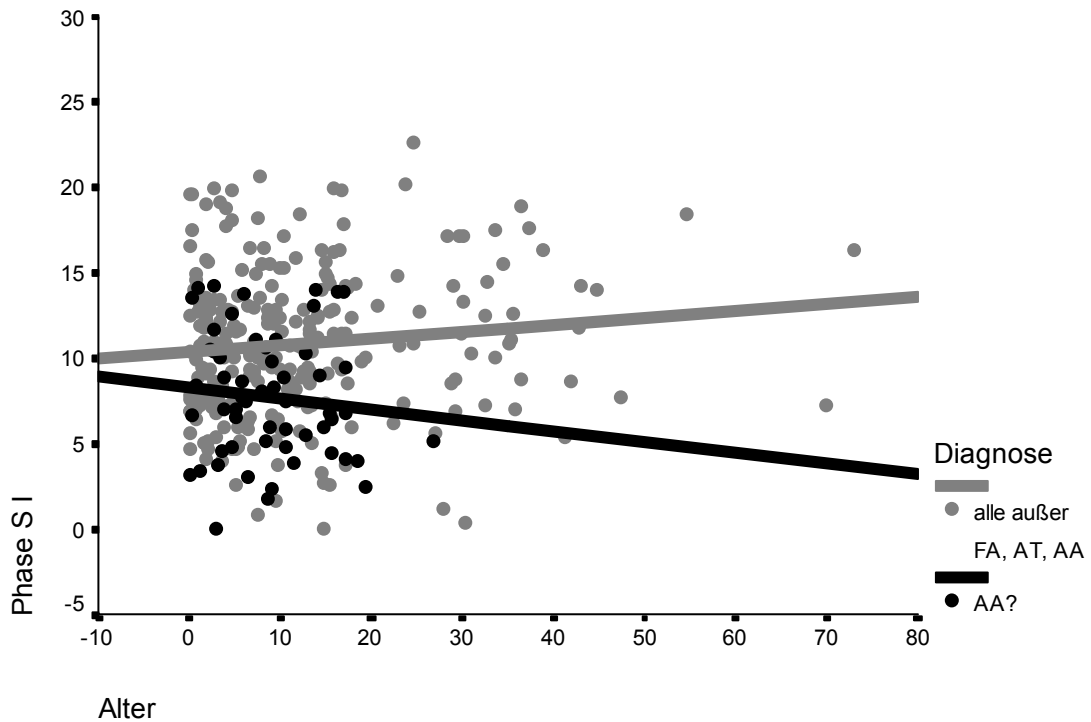
3.6.5.4 G1-Phase des 2. Zyklus



Im Gegensatz zu den Patienten mit gesicherter Diagnose AA erreichten die G1-Phase des 2. Zyklus mit einem Mittelwert von 10,42 (SD = 5,62) fast genauso viele Zellen wie die der Vergleichsgruppe mit einem Mittelwert von 10,72 (SD = 4,00). Die Differenz erwies sich dementsprechend als nicht signifikant ($p = 0,595$).

Das Alter hatte in dieser Phase keinen signifikanten Einfluss. Die Altersregression der Gruppe der Patienten mit fraglicher AA (Regressionsgleichung: $y = 11,55 - 0,113 x$; $p = 0,37$; $R^2 = 0,015$) wies wie die der Vergleichsgruppe eine negative Steigung auf (Regressionsgleichung: $y = 10,83 - 0,011 x$; $p = 0,59$; $R^2 = 0,001$).

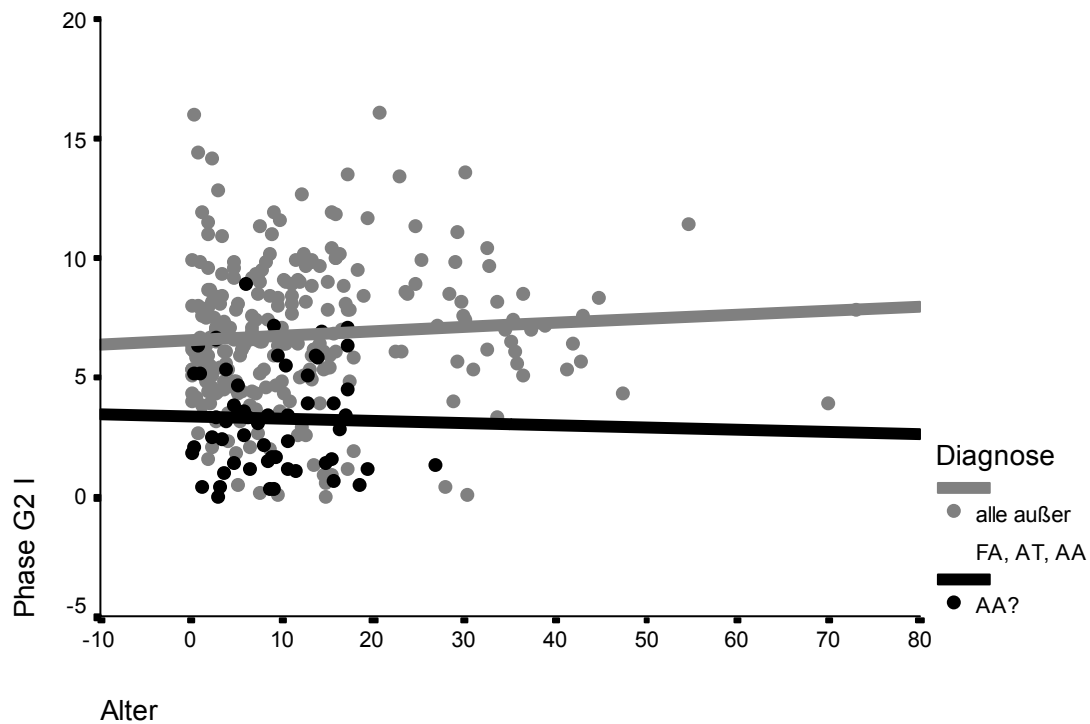
3.6.5.5 S-Phase des 2. Zyklus



Auch in der S-Phase des 2. Zyklus befanden sich mehr Zellen von Patienten mit fraglicher AA als es bei den Patienten mit gesicherter Diagnose der Fall war. Der Mittelwert war mit 7,66 (SD = 3,72) inzwischen hochsignifikant ($p < 0,001$) niedriger als der der Vergleichsgruppe mit 10,89 (SD = 4,35).

Wie bei den vorangegangenen drei Phasen wurden bei jüngeren Patienten mehr Zellen gezählt. Die Altersregression ($y = 8,33 - 0,064 x$) ergab jedoch keine signifikanten Ergebnisse ($p = 0,436$; $R^2 = 0,011$). Das Gleiche galt für die Vergleichsgruppe (Regressionsgleichung: $y = 10,39 + 0,04 x$; $p = 0,075$; $R^2 = 0,012$).

