

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

ZELLZYKLUSDIAGNOSTIK BEI FANCONI ANÄMIE

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

vorgelegt von
Carolin Orlitsch
aus München

Würzburg, Juni 2002

Referent: Prof. Dr. H. Höhn

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. D. Schindler

Dekan: Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2003

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

	Seite
1.1. Klinisches Bild der Fanconi Anämie	1
1.2. Hämatologischer Befund	2
1.3. Labordiagnostik	3
1.3.1. Chromosomenbruchanalyse – Metaphasenanalyse	
1.3.2. Zellzyklusanalyse – Durchflußzytometrie	
1.3.3. Komplementationsgruppentest	
1.3.4. Molekulargenetische Analyse	
1.4. Therapiemöglichkeiten	6
1.4.1. Knochenmarkstransplantation	
1.4.2. Medikamentöse Therapie	
1.4.3. Supportive Maßnahmen	
1.4.4. Gentherapie	
1.5. Aufgabenstellung	11

2. Material und Methoden

2.1	Patienten, welche im Jahr 1999 mit der Fragestellung Fanconi Anämie an das Institut überwiesen wurden	12
2.2	Lymphozytenisolierung und Zellkultur	12
2.3	Durchflußzytometrie (BrdU / Hoechst)	13
2.3.1	Messtechnik	13
2.3.1.1	Impulszytometer	
2.3.1.2	Datenerfassung und Datenspeicherung	
2.3.2	BrdU / Hoechst – Quench Effekt	14
2.3.3	Datenanalyse	15

3. Ergebnisse

3.1	Zellzyklusveränderungen nach MMC – Behandlung; Vergleich zu FA Patienten	17
3.2	Statistische Auswertung der Zellzyklusveränderungen	19
3.3	Wirkung von MMC auf die G2 Phasen Fraktionen bei FA Patienten	23
3.4	Spezifische Kasuistiken	25
3.4.1	Transplantationspatienten	
3.4.2	Zellzyklusbefunde und MMC Zytotoxizitätstest bei einem FA Patienten mit akuter myeloischer Leukämie	

4. Diskussion

4.1 Vergleich zwischen Chromosomenanalyse und Zellzyklusanalyse 29

4.2 Ergebnisse der Diagnostik 1999 31

4.3 Spezifische Kasuistiken 33

4.4 Problematik der Durchflußzytometrie bei Leukämie 35

5. Literaturverzeichnis 37

6. Anhang 43

1. Einleitung

1.1 Klinisches Bild der Fanconi Anämie

Die Fanconi Anämie (FA) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die erstmals im Jahre 1927 beschrieben wurde. (Fanconi G, 1927) Sie führt zu einer vollständigen Depression des Knochenmarks, welche zumeist bereits im Kindesalter manifest wird. Deshalb wird sie auch als genuine Form der Aplastischen Anämie bezeichnet.

Desweiteren treten bei etwa 50% der Patienten eine Reihe von angeborenen Fehlbildungen auf. (Seyshab et al, 1995)

Die breite klinische Variabilität der Symptome erschwert die Diagnosestellung.

Häufig vorgefundene Fehlbildungen sind die Folgenden:

- ☞☞ Wachstumsretardierung (eine große Mehrheit der FA Patienten befindet sich unter der 3. Perzentilenkurve der Größe)
- ☞☞ Skelettanomalien (v.a. Daumen- und Radiushypoplasie, Aplasie oder Anomalien; bei 20% der Patienten sind Hüfte, Wirbelsäule und Rippen verändert angelegt)
- ☞☞ Nierenfehlbildungen (eine Hufeisenniere oder das Fehlen der Nierenanlage treten bei 25% der FA Patienten auf)
- ☞☞ Hyperpigmentierung der Haut (Café au lait Flecken, diffuse Hyperpigmentierung an Abdomen, Genitale und Beugen v.a. im Nacken)
- ☞☞ Mikrocephalie, Mikrophthalmie
- ☞☞ Geistige Retardierung (z.T. auch Lernschwierigkeiten ohne geistige Retardierung)
- ☞☞ Geringes Geburtsgewicht, Gedeihstörungen
- ☞☞ Gastrointestinale Fehlbildungen (z.T. lebensbedrohlich und daher sofort zu operieren)
- ☞☞ Hypogonadismus (v.a. bei männlichen FA Patienten liegt häufig ein Hypogonadismus vor)
- ☞☞ Herzfehler (v.a. Septumdefekte)

(Alter BP, 1993; Glanz A, 1982; Dawson JP, 1955)

Außerdem ist bei FA Patienten eine gesteigerte Inzidenz von Malignomen zu verzeichnen, vor allem myeloische Leukämien (Inzidenz 10-15%) und spinozelluläre Karzinome (Ösophagus, Leber) treten vermehrt auf. (Digweed M, 1999)

Das tatsächliche Risiko einer malignen Erkrankung ist nicht genau bestimmbar und könnte noch weit höher liegen. Viele Patienten sterben bereits aufgrund myeloischer Komplikationen, noch ehe sich ein Malignom entwickeln konnte. (Butturini A et al, 1994)

1.2 Hämatologischer Befund

Anhand eines Blutbildes wird die Zahl der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten bestimmt um eine beginnende Knochenmarksinsuffizienz möglichst früh zu erkennen. Bei vielen FA Patienten ist die Thrombozytopenie die erste zu messende Größe die sich klinisch in Petechien, Zahnfleisch- und Nasenbluten zeigt. Eine Leukopenie, vor allem die Granulozytopenie mit einhergehenden Infekten, Fieber, Nekrosen oder Mykosen, und schließlich die Anämie die sich als Schwäche, Blässe und Müdigkeit zeigt, sollen möglichst früh erkannt werden. Dazu dienen regelmäßige Blutbildkontrollen. (Fanconi G, 1967; Alter BP et al, 1991; Daneshbod-Skibba G et al, 1980)

Als weiterführende Diagnostik dient die Knochenmarkspunktion oder die Knochenmarksbiopsie. (Butturini A, 1994)

Eine schwere aplastische Anämie zeigt folgende Befunde:

- ☞☞ aplastisches, bioptisch leeres Knochenmark
- ☞☞ Granulozyten < 500/mcl
- ☞☞ Thrombozyten < 20000/mcl
- ☞☞ Anämie und Retikulozytopenie

1.3 Labordiagnostik

1.3.1 Chromosomenbruchanalyse – Metaphasenanalyse

Zur Darstellung der Chromosomen wird die Mitose in T- Lymphozyten durch Zusatz von Kolchizin im Stadium der Metaphase gestoppt und das Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden verhindert. Durch Zusatz von Kalium-Chlorid-Lösung wird das Chromatin zum Quellen gebracht und anschließend mit einem Gemisch aus Eisessig und Methanol fixiert. Die so präparierten Lymphozyten werden auf Objektträger aufgetropft und können unter dem Mikroskop beurteilt werden.

