

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

**Zytogenetischer und durchflusszytometrischer Nachweis von
Mosaizismus bei Fanconi Anämie**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Patrick Stimmler
aus Horb am Neckar**

Würzburg, März 2004

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn
Koreferent: Prof. Dr. med. D. Schindler
Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 2004

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1.1 <u>Das Krankheitsbild der Fanconi Anämie</u>	1
1.1.1 Klinische Manifestation der Fanconi Anämie	1
1.1.2 Diagnose und Genetik der Fanconi Anämie	3
1.2 <u>Fragestellung</u>	6
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 <u>Zytogenetische Chromosomenbruchanalyse</u>	7
2.1.1 Chromosomenpräparation aus Lymphozytenkulturen	7
2.1.2 Herstellen von Chromosomenpräparaten	9
2.1.3 Mikroskopische Erfassung der Chromosomenveränderungen	9
2.1.4 Einteilung der Aberrationen	10
2.1.5 Zusammenfassung der Bruchereignisse	12
2.1.6 Beispiele für Bruchereignisse (eigene Bilder)	12
2.2 <u>BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Durchflusszytometrie</u>	14
2.2.1 Lymphozytenisolation und Zellkultur	14
2.2.2 Der BrdU/Hoechst-Versuchsansatz	16
2.2.3 Fluoreszenzfarbstoffe	17
2.2.4 Messung der Zellproben am ICP-22	19
2.2.5 Analyse der Datenfiles	22

3. ERGEBNISSE	24
3.1 Proband 1	25
3.2 Proband 2	31
3.3 Proband 3	37
3.4 Proband 4	43
3.5 Proband 5	49
3.6 Proband 6	55
3.7 Proband 7	61
4. DISKUSSION	67
4.1 Diskussion der Ergebnisse der zytogenetischen Chromosomenbruchanalyse	67
4.2 Mosaizismus bei Fanconi Anämie	69
4.3 Intragenes Crossover und Genkonversion als Ursache der Mosaikbildung bei Fanconi Anämie	71
4.4 Vergleich von Chromosomenbruchanalyse und BrdU/Hoechst-Durchflusszytometrie	75
4.5 Klinische Relevanz	77
5. ZUSAMMENFASSUNG	79
6. LITERATURVERZEICHNIS	80

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Das Krankheitsbild der Fanconi Anämie

1.1.1 Klinische Manifestation der Fanconi Anämie

Die Fanconi Anämie (FA) ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des Kindesalters, die erstmalig im Jahre 1927 durch den Schweizer Pädiater Guido Fanconi (1892-1979) beschrieben wurde. Sie gehört wie die Ataxia teleangiectasia, das Bloom-Syndrom und das Werner-Syndrom zu den so genannten Chromosomenbruchsyndromen. Diese Gruppe von Erkrankungen zeichnet sich durch eine spontane, chromosomale Instabilität in den somatischen Zellen aus. Bei der Fanconi Anämie kann durch den Einfluss von alkylierenden Substanzen wie Diepoxybutan (DEB) oder Mitomycin C (MMC) die Chromosomenbrüchigkeit verstärkt werden.

Das Krankheitsbild der Fanconi Anämie kann neben der Panzytopenie und den damit verbundenen Folgeerscheinungen eine Vielzahl von Fehlbildungen aufweisen. Diese können verschiedene Organsysteme betreffen. Die Kombination sowie die Ausprägung der Fehlbildungen und somit der Schweregrad der Erkrankung sind stark variabel. Bei einem Drittel der Betroffenen besteht ausschließlich eine aplastische Anämie.

Neben den hämatologischen Symptomen treten in 69-79% der Fälle Hautveränderungen auf. Diese stellen somit die häufigste Organmanifestation der Fanconi Anämie dar und erscheinen meist in Form von Hyperpigmentierungen. Diese so genannten Café-au-lait-Flecken finden sich vor allem am Rumpf, im Nacken sowie in Leisten und Achselhöhlen. Es können jedoch auch Hypopigmentierungen auftreten (De-Kerviler et al., 2000).

An dritter Stelle stehen Skelettdeformierungen, insbesondere der oberen Extremitäten. Dabei kommt es häufig zur Hypo- oder Aplasie des Radius und des Daumens. Seltener sind Hüftgelenke, Wirbelsäule (Spina bifida) oder Rippen betroffen. In bis zu 60% der Fälle zeigt sich eine Wachstumsretardierung. Die betroffenen Kinder liegen meist unter der 3%-Perzentile.

Im Bereich des Urogenitalsystems werden hypo- und aplastische Nierenfehlbildungen sowie ektopische oder Beckennierenanlagen beschrieben. Störungen der harnableitenden Organe wie vesikourethraler Reflux oder Hypo- bzw. Epispadie sind eher selten. Hypogonadismus tritt bei männlichen Patienten als Kryptorchismus oder Hodenhypoplasie, bei weiblichen Patienten als hypoplastische Ovarien, infantiler Uterus oder primäre Amenorrhoe in Erscheinung (Alter, 1993). Männer sind diesbezüglich häufiger betroffen als Frauen.

Des Weiteren kann der Gastrointestinaltrakt in Form von Atresien im Bereich des Ösophagus, Duodenums und Jejunums sowie in Form von tracheo-ösophagealen Fisteln betroffen sein (Young und Alter, 1994).

Das kardiovaskuläre System ist oftmals durch ein Fehlen oder eine Dislokation der Radialarterie beteiligt. Seltener kommt es zu Herzfehlbildungen wie z.B. Ventrikelseptumdefekten, Pulmonalstenosen oder einem persistierenden Ductus arteriosus (Smith et al., 1989).

Mikrozephalie ist mit 37% die häufigste Fehlbildung im Bereich des zentralen Nervensystems (Glanz et al., 1982). Weitaus seltener treten ein Hydrocephalus oder vergrößerte Hirnventrikel auf (Giampetro et al., 1993).

Hämatologische Veränderungen sind, wie bereits erwähnt, die Hauptsymptome der Fanconi Anämie. Während zum Zeitpunkt der Geburt meist noch ein unauffälliges Blutbild vorliegt, tritt häufig im Alter zwischen fünf und zehn Jahren eine Panzytopenie auf (Butturini et al., 1994). Die erste Veränderung ist oftmals eine Thrombozytopenie, die sich klinisch durch Petechien sowie Nasen- und Zahnfleischbluten manifestiert. Meist treten im weiteren Verlauf eine Granulozytopenie mit erhöhter Infektanfälligkeit sowie eine Anämie, die sich in Schwäche, Blässe und Müdigkeit äußert, auf. Dieser so genannten aplastischen Phase folgen oft ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) und eine akute myeloische Leukämie (AML). Neben der Leukämie weisen FA-Patienten ein erhöhtes Risiko auf, andere Neoplasien wie unter anderem Plattenepithelcarcinome zu entwickeln.

1.1.2 Diagnose und Genetik der Fanconi Anämie

Da das Auftreten bzw. die Ausprägung der Fehlbildungen bei FA-Patienten sehr heterogen ist, kann die Erkrankung nicht zuverlässig aufgrund ihres klinischen Bildes diagnostiziert werden. Zur Diagnosesicherung dient zum einen der Nachweis einer chromosomalen Instabilität und einer erhöhten Überempfindlichkeit somatischer Zellen gegenüber so genannten „DNA-Crosslinkern“, wie z.B. MMC und DEB (Auerbach et al., 1989). Die chromosomale Instabilität manifestiert sich in gehäuften Chromatidläsionen, so genannten „breaks“ und „gaps“ und Rearrangements der Bruchstücke zu diversen Multiradialfiguren mit mehreren „Armen“ und atypischen Längenverhältnissen der Chromatiden. Diese Untersuchungen werden meist an Lymphozyten durchgeführt, sind jedoch auch an fetalen Zellen, die durch Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie gewonnen werden, möglich (Auerbach et al., 1985).

Zum anderen erfolgt die Diagnosesicherung durch Zellzyklusanalyse mittels BrdU/Hoechst-Durchflusszytometrie. Bei FA-Patienten zeigt sich hierbei eine Arretierung der PHA-stimulierten Lymphozyten in der G2-Phase. Dieser Effekt kann durch die Zugabe von MMC bzw. DEB noch verstärkt werden (Poot et al., 1994; Schindler et al., 1985). Die Durchflusszytometrie ist ein sehr sensitives Diagnostikum. Beschränkt anwendbar ist diese Methode allerdings bei Patienten, bei denen es bereits zum Auftreten einer Myelodysplasie oder Leukämie gekommen ist. Die leukämischen Zellen zeigen nicht mehr die ansonsten für FA-Zellen typische Zellzyklusverteilung (Berger et al., 1993). Insgesamt stellt derzeit die Kombination beider Methoden (Zellzyklusanalyse und zytogenetische Chromosomenbruchanalyse) das optimale Verfahren zur Diagnosestellung der Fanconi Anämie dar (Seyschab et al., 1995).

Nach gegenwärtigem Stand der Forschung sind mindestens acht Komplementationsgruppen (FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G) bekannt. Dies bedeutet, dass es mindestens acht verschiedene Gene geben muss, deren Mutation zum Krankheitsbild der Fanconi Anämie führt. Eine weitere vermutete Komplementationsgruppe, FA-H, wurde nachträglich der Gruppe FA-A zugeordnet (Joenje et al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Komplementationsgruppen und dem Schweregrad bzw. dem Verlauf der Erkrankung besteht (Faivre et al., 2000).

Bisher konnten acht der FA-Gene kloniert werden. Mutationen im Bereich des FANCA-Gens sind am häufigsten. Ungefähr zwei Drittel der FA-Patienten gehören der Komplementationsgruppe A an, 25% den Gruppen C und G. Die übrigen Patienten verteilen sich auf die weiteren Gruppen.

Das FANCC-Gen war das erste Gen, das kloniert wurde (Strathdee et al., 1992). Verglichen mit dem FANCA-Gen ist das Mutationsspektrum des FANCC-Gens wesentlich geringer. Das FANCA-Gen, das 1996 kloniert wur-

de, ist eines der größten FA-Gene. Es gibt über hundert beschriebene Mutationen des FANCA-Gens (Wijker et al., 1999). Eine Vielzahl dieser Mutationen kommt jedoch nur bei einzelnen Patienten vor. Nur wenige werden in mehreren Familien gefunden. Bei den meisten Patienten handelt es sich um so genannte Compound-Heterozygote mit zwei verschiedenen mutierten FANCA-Allelen.

Die genaue Funktion der FA-Proteine ist bisher nicht spezifiziert. Sie scheinen jedoch eine Rolle in der DNA-Reparatur zu spielen, was im Falle des FANCC-Proteins ungewöhnlich erscheint, da nachgewiesen werden konnte, dass es sich um ein zytoplasmatisches Protein handelt. Es wird allerdings vermutet, dass das FANCC-Protein nach einer mutagenen Belastung oder in einer bestimmten Zellzyklus-Phase zum Zellkern transportiert wird (Digweed, 1999). Des Weiteren scheinen die FA-Proteine an der Kontrolle des Zellzyklus und Zellwachstums bzw. der Vermeidung von DNA-Läsionen durch Sauerstoffradikale beteiligt zu sein.

Der Übergang G2/M-Phase ist bei FA-Patienten verlängert (Schindler et al., 1985). Dies wird durch die Exposition gegenüber „Crosslinkers“ oder hohen Sauerstoffkonzentrationen noch verstärkt (Hoehn et al., 1989). Der Übergang G2/M-Phase wird als Kontrollstelle für DNA-Schäden und deren Korrektur vor Fortsetzung der Mitose gesehen. Diese Beobachtung kann eine Erklärung dafür sein, dass FA-Zellen nicht in der Lage sind, DNA-Schäden zu korrigieren und deshalb in der G2-Phase arretieren (Tischkowitz und Hodgson, 2003).

1.2 Fragestellung

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass genetische Instabilität nicht nur nachteilige Effekte, sondern auch Vorteile für betroffene Patienten haben kann. Genetische Instabilität schafft die Möglichkeit zur Korrektur eines genetischen Fehlers, indem eine Reversion oder Kompensation der ursprünglichen Mutation stattfindet. Kommt es z.B. zu einer Korrektur im Bereich des hämatopoetischen Systems von FA-Patienten, so entsteht ein Zellklon korrigierter Blutzellen. Dies führt dazu, dass bei der Diagnostik ein bimodales Verteilungsmuster auffällt und man bei der Untersuchung von z.B. Lymphozyten von FA-Patienten eine Mischung aus erkrankten und gesunden Zellen findet. In diesem Fall spricht man von einer so genannten Mosaik-Konstellation (Mosaizismus). Das Vorhandensein einer Mosaik-Konstellation ist ein Hinweis auf eine Selbstkorrektur der Mutation, indem die erkrankten Zellen nach und nach durch korrigierte Zellen ersetzt werden können.

Gegenstand dieser Arbeit ist es, bei ausgewählten FA-Patienten eine solche Mosaik-Konstellation mittels zytogenetischer Chromosomenbruchanalyse nachzuweisen und diese Ergebnisse mit den Daten der Zellzyklusanalyse zu vergleichen. Dabei soll untersucht werden, wie sich Zellen von FA-Patienten mit einer Mosaik-Konstellation in der Durchflusszytometrie verhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Zytogenetische Chromosomenbruchanalyse

2.1.1 Chromosomenpräparation aus Lymphozytenkulturen

Zur Herstellung eines Chromosomenpräparates werden Zellen benötigt, die sich in Teilung befinden. Möglich ist dies mit Knochenmarkszellen oder mit somatischen Zellen (hier: periphere Blutlymphozyten), die in vitro zur Teilung angeregt werden müssen (z.B. mit Phytohämagglutinin, einem Extrakt aus Bohnensamen).

Um eine Aussage über die spontane und die induzierte Chromosomenbrüchigkeit machen zu können, wurden von jedem Patienten drei Kulturen mit jeweils verschiedenen Konzentrationen Mitomycin C (0, 50 und 100 η g MMC/ml) angefertigt. Aus peripher-venös entnommenem, heparinisiertem Vollblut (EDTA oder Citrat sind ungeeignet, da durch den verursachten Calciumentzug das Zellwachstum verhindert wird) wurden die Lymphozyten wie folgt gewonnen.

Ansetzen der Blutkulturen:

RPMI-Komplett-Medium: - 200 ml RPMI
- 38 ml FCS
- 1 ml Penicillin/Streptomycin

10 ml RPMI-Komplett-Medium wurden in eine 50ml-Kulturflasche gegeben. Dazu kamen 0,8 ml Vollblut, 0,2 ml PHA und in jeweils eine der drei Kulturen jedes Patienten 0 η g, 550 η g und 1100 η g MMC. Die Kulturflasche wurde

fest verschlossen, durch vorsichtiges Schütteln durchmischt und für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Abbruch der Blutkulturen

In jede Kulturflasche wurde 80 µl Colcemid gegeben, ein Mitosegift, das die Ausbildung des Spindelapparates verhindert und dadurch die mitotische Zellteilung in der Metaphase arretiert.

Nach 50 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Blutkulturen in Zentrifugenröhrchen überführt, bei 1400 rpm 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und schließlich das Pellet in ca. 10 ml 0,075 M KCL resuspendiert. Durch Behandlung mit dieser hypotonen Lösung (KCL) wurde den Zellen ein "osmotischer Schock" versetzt, was zum Zerplatzen der Zellmembran der Metaphasezellen und zum Aufquellen des Zytoplasmas führte.

Nach 7-10 Minuten Inkubation bei 37°C und nochmaliger 8 minütiger Zentrifugation (1400 rpm) konnte das durch Absaugen des Überstandes gewonnene Pellet in eiskaltem Fixativ (Methanol-Essigsäure-Gemisch im Verhältnis 3:1) resuspendiert und über Nacht im Kühlschrank fixiert werden.

Waschen der Chromosomen

Zum Waschen der Chromosomen wurden die Präparate 6 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem Fixativ resuspendiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis der Überstand völlig klar erschien. Das gereinigte Präparat konnte in etwas Fixativ gut verschlossen für Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.1.2 Herstellen von Chromosomenpräparaten

Vor dem Auftropfen des Zellmaterials wurden die Objektträger für mehrere Stunden in eine Küvette mit konzentrierter Chromschwefelsäure gestellt, in einer neuen Küvette anschließend ca. 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült, dann nochmals wenige Minuten mit destilliertem Wasser gespült und kühl gestellt.

Das Zellmaterial wurde in so viel Fixativ suspendiert und mit einer Pasteurpipette vorsichtig aufgewirbelt, bis eine leicht trübe Suspension entstand, von der dann auf mehrere gereinigte Objektträger jeweils zwei bis drei Tropfen aufgetropft werden konnte. Das Auftropfen aus 30 bis 40 cm Höhe auf den mit der Pinzette waagrecht gehaltenen Objektträger führt zu einer besseren Aufspreizung der Chromosomen.

Das luftgetrocknete Präparat wurde dann in einer Küvette mit 5%-iger Giemsa-Lösung (5 ml filtrierte Giemsa-Stammlösung plus 100 ml 0,025 M Phosphatpuffer) für 5 Minuten gefärbt und mit destilliertem Wasser gespült.

2.1.3 Mikroskopische Erfassung der Chromosomenveränderungen

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Photomikroskop III der Firma Zeiss. Um sich einen Überblick zu verschaffen, wurde das Präparat zuerst in einer kleineren Vergrößerung (10- und 40-fach) angeschaut, für die Auswertung einer einzelnen Metaphase dann das 100-fach Ölimmersionsobjektiv verwendet.

Zuerst wurde kontrolliert, ob alle 46 Chromosomen vorhanden sind. Dabei kam es nicht auf die Anzahl der Chromosomenbruchstücke, sondern auf die Anzahl der Zentromere an. Ausgewertet wurden nur Metaphasen, die alle 46 Chromosomen aufwiesen oder so stark zerstört waren, dass eine Zählung und Erfassung der einzelnen Bruchereignisse nicht mehr möglich war.

Nun wurde jedes einzelne Chromosom auf Aberrationen untersucht und versucht in die Gruppe A-G einzuordnen, so dass auch Chromosomenumbauten und verloren gegangene azentrische Fragmente erfasst werden konnten. Die Bruchereignisse sowie die Koordinaten der einzelnen Metaphasen auf einem Objektträger wurden in einem Auswertungsprotokoll notiert. Zu Dokumentationszwecken wurden einzelne Metaphasen fotografiert.

Bei jedem Probanden wurden pro MMC-Konzentration jeweils 100 Metaphasen ausgewertet. In machen Fälle war es jedoch nicht möglich nach Auswertung aller Objektträger die Anzahl von 100 Metaphasen zu erreichen. Dies lag entweder daran, dass nicht ausreichend Zellmaterial gewachsen war, oder dass nur wenig auswertbare Metaphasen vorhanden waren. Dies war der Fall bei Proband 1 bei 50 und 100 ng/ml MMC (lediglich 16, bzw. 19 auswertbare Metaphasen), bei Proband 3 bei 100 ng/ml MMC (66 Metaphasen) und bei Proband 4 bei einer Konzentration von 100 ng/ml MMC (59 ausgewertete Metaphasen). In diesen Fällen wurde auf 100% aufgerechnet. In einem Fall, bei Proband 2, war bei einer Konzentration von 100 ng/ml MMC überhaupt keine Auswertung möglich.

2.1.4 Einteilung der Aberrationen

Gap: Die durchgehende Färbung des Chromatids ist unterbrochen, ohne dass es zu einer Dislokation des Bruchstückes kommt.

Isochromatidgap: Die durchgehende Färbung beider Chromatiden ist unterbrochen, ohne dass es zu einer Dislokation der Bruchstücke kommt.

Chromatidbruch: Eines der Chromatiden weist einen Bruch auf. Das Bruchstück liegt jedoch so nahe am Restchromosom, dass es diesem zugeordnet werden kann.

Isochromatidbruch: Beide Chromatiden gebrochen. Die Bruchstücke liegen jedoch so nahe am Restchromosom, dass sie diesem zugeordnet werden können.

Azentrisches Fragment: Durch ein Bruchereignis geht das Zentromer verloren und es entsteht ein azentrisches Fragment.

Chromosomenumbauten: Durch Fusion verschiedener Chromosomen nach einem Bruchereignis entstehen Rearrangements. Diese unterscheiden sich in Form (Bänderungsmuster) und Länge ihrer Chromatiden von normalen Chromosomen. Sie können wie folgend beschrieben werden:

- a) Dizentrisches Chromosom: Nach zwei Bruchereignissen an zwei Chromosomen fusionieren diese. Es entsteht somit ein Chromosom mit zwei Zentromeren
- b) Triradiale und Quadriradiale, bzw. Multiradiale Rearrangements: Mindestens zwei Bruchereignisse an zwei Chromosomen und anschließendem Austausch bzw. Fusion der Bruchstücke führt zur Ausbildung von multiradialen Figuren. Diese Rearrangements weisen dann mehrere „Arme“ auf.
- c) Ringchromosom: Nach zwei Bruchereignissen an den Telomeren eines Chromosoms und anschließender Fusion entsteht ein monozentrisches Ringchromosom.
- d) Akrozentrisches Riesenchromosom: Durch Anlagerung eines azentrischen Fragmentes an ein Chromosom an dessen Telomer ebenfalls ein Bruchereignis stattgefunden hat, führt zur Bildung eines Riesenchromosoms.

- e) Trümmerfelder: Metaphasen, bei denen eine Auflistung der einzelnen Aberrationen aufgrund der Vielzahl von Bruchereignissen nicht möglich war, wurden vom Autor so benannt.

2.1.5 Zusammenfassung der Bruchereignisse

Zusammenfassend wurden die aufgetretenen Bruchereignisse einer Metaphase gezählt. So konnte allen ausgewerteten Metaphasen ein Wert von 0 bis ≥ 10 zugeordnet werden.

2.1.6 Beispiele für Bruchereignisse (eigene Bilder)

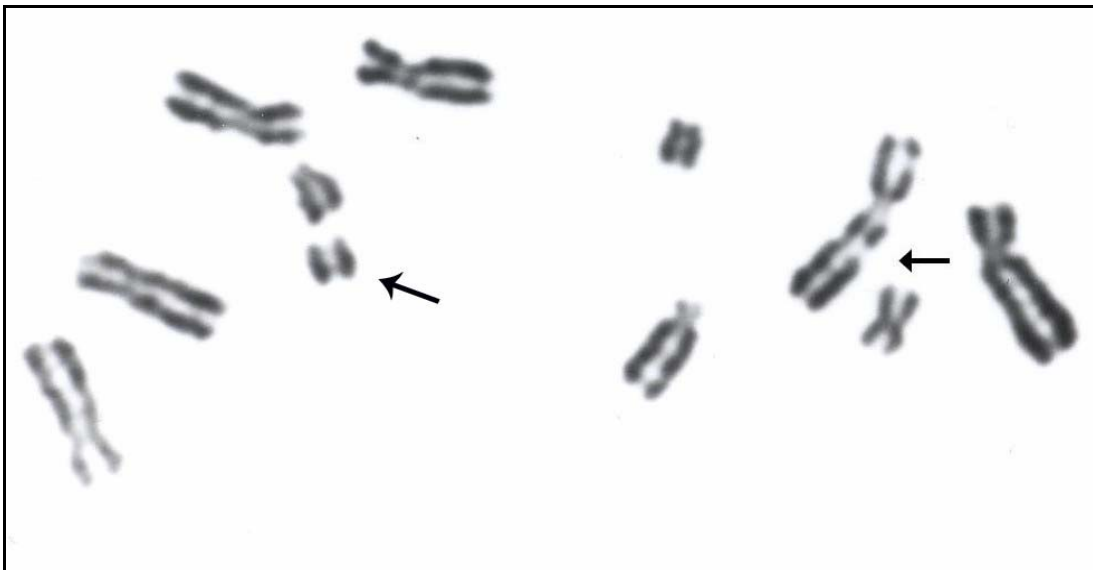


Abb. 2.1 Beispiel für ein Chromosom mit zwei Gaps (rechter Pfeil) und ein azentrischen Fragment (linker Pfeil)

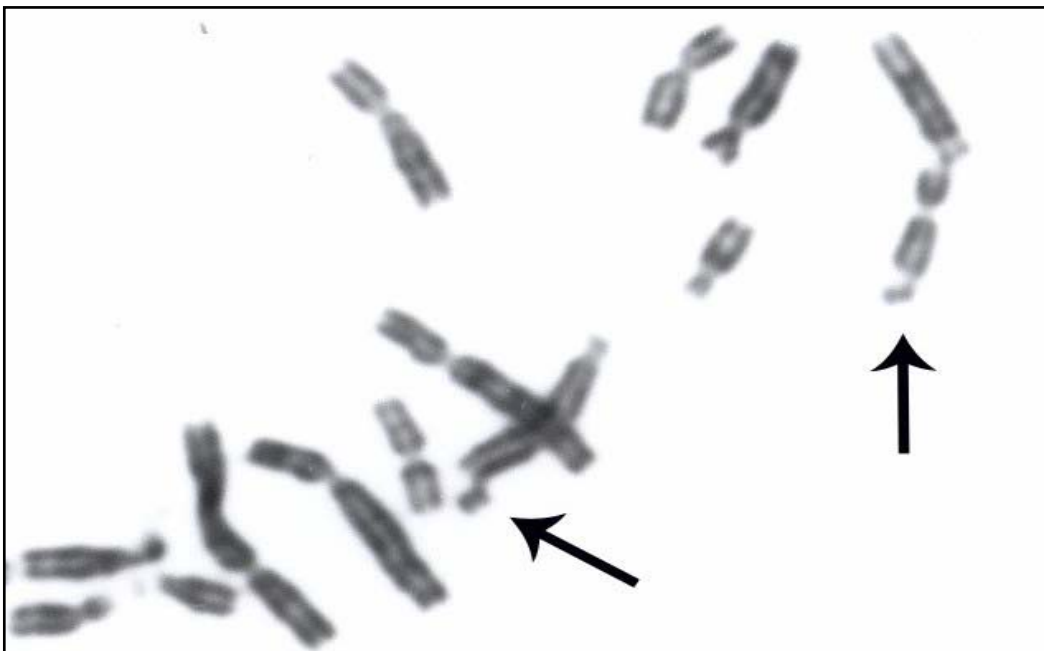


Abb. 2.2 Beispiel für zwei Chromatidbrüche

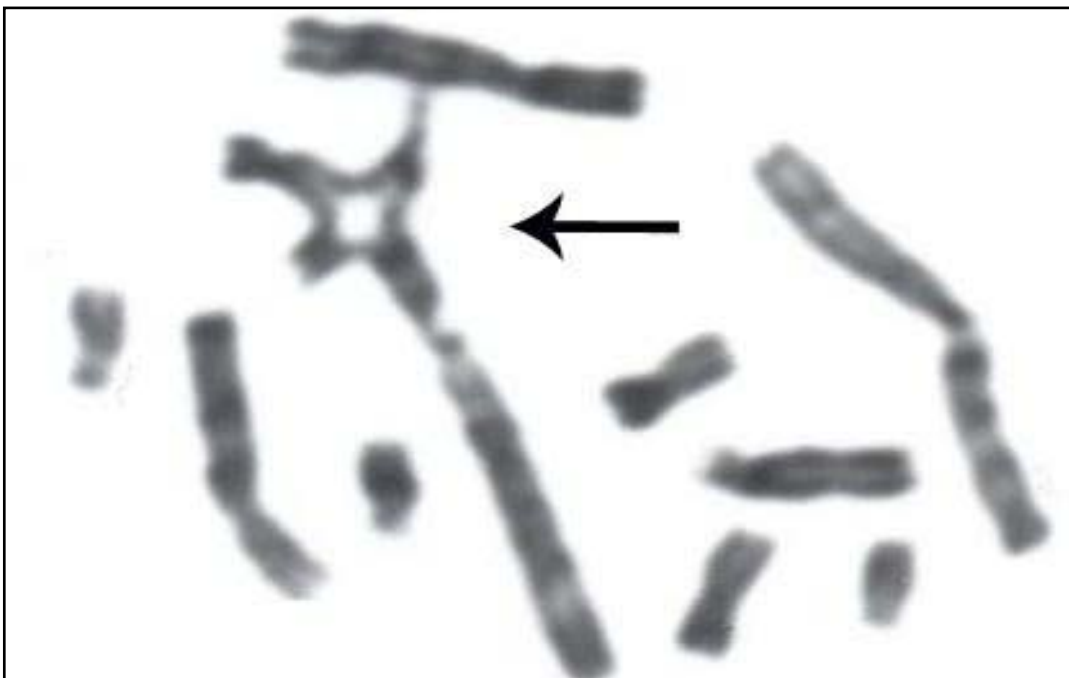


Abb. 2.3 Beispiel für ein quadriradiales Rearrangement

2.2 BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Durchflusszytometrie

2.2.1 Lymphozytenisolation und Zellkultur

Ficoll-Isolation der Lymphozyten

Zur Isolation mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Hypaque-Technik werden pro Proband mindestens 3 ml peripher-venös entnommenes, heparinisiertes Vollblut benötigt.