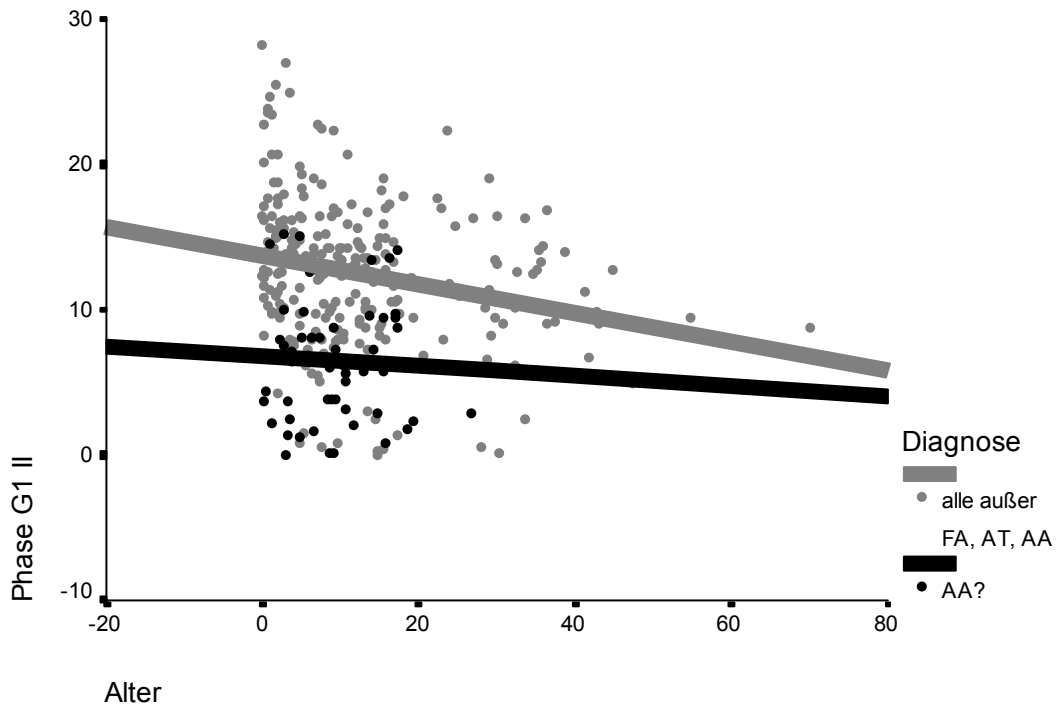
3.6.5.6 G2-Phase des 2. Zyklus



Später als bei den AA-Patienten bildeten sich beim Vergleich dieser Gruppen zwei Cluster. Patienten mit fraglicher AA lagen in der G2-Phase des 2. Zyklus bei einem Mittelwert von 3,25 (SD = 2,23). Dieser war hochsignifikant geringer ($p < 0,001$) als der der übrigen Probanden/Patienten mit 6,76 (SD = 2,90).

Die Altersregression (Regressionsgleichung: $y = 3,39 - 0,01 x$; $p = 0,85$; $R^2 = 0,001$) war wie die der AA-Patienten nicht signifikant. Ebenso ergab sich in der Vergleichsgruppe keine signifikante Korrelation zum Alter (Regressionsgleichung: $y = 6,58 + 0,017 x$; $p = 0,26$; $R^2 = 0,005$).

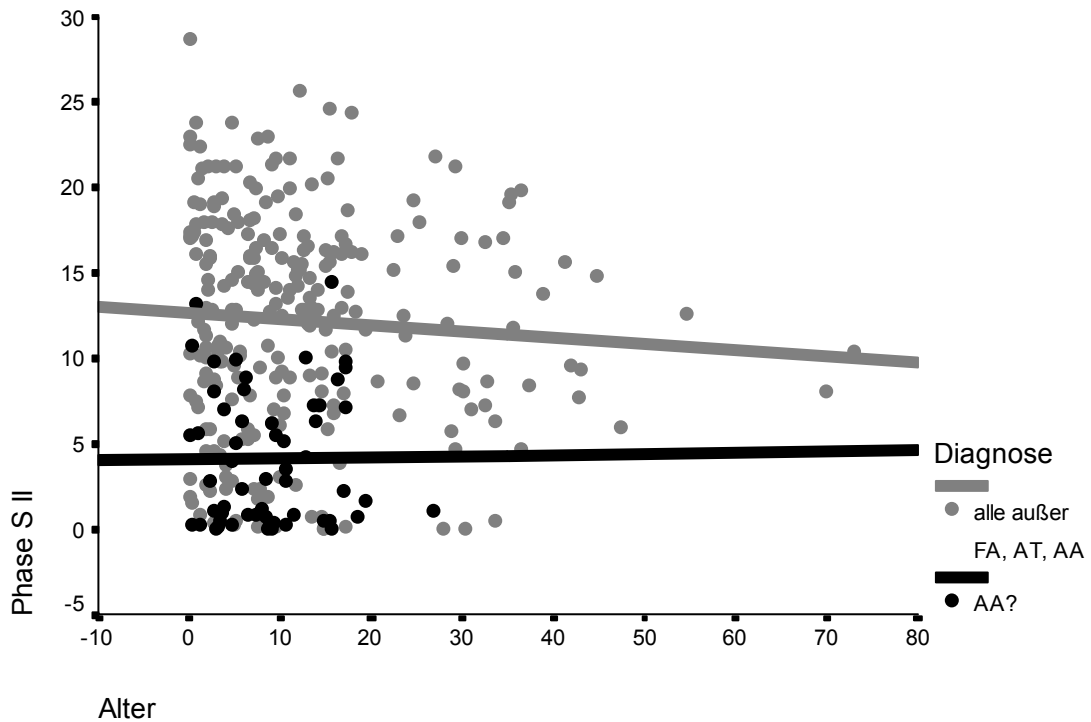
3.6.5.7 G1-Phase des 3. Zyklus



Die G1-Phase des 3. Zellzyklus erreichten mehr Zellen aus der Gruppe der Patienten mit fraglicher AA (MW = 6,41; SD = 4,16) als aus der Gruppe der Patienten mit gesicherter AA (MW = 4,77; SD = 4,37). Die Differenz zur Vergleichsgruppe (MW = 12,34, SD = 5,05) erwies sich als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Es bestanden weder bei den AA?-Patienten (Regressionsgerade: $y = 6,82 - 0,035 x$; $p = 0,71$; $R^2 = 0,003$) noch bei denen mit gesicherter Diagnose AA Signifikanzen hinsichtlich des Alters. Die Vergleichsgruppe hingegen wies eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Alterskorrelation auf (Regressionsgerade: $y = 13,66 - 0,099 x$; $R^2 = 0,057$).