Bei FA Patienten sind charakteristische Chromatidbrüche und Reunionsfiguren in Lymphozyten- Chromosomen zu finden, die erst Jahre nach der ersten Beschreibung der Krankheit durch Fanconi 1927 entdeckt wurden. Die Chromosomenbrüchigkeit wird erstmals 1964 beschrieben. (Schroeder T et al, 1964)

Nach Behandlung der Zellen mit Mitomycin C (MMC) sind in etwa 40% der Metaphasen in FA Zellen beschädigt, 10-fach erhöht gegenüber gesunden Individuen. Auch ohne eine mutagene Behandlung sind Chromosomenbrüche in bis zu 25% der Lymphozyten eines FA Patienten zu beobachten.
(Digweed M, 1999)

1.3.2 Zellzyklusanalyse – Durchflußzytometrie

Lymphozyten aus heparinisiertem Vollblut des Patienten werden mit PTH stimuliert und 72 Stunden kultiviert. Durch das zweidimensionale Meßverfahren der BrdU/Hoechst – EB Technik (siehe 2.3. Durchflußzytometrie) können Aussagen über den reellen DNS Gehalt der Zellen gemacht werden. (Rabinovitch PS et al, 1988) Drei komplette aufeinanderfolgende Zellzyklen werden dargestellt und können in die einzelnen Kompartimente aufgeteilt werden.

Als typisch für Zellen von FA Patienten hat sich eine Störung im Durchlaufen des Zellzyklus erwiesen, die sich in einem G2 Phasen Arrest zeigt. (Kubbies M et al, 1985)

1.3.3 Komplementationsgruppentest

Derzeit sind 7 verschiedene Komplementationsgruppen beschrieben: FA-A bis FA-G, das heißt mindestens 7 verschiedene Gene können zur FA führen. Die Identifikation von vier Genen hat bereits stattgefunden. (FANCA, FANCC, FANCF und FANCG) Zwei weitere FA Gene wurden bereits gemapped (FANCD, FANCE).

(de Winter JP et al, 2000; Joenje H et al, 1997)

Momentan werden verschiedene Wege angewandt um Patienten einer Komplementationsgruppe zuzuordnen:

☞☞ Durch funktionelle Komplementation der Patienten Zellen kann der Nachweis der Heterogenität geführt werden. Dies geschieht entweder durch die Fusion verschiedener FA Zellen und anschließender Selektion der proliferierenden Hybride oder durch retroviralen Gentransfer. Zellen die sich nicht komplementieren gehören derselben Komplementationsgruppe an.

☞☞ Durch Analyse der Gensequenzen auf Lokalisation und Art der Mutationen erhält man Auskunft über die Zugehörigkeit zu einer Komplementationsgruppe der bereits geklonten Gene FANCA, FANCC, FANCF und FANCG.

(Dirksen U, 1999; Joenje H et al,1995; Joenje H et al, 1997)

1.3.4 Molekulargenetische Analyse

Erst vier der FA Gene sind bisher identifiziert worden, jedoch konnten bereits fünf der sieben FA Komplementationsgruppen auf ein Chromosom lokalisiert werden.

(Digweed M, 1999)

- ☞☞ Gruppe A auf Chromosom 16q24.3
- ☞☞ Gruppe C auf Chromosom 9q22.3
- ☞☞ Gruppe D auf Chromosom 3p22-26
- ☞☞ Gruppe E auf Chromosom 6p21-22
- ☞☞ Gruppe G auf Chromosom 9p13

Für drei der bereits geklonten Gene wurden genaue Analysen ihrer Mutationen durchgeführt.

Mutationen in dem FANCA- Gen werden bei 66% der FA Patienten gefunden. (Savino M et al, 1997; Wijker M et al, 1999) Das Gen ist in 43 Exons unterteilt und kodiert für ein 163 kDa Protein. Aufgrund der Fülle der gefundenen Mutationen, hauptsächlich Deletionen, ist es kaum möglich, Aussagen bezüglich der Genotyp- Phänotyp- Korrelation zu machen. Die Heterogenität der Mutationen und die Größe des FANCA- Gens erschweren die Mutationsanalyse für diagnostische Zwecke.

Komplementationsgruppe C Patienten machen etwa 15% aus. (Verlander PC et al, 1994) Das FANCC- Gen ist in 14 Exons unterteilt und kodiert für ein 65 kDa Protein. 10 verschiedene Mutationen sind bis jetzt gefunden worden. Die zwei häufigsten Mutationen zeigen gute Korrelation zum Phänotyp, IVS4+4A>T geht mit ausgeprägten Fehlbildungen und frühem Knochenmarksversagen einher, 322delG zeigt deutlich mildere Krankheitsverläufe.(Gillio AP et al, 1997; Yamashita T et al, 1996)

Das FANCG- Gen besteht aus 14 Exons und kodiert für ein 70 kDa Protein. In FAG Patienten sind bis jetzt 7 Mutationen identifiziert. (de Winter JP et al, 1998) Eine eindeutige Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp kann nicht gefunden werden. Jedoch ist auffallend, daß Patienten der Gruppe G keine Skelettfehlbildungen aufweisen – die zu geringen Patientenzahlen lassen allerdings keine sicheren Aussagen zu.

1.4. Therapiemöglichkeiten

1.4.1 Knochenmarkstransplantation

Die Knochenmarkstransplantation (KMT) ist zum jetzigen Zeitpunkt die einzige Methode um FA Patienten vor ihrer aplastischen Anämie zu bewahren und das Risiko eines myelodysplastischen Syndroms oder einer Leukämie auszuschalten. (Gluckman E, 1996; Gluckman E, 1993)

Eine erfolgreiche Knochenmarkstransplantation ist entscheidend von der Qualität des Spenders abhängig. Die HLA Kompatibilität von Spender und Empfänger müssen entsprechend geprüft werden wobei das beste Ergebnis bei Geschwisterspendern (HLA matched sibling) zu erwarten ist. (Guardiola P et al, 1998; Socie G et al, 1993)

Vor der Transplantation muß das Knochenmark des Empfängers zerstört werden. Durch ein Conditioning Regimen, welches die Dosen an Zytostatika und Bestrahlung vorsieht, wird versucht die graft Reaktion zu unterdrücken. Je nach Verfassung des Patienten, der HLA Übereinstimmung zwischen Empfänger und Spender, und weiteren Faktoren wie einer bestehenden Myelodysplasie oder einer Leukämie muß ein entsprechend angepaßtes, mehr oder weniger aggressives Conditioning stattfinden. Dennoch sind die Dosierungen weitaus geringer als sie bei nicht FA Patienten vor Knochenmarkstransplantationen angewendet werden. (Flowers M et al, 1993)

In neueren Studien wird versucht durch sogenannte Minitransplants den Ausgang der Transplantation positiv zu beeinflussen und die Induktion von Tumoren durch Strahlentherapie und Chemotherapie zu verhindern. Hierzu wurden noch geringere Dosen an Zytostatika eingesetzt und auf eine Bestrahlung wurde weitgehend verzichtet. Momentan werden verschiedene Konditionierungsprotokolle erprobt.