Das Blut wurde in Falconröhrchen überführt und bei Raumtemperatur und 1200 rpm 10 Minuten zentrifugiert, um das Blutserum von den korpuskulären Bestandteilen zu trennen. Der Serumüberstand wurde abgenommen und steril aufbewahrt (autologes Serum) und durch dieselbe Menge HBSS ersetzt. Das Gemisch wurde nochmals 1:1 mit HBSS verdünnt, vorsichtig über 3 ml Ficoll-Lösung (in einem 15 ml Falconröhrchen) geschichtet und dann bei 4 °C und 2100 rpm 30 min zentrifugiert.

Die nun in einem weißlichen Ring angereicherten Lymphozyten wurden nach Abnahme des HBSS/Serum-Überstandes mit einer Pasteurpipette aufgenommen, in 10 ml HBSS resuspendiert und bei 4 °C und 900 rpm 15 min zentrifugiert. Zum Waschen der Lymphozyten konnte dieser Schritt nochmals wiederholt werden.

Zellzählung

Nach der Isolation der Lymphozyten wurde die Anzahl der Zellen mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden drei Eppendorf-Cups mit einmal 10 µl Eisessig (1%), einmal 10 µl Trypanblaulösung (0,2%) und einmal wenige Mikroliter der Lymphozytensuspension vorbereitet. Aus dem letzten Eppendorf-Cup wurden 10 µl zum Eisessig pipettiert und gut

vermischt. Davon kamen 10 μl in das Cup mit Trypanblau und das Ganze nach erneutem Durchmischen auf die Zählkammer. Die Zählkammer ist so geeicht, dass die Zellzahl in fünf großen Kästchen der Zellzahl in 1 μl entspricht. Nach der Bestimmung der Zelldichte, wurde die Lymphozytensuspension auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt.

Zellkultur

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml (dies entspricht 0,5 ml der eingestellten Zellsuspension) in die Zellkulturflaschen eingesät. Das Zellkulturmedium hatte folgende Zusammensetzung:

- 3,560 ml RPMI-Komplett-Medium: - 150 ml RPMI 1640
- 37,5 ml FKS
- 1,8 ml Penicillin / Streptomycin
- 0,500 ml Zellsuspension (1×10^5 Zellen / ml)
- 0,050 ml autologes Serum (1%)
- 0,750 ml FCS (15%)
- 0,050 ml BrdU (10^{-4} M)
- 0,050 ml DC (10^{-4} M)
- 0,010 ml α TG (2×10^5 M)
- 0,0225 ml PHA (1,2 μg / ml)

Die Zellkulturflaschen wurden sorgfältig in Aluminiumfolie eingewickelt, um direktes Licht auf die Zellen zu vermeiden, da in die DNA inkorporiertes BrdU bei direkter Lichteinstrahlung zu Chromosomenbrüchen führen kann. Die Inkubationszeit bei 37,5 °C, 99% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ betrug 72 Stunden.

Ernten der Zellen

Die Ernte erfolgte im abgedunkelten Raum und unter Rotlicht, um direkte Lichteinstrahlung zu vermeiden. Die vorsichtig in ein Falconröhrchen pipetierten Zellen wurden 15 min bei 900 rpm zentrifugiert, das so erhaltene Zellpellet mit 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Messung bei -20 °C aufbewahrt.

Einfriermedium: - 100 ml RPMI 1640 (80%)
- 12,5 ml FCS (10%)
- 12,5 ml DMSO (10%)

2.2.2 BrdU / Hoechst-Versuchsansatz

Durch die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit des Thymidin-Basenanalogs 5-Bromo-2'-desoxyuridin, wird dieses während der S-Phase der semikonservativen DNA-Replikation anstelle von Thymidin in die DNA inkorporiert.

Gibt man das AT-spezifische Fluorochrom Hoechst 33258 hinzu, wird dessen Fluoreszenz durch das Bromatom des BrdU reduziert (engl.: quenching) und somit BrdU in der DNA nachgewiesen (Latt, 1973; Latt et al., 1975, Latt 1977). Durch diese Technik lassen sich proliferierende Zellen, welche BrdU einbauen, von nicht proliferierenden Zellen unterscheiden (Latt et al., 1977). Weiter lassen sich sogar Aussagen über die G1-, S-, und G2/M-Phasenverteilung über einen Zeitraum von mindestens drei Zellzyklen hinweg machen (Kubbies et al., 1985; Rabinovitch et al., 1988, Kubbies et al. 1989).

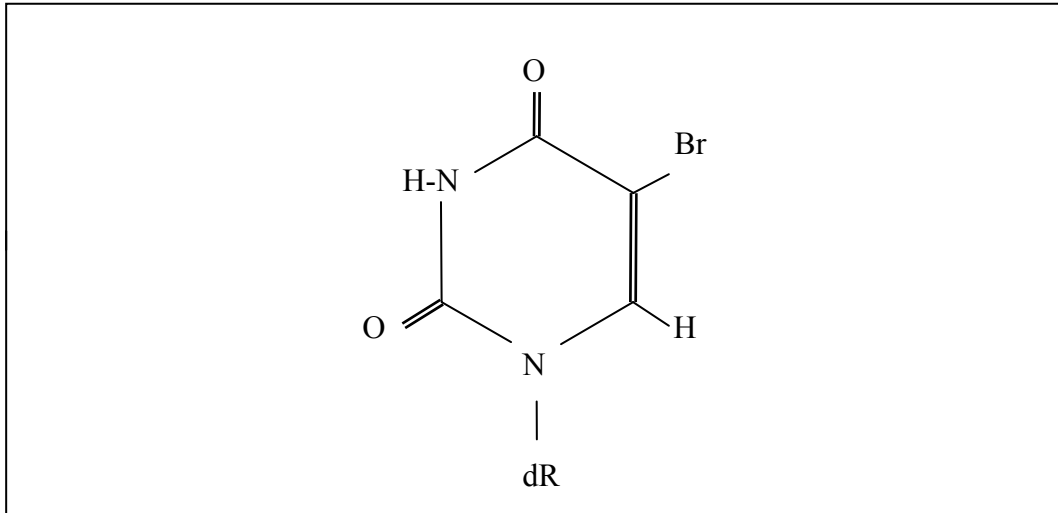


Abb. 2.1: 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU); dR: Desoxyribose

2.2.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Hoechst 33258

Die Bindungsstelle des Hoechst-33258-Fluorochroms, eine spezifische 3 bis 6 Basenpaare lange Sequenz, liegt in der "minor groove" der DNA-Helix. Dort erfolgt die nicht interkalierende Wasserstoffbrückenbindung zwischen Adenin-N₃- bzw. Thymin-O₂-Atomen der DNA-Bindungssequenz und den beiden NH-Gruppen der Bisbenzimidazole des Hoechst-Moleküls. Hydrophobe Wechselwirkungen und elektrostatische Anziehungskräfte stabilisieren zusätzlich den Hoechst-DNA-Komplex (Latt und Langlois, 1990; Harshman und Devan, 1985).

Das Absorptionsmaximum des freien Hoechst-Farbstoffes (bei pH 7) liegt etwa bei 340 nm, das des DNA-gebundenen Hoechst-Moleküls bei 365 nm. Die Emissionsmaxima liegen bei 500 nm und 470 nm, wobei die Fluores-

zenzintensität, die bei freiem Molekül nur sehr schwach ist, proportional zum AT-Gehalt der Bindungsregion zunimmt (Latt und Langlois, 1990).

Ethidiumbromid

Durch die zusätzliche Anwendung von Ethidiumbromid, einem kaum BrdU-sensitiven Fluorochrom, kann ein besseres Auflösungsvermögen erreicht werden. So lassen sich mit dieser nun zweidimensionalen Messung Zellen im zweiten und dritten Zyklus, die sich bei der 1D-Hoechst 33258-Messung weitgehend überlappen, gut unterscheiden (Kubbies und Rabinovitch, 1983; Kubbies et al., 1989; Rabinovitch, 1988).

Ethidiumbromid (EB) ist ein Phenanthidin-Derivat, das im Gegensatz zum Hoechst-Molekül kovalent, nicht basenspezifisch an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet. Durch ein Farbstoffmolekül werden jeweils fünf Nukleotide gebunden.

Das Absorptionsmaximum freien Ethidiumbromids beträgt 480 nm und verschiebt sich in gebundenem Zustand auf 520 nm, wobei auch die Fluoreszenzintensität deutlich ansteigt. Das Emissionsmaximum liegt bei > 600 nm. Angeregt wird Ethidiumbromid vor allem durch das emittierte Licht der Hoechst-Floureszenz, die ihrerseits durch eine Quecksilberhochdrucklampe angeregt wird. Somit wird Energie von Hoechst auf Ethidiumbromid übertragen ("energy transfere"). Das Ausmaß der EB-Fluoreszenzintensität ist somit von der Menge der Hoechst-Emission abhängig (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer).

Durch externe elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenem Farbstoffmolekül und negativ geladenen Phosphatresten können zusätzlich Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplexe entstehen, deren Fluoreszenz jedoch unbedeutend ist.

Mit Hilfe der Ethidiumbromidfärbung kann somit eine Aussage über den gesamten Nukleinsäuregehalt aller analysierten Zellen gemacht werden (Le Pecq und Paoletti, 1967; Latt und Langlois, 1990).

Färbung der Zellproben

- Färbepuffer:
- 10 ml Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4)
 - 10 ml NaCl (0,154 M)
 - 1 ml MgCl₂ (0,5 mM)
 - 1 ml CaCl₂ (1 mM)
 - 1 ml NP40 (0,1%)
 - 0,2 g BSA (0,2%)

Alle Färbeschritte wurden bei indirektem Licht durchgeführt, die Inkubation der Proben erfolgte bei 4°C im Dunkeln. Nachdem die Zellen im Wasserbad (Raumtemperatur) aufgetaut und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert worden sind, konnte das erhaltene Pellet in 1,2 µg/ml Hoechst 33258 Färbepuffer (4 x 10⁵ Zellen/ml) vorsichtig resuspendiert und für 15 min inkubiert werden. Anschließend wurde Ethidiumbromid Färbepuffer in einer Endkonzentration von 1,5 µg/ml zugegeben und nochmals für 15 min inkubiert. Die Färbung war bei 4 °C im Dunkeln für mehrere Stunden stabil.

2.2.4 Messung der Zellproben am ICP-22

Aufbau und Funktion des Durchflusszytometers

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte an einem Impulscytophotometer mit Quecksilberhochdrucklampe (ICP 22; Phywe AG, jetzt Ortho

Diagnostic Systems), das auf Überdrucksystem umgebaut war. Das System zur quantitativen Erfassung der fluoreszierenden DNA setzte sich zusammen aus:

- a) ICP-22 Durchflusszytometer mit Quecksilberhochdrucklampe HBO (Spektrum 300- 800 nm) und zwei Photomultipliern zur simultanen Messung der beiden emittierten Fluoreszenzen (blau und rot)
- b) Impulshöhenanalysator 2103
- c) Mikrocomputer PDP 11/23

Mittels einer Kapillare wurde die Zellsuspension aus dem Probenmessröhrchen angesaugt und durch einen in gleicher Richtung, um die Kapillare fließenden Hüllstrom aus destilliertem Wasser in der optischen Achse zentriert. So gelangte der 20 μm breite Zellstrom zur Messpore (Durchmesser: 200 μm). Aufgrund dieser hydrodynamischen Fokussierung durchliefen die Zellen mit einer Geschwindigkeit von etwa 3 m / sec einzeln, "perlschnurartig aufgereiht" den Ausgang der Messpore, der genau in der Tiefenschärfeebene des Objektivs liegt. In diesem Analysepunkt, der wichtigsten Stelle des gesamten Systems, wurden die Zellen im Bruchteil einer Sekunde durch den Lichtstrahl erfasst, analysiert und klassifiziert. Das Gerät musste mit Hilfe von doppelt gefärbten Hühnererythrozyten oder einem anderen Standard, wie z.B. unstimulierte, isolierte, mononukleäre Zellen, eingestellt werden.

Optisches System und Impulserzeugung

Mittels eines Linsensystems wurde von einer Quecksilberhochdrucklampe HBO 100 (nutzbares Spektrum 300-800 nm) erzeugtes Anregungslicht gebündelt, über einen Erregerfilter parallelisiert und durch Strahlenteilerspiegel in Richtung der Messkammer gebrochen.

Passierte eine angefärbte Zelle die Tiefenschärfeebene des Objektives, den Bereich maximaler Beleuchtungsintensität, wurden die zellulär gebundenen Fluorochrome entsprechend ihrer Absorptionswellenlänge angeregt und emittierten Fluoreszenz längerer Wellenlänge (Stoke'sches Gesetz). Bei der verwendeten Doppelfärbung (Hoechst 33258 und Ethidiumbromid) setzte sich das von einer Zelle ausgehende Fluoreszenzsignal dementsprechend aus verschiedenen Wellenlängenbereichen zusammen. Der Gesamtlichtimpuls beider Fluorochrome wurde im Durchflusszytometer über mehrere Strahlenteilerkanten und Sperrfilter auf die Photokathoden zweier Photomultiplier übertragen. Dabei wurden die beiden unterschiedlichen Fluoreszenzsignale getrennt aber simultan aufgezeichnet.

Die verwendete Filterkombination bestand aus:

- | | | |
|---------------------|----------------------|-------------------------------|
| a) Anregungsfilter: | Farbteiler FT 450 | (50% Transmission 450 nm) |
| | UV-Glasfilter UG1 | (50% Transmission 350 nm) |
| | Buntglasfilter BG 38 | (50% Transmission 380 nm) |
| b) Sperrfilter: | Farbteiler FT 510 | (50% Transmission 490 nm) |
| | Bandpass K 45 | (50% Transmission 438-485 nm) |
| c) Spiegel: | Bandpass K 65 | (50% Transmission 620-680 nm) |

Pulsverarbeitung und Datenspeicherung

Die im Photomultiplier erzeugten Spannungssignale wurden nach Verstärkung dem Analog-Digital-Umwandler im Impulshöhenanalysator mit Peakintegrator zugeführt. Die von jeder Zelle gleichzeitig eingehenden Signale wurden von einem nachgeschalteten Vielkanalanalysator ihrer Intensität nach in fortlaufend nummerierte Kanäle geordnet, wobei die Höhe dem Fluoroch-

romgehalt und damit der DNA-Menge der jeweiligen Zelle entsprach. Höhere Impulse wurden einer entsprechend größeren Kanalzahl zugewiesen, gleich hohe Signalkombinationen im gleichen Kanal aufaddiert.

Die im Mikrocomputer PDP 11/23 aufgenommenen Datenfiles wurden mit Hilfe des Übertragungsprogrammes "PCL" (P.S. Rabinovitch, Universität Washington, Seattle, WA, USA & R. Friedl, Universität Würzburg) auf einen IBM-kompatiblen PC übertragen.

2.2.5 Analyse der Datenfiles

MULTI2D:

Die Analyse der zweidimensionalen Datenfiles erfolgte mit Hilfe des Softwareprogrammes Multi2D (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA). Jeder einzelne Zellzyklus konnte eingerahmt und auf einer zu dieser zweidimensionalen Region parallelen Achse projiziert (Abbildung 2.2) werden.

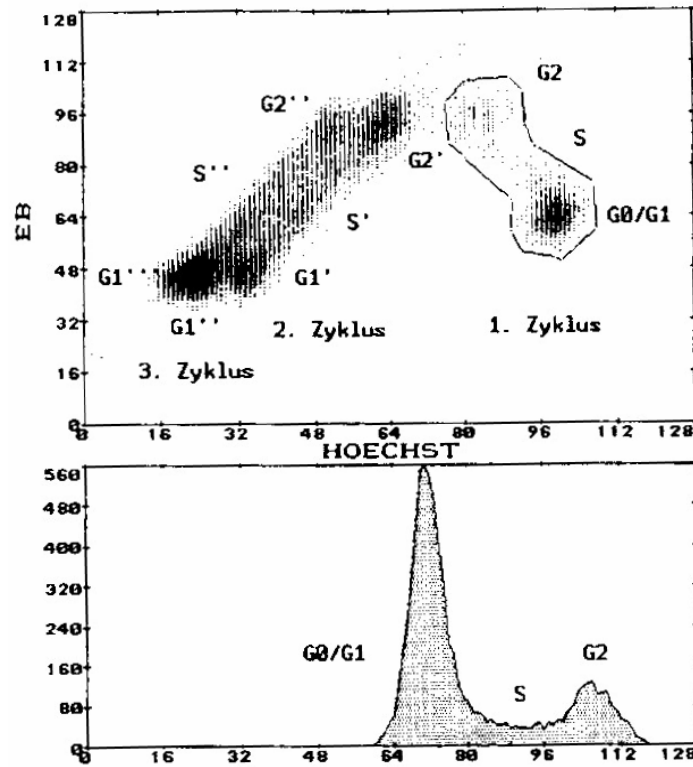


Abb. 2.2: Programm „Multi2D“. Das Histogramm zeigt eine Lymphozytenkultur nach 72 Stunden Inkubation mit 3 komplett durchlaufenen Zellzyklen und begunnenem vierten Zellzyklus. Der erste Zellzyklus wurde eingerahmt und als eindimensionales DNA-Verteilungshistogramm auf die x-Achse projiziert. Der erste Peak von links stellt spiegelbildlich den in G0/G1 befindlichen Zellanteil dar, die folgenden die S- und G2-Phasenanteile.

MCYCLE:

Die nun erhaltenen eindimensionalen DNA-Verteilungshistogramme wurden mit Hilfe eines zweiten Maus-gesteuerten Softwareprogrammes (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA) nach ihren G1-, S- und G2-Phasenanteilen ausgewertet. Dieses Programm basiert auf dem Zellzyklusanalyse-Modell

von Dean und Jett (1974), modifiziert von Rabinovitch (1983) hin zu iterativer polynominaler S-Phasen Annäherung.

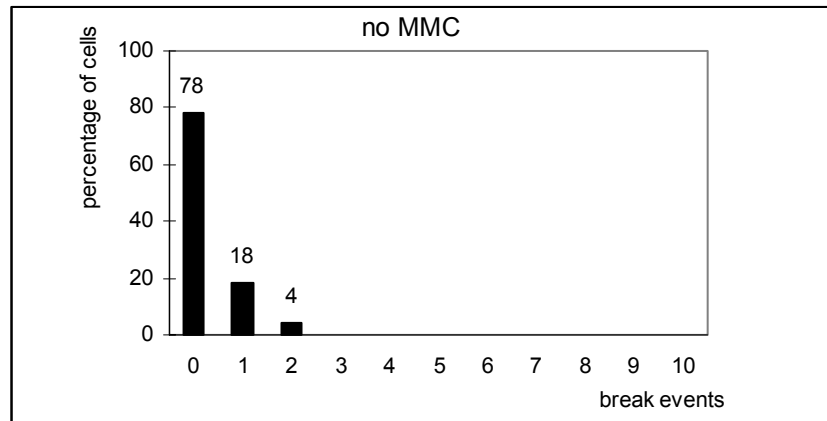
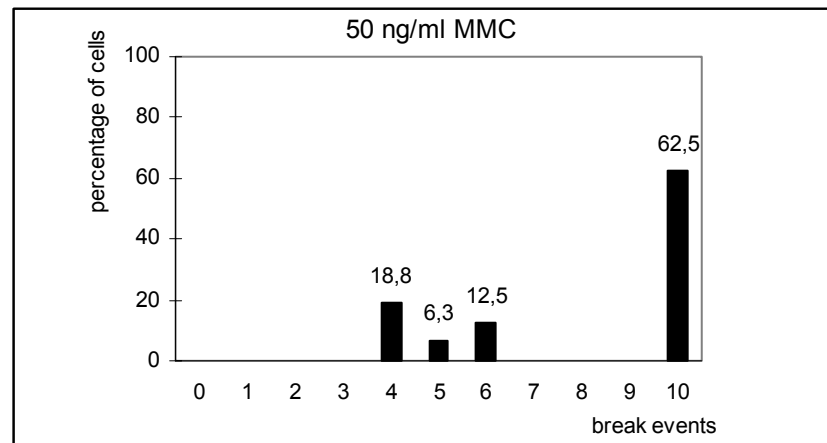
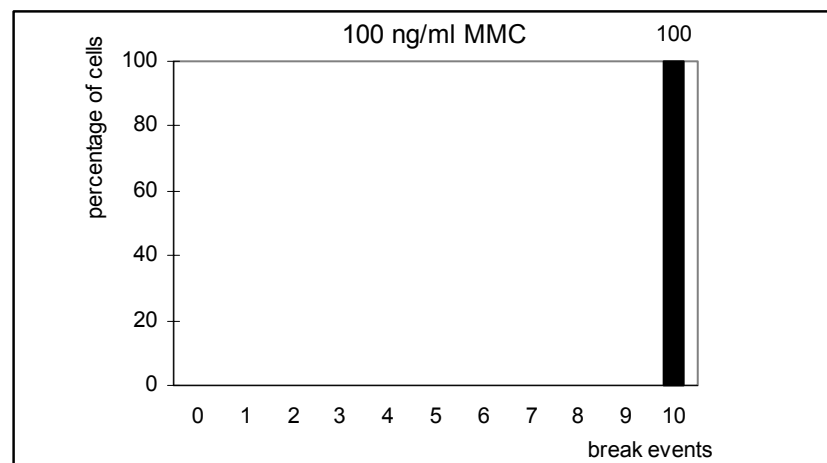
Die im "MULTI2D" erhaltenen Zellzahlen (real data) und die im "MCYCLE" analysierten prozentualen Verteilungen der Zellzykluskompartimente der einzelnen Zellzyklen (G1, S, G2) wurden unter Berücksichtigung der durchlaufenen Zellteilungen auf die ursprünglich eingesäte Ausgangspopulation (original data) zurückberechnet (Softwareprogramm "2DRAGE"; R. Friedl, Universität Würzburg). Die so erhaltenen Daten ergaben die Zellzyklusverteilung in Prozent Originalzellen in G0-G1, S, G2 des ersten Zellzyklus, bzw. G1, S, G2 der darauf folgenden zweiten, dritten und vierten Zellzyklen (Methodenprotokoll; H. Seyschab und H. Höhn, Universität Würzburg).

Diese Daten, sowie zusätzlich berechnete Zellzyklusparameter ($\Sigma G1$, ΣS , $\Sigma G2$, Growth Fraction GF, $\Sigma G2/\Sigma G1$, $\Sigma G2/GF$) ermöglichten präzise Aussagen über replikative Vergangenheit und Proliferationsverhalten und somit über den Grad einer vorliegenden DNA- bzw. Zellschädigung einer Zellpopulation zum Erntezeitpunkt.

3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der zytogenetischen Chromosomenbruchanalyse anhand von Säulendiagrammen und die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse anhand der Histogramme sowie Graphiken der Probanden 1 bis 6 dargestellt und erläutert.

3.1 Proband 1

Abb. 3.1.1**Abb. 3.1.2****Abb. 3.1.3**

Abbildungen 3.1.1-3.1.3:

Die Diagramme zeigen die Zusammenfassung der Chromosomenbruchanalyse der PHA-stimulierten Lymphozytenkultur nach 72 Stunden Inkubation, unter Zugabe von 0, 50 bzw. 100 ng/ml Mitomycin C (MMC). Es handelt sich bei Proband 1 um eine 17jährige Patientin, bei der die Diagnose Fanconi Anämie gestellt wurde.

Abbildung 3.1.1:

Bei Inkubation der Blutzellkultur ohne Zusatz des Klastogens MMC zeigen bereits 22% der ausgewerteten Metaphasen ein oder zwei Bruchereignisse.

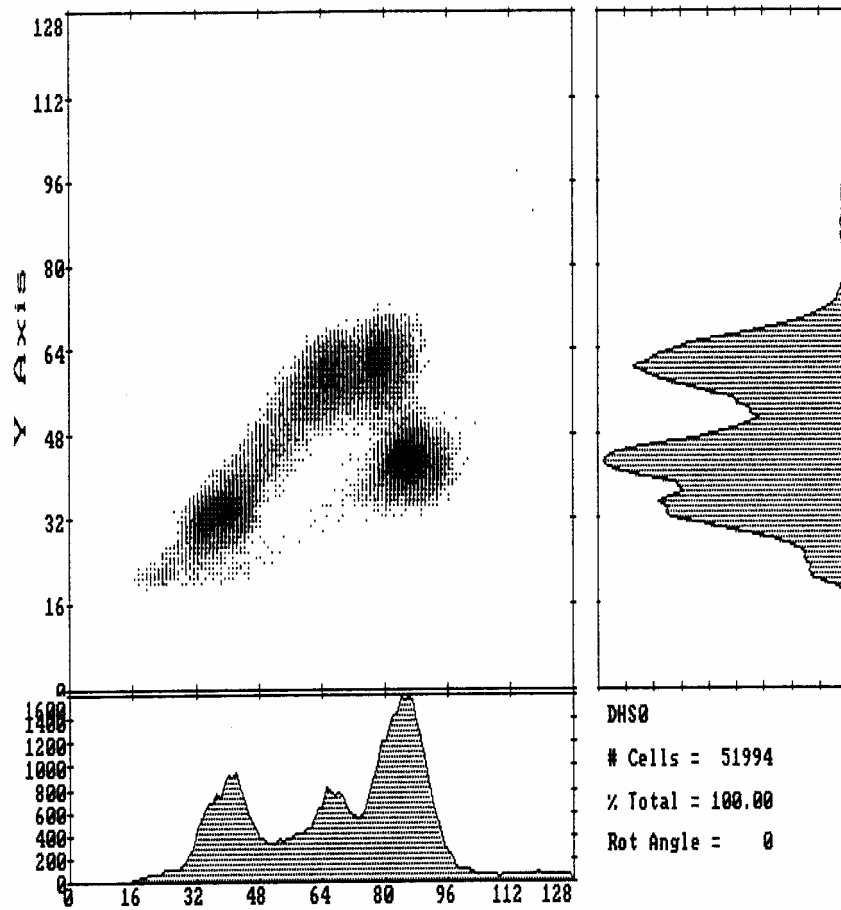
Abbildung 3.1.2:

Nach Inkubation der Blutzellkultur unter Zugabe von 50 ng/ml MMC treten in 62,5% der Metaphasen zehn oder mehr Bruchereignisse auf. Die restlichen ausgewerteten Metaphasen zeigen ebenfalls Bruchereignisse. Ein Chromosomensatz ohne Bruchereignis ist nicht mehr zu finden. Dies bestätigt eindeutig die Diagnose Fanconi Anämie.

Abbildung 3.1.3:

Wird die MMC-Konzentration auf 100 ng/ml erhöht, finden sich keine Metaphasen mehr, die weniger als zehn Bruchereignisse aufweisen. Die meisten Metaphasen sind so stark geschädigt, dass eine Auszählung nicht mehr möglich ist (so genannte „Trümmerfelder“).