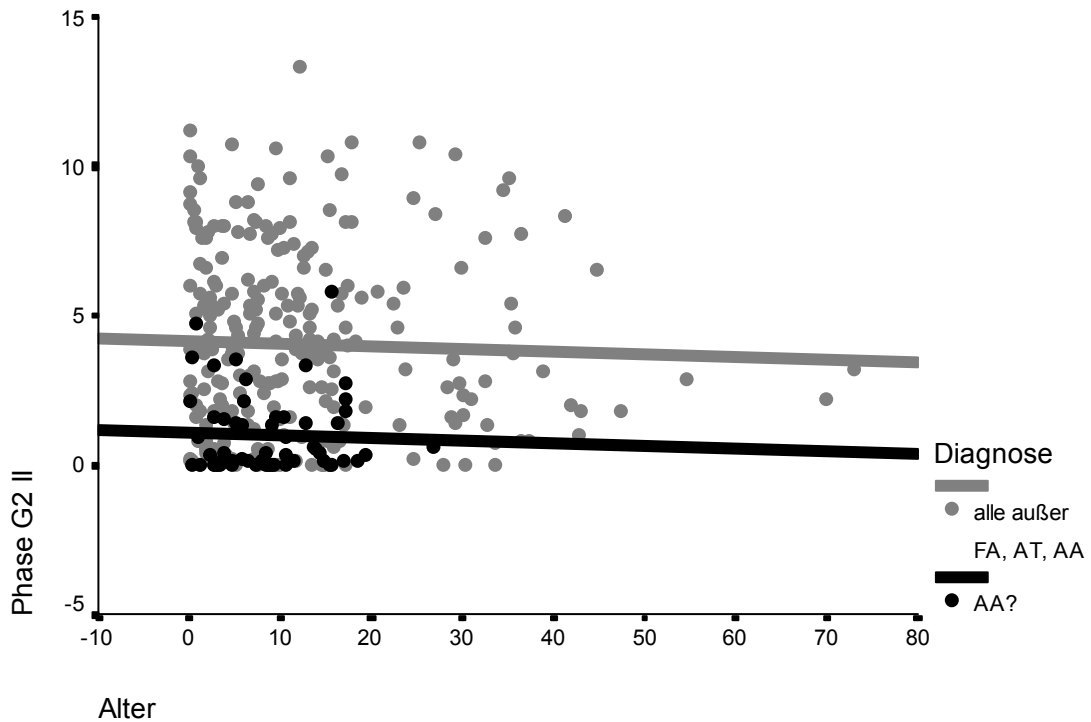
3.6.5.8 S-Phase des 3. Zyklus



In der S-Phase des 3. Zyklus war die Anzahl der Zellen von AA-Patienten annähernd so niedrig wie in der vorangegangenen Phase (MW = 4,05; SD = 3,93). Für die Vergleichsgruppe errechnete sich ein Mittelwert von 12,17 (SD = 6,29). Die Differenz war auf der Ebene $p < 0,001$ hochsignifikant.

Das Alter hatte auch in dieser Phase wie bei den Patienten mit gesicherter AA und der Vergleichsgruppe (Regressionsgleichung: $y = 12,68 - 0,036 x$; $p = 0,185$; $R^2 = 0,005$) keinen Einfluss auf das Zellzyklusverhalten (Regressionsgleichung: $y = 4,05 + 0,007 x$; $p = 9,4$; $R^2 < 0,0001$).

3.6.5.9 G2-Phase des 3. Zyklus



In der letzten diese Untersuchung einschließenden Phase, der G2-Phase des 3. Zyklus, sind sich die Mittelwerte von AA-Patienten mit denen der Patienten mit fraglicher AA mit 1 (SD = 1,33) sehr nahe gekommen. Für die Vergleichsgruppe berechnete sich ein Mittelwert von 4,04 (SD = 3,02). Die Differenz war auf der Ebene $p < 0,001$ hochsignifikant.

Mit der nahezu horizontal verlaufenden Regressionsgeraden ($y = 1,09 - 0,009 x$) lag keine Signifikanz vor ($p = 0,76$; $R^2 = 0,002$). Die Altersregression der Vergleichsgruppe (Regressionsgerade: $y = 4,17 - 0,009 x$; $p = 0,58$) erwies sich wie die der AA-Patienten ebenfalls als nicht signifikant.

4 Diskussion

Im Rahmen der hier an einer größeren Anzahl von FA-, AT- und AA-Patienten angewandten zellkinetischen Analyse mittels BrdU/Hoechst-Durchflußzytometrie wurden PHA-stimulierte, über 72 Stunden kultivierte Lymphozyten während drei konsekutiver Zellzyklen verfolgt.

Mit dieser Methode ist die quantitative Verteilung der Zellen in den einzelnen Fraktionen des jeweiligen Zellzyklus darstellbar sowie eine genaue Unterscheidung zwischen proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen möglich. Für Zellzyklusstudien eignen sich dabei die peripheren Lymphozyten des menschlichen Blutes gegenüber Fibroblasten mehr, da diese Zellsysteme die bessere qualitative Auflösbarkeit der einzelnen Zellzyklen aufweisen.

Mit diesem Verfahren wurde ein charakteristisches, konstant reproduzierbares Proliferationsmuster beobachtet. Da bekannt ist, dass das Spenderalter einen Einfluss auf die Zellaktivierung hat, wurden die Daten mit dem Alter der Patienten korreliert.

4.1 Zellzyklusstörungen bei Fanconi Anämie

Bei unbeeinträchtiger Zellaktivierung aus der G₀/G₁-Ruhephase zeigten sich in allen nachfolgenden Phasen signifikante Abweichungen vom zellkinetischen Bild der Vergleichsgruppe.