(Medeiros C, 1999; Guardiola P, 1998)

☞☞ Matched sibling donor transplants

Nach den Mendelschen Gesetzen ist die Wahrscheinlichkeit 1:4, dass ein Geschwister den gleichen tissue type hat wie das erkrankte Kind. Aus diesem Grund

sollte ein tissue typing der Geschwister unmittelbar nach der Diagnosestellung FA erfolgen. Mit einem matched sibling donor werden die weitaus besten Transplantationsergebnisse erzielt. (Kohli-Kumar M et al, 1994)

☞☞ Umbilical cord blood transplants

Neue Forschungen haben gezeigt, daß aus Nabelschnurblut eines neugeborenen Geschwisters Stammzellen für eine Transplantation gewonnen werden können. Die Möglichkeiten bestehen um bereits vor der Geburt eine eventuelle FA auszuschließen oder einen matched sibling zu bestimmen. Das Nabelschnurblut kann eingefroren werden um zu einem späteren Zeitpunkt für die Transplantation zur Verfügung zu stehen. (Gluckman E et al, 1989)

☞☞ Unrelated donor transplants

Die Resultate dieser Transplantationen sind in keinster Weise so erfolgreich wie die oben erwähnten, außerdem erfordert es großen Aufwand einen unrelated aber HLA matched Spender zu finden. So sollte die Spendersuche lange vor der benötigten Transplantation erfolgen.

☞☞ Mismatched related donor transplants

Auch hier sind die Ergebnisse bei weitem nicht so gut wie bei einem fully matched, unrelated Spender.

FA Patienten die auf einen unrelated oder mismatched Spender angewiesen sind benötigen ein weitaus radikaleres Conditioning als diejenigen mit einem matched sibling als Spender.

Transplantationszentren arbeiten an neuen Protokollen um die schweren Komplikationen der graft versus host disease und graft rejection gering zu halten.

Über den Zeitpunkt der Transplantation sind sich die Experten nicht einig. Manche befürworten die sofortige Transplantation, sobald ein passender Spender gefunden ist also noch vor Beginn einer Androgentherapie und vor allem bevor der Patient Transfusionen erhalten hat, andere raten zu einem zuwarten.

1.4.2 Medikamentöse Therapie

☞☞ Androgene

50 – 75 % der FA Patienten sprechen auf eine Androgentherapie an. Stoffe wie Oxymetholon werden verwendet um die Hämatopoese zu stimulieren. Die Wirkung zeigt sich vor allem in der Regeneration der Erythropoese, aber auch die Thrombozytenproduktion wird positiv beeinflusst. Nur bei wenigen Patienten zeigt sich eine Wirkung auf die Leukozytenzahlen.

Die Nebenwirkungen einer oralen Androgentherapie äußern sich hauptsächlich an der Leber. Hier können sie einen Ikterus bewirken oder Leberadenome induzieren. Ebenfalls unerwünscht ist eine Virilisierung, die bei den verwendeten, geringen Dosen aber selten auftritt.

☞☞ Cortison

Kleine Dosen Prednison werden gegeben um die Knochenreifung, die durch das Androgenpräparat beschleunigt wird, zu normalisieren.

1.4.3 Unterstützende Maßnahmen

☞☞ Bluttransfusionen

Die meisten FA Patienten benötigen bei beginnender Zytopenie Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentrate. Besonders wichtig ist, daß alle Blutprodukte gefiltert werden um die Leukozyten zu entfernen. Die Übertragung des Cytomegalievirus auf diesem Wege oder das Risiko einer graft versus host Reaktion müssen verhindert werden. Durch zusätzliche Bestrahlung der Transfundate soll ebenfalls die graft versus host Reaktion unterbunden werden.

Ein Transplantationskandidat darf auf keinen Fall Blutprodukte von einem eventuellen Spender erhalten um ein Gelingen der Transplantation zu gewährleisten.

☞☞ Erythrozyten

Die Entscheidung zur Transfusion wird nicht nur durch den Hämoglobinwert allein, sondern vor allem durch das klinische Bild des Patienten bestimmt. Um eine Antikörperbildung zu verhindern, muß der optimal passende Spender ausgewählt werden. Nach der Transfusion sollte ein Hämoglobingehalt von 8-9mg/dl erreicht werden. Dieser hat keine suprimierende Wirkung auf die Erythropoese.

Um die Eisenbelastung des Körpers zu überwachen und ein 'Iron overload' zu verhindern, sind regelmäßige Kontrollen des Serumferritins erforderlich. Da Eisen bei der Entstehung freier Radikale mitwirkt, die bei FA Patienten in besonderem Maße schädigend wirken, sollte die Gabe eines Eisenchelatbildners zum Beispiel Deferoxamin in Betracht gezogen werden.

☞☞ Thrombozyten

Auch hier entscheidet nicht nur die Thrombozytenzahl sondern die Klinik der Thrombozytopenie über die Notwendigkeit der Transfusion. Das Risiko der Alloimmunisierung mit Antikörpern gegen fremde Thrombozyten steigt mit der Verwendung verschiedener Spender und sollte gering gehalten werden. (Auerbach AD et al, 1997)

☞☞ Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren stimulieren das hämatopoetische System und fördern die Blutzellproduktion. Bei mit Granulozyten stimulierenden Faktor (G-CSF) behandelten Patienten wurden vor allem zunehmende Neutrophilenzahlen gemessen, selten auch ein Anstieg der Thrombozyten und Erythrozyten. Die Nebenwirkungen dieser Behandlung sind sehr gering. (Guinan EC, 1994; Burdach S et al, 1998)

☞☞ Radikalfänger

Die Zellen von FA Patienten halten oxidativem Streß weniger stand als Zellen gesunder Vergleichspersonen. Freie Radikale haben eine gravierendere Auswirkung auf die geschwächten Zellen. Eine Behandlung mit Radikalfängern wie Flavonoiden (z.B. Rutin) erweist sich daher als sinnvoll. Auch Vitamine wird eine präventive Komponente zugesprochen. (Weisburger JH, 1991)

1.4.4 Gentherapie

Die allogene Stammzelltransplantation ermöglicht die Heilung hereditärer Erkrankungen. (Dirksen U et al 1999)

Ein Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen, bei dem die Wildtyp-cDNA des defekten Gens übertragen wird, stellt das neue Konzept der Behandlung dar. Für die genetisch korrigierte Zelle sollte demnach ein Wachstumsvorteil entstehen, so daß diese korrigierten Zellen das gesamte hämatopoetische System allmählich ersetzen.