Abb. 3.1.4



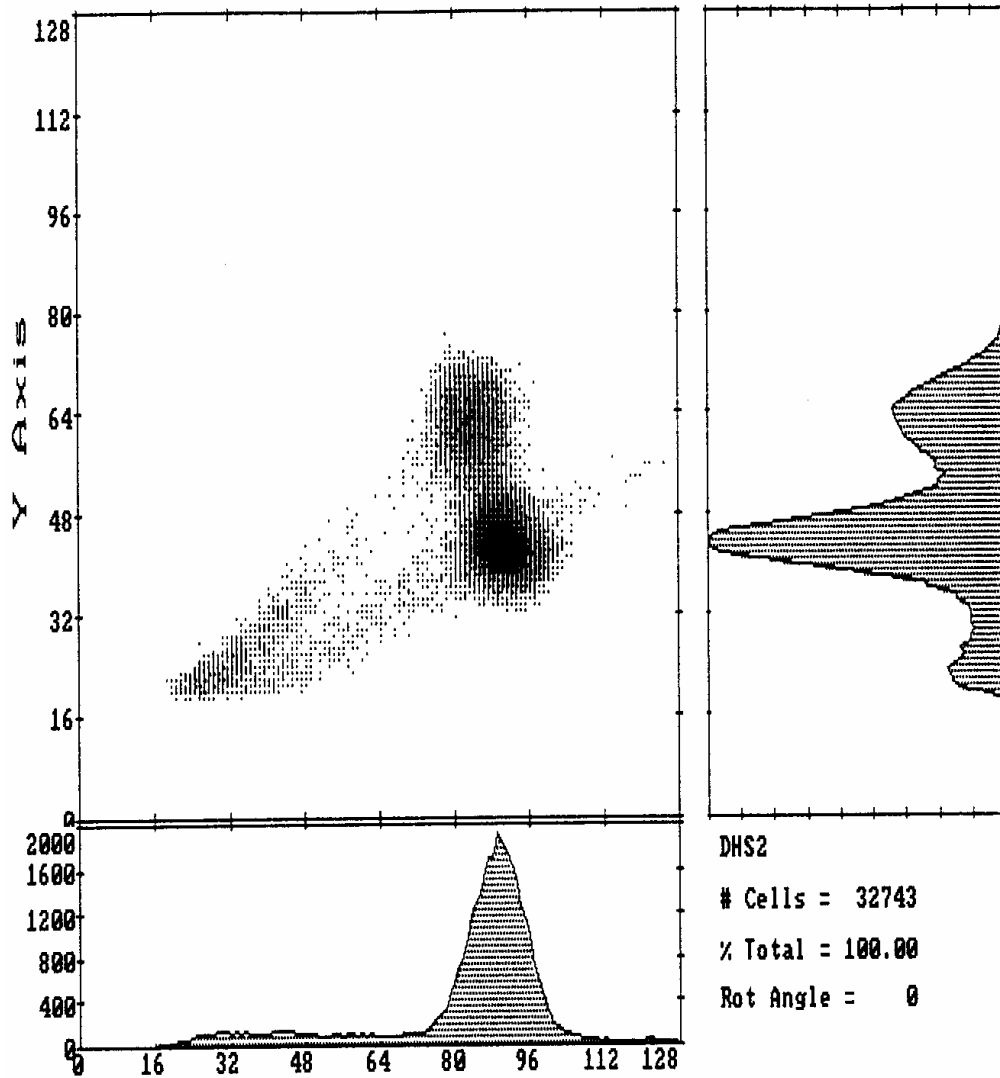
Filename : Proband 1 - 0

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2.
%Plot-Zellen:	53.9	14.6	31.5	31.1	30.8	38.1	43.1	43.5	13.4	100.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	26.3	7.1	15.4	10.7	10.6	13.1	7.0	7.1	2.2	0.4	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	37.5	10.2	21.9	7.6	7.6	9.4	2.5	2.5	0.8	0.1	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	23614	%Real-Zellen =	48.9	%Orig-Zellen =	69.6
Zyklus 2 :	Zellzahl =	16662	%Real-Zellen =	34.5	%Orig-Zellen =	24.6
Zyklus 3 :	Zellzahl =	7862	%Real-Zellen =	16.3	%Orig-Zellen =	5.8
Zyklus 4 :	Zellzahl =	192	%Real-Zellen =	0.4	%Orig-Zellen =	0.1

%Increased Cells = 142.4		S/G1 - Ratio = 1.98	
%Growth-Fraction = 62.5		G2/G1 - Ratio = 3.14	
G2/GF = 0.351	G2./GF = 0.150	(S+G2)/G1 - Ratio = 5.13	
G2../GF = 0.012	G2.../GF = 0.000	δ G2 = 32.0%	
δ G1 = 10.2%	δ S = 20.2%	δ G2/GF = 0.513	
S+S. = 17.7%	S+S.+S.. = 20.2%		

Abb. 3.1.5



Filename : Proband 1 - 50

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2.
%Plot-Zellen:	56.3	20.2	23.5	50.9	44.0	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	54.2	19.4	22.6	1.9	1.7	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	55.2	19.8	23.0	1.0	0.8	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	26301	%Real-Zellen =	96.2	%Orig-Zellen =	98.1
Zyklus 2 :	Zellzahl =	1035	%Real-Zellen =	3.8	%Orig-Zellen =	1.9
Zyklus 3 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells =	101.9	S/G1 - Ratio	=	21.03		
%Growth-Fraction =	44.8	G2/G1 - Ratio	=	23.56		
G2/GF =	0.515	G2./GF =	0.002	(S+G2)/G1 - Ratio	=	44.60
G2../GF =	0.000	G2.../GF =	0.000	δ G2	=	23.1%
δ G1 =	1.0%	δ S =	20.7%	δ G2/GF	=	0.517
S+S. =	20.7%	S+S.. =	20.7%			

BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Histogramme des Probanden 1

Die beiden vorangegangenen Histogramme zeigen die Aufteilung der jeweiligen Zellzyklen der Lymphozytenkultur nach Inkubation für 72 Stunden, einmal ohne Zusatz von MMC (Abb. 3.1.4) und nach Zugabe von 50 ng/ml MMC (Abb. 3.1.5).

Abbildung 3.1.4:

Die Lymphozyten von Proband 1 zeigen ohne Zugabe eines Klastogens eine reduzierte Stimulierbarkeit bezogen auf das Lebensalter (Growth-Fraction von 62,5% proliferierende Zellen). Es kommt zu einer spontanen Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase (21,9% Originalzellen im ersten Zellzyklus), was für die Diagnose FA typisch ist (Compartment G2: $\geq 15\%$ Originalzellen). Betrachtet man die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction, fällt auch hier mit $\delta G2/GF: 0.513$ ein für FA-Patienten typisch erhöhter Wert auf (Normwert: $\delta G2/GF: \leq 0,3$, FA-typisch: $\geq 0,4$).

Abbildung 3.1.5:

Nach Zugabe von 50 ng/ml MMC nimmt die Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase auf 23% Originalzellen zu. Ebenso nimmt die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction ($\delta G2/GF: 0,517$) zu.

Abbildung 3.1.6: Dargestellt ist die Verteilung der Zellen aller durchlaufenen Zellzyklen in den verschiedenen Compartments. Die Summe der G2-Fractionen ($\Sigma G2$) von Proband 1 liegt deutlich im Bereich der FA-Patienten.

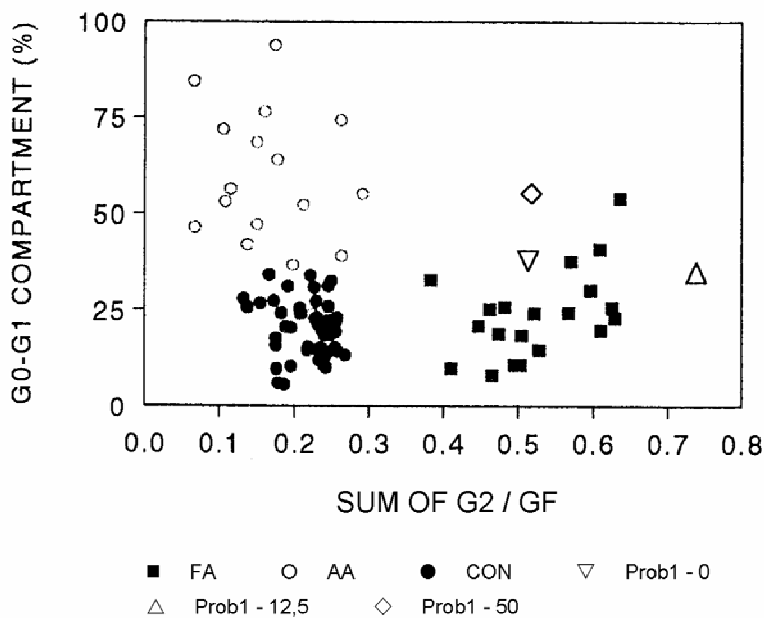
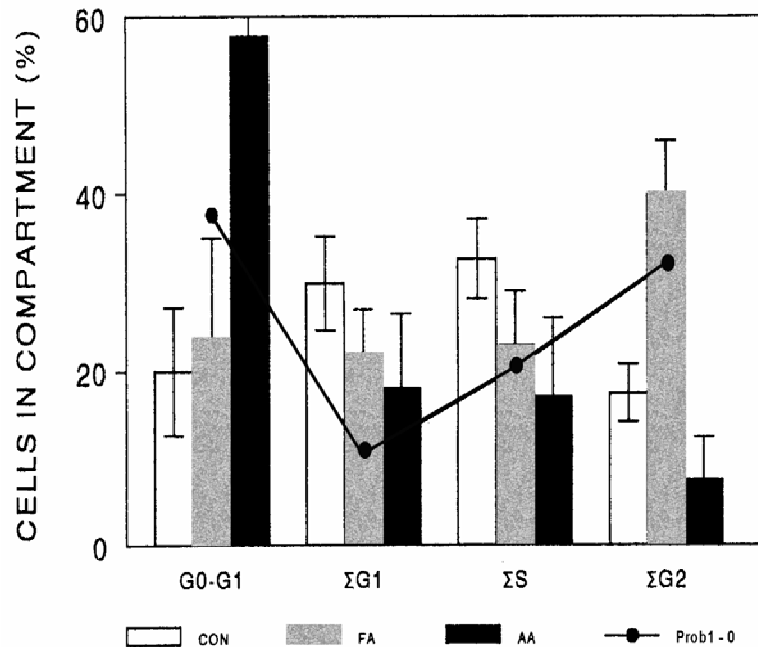
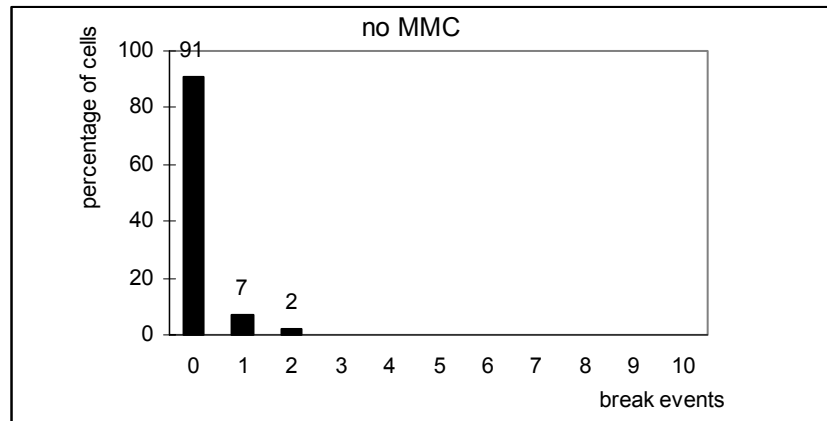
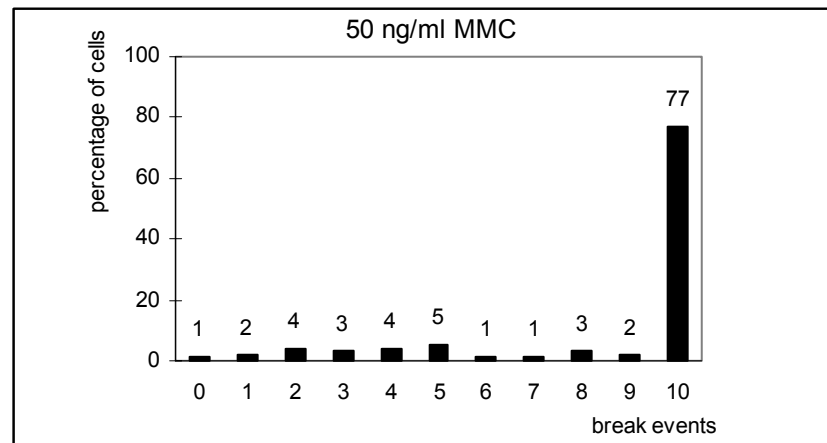
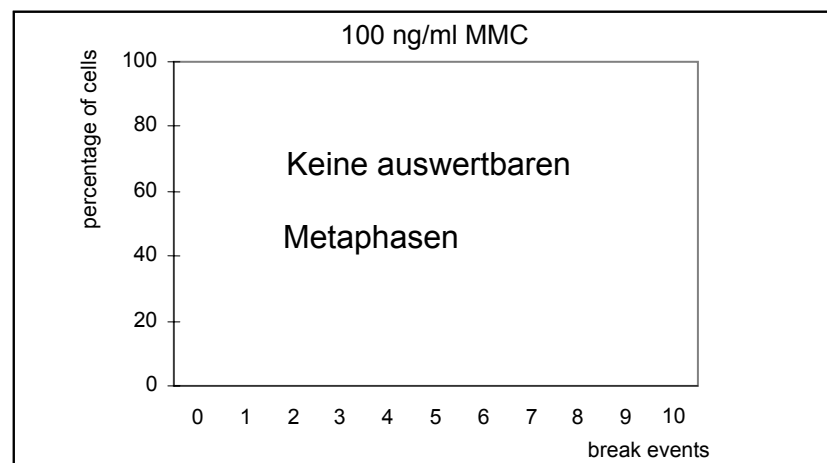


Abbildung 3.1.7: Diese Graphik zeigt die Summe der G2 Phasen/Growth-Fraction des Probanden 1 bei 0, 12,5 und 50 ng/ml MMC im Vergleich zu den unbehandelten Streuwerten von FA-Patienten, einer Gruppe von Patienten

mit aplastischer Anämie und einer Kontrollgruppe. Die Werte von Proband 1 liegen bei sämtlichen MMC-Konzentrationen im Bereich der Gruppe der unbehandelten FA-Patienten.

3.2 Proband 2

Abb. 3.2.1**Abb. 3.2.2****Abb. 3.2.3**

Abbildungen 3.2.1-3.2.3:

Die Diagramme zeigen die Zusammenfassung der Chromosomenbruchanalyse der PHA-stimulierten Lymphozytenkultur nach 72 Stunden Inkubation, unter Zugabe von 0, 50 bzw. 100 ng/ml Mitomycin C (MMC). Es handelt sich bei Proband 2 um eine 3 Monate alte Patientin, bei der die Diagnose Fanconi Anämie gestellt wurde.

Abbildung 3.2.1:

Bei Inkubation der Blutzellkultur ohne Zusatz des Klastogens MMC zeigen 9% der ausgewerteten Metaphasen ein oder zwei Bruchereignisse.

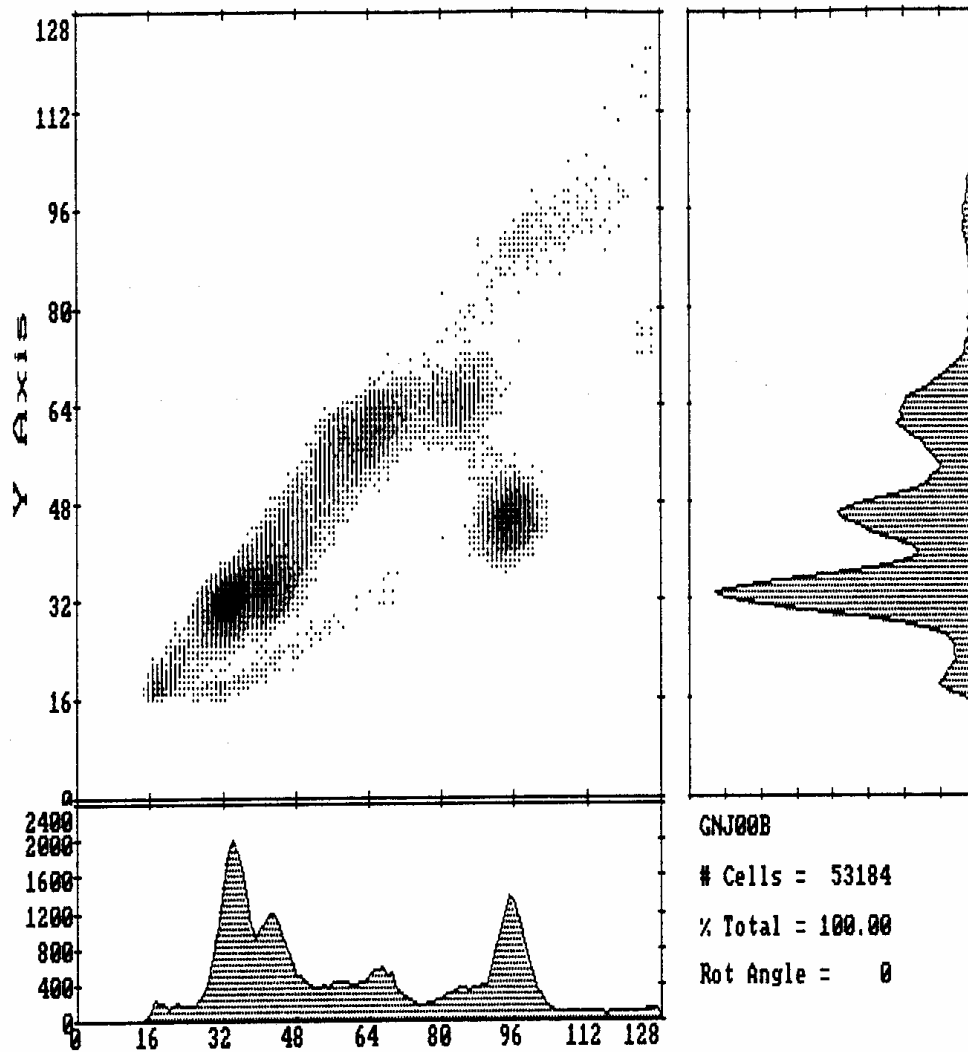
Abbildung 3.2.2:

Nach Inkubation der Blutzellkultur unter Zugabe von 50 ng/ml MMC treten in 77% der Metaphasen zehn oder mehr Bruchereignisse auf. Die meisten Metaphasen sind bereits bei 50 ng/ml MMC so stark geschädigt, dass eine Auszählung nicht mehr möglich ist (so genannte „Trümmerfelder“). Ein Chromosomensatz ohne Bruchereignis ist noch zu finden. Die restlichen ausgewerteten Metaphasen zeigen ebenfalls Bruchereignisse.

Abbildung 3.2.3:

Bei einer Konzentration von 100 ng/ml MMC ist bei Proband 2 kaum mehr Zellmaterial gewachsen. Es waren keine auswertbaren Metaphasen in der Durchsicht aller Objektträger zu finden.

Abb. 3.2.4



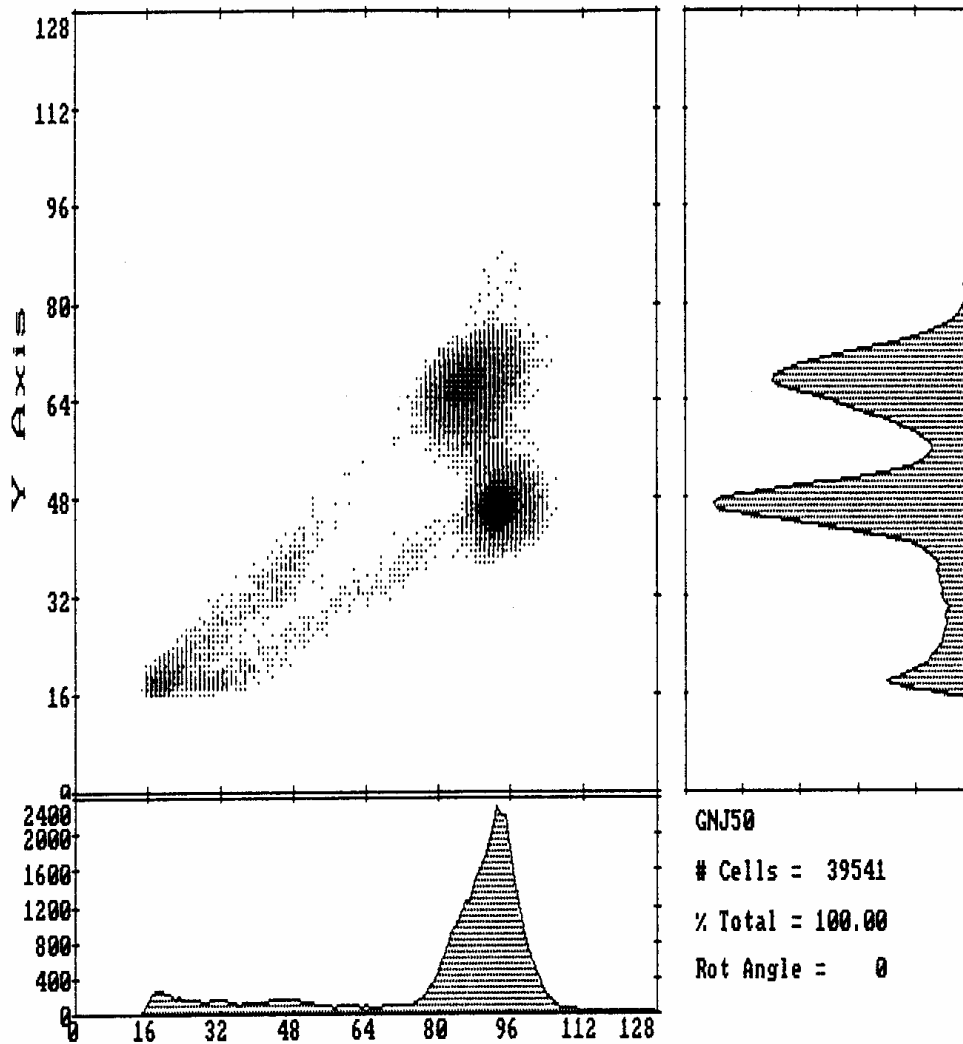
Filename : Proband 2 - 0

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2.
%Plot-Zellen:	68.4	10.5	21.1	44.5	31.0	24.5	72.2	18.8	9.0	100.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	18.9	2.9	5.8	14.8	10.3	8.2	26.6	6.9	3.3	2.1	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	35.2	5.4	10.8	13.8	9.6	7.6	12.4	3.2	1.5	0.5	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	12786	%Real-Zellen =	27.7	%Orig-Zellen =	51.4
Zyklus 2 :	Zellzahl =	15424	%Real-Zellen =	33.4	%Orig-Zellen =	31.0
Zyklus 3 :	Zellzahl =	17044	%Real-Zellen =	36.9	%Orig-Zellen =	17.1
Zyklus 4 :	Zellzahl =	970	%Real-Zellen =	2.1	%Orig-Zellen =	0.5

%Increased Cells =	185.8	S/G1 - Ratio	=	0.68
%Growth-Fraction =	64.8	G2/G1 - Ratio	=	0.75
G2/GF =	0.167	(S+G2)/G1 - Ratio	=	1.43
G2./GF =	0.024	σ G2	=	20.0%
G2.../GF =	0.000	σ G2/GF	=	0.308
σ G1 =	26.6%			
S+S. =	15.0%	S+S.+S.. =	18.2%	

Abb. 3.2.5



Filename : Proband 2 - 50

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...	G1...	S...	G2..
%Plot-Zellen:	41.9	14.6	43.5	60.3	39.2	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	39.8	13.9	41.4	3.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	40.8	14.2	42.4	1.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	30481	%Real-Zellen =	95.1	%Orig-Zellen =	97.5
Zyklus 2 :	Zellzahl =	1575	%Real-Zellen =	4.9	%Orig-Zellen =	2.5
Zyklus 3 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells =	102.5	S/G1 - Ratio	=	10.02
%Growth-Fraction =	59.2	G2/G1 - Ratio	=	27.93
G2/GF =	0.717	(S+G2)/G1 - Ratio	=	37.95
G2./GF =	0.000	σ G1	=	1.5%
G2.../GF =	0.000	σ S	=	15.2%
σ G1	= 1.5%	σ G2	=	42.4%
S+S.. =	15.2%	σ G2/GF	=	0.717
S+S..+S.. =	15.2%			

BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Histogramme des Probanden 2

Die beiden vorangegangenen Histogramme zeigen die Aufteilung der jeweiligen Zellzyklen der Lymphozytenkultur nach Inkubation für 72 Stunden, einmal ohne Zusatz von MMC (Abb. 3.2.4) und nach Zugabe von 50 ng/ml MMC (Abb. 3.2.5).

Abbildung 3.2.4:

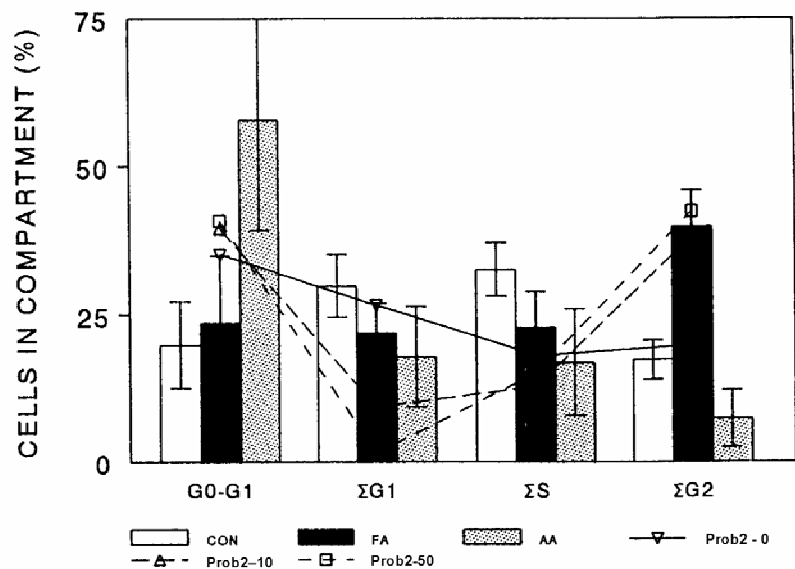
Die Lymphozyten von Proband 2 zeigen ohne Zugabe eines Klastogens eine reduzierte Stimulierbarkeit bezogen auf das Lebensalter (Growth-Fraction von 64,8% proliferierende Zellen). Eine spontanen Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase, die für die Diagnose FA typisch ist (Compartment G2: $\geq 15\%$ Orginalzellen), tritt nicht auf (10,8% Orginalzellen im ersten Zellzyklus). Betrachtet man die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction, liegen die Werte des Probanden 2 auch hier mit $\delta G2/GF: 0.308$ knapp oberhalb des Normbereichs (Normwert: $\delta G2/GF: \leq 0,3$, FA-typisch: $\geq 0,4$).