Der Anteil der Zellen in den frühen Zellzyklen war bei FA-Patienten signifikant höher, in den späten Zellzyklen jedoch signifikant niedriger als bei den gesunden Probanden: Eine verzögerte Zellzykluspassage findet sich hauptsächlich bei älteren Patienten/Probanden in Form einer S-Phase-Verlängerung. Diese Verlängerung verstärkt sich unabhängig vom Alter in der G₂-Phase. Die Hypothese, dass die typischen G₂-Phasen-Akkumulationen von FA-Zellen Ausdruck von unzureichend reparierten DNA-Schäden sind, wird durch den Befund unterstützt, dass die Behandlung mit Coffein die G₂-Phasen-Werte von FA-Lymphozytenkulturen zwar normalisiert, die Zellen jedoch an

der G1/S-Grenze des folgenden Zellzyklus wegen ihrer persistierenden DNA-Schäden liegen bleiben (Sabatier et al., 1988; Seyschab et al., 1994). Als diagnostisches Kriterium für das Vorliegen einer Fanconi-Anämie ist zellkinetisch eine Erhöhung des proliferationsunabhängigen Parameter $\sum G2/GF$ aus der Summe der G2-Phasen zur Wachstumsfraktion (Seyschab, 1992). Unter Wachstumsfraktion versteht sich die gesamte Zellpopulation, die durch Flowzytometrie gemessen wird, abzüglich der G0/G1-Fraktion sämtlicher proliferierender Zellen. In dieser Arbeit zeigte die zellkinetische Analyse der FA-Lymphozyten für die $\sum G2/GF$ einen Wert von 0,49 (SD = 0,11), für die Vergleichsgruppe einen Wert von 0,2 (SD = 0,05). Diese Daten überlappen sich mit den zitierten Referenzwerten. Als Normwert wird ein Wert von $< 0,3$, als für FA pathognomisch ein Wert von $> 0,4$ angenommen.

Zu Beginn des zweiten Zyklus wird (wie bereits von Kubbies et al. 1985 beschrieben) auch hier deutlich, dass die Verlängerung der G2-Phase durch eine Verkürzung der beiden nachfolgenden Phasen kompensiert wird, so dass die gesamte Zellzykluszeit für FA-Zellen annähernd gleich bleibt. Im zweiten Zyklus findet sich nur in der G2-Phase eine verzögerte Zellzykluspassage, während in allen darauffolgenden Phasen des 3. Zyklus die Vergleichsgruppe höhere Werte erreichte. Ältere Patienten/Probanden ließen sich ab der S-Phase des 2. Zellzyklus wesentlich weniger stimulieren. Die Mehrheit der Lymphozyten der FA-Patienten konnte nur die ersten beiden Zellzyklen vollenden. Eine Verlängerung des Zellzyklus bei FA wurde bereits mit Hilfe zytogenetischer (Dutrillaux et al., 1982; Sabatier und Dutrillaux, 1988) und durchflußzytometrischer Methoden (Kubbies et al., 1985) beschrieben.

Die Zellzyklusprogression stellte sich bei älteren Patienten/Probanden insgesamt eingeschränkt dar, so dass zusätzlich abhängig vom Alter ein größerer Anteil von Zellen in den früheren Zellzyklen und ein geringerer Anteil in den späteren Zellzyklen vorhanden war. Im Einzelnen zeigte sich eine altersunabhängige Verteilung nicht-proliferierender Zellen bei FA-Patienten sowie bei Kontrollpersonen. Interessant ist, dass bei beiden Diagnosegruppen in Abhängigkeit vom Alter eine hochsignifikante Erhöhung der S-Phase des 1. Zellzyklus besteht. Die zur diagnostischen Einordnung verwendete G2-Phase zeigt weder für FA-Patienten noch für die Vergleichsgruppe eine Altersabhängigkeit. Zwar erhöht sich als Funktion des Alters die Zahl der Zellen von

AA-Patienten hoch signifikant innerhalb dieser Phase, allerdings stellen AA-Patienten in höherem Alter nicht mehr die wichtigste Differentialdiagnose dar. Somit wird die diagnostische Aussagekraft durch den Alterseffekt nicht beeinträchtigt. Im 2. Zellzyklus fällt auf, dass in der G2-Phase hochsignifikant weniger Zellen von älteren FA-Patienten vorhanden sind. Mit zunehmendem Alter wiesen Lymphozyten älterer FA-Patienten und Probanden in der G1-Phase des 3. Zellzyklus signifikant geringere Phasenanteile auf.

Hinsichtlich der Altersverteilung innerhalb der Geschlechter ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Innerhalb des hier untersuchten Patientenkollektives wurden Mädchen mit durchschnittlich 16 Jahren unwesentlich älter als die Jungen mit durchschnittlich 14 Jahren.

Die prämitotische G2-Phase dient der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden. Da die FA durch eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit charakterisiert werden kann (Schroeder und Kurth, 1971; Swift und Hirschhorn, 1996), wurde die G2-Phase-Störung zunächst als zellkinetische Manifestation von unreparierten DNA-Schäden interpretiert. Studien mit Crosslinking Agents, welche nur in unauffälligen Zellen zu einer S-Phasen-Arretierung führen nicht aber in FA-Zellen, zeigen, dass die darauffolgende G2-Phase bei FA-Zellen kompensatorisch verlängert wird, um die in der S-Phase aufgetretenen Läsionen zu reparieren (Salla-Trepat et al., 2000; Centurion et al., 2000).

Diese zellkinetischen Charakteristika erlauben eine eindeutige Abgrenzung zwischen FA, Kontrollpersonen und kindlicher AA. Im Gegensatz zu AT zeigt sich die G2-Phase Störung bereits spontan bei unter Standardbedingungen kultivierten Lymphozyten. Zellen präleukämischer und leukämischer Patienten weisen keine FA-typische G2-Phase-Verlängerung mehr auf.

4.2 Mosaik-Konstellation bei Fanconi Anämie

Konstitutionelle Mutationen von FA-Patienten können somatisch revertieren (Gross et al., 2000). In einem der beiden Allele wird durch die Reversion die Wildtyp-Sequenz wieder hergestellt. Alle von der Reversion betroffenen Zellen sind funktionell

heterozygot und zeigen wie die obligat heterozygoten Zellen der Eltern der Patienten keine Störungen des Zellzyklus. Im peripheren Blut können revertierte und ursprüngliche FA-Zellen über viele Jahre nebeneinander persistieren. Dies führt bei der durchflußzytometrischen Analyse zu einer großen Schwankungsbreite der G2-Phasen-Werte. Wie die obige Tabelle (3.6.1.3) zeigt, finden sich im G2-Phasen-Bereich zwischen 10 und 14,5 sieben gesicherte und zwei fragliche FA-Mosaikpatienten. Falls die G2-Phase unter dem Wert von 10 bis in den Normalbereich gesunder Kontrollen ($3,8 \pm 2,2$) liegt, ist eine durchflußzytometrische Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose "Fanconi Anämie" nicht mehr möglich. Bei offensichtlicher Diskrepanz zwischen dem klinischen Bild und einem (normalen) Zellzyklusbefund kann die Diagnose FA nur durch eine Untersuchung der Hautfibroblasten des Patienten gesichert werden (Joenje et al., 1998).