Das National Institute of Health initiierte eine Studie zur Gentherapie mit drei FA Patienten der Gruppe C durch. Progenitor Zellen aus dem peripheren Blut wurden verwendet und mit G-CSF stimuliert um die retrovirale Gen Transduktion effektiver zu gestalten. Nach erfolgter Transduktion wurden die Zellen dem Patienten reinfundiert. Dieses Schema wurde mehrmals durchgeführt, im Abstand von jeweils drei Monaten.

Aus dieser Studie geht hervor, daß erstens die Gen Komplementation einen positiven Effekt auf die Hämatopoese der FA Patienten hat und zweitens die Replikation der transduzierten Zellen einen zusätzlichen Selektionsdruck ausübt, so daß etwa resistente Klone im Vorteil sind.

Dennoch bleiben Probleme bestehen die eine erfolgreiche Gentherapie erschweren. Das Hauptproblem ist die niedrige Effizienz der retroviralen Transduktion um multipotente Stammzellen zu erhalten. Eine Vielzahl von hämatopoetischen Stammzellen wird daher zur Transduktion benötigt. Des weiteren erschwert die niedrige Replikationsfrequenz der Stammzellen die vielversprechende Therapie.

(Liu JM, 1998)

1.5 Aufgabenstellung

Unterschiedliche Methoden der Diagnostik der FA werden zur Zeit angewandt. Neue Publikationen beschäftigen sich mehr und mehr mit der Durchflußzytometrie als Alternative zur herkömmlichen Chromosomenanalyse.

Am Humangenetischen Institut der Universität Würzburg wird seit mehreren Jahren die Zellzyklusanalyse zur Diagnosefindung verwendet.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse der FA Diagnostik des Instituts im Jahre 1999 analysiert und validiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten, welche im Jahr 1999 mit der Fragestellung der Fanconi Anämie an das Institut überwiesen wurden.

Auswertung der Ergebnisse der Diagnostik von 25 FA Patienten, die im Jahre 1999 am humangenetischen Institut Würzburg untersucht wurden.

2.2 Lymphozytenisolierung und Zellkultur

Nach der Ficoll-Paque Methode erfolgt die Isolierung der Lymphozyten aus heparinisiertem Vollblut der Patienten. Das Blut wird mit „Hank´s balanced salt solution“ (HBSS) versetzt, in ein mit Ficoll gefülltes Zentrifugenröhrchen pipettiert und anschließend zentrifugiert. Die sich in einer dünnen Zwischenschicht anreichernden Lymphozyten werden mit einer Pipette abgezogen, nochmals mit HBSS verdünnt und pelletiert. Nach erneutem Waschen der Zellen werden sie in RPMI 1640 Zellkulturmedium resuspendiert und in der Fuchs-Rosenthal Kammer ausgezählt.

☞☞ Kulturansatz: 1×10^5 Zellen/ml in RPMI 1640, 15% FCS, 1% autologes

Plasma, 180 μ g/ml Phythämagglutinin (PHA-M), 2×10^{-5} M alpha-Thioglycerol,

1×10^{-4} M 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU), 1×10^{-4} M Desoxycytidin (DC).

☞☞ Kulturerente: 72 Stunden nach Kulturbeginn werden die Lymphozyten geerntet.

Spezifische DNS Schäden werden gesetzt durch Mitomycin C (MMC), das eine kovalente DNS-Quervernetzung bewirkt.

2.3 Durchflußzytometrie (BrdU/ Hoechst)

2.3.1 Meßtechnik

Zur Erfassung der zellspezifischen Fluoreszenz, die durch den Einbau von Bromo-Desoxyuridin anstelle des Thymidin in die DNS entsteht, dient das analytische Impulszytometer ICP 22. Die elektrischen Signale des ICP 22 werden von zwei Analog-Digital- Wandlern digitalisiert und einem Mikrocomputer PDP 11/23 zur Datensicherung zugeführt. Die graphische Darstellung und Auswertung der entstandenen Histogramme erfolgt an einem VT 102 Terminal mit grafikfähiger 4010 und 4027 Texttronik Emulation und am PDP 11/23 Rechner.

2.3.1.1 Impulszytometer ICP 22

Im Impulszytometer enthalten sind das Flußsystem, der optische Apparat und die optoelektronischen Signalwandler (Sekundärelektronenvervielfacher).

Die Zellen gelangen durch Überdruck in die Meßkammer und mittels hydrodynamischer Fokussierung durch einen Hüllstrom aus destilliertem Wasser fließen sie einzeln hintereinander. Nach lichteoptischer Anregung der Fluorochrome, die während des Durchtritts durch die Tiefenschärfenebene des Mikroskopobjektivs der Meßkammer erfolgt, fließen die Zellen in ein Sammelgefäß ab.

Die Anregung der Fluorochrome geschieht durch Licht entsprechend ihrer Absorptionswellenlängen, in diesem Falle UV-Licht zur Hoechstanregung, welches im Auflichtsystem auf die Messkammer gerichtet wird.

Zellgebundene Fluorochrome absorbieren das Anregungslicht und emittieren langwelligeres Licht (Stoke'scher Shift) dessen Intensität der Menge des an die DNS gebundenen Fluorochroms entspricht. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird in die spezifischen Wellenlängen der Farbstoffe (Hoechst 33258 und Ethidium Bromid) aufgetrennt und auf die Photomultiplier gelenkt welche ein der Stärke des Lichts entsprechendes elektrisches Signal erzeugen.