Abbildung 3.2.5:

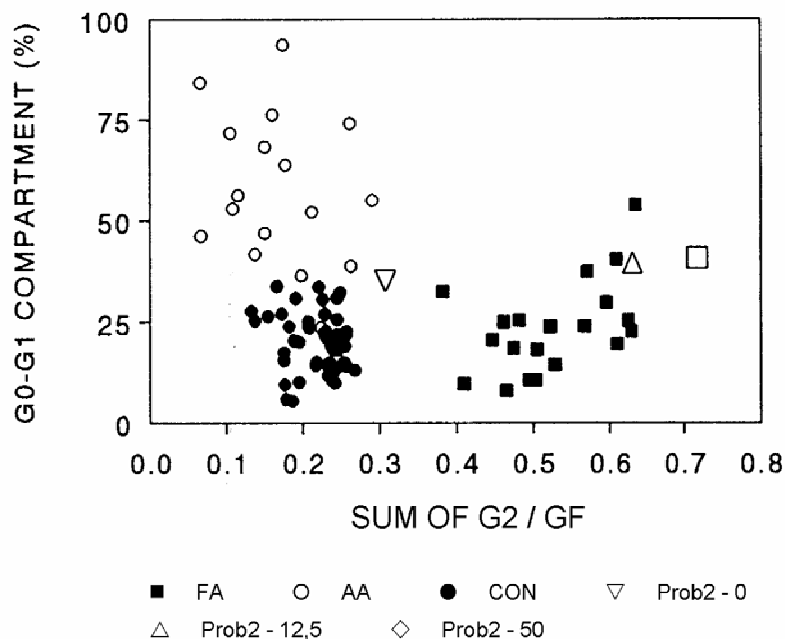
Nach Zugabe von 50 ng/ml MMC zeigt sich eine ausgeprägte Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase mit einem Wert von 42,4% Orginalzellen. Diese wird auch bei Betrachtung der Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction ($\delta G2/GF: 0,717$) deutlich.

Abbildung 3.2.6:

Dargestellt ist die Verteilung der Zellen aller durchlaufenen Zellzyklen unter verschiedenen MMC-Konzentrationen in den einzelnen Compartments. Die Summe der G2-Fractionen ($\Sigma G2$)



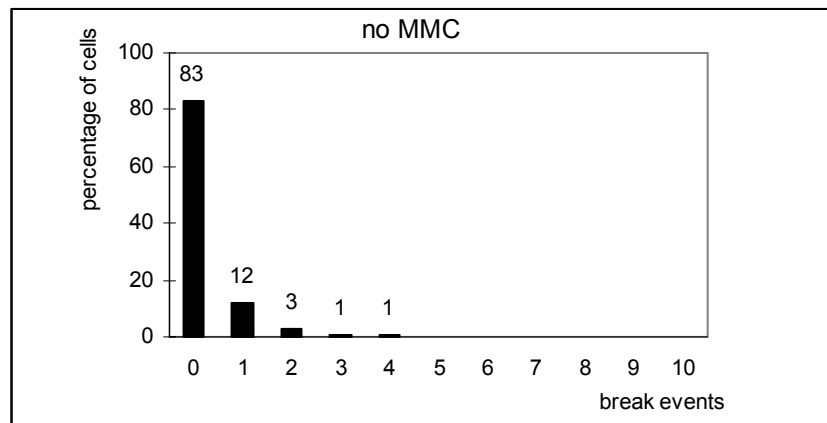
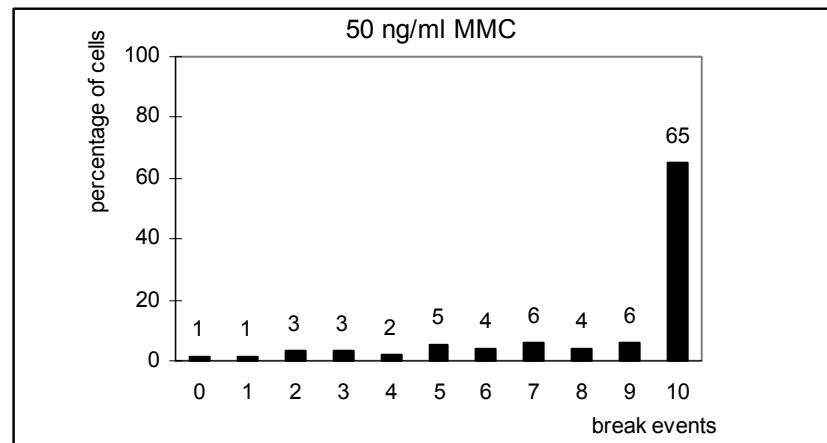
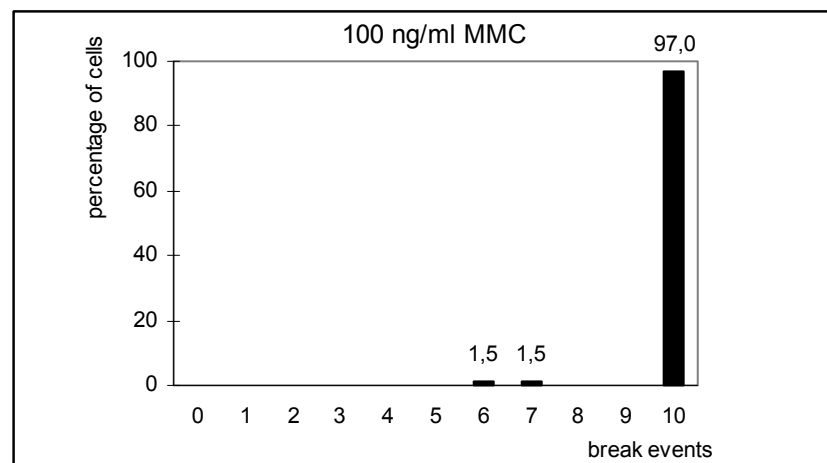
ohne Zusatz von MMC liegt bei Proband 2 nur knapp oberhalb des Normbereiches, nach Zugabe von 10 ng/ml MMC aber bereits deutlich im Bereich der FA-Patienten.

**Abbildung 3.2.7:**

Diese Graphik zeigt die Summe der G2-Phasen/ Growth-Fraction des Probanden 2 bei 0, 12,5 und 50 ng/ml MMC im Vergleich zu den Streuwerten von FA-Patienten, ei-

ner Gruppe von Patienten mit aplastischer Anämie und einer Kontrollgruppe. Die Werte von Proband 2 liegen nach Zugabe von bereits 10 ng/ml MMC im Bereich der Gruppe der unbehandelten FA-Patienten.

3.3 Proband 3

Abb. 3.3.1**Abb. 3.3.2****Abb. 3.3.3**

Abbildungen 3.3.1-3.3.3:

Die Diagramme zeigen die Zusammenfassung der Chromosomenbruchanalyse der PHA-stimulierten Lymphozytenkultur nach 72 Stunden Inkubation, unter Zugabe von 0, 50 bzw. 100 ng/ml Mitomycin C (MMC). Es handelt sich bei Proband 3 um eine 33jährige Patientin, bei der die Diagnose Fanconi Anämie gestellt wurde.

Abbildung 3.3.1:

Bei Inkubation der Blutzellkultur ohne Zusatz des Klastogens MMC zeigen 17% der ausgewerteten Metaphasen ein oder zwei Bruchereignisse.

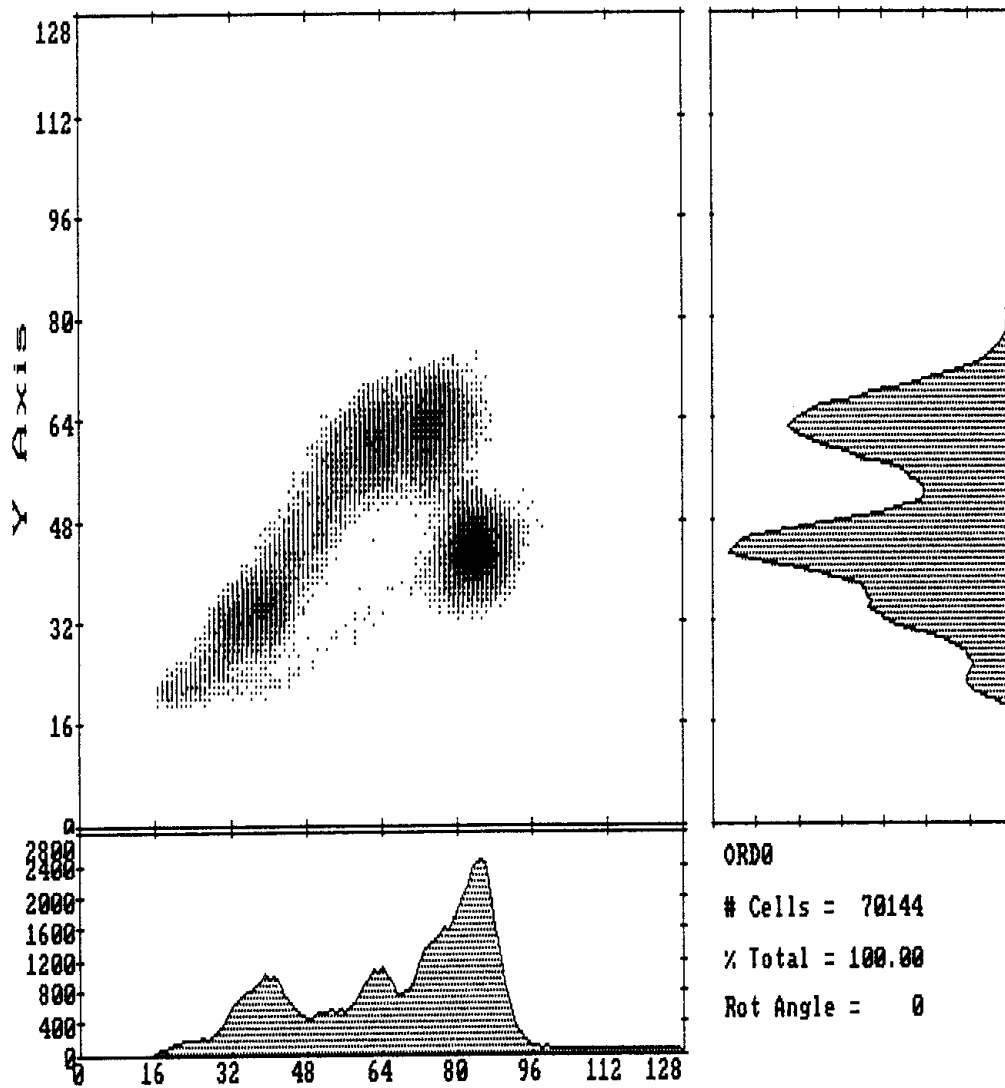
Abbildung 3.3.2:

Nach Inkubation der Blutzellkultur unter Zugabe von 50 ng/ml MMC treten in 65% der Metaphasen zehn oder mehr Bruchereignisse auf. Es finden sich allerdings auch Metaphasen mit keinen oder nur wenigen Bruchereignissen.

Abbildung 3.3.3:

Wird die MMC-Konzentration auf 100 ng/ml erhöht, finden sich nur noch zwei Metaphasen (3%) mit weniger als zehn Bruchereignissen. Die meisten Metaphasen sind so stark geschädigt, dass eine Auszählung nicht mehr möglich ist (so genannte „Trümmerfelder“).

Abb. 3.3.4



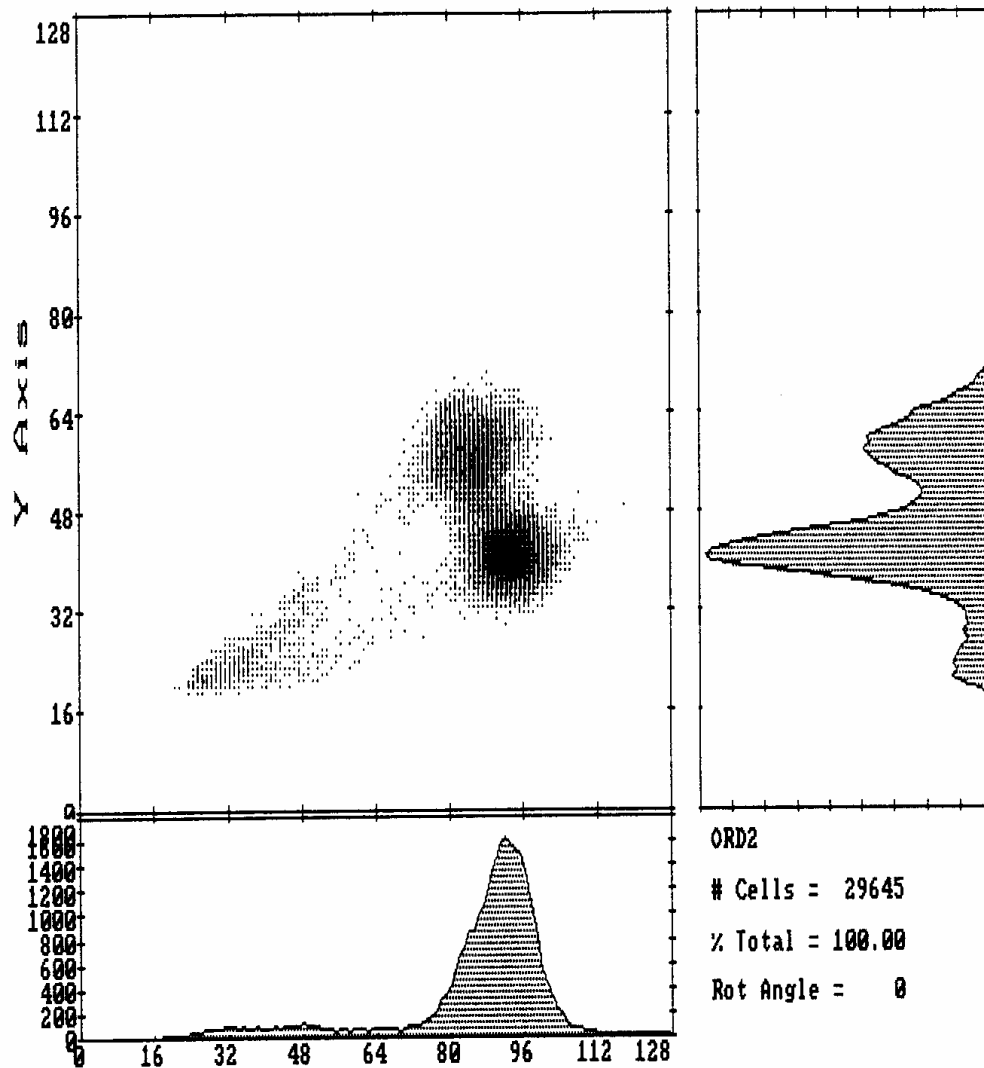
Filename : Proband 3 - 0

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2..
%Plot-Zellen:	53.0	11.1	35.9	32.2	25.5	42.3	25.7	57.6	16.7	100.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	29.9	6.3	20.2	8.9	7.0	11.7	4.0	9.1	2.6	0.3	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	40.3	8.4	27.3	6.0	4.7	7.9	1.4	3.1	0.9	0.1	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	37792	%Real-Zellen =	56.4	%Orig-Zellen =	76.0
Zyklus 2 :	Zellzahl =	18496	%Real-Zellen =	27.6	%Orig-Zellen =	18.6
Zyklus 3 :	Zellzahl =	10539	%Real-Zellen =	15.7	%Orig-Zellen =	5.3
Zyklus 4 :	Zellzahl =	220	%Real-Zellen =	0.3	%Orig-Zellen =	0.1

%Increased Cells = 134.9				S/G1 - Ratio	=	2.19
%Growth-Fraction = 59.7				G2/G1 - Ratio	=	4.87
G2/GF = 0.457	G2./GF = 0.132			(S+G2)/G1 - Ratio	=	7.06
G2../GF = 0.015	G2.../GF = 0.000			σ G2	=	36.1%
σ G1 = 7.4%	σ S = 16.2%			σ G2/GF	=	0.604
S+S. = 13.2%	S+S.+S.. = 16.2%					

Abb. 3.3.5



Filename : Proband 3 - 50

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2.
%Plot-Zellen:	54.1	17.4	28.5	43.7	45.9	10.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	51.8	16.7	27.3	1.9	2.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	52.9	17.0	27.9	1.0	1.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	25408	%Real-Zellen =	95.7	%Orig-Zellen =	97.8
Zyklus 2 :	Zellzahl =	1131	%Real-Zellen =	4.3	%Orig-Zellen =	2.2
Zyklus 3 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 102.2		S/G1 - Ratio = 18.94	
%Growth-Fraction = 47.1		G2/G1 - Ratio = 29.54	
G2/GF = 0.592	G2./GF = 0.005	(S+G2)/G1 - Ratio = 48.48	
G2../GF = 0.000	G2.../GF = 0.000	δ G2 = 28.1%	
δ G1 = 1.0%	δ S = 18.0%	δ G2/GF = 0.597	
S+S. = 18.0%	S+S.+S.. = 18.0%		

BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Histogramme des Probanden 3

Die beiden vorangegangenen Histogramme zeigen die Aufteilung der jeweiligen Zellzyklen der Lymphozytenkultur nach Inkubation für 72 Stunden, einmal ohne Zusatz von MMC (Abb. 3.3.4) und nach Zugabe von 50 ng/ml MMC (Abb. 3.3.5).

Abbildung 3.3.4:

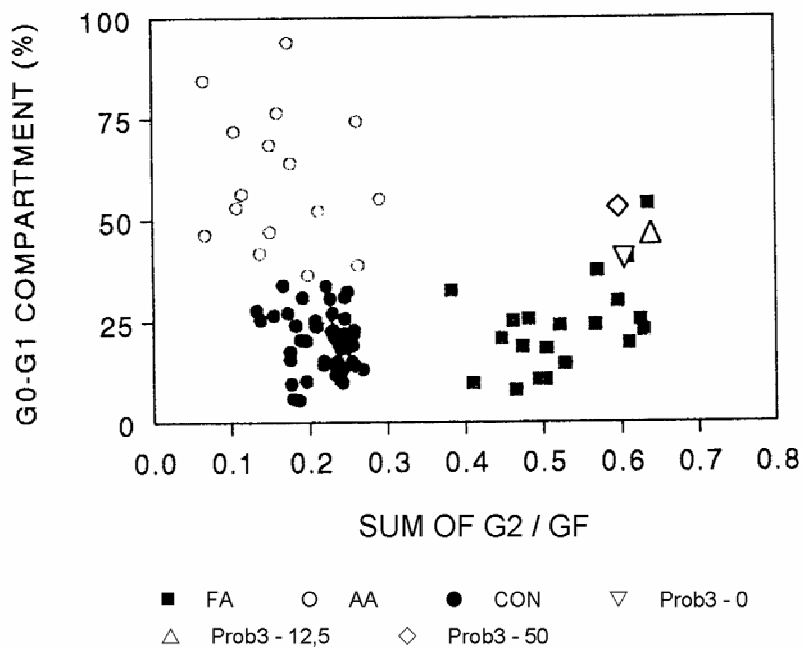
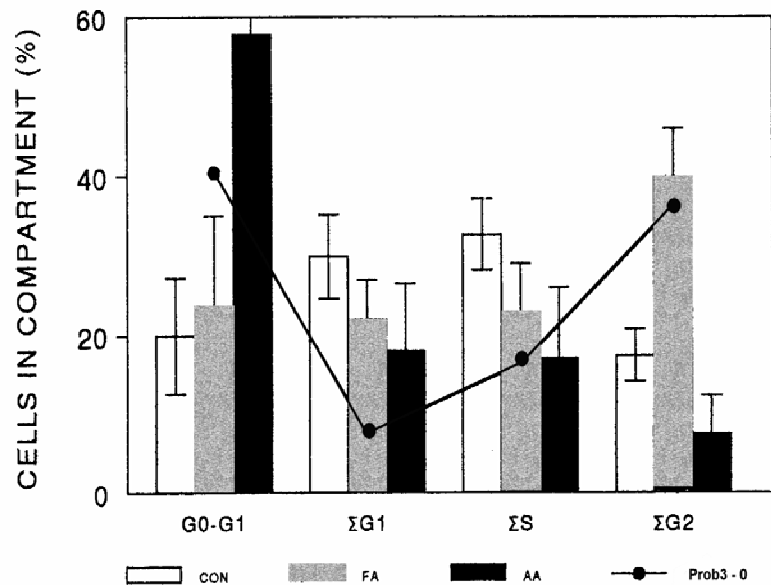
Die Lymphozyten von Proband 3 zeigen ohne Zugabe eines Klastogens eine reduzierte Stimulierbarkeit bezogen auf das Lebensalter (Growth-Fraction von 59,7% proliferierende Zellen). Es kommt zu einer spontanen Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase (27,3% Originalzellen im ersten Zellzyklus), was für die Diagnose FA typisch ist (Compartment G2: $\geq 15\%$ Originalzellen). Betrachtet man die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction, fällt auch hier mit $\delta G2/GF: 0.604$ ein für FA-Patienten typisch erhöhter Wert auf (Normwert: $\delta G2/GF: \leq 0,3$, FA-typisch: $\geq 0,4$).

Abbildung 3.3.5:

Nach Zugabe von 50 ng/ml MMC ändert sich die Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase mit 27,9% Originalzellen kaum. Ebenso bleibt die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction ($\delta G2/GF: 0,597$) nahezu gleich.

Abbildung 3.3.6:

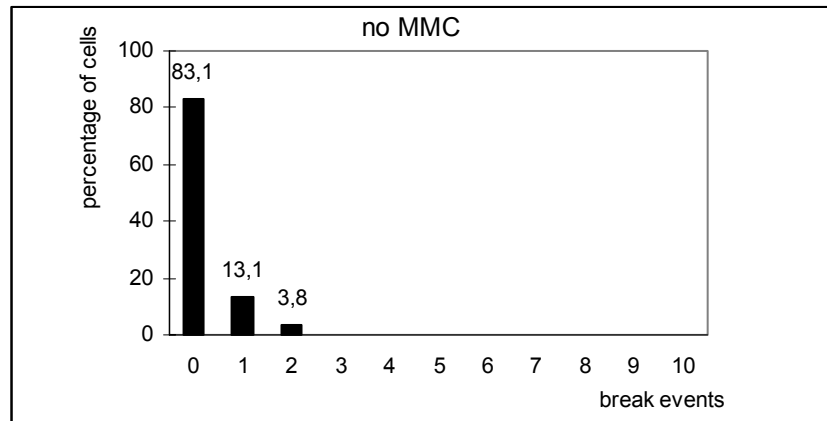
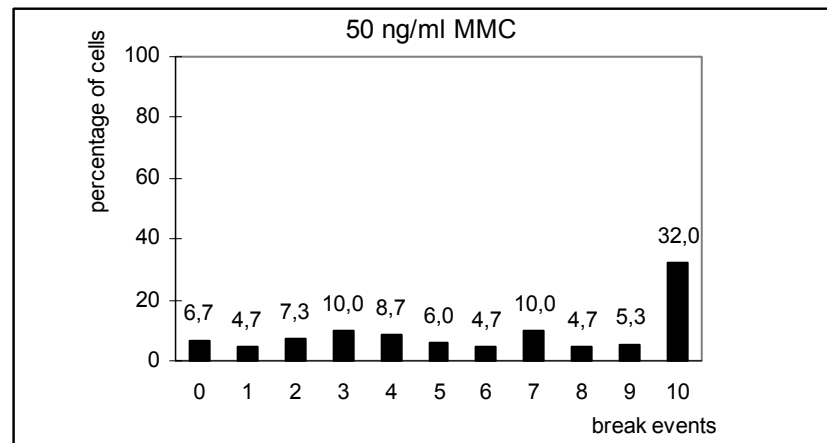
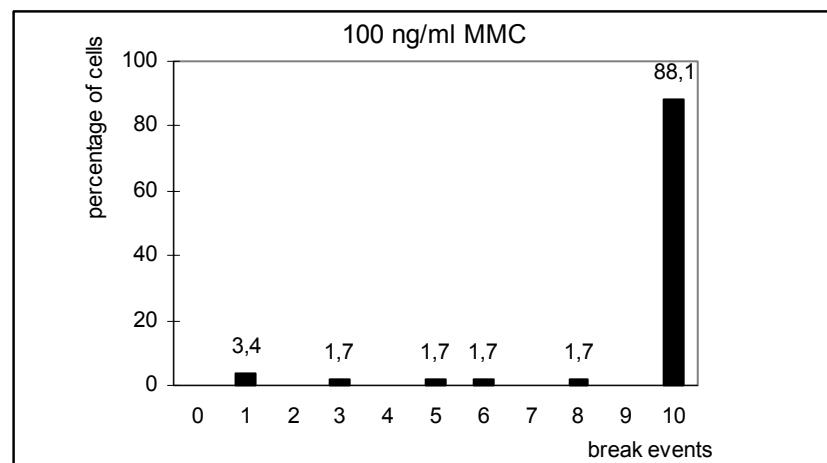
Dargestellt ist die Verteilung der Zellen aller durchlaufenen Zellzyklen in den verschiedenen Compartments. Die Summe der G2-Fractionen ($\Sigma G2$) liegt bei Proband 3 deutlich im Bereich der FA-Patienten.

**Abbildung 3.3.7:**

Diese Graphik zeigt die Summe der G2-Phasen/Growth-Fraction von Proband 3 bei 0, 12,5 und 50 ng/ml MMC im Vergleich zu den unbehandelten Streuwerten von FA-Patienten, einer Gruppe von Patienten mit aplastischer

Anämie und einer Kontrollgruppe. Die Werte von Proband 3 liegen bei sämtlichen MMC-Konzentrationen im Bereich der Gruppe der unbehandelten FA-Patienten.

3.4 Proband 4

Abb. 3.4.1**Abb. 3.4.2****Abb. 3.4.3**

Abbildungen 3.4.1-3.4.3:

Die Diagramme zeigen die Zusammenfassung der Chromosomenbruchanalyse der PHA-stimulierten Lymphozytenkultur nach 72 Stunden Inkubation, unter Zugabe von 0, 50 bzw. 100 ng/ml Mitomycin C (MMC). Es handelt sich bei Proband 4 um einen 31jährigen Patienten, bei dem die Diagnose Fanconi Anämie gestellt wurde.

Abbildung 3.4.1:

Bei Inkubation der Blutzellkultur ohne Zusatz des Klastogens MMC zeigen 17% der ausgewerteten Metaphasen ein oder zwei Bruchereignisse.

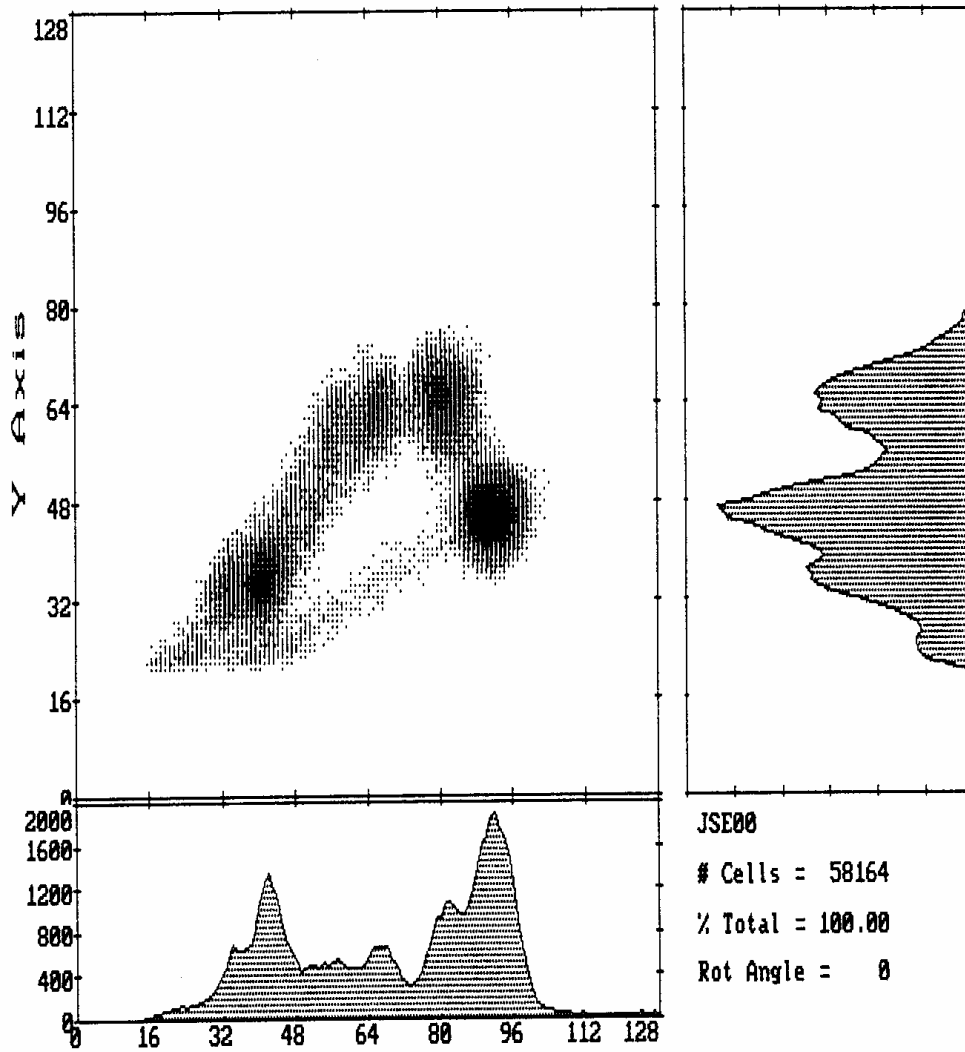
Abbildung 3.4.2:

Nach Inkubation der Blutzellkultur unter Zugabe von 50 ng/ml MMC treten in 32% der Metaphasen zehn oder mehr Bruchereignisse auf. Es finden sich jedoch relativ viele Metaphasen, die völlig intakt sind oder nur wenige Bruchereignisse aufweisen.