4.3 Zellzyklusstörungen bei Ataxia teleangiectasia

AT-Patienten wiesen in allen Phasen hochsignifikante Abweichungen vom zellkinetischen Bild normaler Kontrollpersonen auf. Der zellkinetische Defekt für AT zeigte sich unabhängig von der Behandlung mit ionisierenden Strahlen in Form einer deutlich reduzierten Aktivierung der Lymphozyten, die sich als erhöhte G0G1-Fraktion darstellte. Ein Aktivierungsdefekt von AT-Lymphozyten in vitro wird in der Literatur bestätigt (McFarlin et al., 1972; Schwartzman et al., 1990).

Unbestrahlte AT-Zelllinien konnten von unbestrahlten Kontrollzellen unterschieden werden aufgrund einer hochsignifikant erhöhten G0G1-Phase. Vermutlich ist die hohe nicht-proliferierende G0G1-Fraktion von AT-Lymphozyten darauf zurückzuführen, dass diese Zellen eine Störung in ihrer Mitogen-Antwort aufweisen. Es zeigen sich keine signifikanten S- oder G2-Phase-Störungen wie sie bei dem Chromosomenbruchsyndrom FA beobachtet werden konnten. Alle nachfolgend durchlaufenen Phasen wiesen eine deutliche Erniedrigung auf.

Innerhalb der Gruppe der AT-Patienten variiert die Altersregression deutlich. Die Lymphozyten älterer AT-Patienten wiesen aber insgesamt eine höhere Proliferations-

kapazität auf als die jüngerer Patienten. Ein relativ großer Anteil der Zellen älterer Patienten war noch in den späteren Zellzyklen vorhanden.

Hinsichtlich der Altersverteilung innerhalb der Geschlechter ließen sich keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Weibliche und männliche AT-Patienten wurden durchschnittlich acht bis neun Jahre alt.

Die Altersregression bei **bestrahlten** AT-Zellkulturen verhält sich entsprechend den unbestrahlten Zelllinien. Das Alter der AT-Patienten hatte keinen strahlenabhängigen Einfluss auf das Zellzyklusverhalten. Bestrahlte Zelllinien wiesen wie bei FA-Patienten einen erhöhten Anteil von Zellen in der ersten G2-Phase auf. Im Gegensatz zu FA zeigt sich die G2-Phase-Störung nur bei bestrahlten Lymphozyten. Ein Defekt in der Erkennung und/oder der Reparatur von DNA-Schäden erscheint als Ursache für die AT wahrscheinlich. Zahlreiche Untersuchungen über die G2-Phasen-Störung bestrahlter AT-Zellkulturen lieferten jedoch bisher kein eindeutiges Ergebnis (Übersicht bei Cohen und Levy, 1989).

Ein erhöhter G2/GF-Wert nach Röntgenbestrahlung (1,5 Gy) ist zusammen mit einer altersgemäß unterdurchschnittlichen Stimulierbarkeit der Zellen das diagnostische Kriterium für das Vorliegen einer Ataxia teleangiectasia. Patienten des mit AT- verwandten Nijmegen-Breakage-Syndroms sind gekennzeichnet durch eine ebenfalls erhöhte Strahlensensitivität und eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit der Lymphozyten, während sie klinisch einige Unterschiede zur klassischen Art aufweisen. Eine eindeutige Trennung von Kontrollpersonen wurde für AT-Patienten durch gleichzeitige Analyse der stark reduzierten Aktivierung PHA-stimulierter Lymphozyten (G0G1-Fraktion) und der erhöhten Strahlensensitivität (G2/GF-Wert) bereits aufgezeigt (Seyschab et al., 1992).

4.4 Zellzyklusstörungen bei aplastischer Anämie

Die Literatur bietet ein teilweise widersprüchliches Bild der Lymphozytenproliferation bei AA, welches unterschiedliche pathogenetische Mechanismen reflektieren könnte. So wurde einerseits vermehrtes Wachstum beobachtet (Haas et al., 1970), während in

anderen Studien kein Unterschied (Sabbe et al., 1984), in wieder anderen Studien ein uneinheitliches Wachstum (Böning et al., 1980) beschrieben wurde.

In dieser Untersuchung war den Zellen der an aplastischer Anämie leidenden Patienten im Vergleich zu den Zellen aus der Vergleichsgruppe ein geringeres Wachstum gemeinsam.

Wie schon bei den an FA erkrankten Patienten, nahm auch hier mit steigendem Lebensalter die Proliferationskapazität der Zellen signifikant ab. Hochsignifikant mehr Lymphozyten älterer als jüngerer Patienten ließen sich noch in der G2-Phase des 1. Zyklus nachweisen. Die Lymphozyten älterer Patienten ließen sich in den späteren Zyklen weniger stimulieren, so dass demzufolge mehr Zellen in den früheren Zellzyklen und weniger in den späteren Zellzyklen nachzuweisen waren.

Hinsichtlich der Altersverteilung innerhalb der Geschlechter ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Unter den AA-Patienten wurden Mädchen mit durchschnittlich elf Jahren unwesentlich älter als die Jungen mit neun Jahren.

Das Zellzyklusverhalten insgesamt ähnelt dem der AT-Patienten ohne vorherige Strahlenexposition. Der Anteil der Zellen in den späteren Zellzyklen war bei den AA-Patienten signifikant niedriger als bei den gesunden Probanden. Somit verließen bei den AA-Patienten weniger Zellen die G0/G1-Phase und erreichten in geringerem Maße spätere Zellzyklen gegenüber der Vergleichsgruppe. Nach Untersuchungen von Schindler et al. lässt sich die FA-negative Gruppe gegenüber der Gruppe mit non-FA-aplastischer Anämie (=aplastische Anämie anderer Genese) über eine massive Erhöhung der Zellen in der G0/G1-Phase differenzieren: In dieser Arbeit zeigt die negative Kontrollgruppe dabei Werte von 28,63 (SD = 15,8), wobei die Gruppe der non-FA-aplastischen Anämie im Bereich von 62,07 (SD = 16,97) liegt. Diese Daten überlappen sich mit den zitierten Referenzwerten. Die kindliche aplastische Anämie lässt sich von der klinisch teilweise ähnlich imponierenden FA durch die FA-typische, spontane G2-Phase-Störung eindeutig abgrenzen.