2.3.1.2 Datenerfassung und Datenspeicherung

Die Analogpulse des ICP 22 werden dem Analog- Digitalwandler zugeführt, die Impulsmaxima digitalisiert, quantifiziert und entsprechenden Kanälen zugeordnet. Im Zweiparametersystem werden beide Pulse (Hoechst und Ethidium Bromid) einer Zelle einander zugeordnet und in einem zweidimensionalen Feld im PDP 11/23 Rechner gespeichert. Auf der Abszisse wird jeweils die Hoechst-Fluoreszenzintensität aufgetragen, auf der Ordinate die des Fluorochrom Ethidium Bromids.

2.3.2 BrdU/Hoechst-Quench Effekt

5-Bromo-2'-Desoxyuridin wird von den Zellen aufgenommen und anstelle des Thymin in die DNS eingebaut. Das Bromatom ragt aus der DNS Doppelhelix heraus und wird bei der Färbung mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 ebenfalls von Farbstoffmolekülen umlagert wodurch die Fluoreszenzintensität der DNS reduziert wird.

Durch das zweidimensionale durchflußzytometrische Meßverfahren der BrdU/Hoechst-EB Technik werden Aussagen über den realen DNS-Gehalt von Zellen ermöglicht. Besonders ihre Position innerhalb eines Zellzyklus (Ethidium Bromid Fluoreszenz) und ihre replikative Vergangenheit (reduzierte Hoechst Fluoreszenz) können getroffen werden.

Im ersten Zellzyklus wird die DNS der Zellen unifiliär BrdU-substituiert, wodurch die emittierte Hoechst Fluoreszenz sich verringert, die EB Fluoreszenz sich aber verdoppelt (von $2n$ auf $4n$). Nach der zweiten S-Phase sind die Hälfte der Chromosomen unifiliär, die andere Hälfte bifiliär BrdU-substituiert.

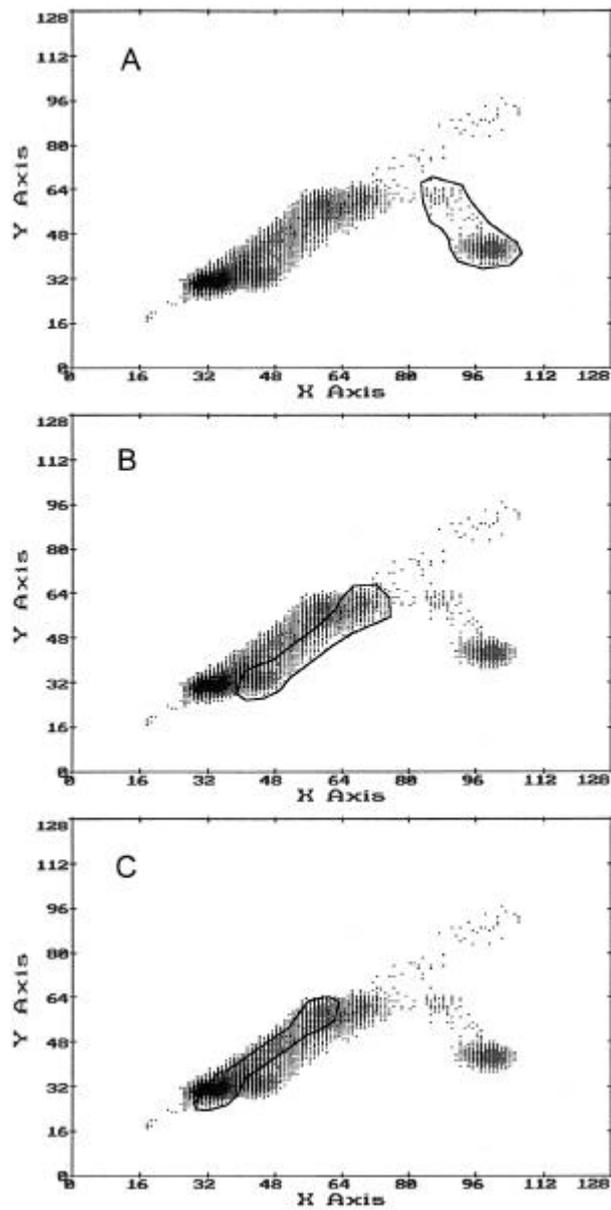
Zu Beginn (G_0/G_1 Ausgangspopulation) ist die Fluoreszenz beider Farbstoffe proportional zum DNS-Gehalt der Zellen.

Beim Eintritt in die erste S-Phase nimmt der DNS-Gehalt der Zellen und damit die EB-Fluoreszenzintensität zu. Aufgrund der BrdU-Substitution während der ersten S-Phase wird die Hoechst-Fluoreszenz infolge des Quencheffekts aber verringert (siehe Abb. 1).

Nach der ersten Mitose der unifiliär BrdU-substituierten G2-Zellen entspricht die EB-Fluoreszenz der Tochterzellen G1 wieder derjenigen der Ausgangspopulation G0/G1. Da die Hoechst Fluoreszenz sich verringert hat, können die G1-Zellen des zweiten Zellzyklus von den nichtproliferierenden G0/G1 Zellen vollständig unterschieden werden. Durchlaufen die G1-Phase Zellen nun die zweite S-Phase werden erneut 50% der DNS bifiliär substituiert was zu einer weiteren nunmehr geringeren Abnahme der Hoechst Fluoreszenz führt. Dadurch werden die S- und G2-Zellen des zweiten Zyklus jetzt rechts von ihren Ausgangszellen (G1-Population) abgebildet. Nach Teilung der G2-Zellen liegen die G1-Zellen des dritten Zyklus (G1) links neben den G1-Zellen. Die Zellen im dritten Zyklus bilden eine separate Spur links neben dem zweiten Zellzyklus. Es können also drei komplette aufeinanderfolgende Zellzyklen nach 72 Stunden mit ihren jeweiligen Kompartimenten unterschieden werden. (Rabinovitch et al, 1988).

2.3.3 Datenanalyse

Die Auswertung solch komplexer 2D-Histogramme erfolgt interaktiv durch Einkreisung der einzelnen Zellzyklen. Diese werden für eine maximale Kanalauflösung gedreht und auf die Ethidium Bromid Achse projiziert. Dadurch entstehen eindimensionale Kurven - entsprechend der klassischen DNS-Histogramme - wobei die berechneten Flächenanteile unter den Kurven die Anteile der jeweiligen Zellen in den verschiedenen Zyklusphasen darstellen. Unter Berücksichtigung der Zellzahl der einzelnen Zyklen werden die Flächenanteile der einzelnen Phasen auf die Gesamtkultur umgerechnet. Die so errechneten Daten spiegeln den aktuellen Zellzyklusstatus wieder.