Abbildung 3.4.3:

Wird die MMC-Konzentration auf 100 ng/ml erhöht, finden sich nur noch einige Metaphasen, die weniger als zehn Bruchereignisse aufweisen. Viele der Metaphasen sind so stark geschädigt, dass eine Auszählung nicht mehr möglich ist (so genannte „Trümmerfelder“).

Abb. 3.4.4



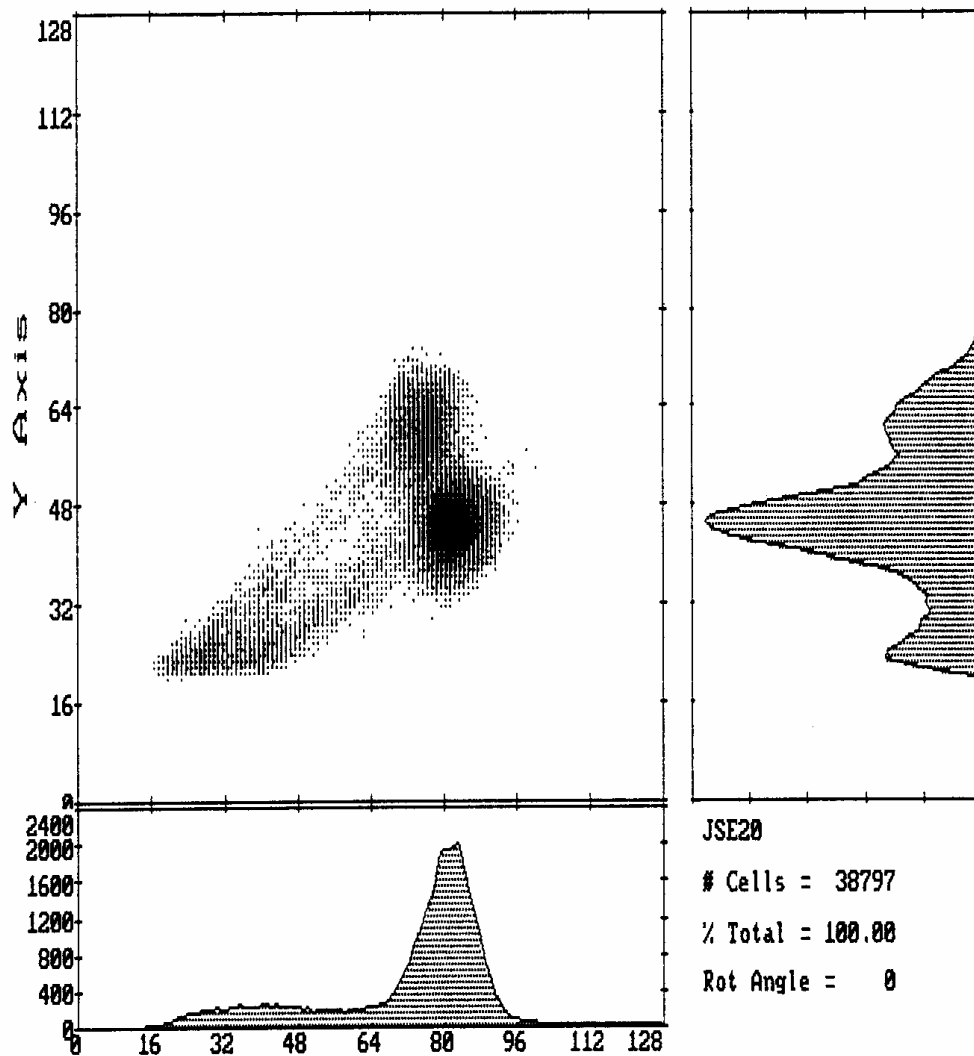
Filename : Proband 4 - 0

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2.
%Plot-Zellen:	55.2	19.5	25.3	44.4	28.9	26.7	29.8	55.2	15.0	100.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	29.7	10.5	13.6	13.3	8.6	8.0	4.8	8.8	2.4	0.2	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	40.8	14.4	18.7	9.1	5.9	5.5	1.6	3.0	0.8	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	28316	%Real-Zellen =	53.9	%Orig-Zellen =	74.0
Zyklus 2 :	Zellzahl =	15705	%Real-Zellen =	29.9	%Orig-Zellen =	20.5
Zyklus 3 :	Zellzahl =	8421	%Real-Zellen =	16.0	%Orig-Zellen =	5.5
Zyklus 4 :	Zellzahl =	122	%Real-Zellen =	0.2	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 137.3		%Growth-Fraction = 59.2		S/G1 - Ratio = 2.17
G2/GF = 0.316	G2./GF = 0.093	G2/G1 - Ratio = 2.32		(S+G2)/G1 - Ratio = 4.49
G2../GF = 0.014	G2.../GF = 0.000	σ G2 = 25.0%		σ G2/GF = 0.423
σ G1 = 10.8%	σ S = 23.4%			
S+S. = 20.3%	S+S.+S.. = 23.4%			

Abb. 3.4.5



Filename : Proband 4 - 50

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2..
%Plot-Zellen:	60.1	20.0	19.9	24.6	63.2	12.2	60.0	35.0	5.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	55.7	18.5	18.5	1.5	3.9	0.7	0.7	0.4	0.1	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	58.0	19.3	19.2	0.8	2.0	0.4	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	27815	%Real-Zellen =	92.7	%Orig-Zellen =	96.5
Zyklus 2 :	Zellzahl =	1842	%Real-Zellen =	6.1	%Orig-Zellen =	3.2
Zyklus 3 :	Zellzahl =	340	%Real-Zellen =	1.1	%Orig-Zellen =	0.3
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 104.1		S/G1 - Ratio = 22.25	
%Growth-Fraction = 42.0		G2/G1 - Ratio = 20.36	
G2/GF = 0.457	G2./GF = 0.009	(S+G2)/G1 - Ratio = 42.61	
G2../GF = 0.000	G2.../GF = 0.000	σ G2 = 19.6%	
σ G1 = 1.0%	σ S = 21.4%	σ G2/GF = 0.467	
S+S. = 21.3%	S+S.+S.. = 21.4%		

BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Histogramme des Probanden 4

Die beiden vorangegangenen Histogramme zeigen die Aufteilung der jeweiligen Zellzyklen der Lymphozytenkultur nach Inkubation für 72 Stunden, einmal ohne Zusatz von MMC (Abb. 3.4.4) und nach Zugabe von 50 ng/ml MMC (Abb. 3.4.5).

Abbildung 3.4.4:

Die Lymphozyten des Probanden 4 zeigen ohne Zugabe eines Klastogens eine reduzierte Stimulierbarkeit bezogen auf das Lebensalter (Growth-Fraction von 59,2% proliferierende Zellen). Es kommt zu einer spontanen Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase (18,7% Originalzellen im ersten Zellzyklus), was für die Diagnose FA typisch ist (Compartment G2: $\geq 15\%$ Originalzellen).

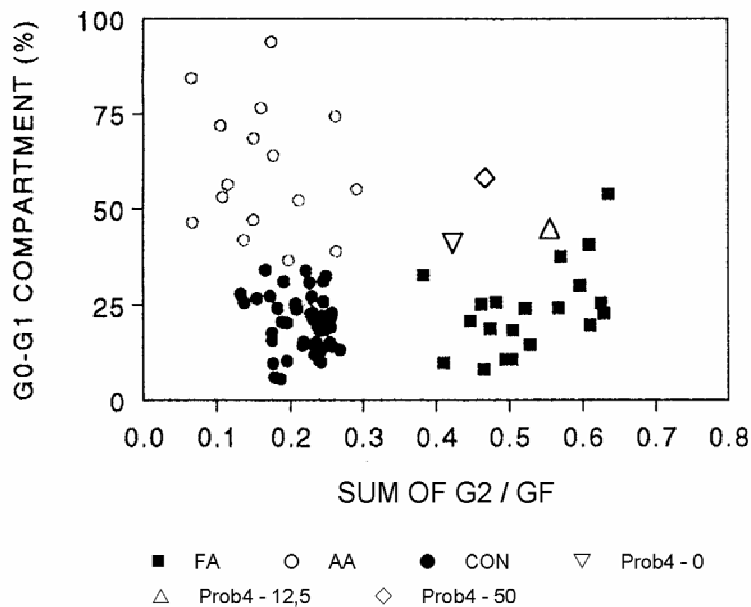
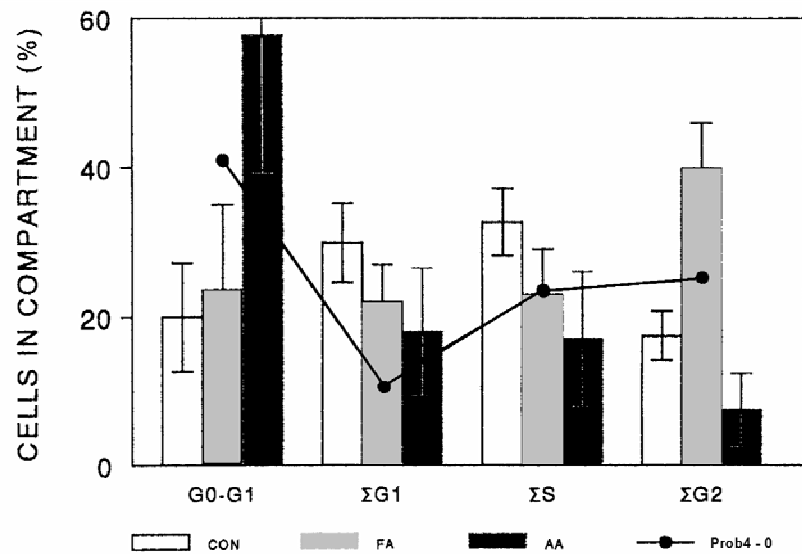
Betrachtet man die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction, fällt auch hier mit $\delta G2/GF: 0.423$ ein für FA-Patienten typisch erhöhter Wert auf (Normwert: $\delta G2/GF: \leq 0,3$, FA-typisch: $\geq 0,4$).

Abbildung 3.4.5:

Nach Zugabe von 50 ng/ml MMC nimmt die Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase auf 19,3% Originalzellen zu. Ebenso nimmt die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction ($\delta G2/GF: 0,467$) zu.

Abbildung 3.4.6:

Dargestellt ist die Verteilung der Zellen aller durchlaufenen Zellzyklen in den verschiedenen Compartments. Die Summe der G2-Fractionen ($\Sigma G2$) von Proband 4 liegt deutlich im Bereich der FA-Patienten.

**Abbildung 3.4.7:**

Diese Graphik zeigt die Summe der G2-Phasen/Growth-Fraction des Probanden 4 bei 0, 12,5 und 50 ng/ml MMC im Vergleich zu den unbehandelten Streuwerten von FA-Patienten, einer Gruppe von Patienten mit

mit aplastischer Anämie und einer Kontrollgruppe. Die Werte von Proband 4 liegen bei sämtlichen MMC-Konzentrationen im Bereich der Gruppe der unbehandelten FA-Patienten.

3.5 Proband 5

Abb. 3.5.1

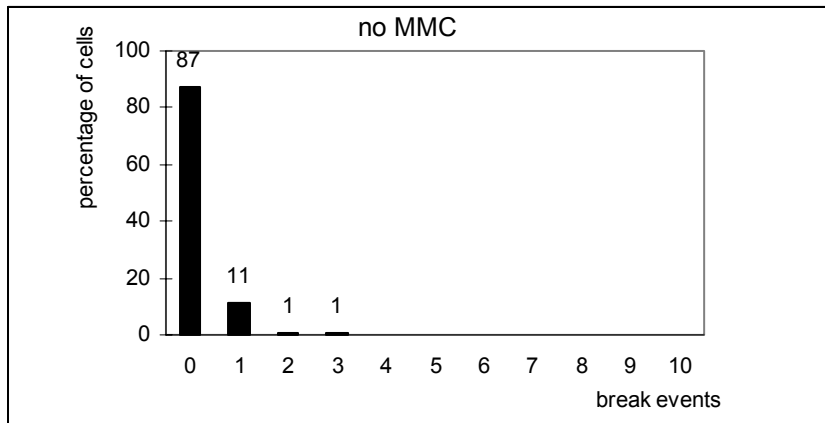


Abb. 3.5.2

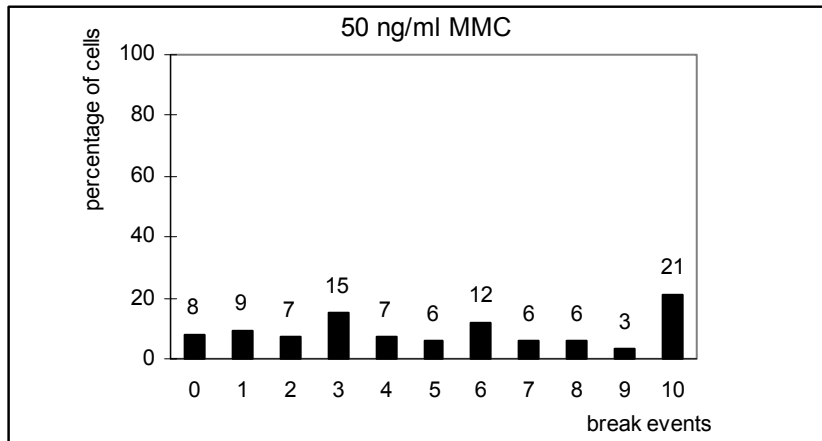


Abb. 3.5.3

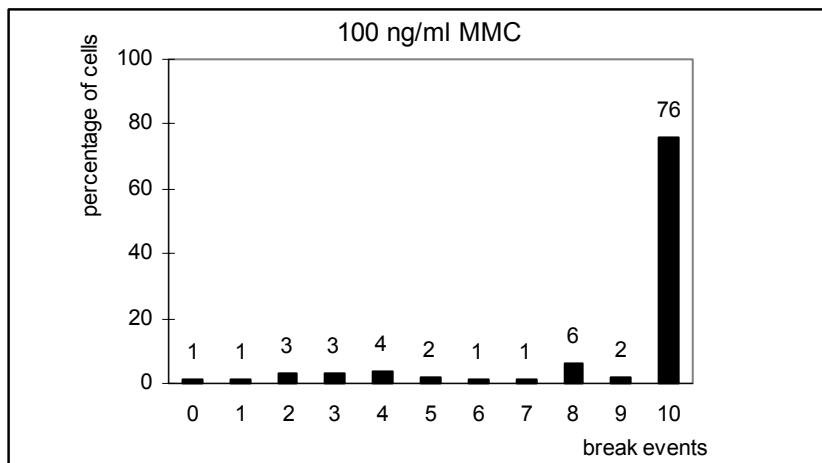


Abbildung 3.5.1-3.5.3:

Die Diagramme zeigen die Zusammenfassung der Chromosomenbruchanalyse der PHA-stimulierten Lymphozytenkultur nach 72 Stunden Inkubation, unter Zugabe von 0, 50 bzw. 100 ng/ml Mitomycin C (MMC). Es handelt sich bei Proband 5 um eine 11jährige Patientin, bei der die Diagnose Fanconi Anämie gestellt wurde.

Abbildung 3.5.1:

Bei Inkubation der Blutzellkultur ohne Zusatz des Klastogens MMC zeigen 13% der ausgewerteten Metaphasen ein bis drei Bruchereignisse.

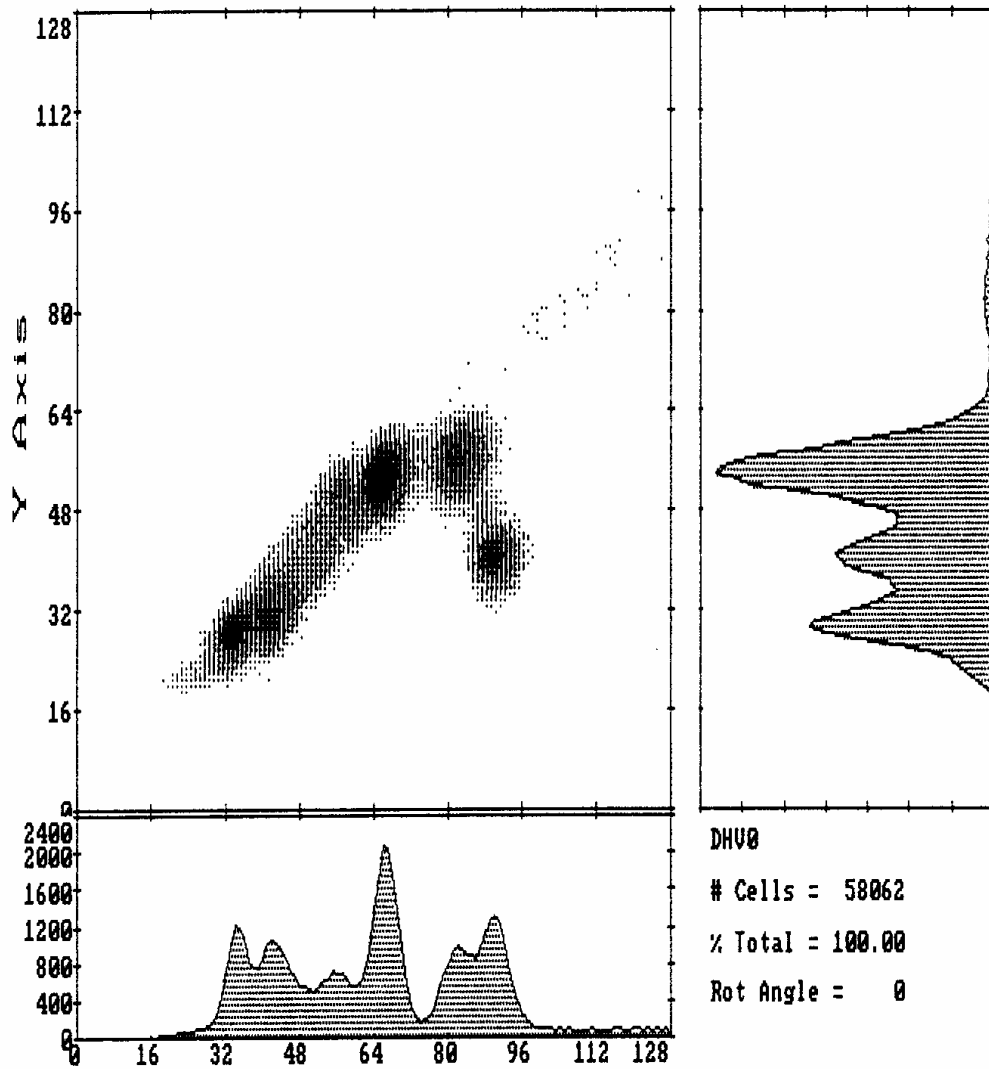
Abb. 3.5.2:

Nach Inkubation der Blutzellkultur unter Zugabe von 50 ng/ml MMC treten lediglich in 21% der Metaphasen zehn oder mehr Bruchereignisse auf. Es finden sich jedoch relativ viele Metaphasen mit nur wenigen Bruchereignissen. 8% der Metaphasen sind völlig intakt.

Abb. 3.5.3:

Wird die MMC-Konzentration auf 100 ng/ml erhöht, weisen 76% der Metaphasen zehn oder mehr Bruchereignisse auf. Darunter auch viele, die so stark geschädigt sind, dass eine Auszählung nicht mehr möglich ist (so genannte „Trümmerfelder“). Allerdings finden sich in 24% der Metaphasen weniger als zehn Bruchereignisse, bis hin zu keinem Ereignis.

Abb. 3.5.4



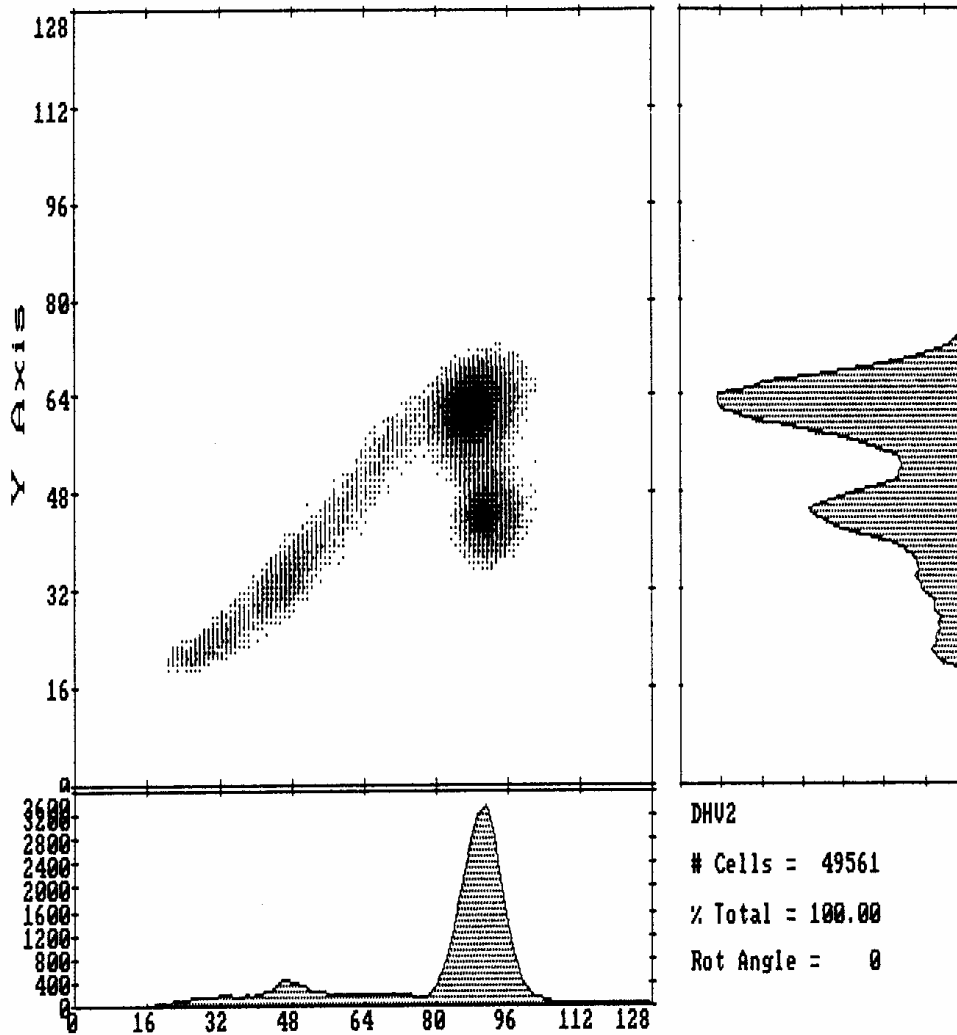
Filename : Proband 5 - 0

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2.
%Plot-Zellen:	38.3	13.2	48.5	20.2	27.5	52.3	37.0	50.0	13.0	100.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	11.4	3.9	14.4	8.5	11.6	22.0	10.2	13.8	3.6	0.7	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	19.7	6.8	25.0	7.4	10.0	19.0	4.4	6.0	1.5	0.2	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	16843	%Real-Zellen =	29.7	%Orig-Zellen =	51.5
Zyklus 2 :	Zellzahl =	23811	%Real-Zellen =	42.0	%Orig-Zellen =	36.4
Zyklus 3 :	Zellzahl =	15587	%Real-Zellen =	27.5	%Orig-Zellen =	11.9
Zyklus 4 :	Zellzahl =	417	%Real-Zellen =	0.7	%Orig-Zellen =	0.2

%Increased Cells = 173.3				S/G1 - Ratio	=	1.91
%Growth-Fraction = 80.3				G2/G1 - Ratio	=	3.82
G2/GF = 0.311	G2./GF = 0.237			(S+G2)/G1 - Ratio	=	5.73
G2../GF = 0.019	G2../GF = 0.000			δ G2	=	45.6%
δ G1 = 11.9%	δ S = 22.8%			δ G2/GF	=	0.568
S+S. = 16.8%	S+S.+S.. = 22.8%					

Abb. 3.5.5



Filename : Proband 5 - 50

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...	G1...	S...	G2..
%Plot-Zellen:	22.8	19.5	57.7	41.7	53.0	5.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	19.0	16.3	48.1	6.9	8.8	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	20.7	17.7	52.5	3.8	4.8	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	38007	%Real-Zellen =	83.4	%Orig-Zellen =	90.9
Zyklus 2 :	Zellzahl =	7581	%Real-Zellen =	16.6	%Orig-Zellen =	9.1
Zyklus 3 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 109.1				S/G1 - Ratio	=	5.96
%Growth-Fraction = 79.3				G2/G1 - Ratio	=	14.00
G2/GF = 0.662	G2./GF = 0.006			(S+G2)/G1 - Ratio	=	19.96
G2../GF = 0.000	G2.../GF = 0.000			δ G2	=	52.9%
δ G1 = 3.8%	δ S = 22.5%			δ G2/GF	=	0.668
S+S. = 22.5%	S+S.+S.. = 22.5%					

BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Histogramme des Probanden 5

Die beiden vorangegangenen Histogramme zeigen die Aufteilung der jeweiligen Zellzyklen der Lymphozytenkultur nach Inkubation für 72 Stunden, einmal ohne Zusatz von MMC (Abb. 3.5.4) und nach Zugabe von 50 ng/ml MMC (Abb. 3.5.5).

Abbildung 3.5.4:

Die Lymphozyten von Proband 5 zeigen ohne Zugabe eines Klastogens eine nur leicht reduzierte Stimulierbarkeit bezogen auf das Lebensalter (Growth-Fraction von 80,3% proliferierende Zellen). Es kommt zu einer spontanen Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase (25% Originalzellen im ersten Zellzyklus), was für die Diagnose FA typisch ist (Compartment G2: $\geq 15\%$ Originalzellen).