5 Zusammenfassung

Aussagekräftige Resultate durch zellkinetische Untersuchungen an Patienten mit Chromosomenbruchsyndromen zu erzielen, stellt sich aus folgenden Gründen problematisch dar: einerseits die Seltenheit dieser Erbkrankheit und andererseits die häufig vorkommenden hämatologischen und immunologischen Probleme der Patienten bereiten Schwierigkeiten in der Verfügbarkeit von Zellmaterial. Eine eindeutige Abgrenzung gegenüber Kontrollpersonen mit Hilfe der bivariaten durchflußzytometrischen Analyse wurde in dieser Untersuchung anhand eines größeren Patienten-Kollektives und unter standardisierten Bedingungen sowohl für FA-Patienten als auch für AT- und AA-Patienten statistisch abgesichert:

FA-Patienten lassen sich durch die prominente Akkumulation von unbehandelten Lymphozyten in der G2-Phase von Kontrollpersonen und Patienten mit kindlicher aplastischer Anämie trennen. Eine Ausnahme stellen Mosaik-Konstellationen dar, welche intermediäre G2-Phasen-Werte aufweisen, solange noch kein völliger Ersatz der peripheren Lymphozyten durch die revertierten Zellen stattgefunden hat. Bei persistierender Diskrepanz zwischen zytogenetischem und klinischem Befund muss zur diagnostischen Bestätigung auf die Analyse von Fibroblastenkulturen zurückgegriffen werden. Als Referenzwerte wurden in dieser Untersuchung G2-Phasen-Werte von 10 bis 3,8 (SD = 2,2) ermittelt.

AT-Patienten können hingegen durch die gleichzeitige Analyse der reduzierten Aktivierung unbehandelter Lymphozyten (G0G1-Fraktion) und der erhöhten Strahlensensitivität (G2/GF-Wert) von gesunden Probanden unterschieden werden.

Die kindliche AA lässt sich von der klinisch teilweise ähnlich imponierenden FA durch deren G2-Phase-Störung zuverlässig abgrenzen. Die Patienten mit non-FA-aplastischer Anämie zeigten im zellkinetischen Bild eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch PHA, sichtbar in einer Erhöhung der G0G1-Fraktion.

Weder bei FA-, AT- noch bei AA-Patienten ließen sich signifikante geschlechtsabhängige Altersverteilungen nachweisen. Innerhalb der Gruppe der FA- und der

AA-Patienten ließ sich ein geringer Altersunterschied zugunsten der weiblichen Patienten feststellen.

Mit steigendem Lebensalter der FA- und AA-Patienten nahm die Proliferationskapazität der Lymphozyten ab. Wie in der Literatur beschrieben, zeigt sich ebenfalls eine Abnahme der Stimulierbarkeit der Kontroll-Lymphozyten mit zunehmendem Lebensalter (Schindler et al., 1988). Interessanterweise wiesen die unbestrahlten Lymphozyten älterer AT-Patienten im Vergleich zu den jüngeren eine höhere Proliferationskapazität auf. Das Alter der AT-Patienten hatte zudem keinen strahlenabhängigen Einfluss auf das Zellzyklusverhalten. Aufgrund der geringen Anpassungsgüte des Modells können die Altersgeraden nicht effektiv für die Vorhersage der Zellanzahl in Abhängigkeit vom Alter benutzt werden; nur ein Minimum der beobachteten Variabilität der Zellzahl wird durch das Alter erklärt.

Der Einfluss des biologischen Alters auf die Zellkinetik könnte mit einer verminderten Reparaturfähigkeit der Zellen interpretiert werden.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten jedoch, dass die Alterseinflüsse auf die Zellkinetik sehr viel geringer sind als die Einflüsse von Genotyp und Krankheitstyp. Somit konnte die Methode der mehrparametrischen Durchflusszytometrie in der Diagnostik und Differentialdiagnostik der aplastischen Anämien des Kindesalters sowie in der Erfassung von Genotypen mit erhöhter Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung validiert werden.

6 Literaturverzeichnis

Auerbach AD (1993)

Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp Hematol* (New York) **21**: 731-733.

Aurias, A.; Dutrillaux, B.; Buriot, D.; Lejeune, J. (1980)

High frequency of inversions and translocations of chromosome 7 and 14 in ataxia-teleangiectasia. *Mutat Res* **69**: 369-374.

Aurias, A.; Dutrillaux, B. (1986)

Probable involvement of immunoglobulin superfamily genes in most recurrent chromosomal rearrangements from ataxia teleangiectasia. *Hum Genet* **72**: 210-214.

Barbi, G.; Scheres JMJC; Schindler, D.; Taalman RDFM; Rodens, K.; Mehnert, K.; Müller, M.; Seyschab, H. (1991)

Chromosomal instability and X-Ray hypersensitivity in a microcephalic and growth-retarded child. *Am J Med Genet* **40**: 44-50.

Böning, L.; Lau, B.; Wilmanns, W. (1980)

Kultur mononukleärer Blutzellen von Patienten mit aplastischer Anämie in der Diffusionskammer. *Blut* **41**: 445-450

Buchwald, M.; Joenje, H.; Auerbach, A.D. (1997)

Fanconi anemia, in Vogelstein B, Kinzler KW (eds): *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill.

Bridges, B.A.; Lenoir, G.; Tomatis, L. (1985)

Workshop on ataxia-teleangiectasia heterozygotes and cancer. *Cancer Res* **45**: 3979-3980.

Centurion, S.A.; Kou, H.R.; Lambert, W.C. (2000)

Damage resistant DNA synthesis in Fanconi anemia cells treated with a DNA crosslinking agent. *Exp Cell Res* **260**: 216-221.

Cohen, M.M.; Levy, H.P. (1989)

Chromosome instability syndromes. *Adv Hum Genet* **18**: 43-149, 465-471.

Cohen, M.M.; Simpson, S.J.; Pazos, L. (1981)

Specificity of bleomycin-induced cytotoxic effects on ataxia teleangiectasia lymphoid cell lines. *Cancer Res* **41**: 1817-1823.

Dutrillaux, B.; Aurias, A.; Dutrillaux, A.M.; Buriot, D.; Prieur, M. (1982)

The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum Genet* **62**: 327-332.

Edwards, M.J.; Taylor, A.M.R.; Fluide, E.J. (1981)

Bleomycin-induced inhibition of DNA synthesis in ataxia-teleangiectasia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **102**: 610-616.

Faivre, L.; Guardiala, P.; Lewis, C.; Dokal, I., Ebell, W.; Zatterale, A.; Altay, C.; Poole, J.; Stones, D.; Kwee, M.L.; van Weel-Sipman, M.; Havenga, C.; Morgan, N.; de Winter, J.; Digweed, M.; Savoia, A.; Pronk, J.; de Ravel, T.; Jansen, S.; Joenje, H.; Gluckmann, E.; Mathew, C.G. (2000)

Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi Anaemia Research Group. *Blood* **96**: 4064-70

Fanconi Anaemia/Breast Cancer Consortium (1996)

Positional cloning of the Fanconi anaemia group. *A gene Nature Genet* **14**: 324-328.

Fanconi, G. (1927)

Familiäre infantile perniziosartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrb. Kinderh.* **117**: 257-280.

Friedberg, E.C. (1985)

DNA Repair. W.H. Reeman and Company, New York.