Y-Achse: EB-Fluoreszenz

X-Achse: BrdU-Fluoreszenz

Abbildung 1:

Zweidimensionale Zytogramme einer 72 Stunden Kultur

A 1. Zyklus

B 2. Zyklus

C 3. Zyklus

G1 Phase des 4. Zyklus

3. Ergebnisse

3.1 Zellzyklusveränderungen nach Mitomycin C Behandlung Vergleich zu FA Patienten

Wie unter Punkt 2.3.2 BrdU/Hoechst-Quench Effekt erläutert, können durch eine durchflußzytometrische Untersuchung drei aufeinanderfolgende Zellzyklen mit ihren jeweiligen Zellfraktionen dargestellt werden.

Die charakteristischen Verteilungen in die jeweiligen Kompartimente mit bzw. ohne den Einfluß von MMC ist in Abbildung 2 A-D dargestellt.

Die Abbildung 2A zeigt die Zellzyklusverteilung bei einer gesunden Kontrollperson. Die Zellen durchlaufen mehrere Zellzyklen und zeigen keinen Hinweis auf Blockierung in den G2 Phasen.

Wie in Abbildung 2B dargestellt, kommt es bei einem gesunden Patienten unter dem Einfluß des Crosslinkbildners Mitomycin C (MMC) in einer Dosis von 10ng/ml bereits zu Störungen der Zellzyklusprogression. Durch die DNS- Schädigung, die während der Synthesephase induziert wurde, kommt es insbesondere zu einer Akkumulation der Zellen in der G2 Phase. Um zu verhindern, daß fehlerhafte Information in der Mitosephase weitergegeben wird, werden die Zellen in der G2 Phase arretiert, und die Reparaturmechanismen der Zellen werden aktiviert. Da die Mehrheit der DNS- Schäden durch die Reparaturenzyme nicht zu beheben ist kommt es zu einem deutlichen G2 Phasen Anstieg.

Durch eine weitere Erhöhung der MMC Konzentration auf 50ng/ml bei einem gesunden Patienten werden die oben beschriebenen Effekte noch deutlicher. (Abbildung 2C) Als Zeichen für die stärkeren Zellschäden, welche durch das MMC induziert wurden findet man einen noch deutlicheren Arrest in der G2 Phase.

Bei einem FA Patienten ist bereits ohne den Einfluß eines Crosslinkbildners eine Erhöhung der G2 Phase zu erkennen (Abbildung 2D). Durch die endogene Instabilität der Chromosomen der Patienten kommt es zu vergleichsweise hohen G2 Phase Werten die bereits ohne den Einfluß eines toxischen Agens auftreten. Diese G2 Phasenerhöhung wird daher als diagnostischer Parameter genutzt.

Im Anhang zu finden sind die Darstellungen der durchflußzytometrischen Untersuchungen aller in den Tabellen aufgeführten FA Patienten.

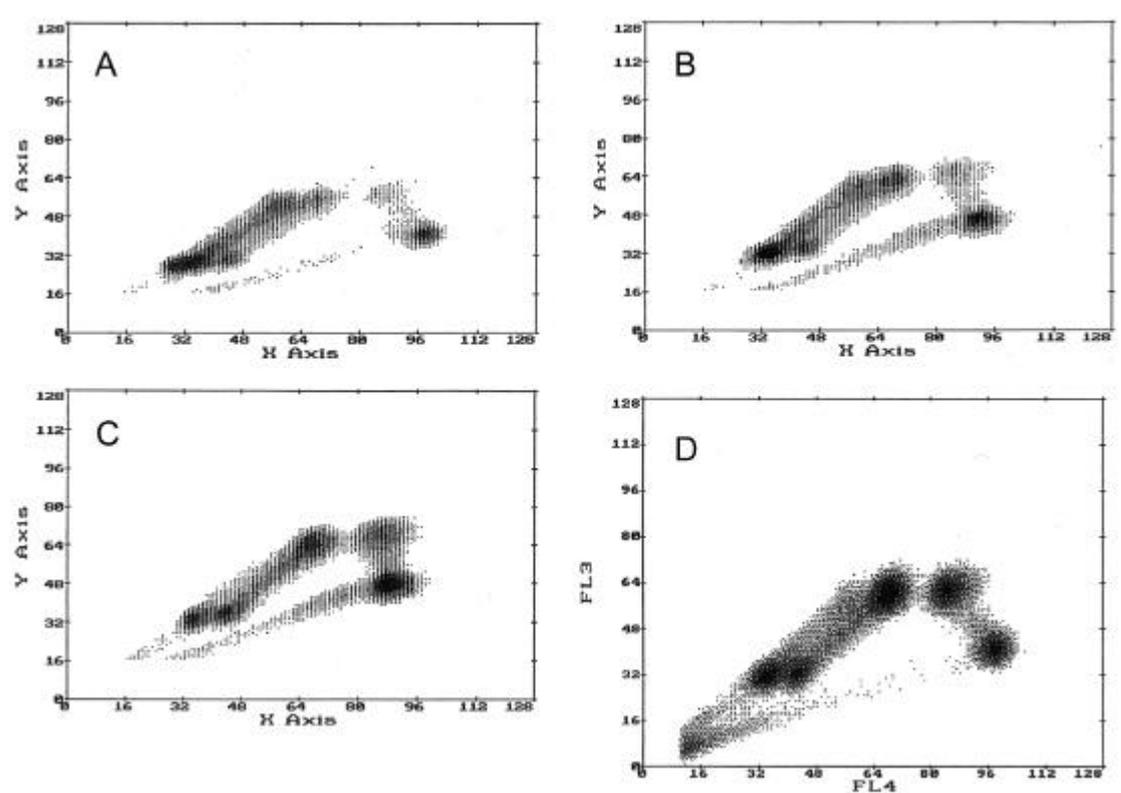


Abbildung 2: Durchflußzytometrische Darstellungen

- A Kontrollpatient ohne den Einfluß von MMC
- B Kontrollpatient bei 10 ng/ml MMC
- C Kontrollpatient bei 50 ng/ml MMC
- D FA Patient ohne den Einfluß von MMC

3.2 Statistische Auswertung der Zellzyklusveränderungen

Die Tabellen 1A und 1B zeigen die Ergebnisse der quantitativen Zellzyklusanalyse, wobei in Tabelle 1A die Daten von 25 FA Patienten, und Tabelle 1B die Daten von 31 Kontrollpatienten aufgetragen sind. Die Angaben erfolgen jeweils in % der Gesamtzellen in den verschiedenen Kompartimenten (G0/G1 Phasen, S Phase, G2 Phase). Als diagnostischer Parameter findet sich weiterhin die Summe G2/GF, wobei GF die Wachstumsfraktion darstellt.