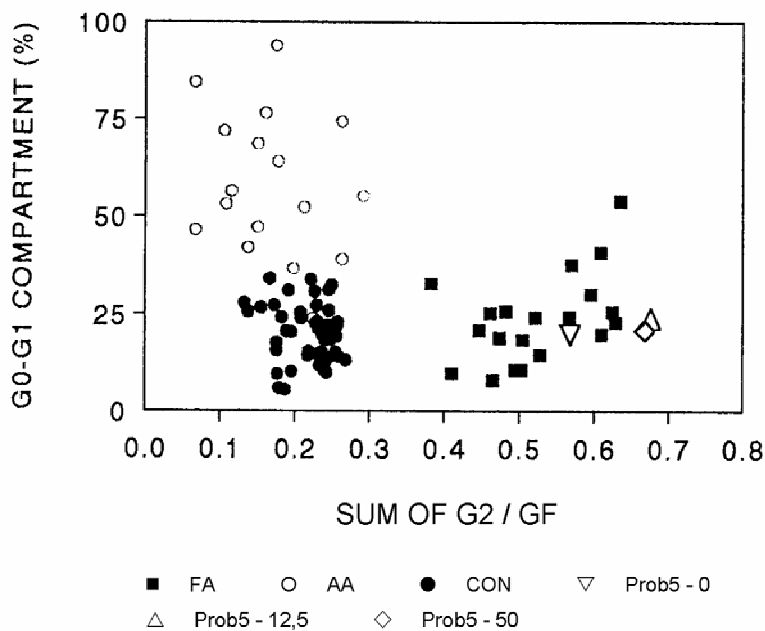
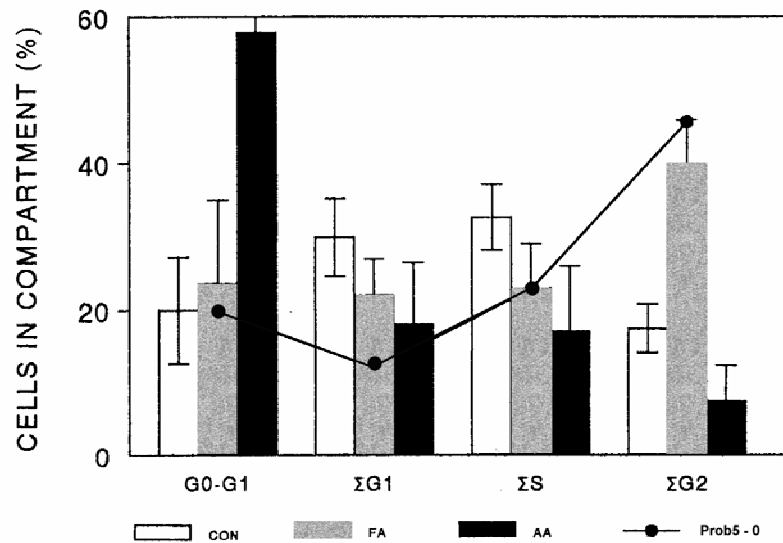
Betrachtet man die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction, fällt auch hier mit $\delta G2/GF: 0.568$ ein für FA-Patienten typisch erhöhter Wert auf (Normwert: $\delta G2/GF: \leq 0,3$, FA-typisch: $\geq 0,4$).

Abbildung 3.5.5:

Nach Zugabe von 50 ng/ml MMC nimmt die Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase deutlich auf 52,5% Originalzellen zu. Ebenso nimmt die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction ($\delta G2/GF: 0,668$) zu.

Abbildung 3.5.6:

Dargestellt ist die Verteilung der Zellen aller durchlaufenen Zellzyklen in den verschiedenen Compartments. Die Summe der G2-Fractionen ($\Sigma G2$) liegt bei Proband 5 deutlich im Bereich der FA-Patienten.

**Abbildung 3.5.7:**

Diese Graphik zeigt die Summe der G2-Phasen/Growth-Fraction von Proband 5 bei 0, 12,5 und 50 ng/ml MMC im Vergleich zu den unbehandelten Streuwerten von FA-Patienten, einer Gruppe von Patienten

mit aplastischer Anämie und einer Kontrollgruppe. Die Werte des Probanden 5 liegen bei sämtlichen MMC-Konzentrationen im Bereich der Gruppe der unbehandelten FA-Patienten.

3.6 Proband 6

Abb. 3.6.1

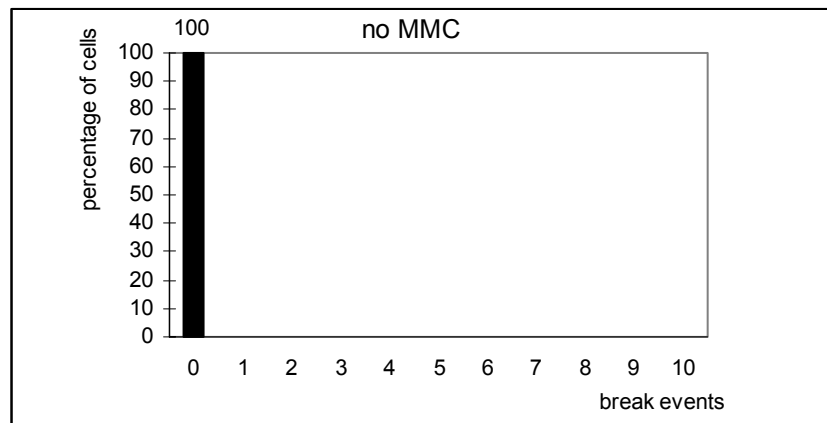


Abb. 3.6.2

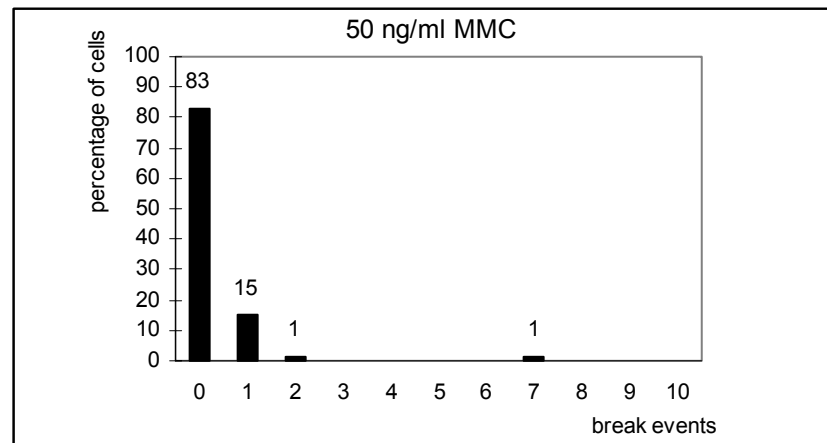
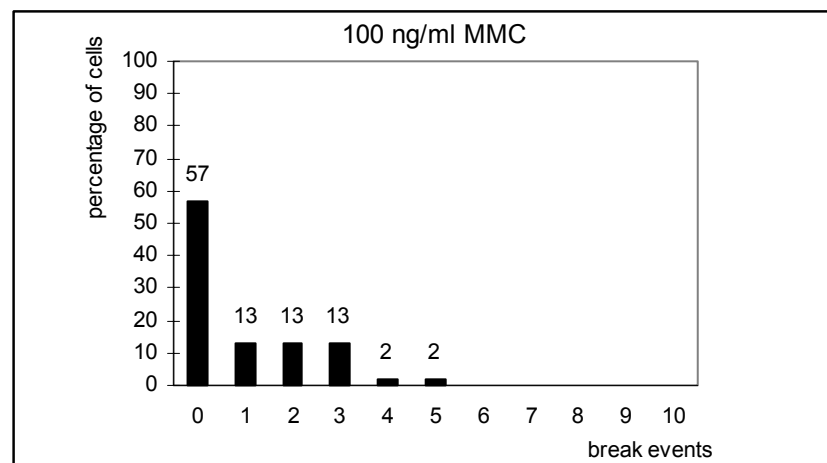


Abb. 3.6.3



Abbildungen 3.6.1-3.6.3:

Die Diagramme zeigen die Zusammenfassung der Chromosomenbruchanalyse der PHA-stimulierten Lymphozytenkultur nach 72 Stunden Inkubation, unter Zugabe von 0, 50 bzw. 100 ng/ml Mitomycin C (MMC). Es handelt sich bei Proband 6 um eine 46jährige Patientin, bei der eine Fanconi Anämie bestand.

Abbildung 3.6.1:

Bei Inkubation der Blutzellkultur ohne Zusatz des Klastogens MMC weist keine der ausgewerteten Metaphasen ein Bruchereignis auf.

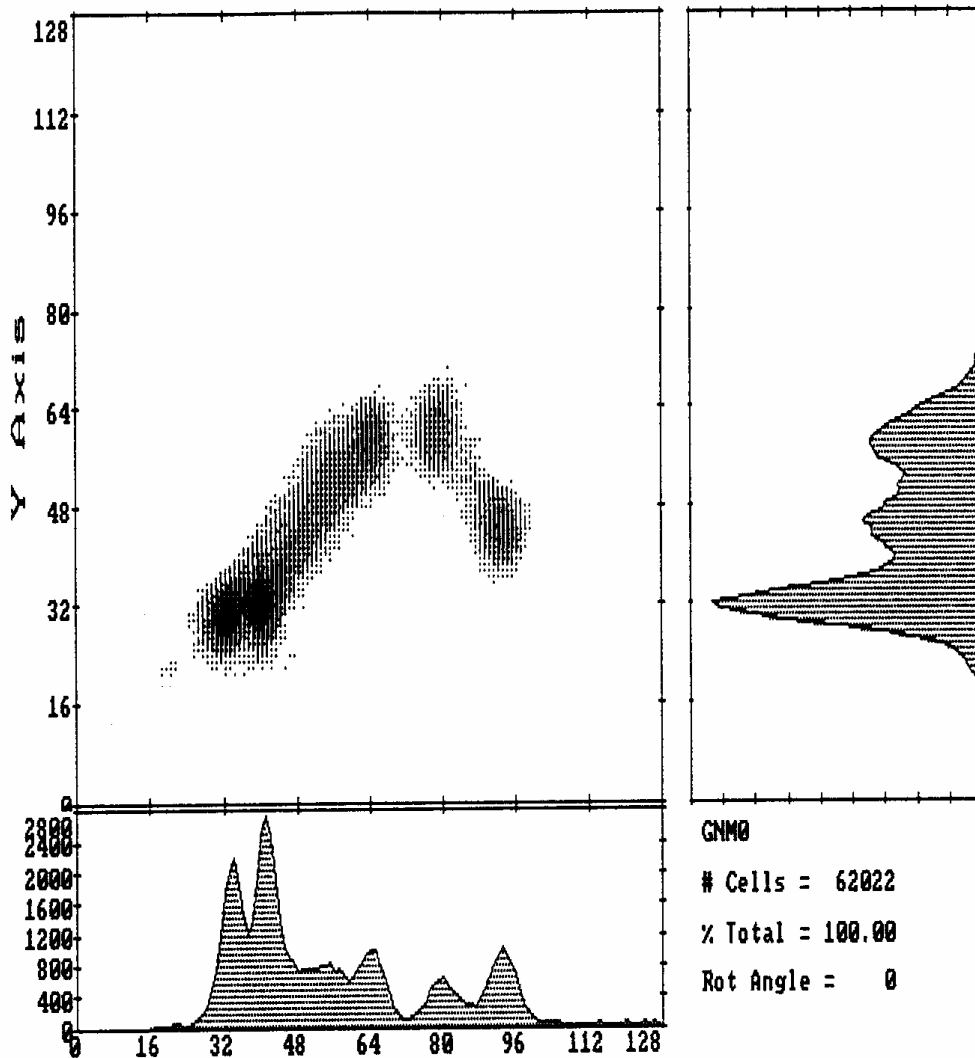
Abbildung 3.6.2:

Nach Inkubation der Blutzellkultur unter Zugabe von 50 ng/ml MMC treten in 83% der Metaphasen keine Bruchereignisse auf. Eine Metaphase zeigt sieben Bruchereignisse, die restlichen ausgewerteten Metaphasen weisen ein oder zwei Bruchereignisse auf.

Abbildung 3.6.3:

Wird die MMC-Konzentration auf 100 ng/ml erhöht, finden sich noch in 57% der Metaphasen keine Bruchereignisse. Die restlichen ausgewerteten Metaphasen weisen ein bis fünf Ereignisse auf. Metaphasen, die so stark geschädigt sind, dass eine Auszählung nicht mehr möglich ist (so genannte „Trümmerfelder“), zeigen sich nicht.

Abb. 3.6.4



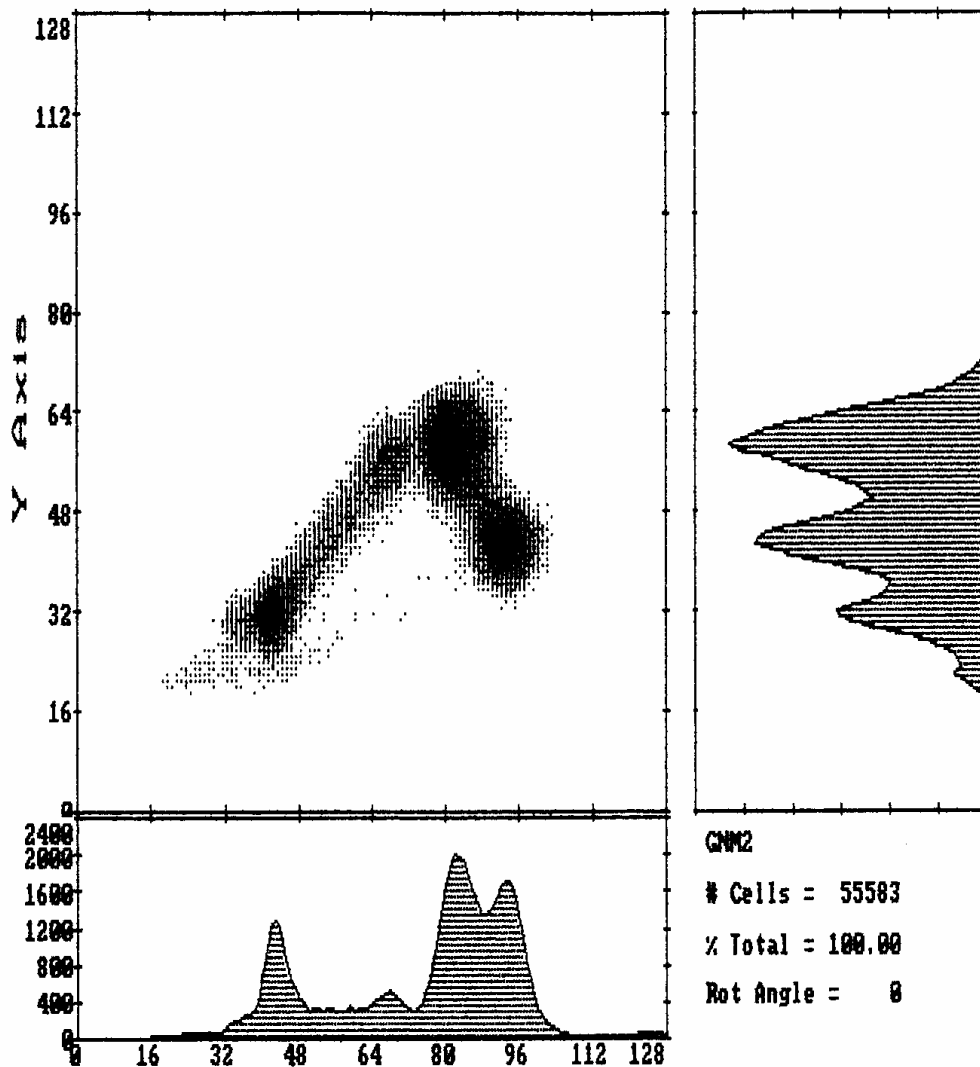
Filename : Proband 6 - 0

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2.
%Plot-Zellen:	46.7	23.2	30.1	42.4	35.1	22.5	50.5	36.7	13.1	100.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	9.5	4.7	6.1	18.8	15.6	10.0	16.9	12.3	4.4	1.7	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	18.6	9.2	12.0	18.4	15.2	9.8	8.3	6.0	2.1	0.4	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	12712	%Real-Zellen =	20.3	%Orig-Zellen =	39.8
Zyklus 2 :	Zellzahl =	27777	%Real-Zellen =	44.4	%Orig-Zellen =	43.5
Zyklus 3 :	Zellzahl =	20923	%Real-Zellen =	33.6	%Orig-Zellen =	16.4
Zyklus 4 :	Zellzahl =	1047	%Real-Zellen =	1.7	%Orig-Zellen =	0.4

%Increased Cells = 195.4		%Growth-Fraction = 81.4		S/G1 - Ratio	=	1.12
G2/GF	= 0.147	G2./GF	= 0.120	G2/G1 - Ratio	=	0.88
G2../GF	= 0.026	G2.../GF	= 0.000	(S+G2)/G1 - Ratio	=	2.01
σ G1	= 27.1%	σ S	= 30.5%	σ G2	=	23.9%
S+S.	= 24.5%	S+S.+S..	= 30.5%	σ G2/GF	=	0.293

Abb. 3.6.5



Filename : Proband 6 - 50

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2..
%Plot-Zellen:	31.8	22.5	45.7	42.1	43.1	14.8	93.0	6.0	1.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	21.4	15.1	30.7	12.8	13.1	4.5	2.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	25.7	18.2	37.0	7.7	7.9	2.7	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	35100	%Real-Zellen =	67.1	%Orig-Zellen =	80.9
Zyklus 2 :	Zellzahl =	15876	%Real-Zellen =	30.4	%Orig-Zellen =	18.3
Zyklus 3 :	Zellzahl =	1299	%Real-Zellen =	2.5	%Orig-Zellen =	0.7
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 120.6

%Growth-Fraction = 74.3

G2/GF = 0.498	G2./GF = 0.036	S/G1 - Ratio = 3.11
G2../GF = 0.000	G2.../GF = 0.000	G2/G1 - Ratio = 4.73
Σ G1 = 8.4%	Σ S = 26.1%	(S+G2)/G1 - Ratio = 7.84
S+S. = 26.1%	S+S.+S.. = 26.1%	Σ G2 = 39.7%
		Σ G2/GF = 0.535

BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Histogramme des Probanden 6

Die beiden vorangegangenen Histogramme zeigen die Aufteilung der jeweiligen Zellzyklen der Lymphozytenkultur nach Inkubation für 72 Stunden, einmal ohne Zusatz von MMC (Abb. 3.6.4) und nach Zugabe von 50 ng/ml MMC (Abb. 3.6.5).

Abbildung 3.6.4:

Die Lymphozyten von Proband 6 zeigen ohne Zugabe eines Klastogens eine normale Stimulierbarkeit bezogen auf das Lebensalter (Growth-Fraction von 81,4% proliferierende Zellen). Die Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus sind mit einem Wert von 12% Originalzellen im Normbereich (für die Diagnose FA typisch ist: Compartment G2: $\geq 15\%$ Originalzellen).

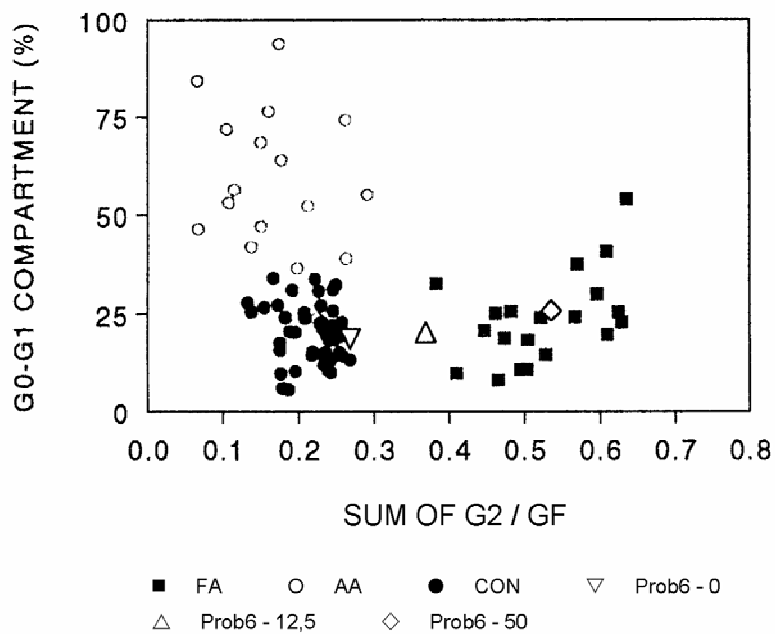
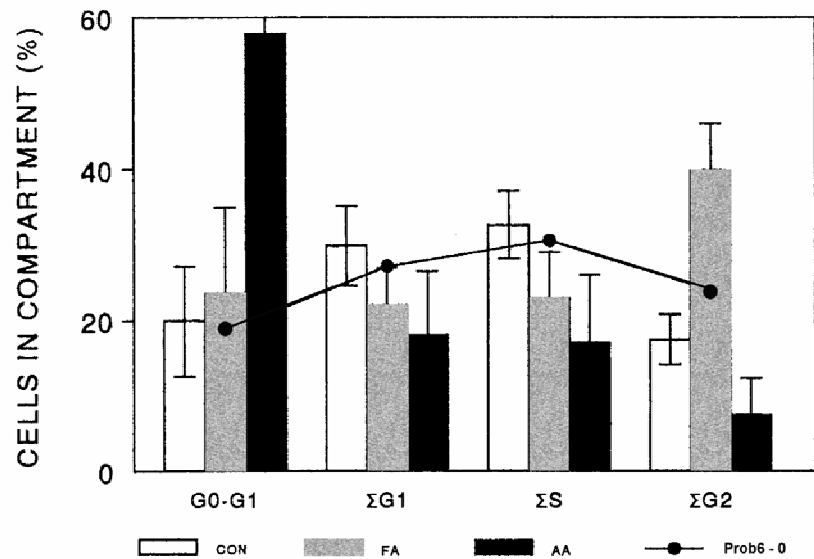
Betrachtet man die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction, liegen die Werte von Proband 6 auch hier mit $\delta G2/GF: 0.293$ im Bereich der oberen Norm (Normwert: $\delta G2/GF: \leq 0,3$, FA-typisch: $\geq 0,4$).

Abbildung 3.6.5:

Nach Zugabe von 50 ng/ml MMC zeigt sich eine Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase mit einem Wert von 37% Originalzellen. Deutlich wird dies auch bei Betrachtung der Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction ($\delta G2/GF: 0,535$).

Abbildung 3.6.6:

Dargestellt ist die Verteilung der Zellen aller durchlaufenen Zellzyklen in den verschiedenen Compartments. Die Summe der G2-Fractionen ($\Sigma G2$) von Proband 6 liegt knapp oberhalb der Kontrollgruppe.

**Abbildung 3.6.7:**

Diese Graphik zeigt die Summe der G2-Phasen/Growth-Fraction von Proband 6 bei 0, 12,5 und 50 ng/ml MMC im Vergleich zu den unbehandelten Streuwerten von FA-Patienten, einer Gruppe von Patienten

mit aplastischer Anämie und einer Kontrollgruppe. Die Werte von Proband 6 liegen erst bei einer Konzentration von 50 ng/ml MMC im Bereich der Gruppe der unbehandelten FA-Patienten.

3.7 Proband 7

Abb. 7.1

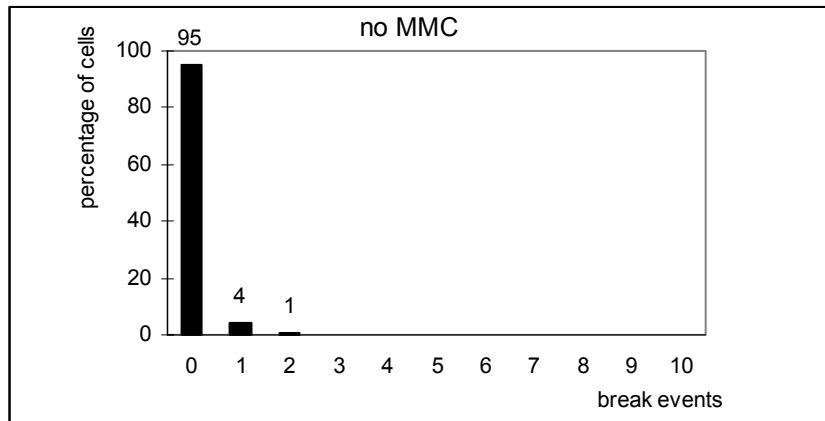


Abb. 7.2

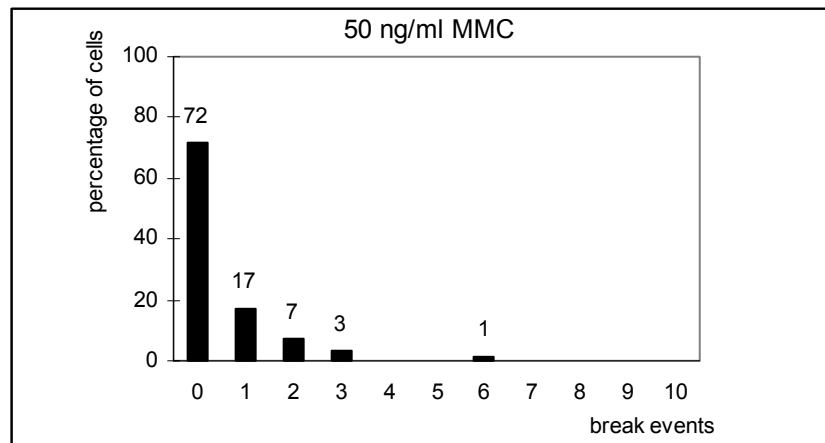
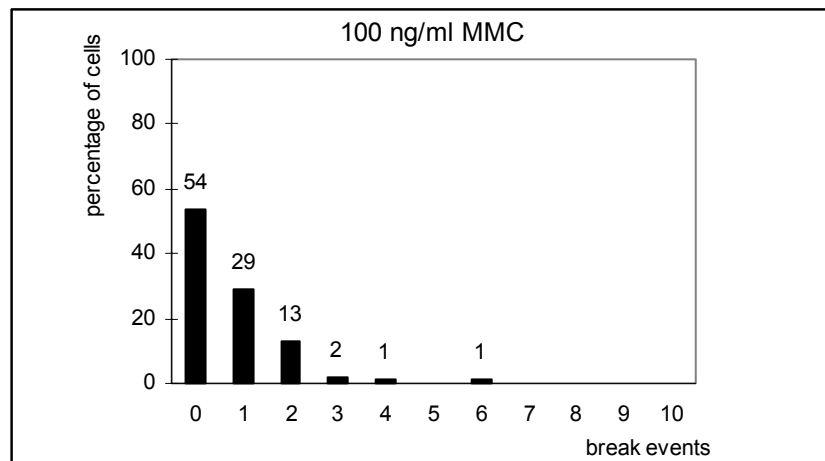


Abb. 7.3



Abbildungen 3.7.1-3.7.3:

Die Diagramme zeigen die Zusammenfassung der Chromosomenbruchanalyse der PHA-stimulierten Lymphozytenkultur nach 72 Stunden Inkubation, unter Zugabe von 0, 50 bzw. 100 ng/ml Mitomycin C (MMC). Es handelt sich bei Proband 7 um eine 18jährige Patientin, bei der die Diagnose Fanconi Anämie ausgeschlossen wurde.

Abbildung 3.7.1:

Bei Inkubation der Blutzellkultur ohne Zusatz des Klastogens MMC zeigen 95% der ausgewerteten Metaphasen keine, die restlichen 5% ein oder zwei Bruchereignisse.