Führer, M.; Bender-Götze, C.H.; Ebell, W.; Friedrich, W.; Kohne, E. (1994)

Die Behandlung der aplastischen Anämie - Zielsetzung und Aufbau des Pilotprotokolls SAA. *Klin. Pädiatr.* **206**: 289-295.

Glanz, A.; Fraser, E.C. (1982)

Spectrum of anomalies in Fanconi anemia. *J Med Genet* **19**:412.

Gordon-Smith, E.C.; Rutherford, T.R. (1991)

Fanconi anemia: Constitutional aplastic anemia. *Semin Hematol* **28**: 104-112.

Gross, M. (2002)

Mutationsanalyse in den Fanconi Anämie-Genen unter besonderer Berücksichtigung von FANCA. In: *Fanconi Anämie* (Schindler, D.; Hoehn, H.) medizinischgenetik edition 2, München 64-72.

Haas, R.J.; Kretschmer, V.; Fliedner, T.M. (1970)

Phytohämagglutinin-Stimulation von Lymphozyten bei Patienten mit aplastischer Anämie. *Med Klin* **65**: (15) 724-729

Hartwell, L.H. (1992)

Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* **71**: 543.

Hecht, F.; Koler, R.D.; Rigas, D.A.; Dahnke, G.S.; Case, M.P.; Tisdale, V.; Miller, R.W. (1966)

Leukaemia and lymphocytes in ataxia teleangiectasia. *Lancet* II: 1193.

Henderson, L.; Cole, H.; Arlett, C.; James, S.E.; Cole, J.; Lehmann, A.; Rosenbloom, L.; Redmond, T.; Meller, S. (1985)

Diagnosis of ataxia-teleangiectasia by T-lymphocyte cloning assay. *Lancet* II: 1242.

Joenje, H.; Arwert, F.; Kwee, M.L.; Madan, K.; Hoehn, H. (1998)

Confounding factors in the diagnosis of Fanconi anaemia. *Am J Med Genet* **79**: 403-5

Joenje, H.; Patel, K.J. (2001)

The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nature reviews/Genetics* Vol.2, Jun 2001: 446-457.

Kohn, P.H.; Whang-Peng, J.; Levis, W.R. (1982)

Chromosomal instability in ataxia teleangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet* **6**: 289-302.

Kubbies, M.; Schindler, D.; Hoehn, H.; Schinzel, A.; Rabinovitch, P.S. (1985b)

BrdU-Hoechst flow cytometry reveals regulation of human lymphocyte growth by donor-age-related growth fraction and transition rate. *J Cell Physiol* **125**: 229-234.

Kubbies, M.; Schindler, D.; Hoehn, H.; Schinzel, A.; Rabinovitch, P.S. (1985, 1985c)

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**: 1022-1030.

Kubbies, M.; Schindler, D.; Hoehn, H.; Friedl, R.; Rabinovitch, P.S. (1987)

BrdU/Hoechst cell cycle analysis applied to Fanconi anemia and inhibitory agents. In: *Clinical Histometry and Cytometry* (Burger M., Ploem JS, Goerttler K eds.), Academic Press, New York 243.

Liu, J.M.; Buchwald, M.; Walsh, C.E.; Young, N.S. (1994)

Fanconi anemia and novel strategies for therapy. *Blood* **84**: 3995-4007.

Llerena Jr., J.C.; Murer-Orlando, M. (1991)

Bloom syndrome and ataxia teleangiectasia. *Semin Hematol* **28**: 95-103.

Lo ten Foe, J.R.; Rooimans, M.A.; Bosnoyan-Collins, L.; Alon, N.; Wijker, M.; Parker, L.; Lightfoot, F. et al. (1996)

Expression cloning of a cDNA for the major fanconi anaemia gene, FAA. *Nature Genet* **14**, 320-323.

Lo ten Foe, J.R.; Kruyt, F.A.; Zweekhorst, M.B.; Pals, G.; Gibson, R.A.; Mathew, C.G.; Joenje, H.; Arwert, F. (1998)

Exon 6 skipping in the Fanconi anemia C gene associated with a nonsense/missense mutation (775C>T) in exon 5: the first example of a nonsense mutation in one exon causing skipping of another downstream. *Hum Mutat* **1**:25-27

McFarlin, D.E.; Strober, W.; Waldmann, T.A. (1972)

Ataxia-teleangiectasia. *Medicine* **51**: 281-314.

Miglierina, R.; Le Coniat, M.; Berger, R. (1991)

A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow-cytometry. *Anal Cell Pathol* **3**: 111-114.

Mitchison, J.M. (1971)

The biology of the cell cycle. Cambridge University press, London.

Sabatier, L.; Dutrillaux, B. (1988)

Effect of caffeine in Fanconi anemia. I. Restoration of a normal duration of G2 phase. *Hum Genet* **79**: 242-244.

Sabbe, J.M.; Haak, H.L.; Te Velde, J.; Bradley, B.A.; De Bode, L.; Blom, J.; Van Rod, J.J. (1984)

Immunological investigations in aplastic anemia patients. *Acta Haematol* **71**: 178-188

Sala-Trepat, M.; Rouillard, D.; Escarceller, M.; Laquerbe, A.; Moustacchi, E.; Papadopoulo, D. (2000)

Arrest of S phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Exp Cell Res* **260**: 208-215.

Schindler, D.; Kubbies, M.; Hoehn, H.; Schinzel, A.; Rabinovitch, P.S. (1985)

Presymptomatic diagnosis of Fanconi's anemia. *Lancet* **1**: 937.

Schindler, D.; Kubbies, M.; Hoehn, H.; Schinzel, A.; Rabinovitch, P.S. (1987)

Presymptomatic diagnosis of Fanconi anemia and detection of a preleukemic aberration (1q12-32 triplication) via BrdU/Hoechst flow cytometry. *Am J Pediat Hemat/Oncol* **9**: 172.

Schindler, D.; Kubbies, M.; Priest, R.E.; Hoehn, H.; Rabinovitch, P.S. (1988)

The phytohemagglutinin response of human peripheral blood lymphocytes as a function of donor age: A re-examination using BrdU-Hoechst flow cytometry. *Mech Ageing Dev* **44**: 253-263.

Schindler, D.; Hoehn, H. (1999)

Flow cytometric testing for syndromes with chromosomal instability, aplastic anaemia and related haematological disorders. R.-D. Wegner: Diagnostic Cytogenetics; Springer Verlag, Berlin Heidelberg: 269-281

Schroeder, T.M.; Kurth, R. (1971)

Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. Blood **37**: 96-112.