☞☞ Für den ersten Wert, das G0/G1 Kompartiment, ergab sich bei den aufgeführten FA Patienten ein Mittelwert von 31,01 mit einer Standardabweichung von 15,05. Als Mittelwert der Kontrollpatienten ergab sich 25,69 mit einer Standardabweichung von 5,83. Die G0/G1 Phasen beider Tabellen sind relativ hohen Schwankungen ausgesetzt wobei das keinen Krankheitswert widerspiegelt. Der G0 Wert ist stark altersabhängig und individuell sehr verschieden.

Der t-Test ergab für G0/G1 ein p von 0,11- beide Mittelwerte sind auf der 0,05 Ebene nicht signifikant unterschiedlich .

☞☞ Die Werte der Synthesephase zeigen deutlicher Unterschiede zwischen FA Patienten und der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der FA Patienten liegt bei 8,64 mit einer Standardabweichung von 2,69, die Kontrollpatienten ergaben eine Mittelwert von 7,03 mit einer Standardabweichung von 2,89.

Der t-Test ergab für die S Phase ein p von 0,04- beide Mittelwerte sind auf der 0,05 Ebene signifikant unterschiedlich.

☞☞ Am deutlichsten lassen sich im Vergleich der G2 Phasen Werte signifikante Unterschiede feststellen. Bei den FA Patienten ergab sich ein Mittelwert von 21,32 mit einer Standardabweichung von 6 wohingegen die Kontrollgruppe lediglich einen Mittelwert von 3,97 bei einer Standardabweichung von 1,49 zeigt.

Der t-Test ergab für die G2 Phase ein $p > 0,0001$ - beide Mittelwerte sind auf der 0,05 Ebene signifikant unterschiedlich.

☞☞ Als diagnostischer Parameter wird die Summe G2/GF verwendet. GF stellt die Wachstumsfraktion dar, i.e. alle sich teilenden Zellen, außer der G0 Phase. Der Mittelwert der FA Patienten liegt bei 0,48 mit einer Standardabweichung von 0,07.

Fanconi Anämie Patienten				
Kompartiment	G0/G1	S	G2	Summe G2/GF
	% Zellen	% Zellen	% Zellen	
Pat #1 arn	34,7	10,4	19,8	0,451
Pat #2 get	32,4	9,4	16,5	0,467
Pat #3 kee	39,1	6,2	19,9	0,468
Pat #4 ans	59,8	8,6	16,7	0,475
Pat #5 van	10,7	7,4	20,2	0,406
Pat #6 sta	60,2	7,2	13,5	0,506
Pat #7 tmm	40,7	12,4	19,3	0,433
Pat #8 lea	27,0	4,3	14,7	0,536
Pat #9 psp	30,3	10,4	25,5	0,476
Pat #10 mrf	41,9	7,3	19,6	0,553
Pat #11 hgk	20,3	7,8	26,8	0,553
Pat #12 sgk	26,1	7,1	26,1	0,568
Pat #13 sga	21,2	6,6	31,9	0,588
Pat #14 kRm	10,9	6,3	12,2	0,343
Pat #15 tmsn	54,4	11,6	15,6	0,381
Pat #16 mrc	11,1	6,2	26,5	0,484
Pat #17 mrt	1,7	4,8	23,9	0,497
Pat #18 fica	10,9	5,1	34,6	0,580
Pat #19 knm	34,6	9,7	23,0	0,548
Pat #20 otk	25,6	13,6	27,7	0,443
Pat #21 klm	39,3	12,5	23,4	0,494
Pat #22 akm	39,5	13,2	10,4	0,343
Pat #23 akn	28,9	6,9	28,0	0,546
Pat #24 scp	28,2	9,1	19,4	0,517
Pat #25 crs	45,8	11,8	17,7	0,434
Mittelwert	31,01	8,64	21,32	0,480
Standardabweichung	15,05	2,69	6,00	0,07

Tabelle 1A:

Zellzyklusverteilung bei FA Patienten

Kontrollpatienten				
Kompartiment	G0/G1	S	G2	Summe G2/GF
	Zellen %	Zellen %	Zellen %	
Pat #1 soi	24,6	5,9	3,1	0,204
Pat #2 arm	31,4	10,6	3,1	0,178
Pat #3 mes	26,9	4,5	3,5	0,232
Pat #4 tut	21,7	5,9	3,7	0,208
Pat #5 bes	29,0	6,6	2,9	0,185
Pat #6 frt	29,8	8,9	5,9	0,239
Pat #7 kka	26,3	5,2	3,5	0,187
Pat #8 lel	28,8	7,9	2,7	0,223
Pat #9 bkk	16,2	11,4	4,6	0,192
Pat #10 bkV	24,8	14,2	4,1	0,211
Pat #11 git	29,4	7,0	4,3	0,210
Pat #12 bad	25,1	9,4	5,3	0,225
Pat #13 mrw	34,7	9,3	5,2	0,155
Pat #14 hkj	31,1	6,5	3,6	0,182
Pat #15 rnt	29,2	7,2	3,8	0,162
Pat #16 cnn	27,8	4,4	7,6	0,273
Pat #17 coj	29,3	3,3	4,5	0,215
Pat #18 kre	15,5	11,2	5,6	0,187
Pat #19 ggm	16,5	2,9	1,8	0,202
Pat #20 nkl	30,9	10,2	3,1	0,202
Pat #21 szd	20,5	3,0	2,8	0,153
Pat #22 wsd	21,6	10,8	4,8	0,207
Pat #23 bnt	31,8	4,5	4,1	0,153
Pat #24 alt	21,8	6,3	6,3	0,219
Pat #25 otc	33,8	5,3	1,8	0,134
Pat #26 ots	35,5	4,1	4,5	0,215
Pat #27 ghd	26,3	9,7	4,2	0,225
Pat #28 mrm	25,5	8,0	2,6	0,191
Pat #29 caa	19,1	6,8	7,0	0,224
Pat #30 scs	14,1	3,6	1,4	0,179
Pat #31 ore	17,5	3,3	1,8	0,151
Mittelwert	25,69	7,03	3,97	0,20
Standardabweichung	5,83	2,89	1,49	0,03

Tabelle 1B:

Zellzyklusverteilung bei Kontrollpatienten

Die Kontrollgruppe zeigt einen Mittelwert von 0,2 bei einer Standardabweichung von 0,03.

Der t-Test ergab für die Summe G2/GF ein $p > 0,0001$ - beide Mittelwerte sind auf der 0,05 Ebene signifikant unterschiedlich.