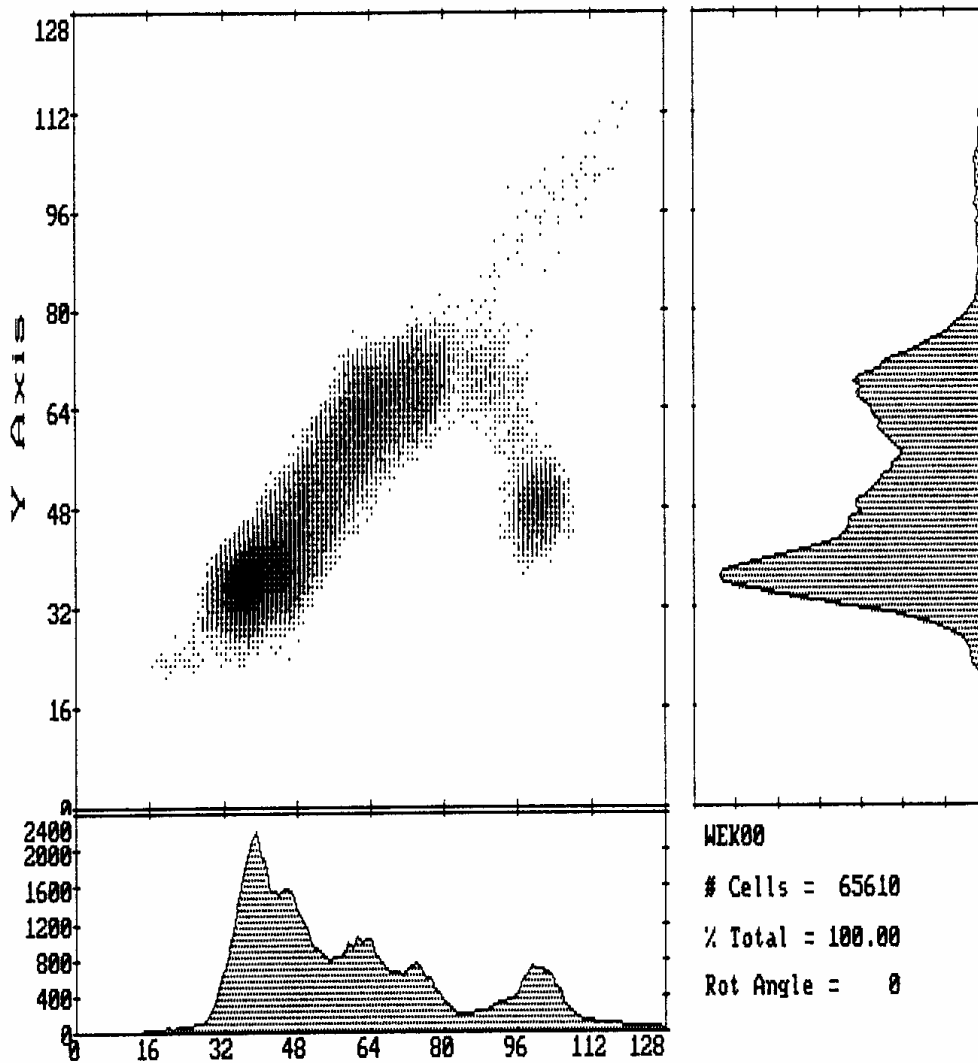
Abbildung 3.7.2:

Nach Inkubation der Blutzellkultur unter Zugabe von 50 ng/ml MMC treten in 72% der Metaphasen keine Bruchereignisse auf. Die restlichen ausgewerteten Metaphasen zeigen ein bis drei Bruchereignisse. Lediglich eine Metaphase weist 6 Ereignisse auf.

Abbildung 3.7.3:

Wird die MMC-Konzentration auf 100 ng/ml erhöht, finden sich noch in 54% der Metaphasen keine Bruchereignisse. Die restlichen ausgewerteten Metaphasen weisen ein bis sechs Ereignisse auf. Metaphasen, die so stark geschädigt sind, dass eine Auszählung nicht mehr möglich ist (so genannte „Trümmerfelder“), zeigen sich nicht.

Abb. 3.7.4



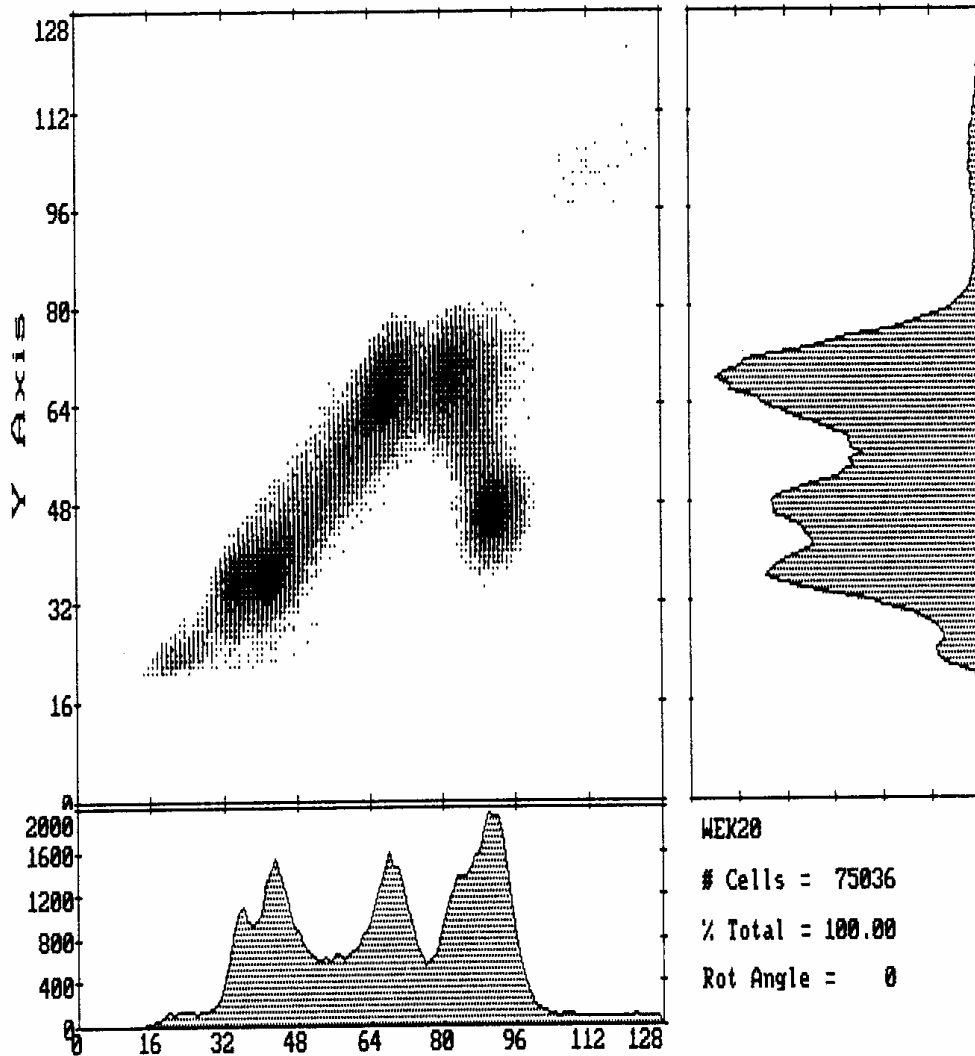
Filename : Proband 7 - 0

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2.
%Plot-Zellen:	57.3	27.0	15.7	40.7	35.8	23.5	41.2	44.4	14.4	78.3	21.3	0.4
%Real-Zellen:	7.0	3.3	1.9	13.8	12.1	7.9	19.8	21.3	6.9	4.6	1.3	0.0
%Orig-Zellen:	16.7	7.9	4.6	16.4	14.4	9.5	11.8	12.7	4.1	1.4	0.4	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	7483	%Real-Zellen =	12.2	%Orig-Zellen =	29.2
Zyklus 2 :	Zellzahl =	20696	%Real-Zellen =	33.8	%Orig-Zellen =	40.3
Zyklus 3 :	Zellzahl =	29448	%Real-Zellen =	48.1	%Orig-Zellen =	28.7
Zyklus 4 :	Zellzahl =	3627	%Real-Zellen =	5.9	%Orig-Zellen =	1.8

%Increased Cells = 238.8		S/G1 - Ratio = 1.20	
%Growth-Fraction = 83.3		G2/G1 - Ratio = 0.61	
G2/GF = 0.055	G2./GF = 0.114	(S+G2)/G1 - Ratio = 1.81	
G2../GF = 0.050	G2.../GF = 0.000	σ G2 = 18.2%	
σ G1 = 29.6%	σ S = 35.4%	σ G2/GF = 0.219	
S+S. = 22.3%	S+S.+S.. = 35.1%		

Abb. 3.7.5



Filename : Proband 7 - 50

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2..
%Plot-Zellen:	34.0	25.0	41.0	25.2	44.1	30.7	56.9	43.1	0.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	13.2	9.7	15.9	12.4	21.7	15.1	6.8	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	19.9	14.6	24.0	9.3	16.3	11.4	2.6	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	27370	%Real-Zellen =	38.8	%Orig-Zellen =	58.4
Zyklus 2 :	Zellzahl =	34701	%Real-Zellen =	49.2	%Orig-Zellen =	37.0
Zyklus 3 :	Zellzahl =	8454	%Real-Zellen =	12.0	%Orig-Zellen =	4.5
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 150.6				S/G1 - Ratio	=	2.76
%Growth-Fraction = 80.1				G2/G1 - Ratio	=	2.97
G2/GF	= 0.299	G2./GF	= 0.142	(S+G2)/G1 - Ratio	=	5.73
G2../GF	= 0.000	G2.../GF	= 0.000	δ G2	=	35.3%
δ G1	= 11.9%	δ S	= 32.9%	δ G2/GF	=	0.441
S+S.	= 30.9%	S+S.+S..	= 32.9%			

BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Histogramme des Probanden 7

Die beiden vorangegangenen Histogramme zeigen die Aufteilung der jeweiligen Zellzyklen der Lymphozytenkultur nach Inkubation für 72 Stunden, einmal ohne Zusatz von MMC (Abb. 3.7.4) und nach Zugabe von 50 ng/ml MMC (Abb. 3.7.5).

Abbildung 3.7.4:

Die Lymphozyten von Proband 7 zeigen ohne Zugabe eines Klastogens eine normale Stimulierbarkeit bezogen auf das Lebensalter (Growth-Fraction von 83,3% proliferierende Zellen). Die Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus sind mit einem Wert von 4,6% Originalzellen im Normbereich (für die Diagnose FA typisch ist: Compartment G2: $\geq 15\%$ Originalzellen).

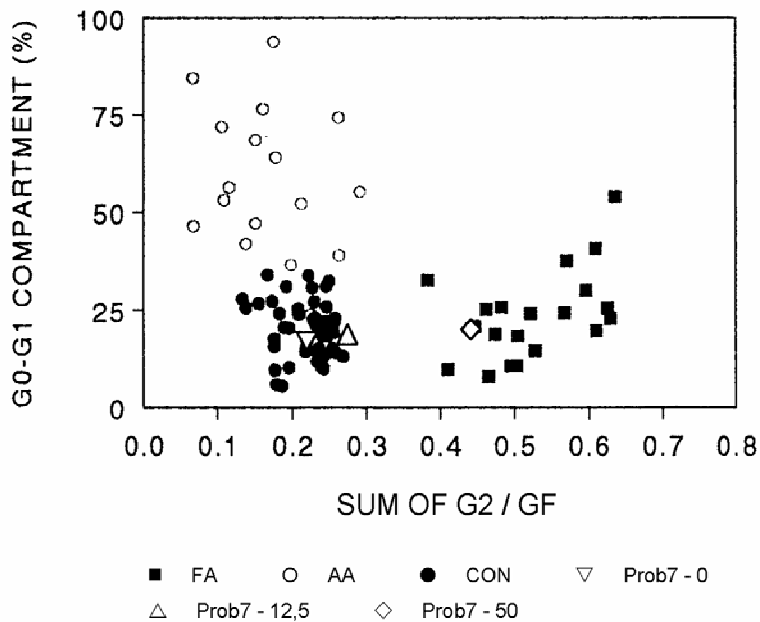
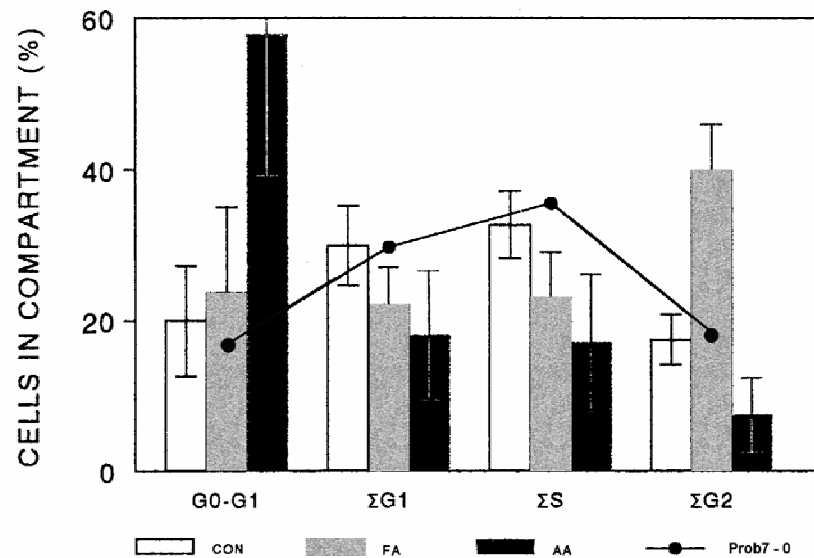
Betrachtet man die Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction, liegen die Werte von Proband 7 auch hier mit $\delta G2/GF: 0.219$ im Normbereich (Normwert: $\delta G2/GF: \leq 0,3$, FA-typisch: $\geq 0,4$).

Abbildung 3.7.5:

Nach Zugabe von 50 ng/ml MMC kommt es zu einem Anstieg im Kompartiment der G2-Phasen mit einem Wert von 24% Originalzellen im 1. Zellzyklus. Dies wird auch bei Betrachtung der Summe der G2-Phasen aller durchlaufenen Zellzyklen im Verhältnis zur Growth-Fraction deutlich: $\delta G2/GF: 0,441$ (Normwert bei unbehandelten Proben: $\delta G2/GF: \leq 0,3$, FA-typisch: $\geq 0,4$).

Abbildung 3.7.6:

Dargestellt ist die Verteilung der Zellen aller durchlaufenen Zellzyklen in den verschiedenen Compartments. Die Summe der G2-Fractionen ($\Sigma G2$) von Proband 7 liegt im Bereich der Kontrollgruppe.

**Abbildung 3.7.7:**

Diese Graphik zeigt die Summe der G2-Phasen/Growth-Fraction von Proband 7 bei 0, 12,5 und 50 ng/ml MMC im Vergleich zu den unbehandelten Streuwerten von FA-Patienten,

einer Gruppe von Patienten mit aplastischer Anämie und einer Kontrollgruppe. Die Werte von Proband 7 liegen erst bei einer Konzentration von 50 ng/ml MMC knapp im Bereich der Gruppe der unbehandelten FA-Patienten.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse der zytogenetischen Chromosomenbruchanalyse

Die Fanconi Anämie ist eine genetisch und phänotypisch heterogene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Sie ist vergesellschaftet mit chromosomaler Instabilität und Überempfindlichkeit gegenüber so genannten „DNA-Crosslinkern“, wie z.B. MMC und DEB (Sasaki und Tonumura, 1973). Diese Überempfindlichkeit ist ein entscheidendes Kriterium zur Sicherung der Diagnose einer Fanconi Anämie (Auerbach et al., 1989).

In dieser Arbeit wurden sechs klinisch und zytogenetisch bestätigte FA-Patienten zytogenetisch und durchflusszytometrisch untersucht (Probanden 1 bis 6). Zusätzlich wurden diese Untersuchungen bei einer Probandin durchgeführt, bei der initial der Verdacht auf eine FA bestand, jedoch mit Hilfe der Untersuchung von Fibroblastenkulturen definitiv ausgeschlossen werden konnte (Proband 7).

Die Chromosomenbruchanalyse einer PHA-stimulierten Lymphozytenkultur nach 72 Stunden (wie in Kap. 2.1 Material und Methoden beschrieben) zeigt bei FA-Patienten unter ansteigenden MMC-Konzentrationen eine deutliche Zunahme der Chromosomenbruchrate. Dieses typische Verhalten der Lymphozyten wird bei Betrachtung der Ergebnisse der Chromosomenbruchanalyse von Proband 1 deutlich (Kap. 3.1). Ohne Zugabe von MMC fallen in 22% der ausgewerteten Metaphasen ein oder zwei Bruchereignisse auf. Schon nach Zugabe von 50 ng/ml MMC treten in 62,5% der Metaphasen zehn oder mehr Bruchereignisse auf. Dabei ist die Mehrzahl so geschädigt, dass eine einzelne Auflistung der Aberrationen nicht mehr möglich ist. Wird die Dosis auf 100 ng/ml MMC erhöht finden sich nur noch Metaphasen mit zehn und

mehr Bruchereignissen. Dies bestätigt eindeutig die Diagnose Fanconi Anämie.

Im Vergleich dazu weisen bei Proband 7, bei einer Konzentration von 50 ng/ml MMC, nur 27% der Metaphasen ein bis drei Bruchereignisse und 1% der Metaphasen sechs Bruchereignisse auf. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml MMC sind noch 54% der Metaphasen völlig intakt. Ein Chromosomensatz mit zehn oder mehr Bruchereignissen ist nicht zu finden. Dies spricht gegen die Diagnose Fanconi Anämie.

Betrachtet man nun im Vergleich dazu die Probanden 3 und 4, fällt auf, dass sich bei einer Konzentration von 50 ng/ml MMC noch einige Metaphasen mit wenigen oder keinen Bruchereignissen finden. Selbst bei einer Konzentration von 100 ng/ml MMC lassen sich noch solche Metaphasen finden. Sie unterscheiden sich somit bezüglich der Überempfindlichkeit gegenüber dem „Crosslinker“ MMC von Proband 1, obwohl es sich in allen drei Fällen um Patienten mit der Diagnose Fanconi Anämie handelt. Bei Proband 4 scheint die verminderte Chromosomenbrüchigkeit etwas ausgeprägter als bei Proband 3 zu sein.

Am eindrucklichsten tritt diese offensichtlich verminderte Überempfindlichkeit gegenüber MMC bei Proband 5 auf. Bei einer Konzentration von 50 ng/ml MMC liegen noch 79% der Metaphasen unter einer Bruchrate von zehn Ereignissen, 8% zeigen keine Aberrationen. Auch nach Zugabe von 100 ng/ml MMC sind in 24% der Metaphasen weniger als zehn Chromosomenbrüche zu finden, 1% ist völlig intakt. Dies lässt eine Bimodalität der Lymphozyten in der Anfälligkeit gegenüber MMC vermuten.

Die Lymphozytenkulturen von Proband 2 sind schwierig einzuordnen. Bei einer Konzentration von 50 ng/ml MMC liegen noch 23% der ausgewerteten Metaphasen unter einer Bruchrate von zehn Ereignissen. Auch finden sich in

1% noch Metaphasen, die komplett intakt sind. Erhöht man jedoch die Konzentration auf 100 ng/ml MMC, so ist eine Beurteilung nicht mehr möglich. Bei dieser Konzentration ist nur minimal Zellmaterial gewachsen, so dass eine Auswertung nicht möglich ist. Die Anwesenheit von MMC bewirkt folglich eine starke Wachstumshemmung, die eventuell mit dem geringen Alter von Proband 2 zum Untersuchungszeitpunkt (3 Monate) zusammenhängt.

Bei Proband 6 handelt es sich um eine Patientin, bei der schon vor Jahren die Diagnose Fanconi Anämie gestellt wurde. Bei der zytogenetischen Chromosomenuntersuchung zum aktuellen Untersuchungszeitpunkt zeigt sich allerdings ein völlig untypisches Verhalten der Chromosomen unter dem Einfluss von MMC. Bei einer Konzentration von 50 ng/ml sind 83% der Metaphasen völlig intakt, die restlichen weisen ein oder zwei, in einem Fall sieben Chromosomenbrüche auf. Selbst bei einer Konzentration von 100 ng/ml MMC finden sich keine Metaphasen mit zehn oder mehr Bruchereignissen. Die peripheren Lymphozyten von Proband 6 verhalten sich somit nahezu unauffällig gegenüber ansteigenden Konzentrationen des „Crosslinkers“ MMC. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Fibroblastenkulturen des Probanden 6 eine erhöhte MMC-Sensitivität aufwiesen, muss der nahezu normale zytogenetische und durchflusszytometrische Befund als Ausdruck eines im peripheren Blut kompletten Mosaikstatus interpretiert werden. Ohne die differentialdiagnostische Untersuchung der Fibroblasten hätte die Diagnose FA bei diesem Probanden weder zytogenetisch noch durchflusszytometrisch bestätigt werden können.

4.2 Mosaizismus bei Fanconi Anämie

Nach Auswertung der Chromosomenbrüche besteht der Verdacht, dass sich die Chromosomen der Blutlymphozyten der Probanden 3 bis 5 nicht homogen bezüglich ihrer Anfälligkeit gegenüber MMC verhalten. Es liegt die Ver-

mutung nahe, dass eine Mischung von MMC-sensiblen und MMC-resistenten Lymphozyten im peripheren Blut vorliegt, eine so genannte Mosaik-Konstellation besteht. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es auf der Ebene der Lymphozytenvorläuferzellen eines FA-Patienten während der Zellteilung zu einer Veränderung im Bereich des mutierten FA-Gens gekommen ist und diese zu einer Korrektur des mutierten FA-Gens führt. Alle aus diesem Zellklon entstandenen Lymphozyten wären somit heterozygot bezüglich dem Merkmal Fanconi Anämie. Dieser Vorgang wird als „reverse mosaicism“ bezeichnet (Lo Ten Foe et al., 1997).

Kommt es zu einer Korrektur auf einer frühen Stufe der lymphozytären Vorläuferzellen oder womöglich einer hämatopoetischen Stammzelle kann daraus ein Zellklon entstehen, der heterozygot bezüglich des Merkmals „Fanconi Anämie“ ist. Nimmt man an, dass bei dieser entstandenen Subpopulation ein Wachstumsvorteil gegenüber der homozygoten, erkrankten Zellen besteht (Hirschhorn et al., 1996; Stephan et al., 1996), könnte dies nach einer gewissen Zeit dazu führen, dass im peripheren Blut nur noch unauffällig (bezüglich der Chromosomenbrüchigkeit) erscheinende Lymphozyten zu finden sind.

In der Arbeit von Lo Ten Foe et al. (1997) wird über solch einen Verlauf bei einem FA-Patienten berichtet. Im Alter von einem Monat wurde bei diesem Patienten Fanconi Anämie diagnostiziert. Es fiel bereits nach drei Jahren ein untypisches Wachstumsverhalten der Lymphozytenkulturen unter dem Einfluss von alkylierenden Substanzen auf (Kwee et al., 1983). Als nach 12 Jahren eine Komplementationsanalyse durchgeführt werden sollte, war dies aufgrund einer neu aufgetretenen MMC-Resistenz der Lymphoblasten nicht mehr möglich. In der daraufhin durchgeführten Chromosomenbruchanalyse waren bei einer Konzentration von 100 ng/ml MMC nur in weniger als 10% der Zellen zehn oder mehr Bruchereignisse zu finden. Es lag die Schlussfolgerung nahe, dass bei dem Patienten ein phänotypisch revertierter Zellklon einer pluripotenten Knochenmarkszelle entstanden ist, der aufgrund des

Wachstumsvorteils die erkrankten Vorläuferzellen verdrängt hat, so dass im peripheren Blut nahezu alle MMC-sensiblen Lymphozyten durch MMC-resistente Lymphozyten ersetzt worden sind. Um dies zu verifizieren, wurde die DNA von Lymphoblasten und Fibroblasten des Patienten mit Hilfe eines X-chromosomalen Markers mittels PCR verglichen. Dabei bestätigte sich, dass die Lymphoblasten im Gegensatz zu den Fibroblasten monoklonalen Ursprungs waren und somit alle aus einem korrigierten Zellklon stammten.

4.3 Intragenes Crossover und Genkonversion als Ursache der Mosaik-Bildung bei Fanconi Anämie

Treten im peripheren Blut eines FA-Patienten phänotypisch korrigierte Lymphozyten auf, muss es während der Mitose einer hämatopoetischen Vorläuferzelle zur Korrektur des betroffenen Gens gekommen sein. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Theorie des intragenen, somatischen Crossover. Dieser Mechanismus wurde bereits beim Bloom-Syndrom beschrieben (Ellis et al., 1995). Voraussetzung dafür ist das Vorliegen einer so genannten „Compound-Heterozygotie“. Das bedeutet, dass bei einer rezessiv vererbten Erkrankung der mütterlicherseits vererbte Gendefekt nicht dem des väterlicherseits vererbten entspricht. Der betroffene Patient trägt somit zwei erkrankte Gene auf beiden Allelen, der Defekt liegt aber jeweils an einer anderen Stelle. Kommt es nun während der Mitose zu einem Crossover, so dass beide Gendefekte auf einem Allel zu liegen kommen, entsteht ein unverändertes Wildtyp-Allel. Die daraus hervorgehenden Zellen sind somit mit einem korrigierten, heterozygoten Chromosomensatz ausgestattet (siehe Abb. 4.1).

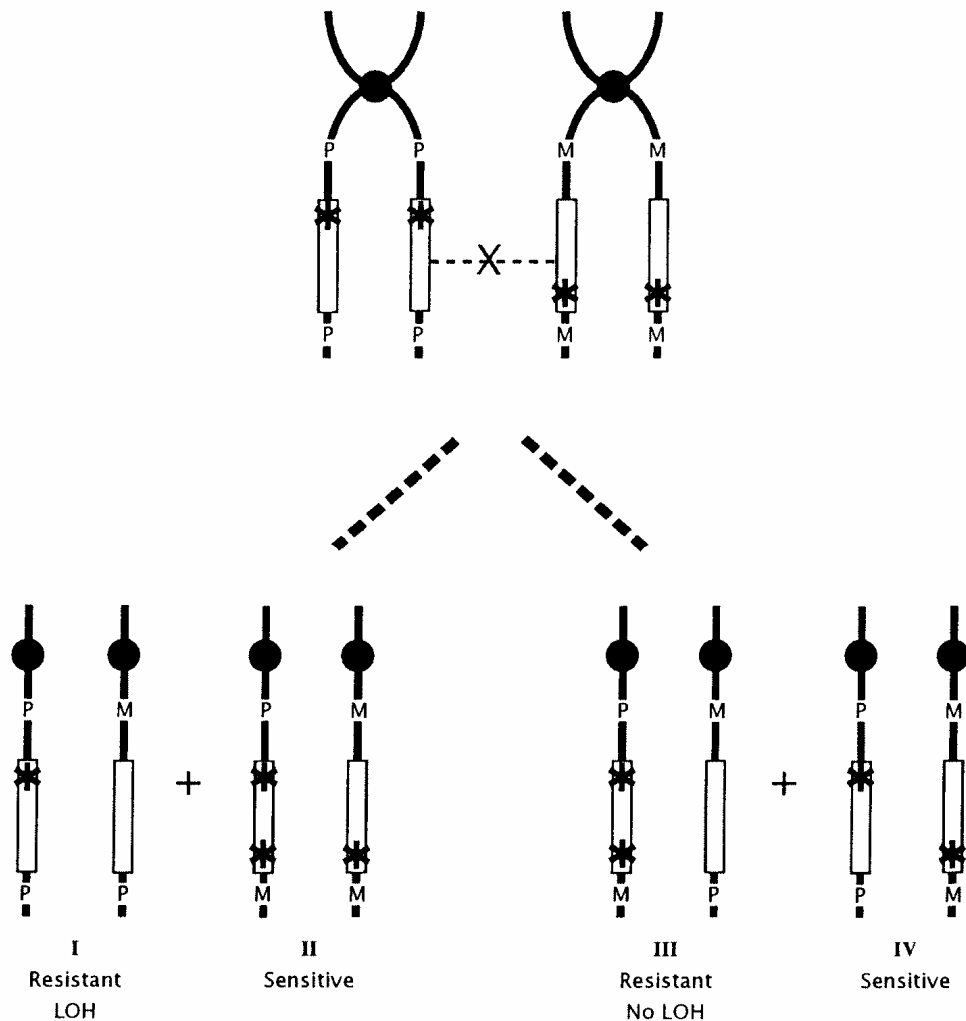


Abb. 4.1 (modifiziert nach einer Abbildung von Lo Ten Foe et al., 1997): Dargestellt ist der Mechanismus des intragenen Crossover. Der betroffene Genort (vertikales Kästchen) liegt unterhalb des Centromers (●). Der Ort der beiden Mutationen ist als Stern (*) markiert. Die Chromatiden sind jeweils mit M = Maternal und P = Paternal gekennzeichnet. In den Tochterzellen (untere Reihe) kam es durch Crossover in den Fällen I und III zum Verlust der Mutationen auf einem Allel, was zur Resistenz gegenüber MMC führt. Bezüglich Markern, die distal des Genorts ansetzen, resultiert im Fall I ein Verlust der Heterozygotie (LOH = loss of heterozygosity), Im Fall III bleibt diese erhalten.