Schwartzman, J.S.; Sole, D.; Naspitz, C.K. (1990)

Ataxia-teleangiectasia: A clinical and laboratory review study of 14 cases. Allergol Immunopathol Madr **18**: 105-111.

Seemanova, E.; Passarge, E.; Beneskova, D.; Houstek, J.; Kasal, P.; Sevcikova, M. (1985)

Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: A new autosomal recessive disorder. Am J Med Genet **20**: 639-648.

Seyschab H. (1992)

Exogen und genetisch bedingte Störungen des Zellzyklus: Durchflußzytometrische Untersuchungen an menschlichen Blutlymphozyten. Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg

Seyschab, H.; Schindler, D.; Friedl, R.; Barbi, G.; Boltshauser, E.; Fryns, J.P.; Hanefeld, F.; Korinthenberg, R.; Krageloh-Mann, I.; Scheres, J.M. et al. (1992)

Simultaneous measurement, using flow cytometry, of radiosensitivity and defective mitogen response in ataxia teleangiectasia and related syndromes. Eur J Pediatr **151**: 756-760.

Seyschab, H.; Bretzel, G.; Friedl, R.; Schindler, D.; Sun, Y; Hoehn, H. (1994)

Modulation of the spontaneous G2 phase blockage in Fanconi anemia cells by caffeine: differences to cells arrested by x-irradiation. Mutat Res **308**: 149-57

Seyschab, H.; Friedl, R.; Sun, Y.; Schindler, D.; Hoehn, H.; Hentze, S.; Schroeder-Kurth, T. (1995)

Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* **85**, 2233-2237.

Shaham, M.; Becker, Y.; Lerer, I.; Voss, R. (1983)

Increased level of bleomycin-induced chromosome breakage in ataxia teleangiectasia skin fibroblasts. *Cancer Res* **43**: 4244-4247.

Smith, J.A.; Martin, L. (1973)

Do cells cycle? *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 1263.

Strathdee, C.A.; Gavish, H.; Shannon, W. and Buchwald, M. (1992)

Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* **356**: 763-767.

Swift, M.R.; Hirschhorn, K. (1966)

Fanconi's anemia: Inherited susceptibility to chromosome breakage in various tissues. *Ann Intern Med* **65**: 496-503.

Taalman, R.D.; Hustinx, T.W.; Weemaes, C.M.; Seemanova, E.; Schmidt, A.; Passarge, E.; Scheres, J.M. (1989)

Further delineation of the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* **32**: 425-431.

Taylor, A.M.R.; Harnden, D.G.; Arlett, C.F.; Harcourt, S.A.; Lehmann, A.R.; Stevens, S.; Bridges, B.A. (1975)

Ataxia-teleangiectasia: A human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* **258**: 427-429.

Taylor, A.M.R.; Metcalfe, J.A.; Oxford, J.M.; Harnden, D.G. (1976)

Is chromatid-type damage in ataxia teleangiectasia after irradiation at G0 a consequence of defective repair? *Nature* **260**: 441-443.

Taylor, A.M.R.; Rorney, C.M.; Campbell, J.B. (1979)

Unusual sensitivity of ataxia teleangiectasia cells to bleomycin. *Cancer Res* **39**: 1046-1050.

Taylor, A.M.R.; Oxford, J.M.; Metcalfe, J.A. (1981)

Spontaneous cytogenetic abnormalities in lymphocytes from thirteen patients with ataxia teleangiectasia. *Int J Cancer* **27**: 311-319.

Vogelstein, B.; Fearon, E.R.; Kern, S.Z.; Hamilton, S.R.; Preisinger, A.C.; Nakamura, Y.; White, R. (1989)

Allelotype of colorectal carcinoma. *Science* **244**: 207.

Waisfisz, Q.; Morgan, N.V.; Savino, M.; de Winter, J.P.; van Berkel, C.G.; Hoatlin, M.E.; Ianzano, L.; Gibson, R.A.; Arwert, F.; Savoia, A.; Mathew, C.G.; Pronk, J.C.; Joenje, H. (1999)

Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi anemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet* **22**: 379-383.

Young, N.S.; Alter, B.P. (1994)

Aplastic anemia, acquired and inherited. Philadelphia, Saunders.

Young, N.S.; Speck, B. (1984)

Antithymocyte and antilymphocyte globulins: Clinical trials and mechanism of action. In: Young NS, Levine AS, Humphries RK (eds) *Aplastic anemia: Stem cell biology and advances in treatment*. Alan R Liss, New York 221-226.

7 Abkürzungsverzeichnis

AA	=	Aplastische Anämie
AS	=	autologes Serum
AT	=	Ataxia Teleangiectasia
CON	=	Patient/Proband der Vergleichsgruppe
BrdU	=	5-Bromo-2'-desoryuridin
DEB	=	Diepoxybutan
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
EB	=	Ethidiumbromid
FA	=	Fanconi Anämie
GF	=	Wachstumsfraktion
HBSS	=	Hank's Balanced Salt Solution
M	=	männliche Patienten/Probanden
MMC	=	Mitomycin C
MW	=	Mittelwert
p	=	Signifikanz
PHA	=	Phytohämagglutinin
R ²	=	Bestimmtheitsmaß
RT	=	Raumtemperatur
SD	=	Standardabweichung
$\sum G2/GF$	=	Summe der G2-Phasen geteilt durch die Wachstumsfraktion
W	=	weibliche Patienten/Probanden
ZKF	=	Zellkulturflaschen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Holger Höhn für die Überlassung des Themas, die motivierende Förderung dieser Arbeit und seine unerschöpfliche Geduld.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Tiemo Grimm für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Bettina Christiane Karin Wuttke
Geburtsdatum, -ort 20.11.1972, Bonn
Eltern Dr. med. Ingeborg Wuttke-Görnandt und
Prof. Dr. med. Hermann Wuttke
Nationalität deutsch

Schulbildung 08/1979-06/1980 Grundschule, Siegburg
08/1980-06/1983 Grundschule, Saarlouis
08/1983-06/1993 Gymnasium am Stadtgarten, Saarlouis
06/1993 Abitur

Hochschulausbildung 05/1994-05/2001 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/1996 Ärztliche Vorprüfung
08/1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr 05/2000-06/2000 Chirurgie: Raigmore Hospital,
Inverness, U.K.
07/2000-08/2000 Chirurgie: Mater Hospital,
Belfast, U.K.
9/2000-11/2000 Radiologie: Institut Röntgendiagnostik,
Universität Würzburg
12/2000-03/2001 Innere Medizin: Luzerner Höhenklinik,
Montana, Schweiz

Klinische Tätigkeit 11/2001 – 10/2002
II. Medizinische Klinik des Klinikums Rechts der Isar der
Technischen Universität München
Seit 11/2002
Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der
Universität Essen

Düsseldorf, Januar 2004