Das Phänomen des intragenen Crossover wird in der Arbeit von Lo Ten Foe (1997) beschrieben. Ein FA-Patient der Komplementationsgruppe C war bereits als „Compound Heterozygoter“ identifiziert. Die Mutationen lagen im Exon 1 (Mutation 322delG; Strathdee et al., 1992 und Verlander et al., 1994) und Exon 14 (Mutation 1806insA; Lo Ten Foe et al., 1996) des Chromosoms 9. Die untersuchten Fibroblasten zeigten eine MMC-Sensibilität, während die EBV-immortalisierten lymphoblastoiden Zellen MMC-resistent waren.

In den folgenden Hybridisierungsversuchen wurden Hybride aus den MMC-resistenten, lymphoblastoiden Zellen und Hamsterzellen, sowie aus Fibroblasten und Hamsterzellen hergestellt. In den Lymphoblasten/Hamster-Hybriden konnte ein Chromosom 9 ohne die beiden Mutationen nachgewiesen werden, was für das Vorliegen eines FA-C Wildtyp-Allels sprach. Anschließend konnte mittels Haplotypen-Analyse die intragene Rekombination in den Lymphoblasten/Hamster-Hybriden nachgewiesen werden, die zur Bildung des Wildtyp-Allels führte.

In derselben Arbeit wird von zwei weiteren FA-Patienten berichtet, die ebenfalls als „Compound-Heterozygote“ bekannt waren und bei denen eine MMC-Resistenz vorlag. Die Mutationen lagen ebenfalls im Exon 1 (wie oben) und Exon 14 (Mutation L554P; Dokal et al., 1996). Bei der Untersuchung der MMC-resistenten Lymphoblasten konnte im Bereich des Exon 1 keine Mutation mehr nachgewiesen werden. Geht man vom Mechanismus des intragenen Crossover aus, müsste, wie in Abbildung 4.1 beschrieben, der Fall 1 vorliegen. Es wäre durch die intragene Rekombination der Verlust der Heterozygotie (für Marker distal des Gens) zu erwarten. In den durchgeführten Untersuchungen konnte dieser aber nicht bestätigt werden. Es lag eine Heterozygotie vor. Somit ist ein intragenes Crossover als Korrekturmechanismus auszuschließen und von einer Genkonversion auszugehen.

Wie bereits erwähnt könnte ein Wachstumsvorteil der korrigierten Zellen gegenüber den erkrankten Zellen dazu führen, dass über die Zeit ein komplett korrigierter Phänotyp entsteht. In einer Arbeit von M. Gross et al. (2003) wird

beschrieben, dass eine Korrektur auf einer relativ frühen Stufe des hämatopoetischen Systems, womöglich im Bereich einer hämatopoetischen Stammzelle, möglich ist. Bei einem FANCA-Patienten konnte eine Compound-Heterozygotie durch Mutationsanalyse der Fibroblasten nachgewiesen werden. Die DNA-Sequenzierung aus den MMC-resistenten Lymphoblasten und peripheren mononukleären Blutzellen zeigte eine Rückkehr zum Wildtyp-Allel. Dies spiegelte sich in der Normalisierung der Chromosomenbrüchigkeit wider. Der Patient wurde über einen Zeitraum von vier Jahren beobachtet. Es kam klinisch neben einem Anstieg der Leukozyten auch zum Anstieg der Thrombozyten und des Hämoglobin-Wertes. Es liegt somit die Schlussfolgerung nahe, dass es zu einer Korrektur im Bereich einer gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzelle aller drei Zellreihen gekommen ist.

Bei rezessiv vererbten Erkrankungen führt die Korrektur (somatische Reversion) einer der beiden vererbten Mutationen wieder zur Heterozygotie in den Abkömmlingen der korrigierten Zelle. Abhängig vom entsprechenden Korrekturmechanismus kann die Funktion der betroffenen Zelllinien auch nur teilweise wiederhergestellt werden.

Es wird vermutet, dass eine komplette Wiederherstellung des Phänotyps auf Mechanismen wie intragener Rekombination, Genkonversion oder Rückmutation beruht (Gross et al., 2003). Partielle Wiederherstellung einer Proteinfunktion wurde hingegen bei so genannten Kompensationsmutationen („second site“-Mutationen) beobachtet. Dabei bleibt die verursachende Mutation unverändert. Die unterhalb der Mutation gelegene DNA wird jedoch durch Insertion, Deletion oder Punktmutation so verändert, dass als Produkt ein Protein mit zumindest partieller Funktion entsteht (Waisfisz et al., 1999).

4.4 Vergleich von Chromosomenbruchanalyse und BrdU/Hoechst-Durchflusszytometrie

Bei allen Probanden wurde zusätzlich zur Chromosomenbruchanalyse eine Analyse des Zellzyklus mittels BrdU/Hoechst-Durchflusszytometrie durchgeführt (Poot et al., 1994 und Seyschab et al., 1995). Die geringe Ausbeute an mitotischen Zellen bei FA-Patienten stellt oft ein Problem bei der zytogenetischen Chromosomenbruchanalyse dar. Dies ist bei der durchflusszytometrischen Untersuchung weniger ausschlaggebend und ein entscheidender Vorteil dieser Methode.

In dieser Arbeit wurden die PHA-wachstumsstimulierten Zellkulturen ohne Zusatz von MMC und mit 12,5 und 50 ng/ml MMC über 72 Stunden inkubiert. Auf die Zugabe von 100 ng/ml MMC wurde verzichtet, da dann die Proliferation der FA-Zellen zu stark blockiert und eine Auswertung kaum mehr möglich ist.

Bei FA-Patienten kommt es zu einer spontanen Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase. Typisch ist ein Anteil von $\geq 15\%$ Originalzellen im Kompartiment G2. Verstärkt wird dieser Effekt durch die Zugabe von MMC. Die Zellzyklusblockierung in der G2-Phase wird auch bei Betrachtung der Summe aller G2-Phasen im Verhältnis zur gesamten Wachstumsfraktion ($\Sigma G2/GF$) deutlich. Hier ist bei FA-Patienten ein Wert von $>0,4$ typisch. In Abbildung 4.2 wird dies veranschaulicht. Dargestellt sind die Werte der 72 Stunden-Lymphozytenkultur der Probanden 1 bis 7 ohne Zugabe von MMC im Vergleich zu den unbehandelten Streuwerten von FA-Patienten und einer Kontrollgruppe. Die Probanden 1, 3, 4 und 5 liegen deutlich im Bereich der Gruppe der FA-Patienten, Proband 7 im Bereich der Kontrollgruppe. Aufgrund der Chromosomenbruchanalyse hätte man vermuten können, dass sich die Probanden 3 bis 5 bei der Zellzyklusanalyse ähnlich indifferent verhalten und sich eher zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der FA-Patienten einordnen. Dies ist allerdings nur bei Proband 2 und 6 zu sehen,

wobei die Auswertung der Chromosomenbruchanalyse bei Proband 2, wie oben beschrieben, erschwert war. Im Fall von Proband 6 bestätigt die Zellzyklusanalyse das Ergebnis der Chromosomenbruchanalyse. Dies lässt eine Mosaik-Konstellation in „fortgeschrittenem Stadium“ vermuten und annehmen, dass der Zellklon der korrigierten Zellen bereits überwiegt. Erst bei einer Konzentration von 50 ng/ml MMC verhalten sich die Zellen dieses Probanden (mit einem Wert von $\Sigma G2/GF$: 0,535; vgl. Abb. 3.6.5) wie die Zellen von FA-Patienten ohne Zugabe von MMC.

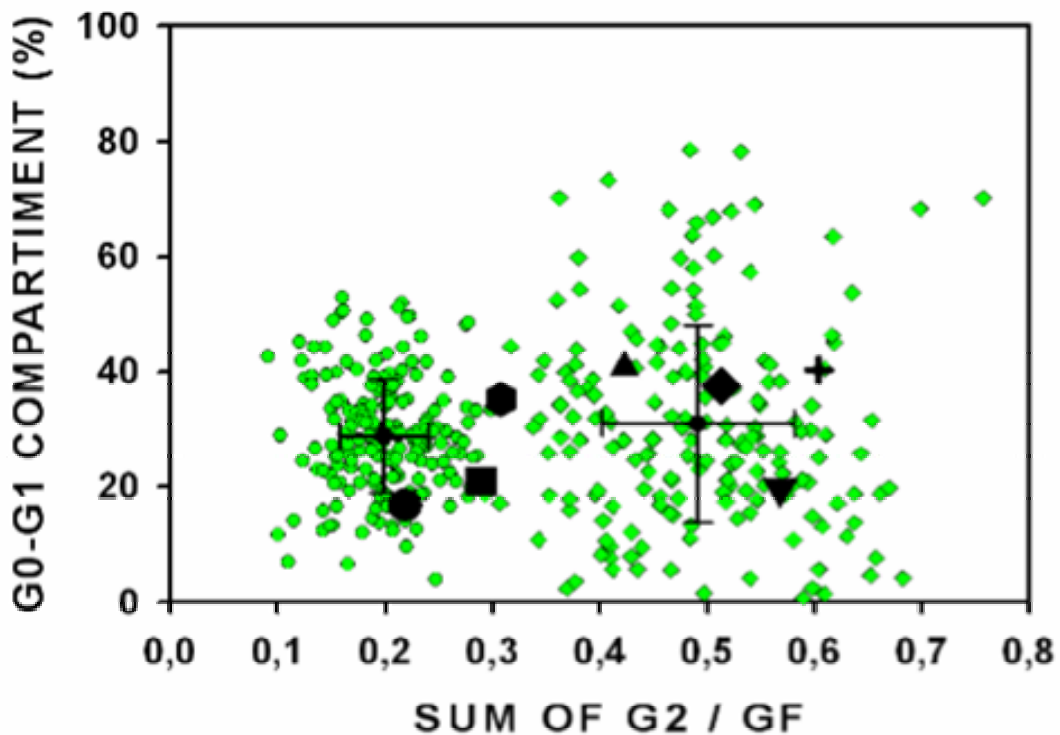


Abb. 4.2: Summe der G2-Phasen/Growth Fraction gegenüber dem Anteil im G0-G1 Kompartiment der Probanden 1-7 ohne Zugabe von MMC im Vergleich zu den unbehandelten Streuwerten von FA-Patienten (kleine Quadrate rechts) und einer Kontrollgruppe (kleine Kreise links).

◆ = Proband 1, ● = Proband 2, + = Proband 3, ▲ = Proband 4,
▼ = Proband 5, ■ = Proband 6, ● = Proband 7

Betrachtet man die Mosaik-Bildung als zeitlichen Ablauf, ist festzuhalten, dass diese in einem frühen Stadium nur schwer in der Zellzyklusanalyse nachzuweisen ist. Die Erfassung eines Mosaizismus mittels Chromosomenbruchanalyse scheint hierbei sensibler zu sein. Es ist andererseits die Frage, ob die zytogenetische Chromosomenbruchanalyse nicht falsch positive Werte bezüglich des Auftretens eines Mosaizismus liefert und dadurch zu häufig das Vorhandensein eines Mosaiks in einem frühen Stadium diagnostiziert wird. Es ist daher sicherlich sinnvoll, die zytogenetische und durchflusszytometrische Untersuchung zu wiederholen. Bestand bei der zytogenetischen Erstuntersuchung der Verdacht auf Mosaizismus, müsste sich dies in der Kontrolle der Chromosomenbrüchigkeit im weiteren Verlauf eindeutig bestätigen und im Folgenden auch in der Zellzyklusanalyse in Erscheinung treten.

4.5 Klinische Relevanz

Mosaizismus im Bereich der somatischen Zellen als Ergebnis der Selbstkorrektur kann bedeutende klinische Konsequenzen haben. Im Falle der Fanconi Anämie kann die klonale Ausdehnung der korrigierten Knochenmarkstammzellen oder frühen Vorläuferzellen zu einer kompletten Umkehr des erkrankten Phänotyps im peripheren Blut führen. Dies bedeutet einerseits, dass die Diagnosesicherung durch Untersuchung der Lymphozyten nicht mehr möglich ist und andere Körperzellen, wie z.B. Fibroblasten, untersucht werden müssen (Joenje et al., 1998). Andererseits kann das Auftreten eines Mosaizismus zumindest bei einigen FA-Patienten den natürlichen Krankheitsverlauf mildern und sogar verbessern (Lo Ten Foe et al., 1997). In diesem positiven Zusammenhang gesehen, mag es gerechtfertigt sein, von „natürlicher Gentherapie“ zu sprechen (Youssofian, 1996).

Die Prognose der Fanconi Anämie ist abhängig vom Fortschreiten des Knochenmarkversagens und dem ansteigenden Neoplasierisiko. In vorausge-

gangenen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Komplementationsgruppen bzw. den einzelnen Mutationen und dem Schweregrad bzw. dem Verlauf der Erkrankung besteht (Faivre et al., 2000). So verläuft z.B. die Panzytopenie bei FA-Patienten der Gruppe G im Vergleich zu den anderen Gruppen meist schwerer. Auch das Risiko, eine AML oder ein MDS zu entwickeln, ist bei diesen Patienten höher. Außerdem konnte aufgezeigt werden, dass die Prognose von FA-Patienten nach Durchführung einer Stammzelltransplantation (unverwandter Fremdsponder) abhängig vom Ausmaß der körperlichen Fehlbildungen ist. Weiterhin wurde festgestellt, dass eine Stammzelltransplantation die beste Prognose hat, wenn sie in jüngerem Alter und vor Auftreten schwerer hämatologischer Komplikationen durchgeführt wird (Gluckman et al., 1995). Es wurde deshalb zur Festlegung der Therapieindikation gefordert, verschiedene Risikogruppen zu definieren, wobei z.B. die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Komplementationsgruppe oder die Art der einzelnen Mutation eine Rolle spielt.

Das Vorhandensein eines Mosaizismus sollte bei der Einteilung in verschiedene Risikogruppen ebenfalls berücksichtigt werden. Geht man davon aus, dass bei Patienten mit ausgeprägtem Mosaizismus eine gewisse Potenz zur Selbstkorrektur im Bereich des hämatopoetischen Systems besteht, sollte in diesen Fällen ein eher abwartendes Regime empfohlen werden. Durch die frühzeitige Einleitung einer Knochenmarks- bzw. Stammzelltransplantation würde die Möglichkeit zur Selbstkorrektur verhindert werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs FA-Patienten und eine Patientin, bei der eine Fanconi Anämie ausgeschlossen wurde, auf das Vorhandensein eines Mosaizismus untersucht. Dabei wurde bei allen Patienten eine zytogenetische Chromosomenbruchanalyse durchgeführt und die Ergebnisse mit den Daten der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse verglichen. Bei einer FA-Patientin konnte weder in der Chromosomenbruchanalyse noch in der Zellzyklusanalyse das Vorhandensein eines Mosaizismus nachgewiesen werden. Bei drei FA-Patienten gab es in der Auswertung der Metaphasen auf Chromosomenbrüchigkeit den Hinweis auf das Vorliegen einer Mosaik-Konstellation, wobei dies in einem Fall (Proband 5) besonders ausgeprägt war. Die Zellzyklusanalyse konnte das Vorhandensein eines Mosaizismus jedoch in allen drei Fällen nicht bestätigen. Bei einer FA-Patientin zeigten sich die Chromosomen in der Chromosomenbruchanalyse nahezu unauffällig. Die erfolgreiche und komplette Selbstkorrektur spiegelte sich auch eindeutig in der Zellzyklusanalyse wider.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die zytogenetische Chromosomenbruchanalyse zum Nachweis eines Mosaizismus besser geeignet ist als die Zellzyklusanalyse, da sie eine höhere Sensitivität zu haben scheint. Um eine definitive Aussage sowohl über die Sensitivität, als auch die Spezifität beider Untersuchungen machen zu können, ist es nötig FA-Patienten im Verlauf mehrmals zu untersuchen. Dabei müsste sowohl eine Chromosomenbruchanalyse als auch eine Durchflusszytometrie durchgeführt werden und die Ergebnisse dann mit dem klinischen Befinden bzw. den Blutwerten (Hämatokrit/Hämoglobinwert, Leukozyten- und Thrombozytenzahl) verglichen werden. Da das Vorhandensein eines Mosaizismus Konsequenzen für die Diagnose und eventuell Therapiefestlegung hat, erscheinen weitere Untersuchungen diesbezüglich sinnvoll.

6. Literaturverzeichnis

Alter BP (1993) Fanconi Anaemia and its Variability. Annotation, British Journal of Haematology 85: 9-14

Auerbach AD, Sagi M, Adler B (1985) Fanconi anemia: prenatal diagnosis in 30 fetuses at risk. Pediatrics 76: 794-800

Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth T (1989) International Fanconi Anaemia Registry: First report; in Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G, eds. (1989) Fanconi Anemia; Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects. Springer-Verlag: 3-12

Berger R, Le Coniat M, Gendron MC (1993) Fanconi anemia. Chromosome breakage and cell cycle studies. Cancer Genet Cytogenet 69: 13-16

Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD (1994) Hematologic Abnormalities in Fanconi Anemia: An International Fanconi Anemia Registry Study. Blood 84: 1650-1655

Dean PN, Jett JH (1974) Mathematical analysis of DNA distributions derived from microfluorometry. J Cell Biol 60: 523-527

De-Kerviller E, Guermazi A, Zagdanski AM, Gluckman E, Frija J (2000) The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia. Clin-Radiol. 55: 340-345

Digweed M (1999) Molekulare Grundlagen der Fanconi-Anämie. Klin. Pädiatr. 211: 192-197

Dokal I, Chase A, Morgan NV, Coulthard S, Hall G, Mathew CG, Roberts I (1996) Positive diepoxybutane test in only one of two brothers found to be compound heterozygotes for Fanconi's anaemia complementation group C mutations. *Br J Haematol* 93: 813-816

Ellis NA, Lennon DJ, Proytcheva M, Alhadeff B, Henderson EE, German J (1995) Somatic intragenic recombination within the mutated locus BLM can correct the high sister-chromatid exchange phenotype of Bloom syndrome cells. *Am J Hum Genet* 57: 1019-1027

Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee ML, van Weel-Sipman M, Havenga C, Morgan N, de Winter J, Digweed M, Savoia A, Pronk J, de Ravel T, Jansen S, Joenje H, Gluckman E, Mathew CG (2000) Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood* 96: 4064-4070

Fanconi G (1927) Familiäre infantile perniziösartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrb. Kinderheilkd.* 117: 257-280

Giampetro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC, Pavlakis SG, Davis JG, Auerbach AD (1993) The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the international Fanconi anemia registry. *Pediatrics* 91: 1116-1120

Glanz A, Fraser FC (1982) Spectrum of anomalies in Fanconi anemia. *J Med Gene* 19: 412-416

Gluckman E, Auerbach AD, Horowitz MM, et al. (1995) Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Blood* 86: 2856-2862

Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H (2002) Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* 98: 126-135

Harshman KD, Devan PB (1985) Molecular recognition of β -DNA by Hoechst 33258. *Nucleic Acids Research* 43: 4825

Hirschhorn R, Yang DR, Puck JM, Huie ML, Jiang C-K, Kurlandsky EL (1996) Spontaneous in vivo reversion to normal of an inherited mutation in a patient adenosine deaminase deficiency. *Nature Genet* 13: 290-295

Hoehn H, Kubbies M, Schindler D, Poot M, Rabinovitch PS (1989) BrdU-Hoechst flow cytometry links the cell kinetic defect of Fanconi anaemia to oxygen hypersensitivity. In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G, eds. *Fanconi Anemia; Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects*. Berlin: Springer-Verlag 162-173

Joenje H, Awert F, Kwee ML, Madan K, Hoehn H (1998) Confounding factors in the diagnosis of Fanconi anemia. *Am J med Genet* 79: 403-405

Joenje H, Levitus M, Waisfisz Q, D'Andrea A, Garcia-Higuera I, Pearson T, van Berkel CG, Rooimans MA, Morgan N, Mathew CG, Arwert F (2000) Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. *Am J Hum Genet* 67: 759-762

Kubbies M, Rabinovitch PS (1983) Flow cytometric analysis of factors which influence the BrdU/Hoechst quenching effect in cultivated human fibroblasts and lymphocytes. *Cytometry* 3: 276-81

Kubbies M, Hoehn H, Schindler D, Chen YC, Rabinovitch PS (1989) Cell cycle analysis via BrdU/Hoechst flow cytometry: Principles and applications. In: Yen A (ed) Flow Cytometry: Advanced research and clinical applications. Vol. II . CRC Press, Inc., Boca Raton Florida, pp 5-28

Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Rabinovitch PS (1985) Cell cycle kinetics by BrdU/Hoechst flow cytometry: An alternativ to the differential metaphase labeling technique. Cell Tissue Kinet 18: 551-562

Kwee ML, Poll EHA, Van der Kamp JJP, De Koning H, Eriksson AW, Joenje H (1983) Unusual response to bifunctional alkylating agents in a case of Fanconi anaemia. Hum Genet 64: 384-387

Latt SA (1973) Microfluorometric detection of DNA synthesis in human metaphase chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3395

Latt SA (1977) Fluorometric detection of DNA synthesis: possibilities for interfacing BrdU dye technique with flow fluorometry. J. Histochem. Cytochem 25: 913

Latt SA, George YS, Gray JW (1977) Flow cytometric analysis of BrdU-substituted cells stained with 33258 Hoechst. J. Histochem. Cytochem. 25: 927

Latt SA, Langlois RG (1990) Fluorescent probes of DNA microstructure and DNA synthesis. In: Flow cytometry and Sorting, Wiley-Liss: 249

Latt SA, Wohlleb JC (1975) Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin and metaphase chromosomes. Chromosoma 52: 297

Le Pecq JB, Paoletti C (1967) A fluorescent complex between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.* 27: 87

Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJP, van Weel M, Pauli RM, Shahidi NT, Dokal I, Roberts I, Altay C, Gluckman E, Gibson RA, Mathew CG, Arwert F, Joenje H (1997) Somatic Mosaicism in Fanconi Anemia: Molecular Basis and Clinical Significance *Eur J Hum Genet* 5: 137-148

Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Joenje H, Arwert F (1996) A novel frameshift mutation (1806insA) in exon 14 of the Fanconi anemia gene, FAC. *Hum Mutat* 7: 264-265

Poot M, Hoehn H, Kubbies M, Grossmann A, Chen Y, Rabinovitch PS (1994): Cell-cycle analysis using continuous bromodeoxyuridine labeling and Hoechst 33358-ethidium bromide bivariate flow cytometry. *Methods Cell Biol* 41: 327-340

Rabinovitch PS, Kubbies M, Chen YC, Schindler D, Hoehn H (1988) BrdU/Hoechst flow cytometry: A unique tool for quantitative cell cycle analysis. *Exp. Cell Res.* 174:309-18

Rabinovitch PS (1983) Regulation of human fibroblast growth rate by both noncycling cell fraction and transition probability is shown by growth in 5-bromodeoxyuridine followed by Hoechst 33258 flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2951-55

Sasaki MS, Tonomura A (1973) A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res.* 33: 1829-1836

Schindler D, Kubbies M, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS (1985) Presymptomatic diagnosis of Fanconi's anaemia. *Lancet* i: 937

Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G, eds. (1989) *Fanconi Anemia; Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects*. Springer-Verlag

Seyschab H, Höhn H, (1992) *Methodenprotokoll: Zellzyklus-Test: Diagnostik von endogen oder exogen bedingten Proliferationsstörungen*. Institut für Humangenetik, Universität Würzburg

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

Smith S, Marx MP, Jordaan CJ, Niekerk CH (1989) Clinical Aspects of a Cluster of 42 Patients in South Africa with Fanconi Anemia. In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G, eds. (1989) *Fanconi Anemia; Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects*. Springer-Verlag: 34-46

Stephan V, Wahn V, le Deist F, Dirksen U, Broker B, Muller-Fleckenstein I, Horneff G, Schrotten H, Fischer A, de Saint Basile G (1996) Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T-cells. *New Engl J Med* 335: 1563-1567

Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M (1992) Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet* 1: 196-8

Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M (1992) Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 356: 763-767

Tischkowitz MD, Hodgson SV (2003) Fanconi anaemia. *J Med Genet.* 40(1): 1-10 Review

Verlander PC, Lin JD, Udono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG, Auerbach AD (1994) Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *Am J Hum Genet* 54: 595-601

Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CG, Hoatlin M, Ianzano L, Gibson RA, Arwert F, Savoia A, Mathew CG, Pronk J, Joenje H (1999) Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi anemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nature Genet* 22: 379-383

Wijker M, Morgan NV, Herterich S, van Berkel CG, Tipping AJ, Gross HJ, Gille JJ, Pals G, Savino M, Altay C, Mohan S, Dokal I, Cavenagh J, Marsh J, van Weel M, Ortega JJ, Schuler D, Samochatova E, Karwacki M, Bekassy AN, Abecasis M, Ebell W, Kwee ML, de Ravel T, et al. (1999) Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Hum Genet* 7: 52-59

Young NS, Alter BP (1994) Clinical features of Fanconi anemia. In: *Aplastic Anemia Acquired and Inherited*. WB Saunders: 275-309

Youssoufian H (1996) Natural gene therapy and the Darwinian legacy. *Nature Genet* 13: 255-256

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Höhn möchte ich für die Überlassung des Themas, ganz besonders aber für die unkomplizierte und kompetente Betreuung danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn R. Friedl für die Unterstützung bei der Durchflusszytometrie und Überlassung der durchflusszytometrischen Daten sowie bei Fr. G. Emmert für die Hilfe bei den Zellkulturen bedanken.

Für die Einführung in die zytogenetische Chromosomenbruchanalyse danke ich Fr. A. Hörning, Fr. U. Wolf und Herrn Dr. W. Feichtinger. Fr. G. Hesse danke ich für die schnelle und professionelle Entwicklung der Fotos.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn R. Dietrich und der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe bedanken, die es mir ermöglichten, mehrmals an den Fanconi-Anämie-Familientreffen und den internationalen, wissenschaftlichen Workshops teilzunehmen.

Ein besonderer Dank gebührt Fr. Dr. K. Raff für die mühevollen Korrektur meiner Arbeit.

An dieser Stelle gilt mein ganz persönlicher Dank meinen Eltern Margret und Wilhelm Stimmler, die mir mein Studium ermöglichten und mich stets unterstützten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname	Stimmler
Vorname	Patrick Wilhelm
Geburtsdatum	08. April 1973
Geburtsort	Sulz/N
Eltern	Margret Stimmler, geborene Schäfer und Wilhelm Stimmler

Schulbildung

09/79–07/83	Grundschule Horb/N
09/83–07/92	Martin-Gerbert-Gymnasium, Horb/N

Zivildienst

09/92–11/93	Haus Clemens von Galen, Wohn- heim für geistig und mehrfach behin- derte Frauen und Männer, Caritas- verband Stuttgart
12/93–03/94	Tätigkeit als Heilerziehungshelfer, Haus Clemens von Galen, Stuttgart

Hochschulausbildung

05/94–05/01	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/00–03/01	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Würzburg und am Kantonalen Spital Grabs, Schweiz

Prüfungen

09/96	Ärztliche Vorprüfung
08/97	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/00	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/01	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

Seit 06/01	Arzt im Praktikum und anschließend Assistenzarzt an der Universitätsfrauenklinik Regensburg am Caritas-Krankenhaus St. Josef, Klinikdirektor Prof. Dr. med. O. Ortmann
12/02	Approbation als Arzt

Regensburg, März 2004