Um die deutlichen Unterschiede zu veranschaulichen sind in Abbildung 3 Werte beider Tabellen in einem Koordinatensystem aufgetragen - auf der x-Achse die Summe G2/GF, auf der y-Achse der G0/G1 Wert.

Dabei ergibt sich eine deutliche Diskriminierung zwischen den jeweiligen Meßdaten.

Durch die erhöhte G2 Fraktion bei FA Patienten wird diese Gruppe weiter rechts abgebildet als die der Kontrollpatienten.

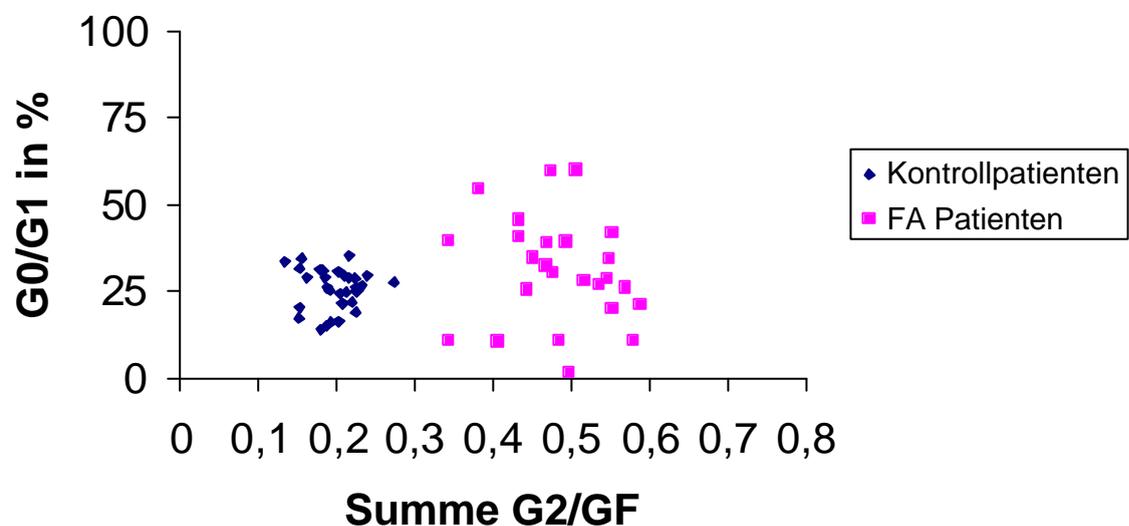


Abbildung 3:

Graphische Darstellung der diagnostischen Parameter

3.3 Wirkung von Mitomycin C auf die G2-Phasen-Fractionen bei FA Patienten

In Tabelle 2 aufgeführt sind die G2 Phasen (in % der original Zellen) von FA Patienten bei ansteigenden MMC Werten.

☞ Bereits ohne den Einfluß von MMC finden sich hier relativ hohe Werte bei einer ebenfalls hohen Standardabweichung. Der Mittelwert liegt bei 21,32 mit einer Standardabweichung von 6.

☞ Durch den Zusatz von MMC in geringer Konzentration (5 ng/ml) ist eine nochmalige Erhöhung der G2 Phasen Werte auf einen Mittelwert von 33,05 zu erkennen. Auch die Standardabweichung steigt wegen interindividueller Unterschiede auf 9,76 an.

☞ Bei weiteren Konzentrationssteigerungen des MMC (10 ng/ml, 50 ng/ml) nimmt auch die G2 Phase weiter zu. Der G2 Phasen Arrest spiegelt die Menge der geschädigten Chromosomen wieder, die vor dem weiteren Durchlaufen des Zellzyklus gestoppt werden. Der Mittelwert liegt bei 10 ng/ml MMC bei 35,8 mit einer Standardabweichung von 10,18. Bei 50 ng/ml MMC beträgt der Mittelwert 36,57 mit einer Standardabweichung von 14,57. Zu sehen ist, daß auch die Standardabweichung weiter zunimmt aufgrund der individuellen Unterschiede.

G2 Phasen (%original Zellen)				
	0 ng/ml MMC	5 ng/ml MMC	10 ng/ml MMC	50 ng/ml MMC
Pat #1 arn	19,8	34,3	43,1	45,4
Pat #2 get	16,5	27,3	28,1	35,0
Pat #3 kee	19,9	35,9	36,1	33,6
Pat #4 ans	16,7	ND	ND	ND
Pat #5 van	20,2	43,6	47,2	58,4
Pat #6 sta	13,5	ND	ND	ND
Pat #7 tmm	19,3	32,8	31,8	ND
Pat #8 lea	14,7	32,1	33,6	41,5
Pat #9 psp	25,5	39,9	42,7	40,9
Pat #10 mrf	19,6	26,4	29,4	26,5
Pat #11 hgk	26,8	ND	ND	ND
Pat #12 sgk	26,1	38,9	42,4	41,0
Pat #13 sga	31,9	46,7	49,0	53,0
Pat #14 kRm	12,2	31,6	42,2	60,6
Pat #15 tmsn	15,6	16,9	17,8	12,3
Pat #16 mrc	26,5	20,2	21,1	9,2
Pat #17 mrt	23,9	34,8	42,6	59,9
Pat #18 fica	34,6	ND	ND	ND
Pat #19 knm	23,0	ND	ND	ND
Pat #20 otk	27,7	47,8	49,6	39,7
Pat #21 klm	23,4	36,9	37,7	30,0
Pat #22 akm	10,4	17,8	22,1	32,1
Pat #23 akn	28,0	51,3	50,4	29,9
Pat #24 scp	19,4	24,2	20,9	16,4
Pat #25 crs	17,7	21,6	28,1	29,5
Mittelwert	21,32	33,05	35,8	36,57
Standardabweichung	6,00	9,76	10,18	14,57

Tabelle 2:

G2 Phasen Fraktionen bei FA Patienten bei steigender MMC Konzentration

3.4 Spezifische Kasuistiken

3.4.1 Transplantationspatienten

Die Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Zellzyklusanalyse zweier FA Patienten zum Diagnosezeitpunkt und nach Knochenmarkstransplantation.

☞ Pat #1 zeigt im G0/G1 Kompartiment einen Anstieg von 34,6 auf 71,9. Die S Phase ging von 9,7 auf 3,6 zurück.

Nach erfolgter Transplantation ist eine deutliche Abnahme der G2 Phase von 23 auf 1,9 und daraus resultierend auch ein Rückgang der Summe G2/GF von 0,548 auf 0,108 zu erkennen.

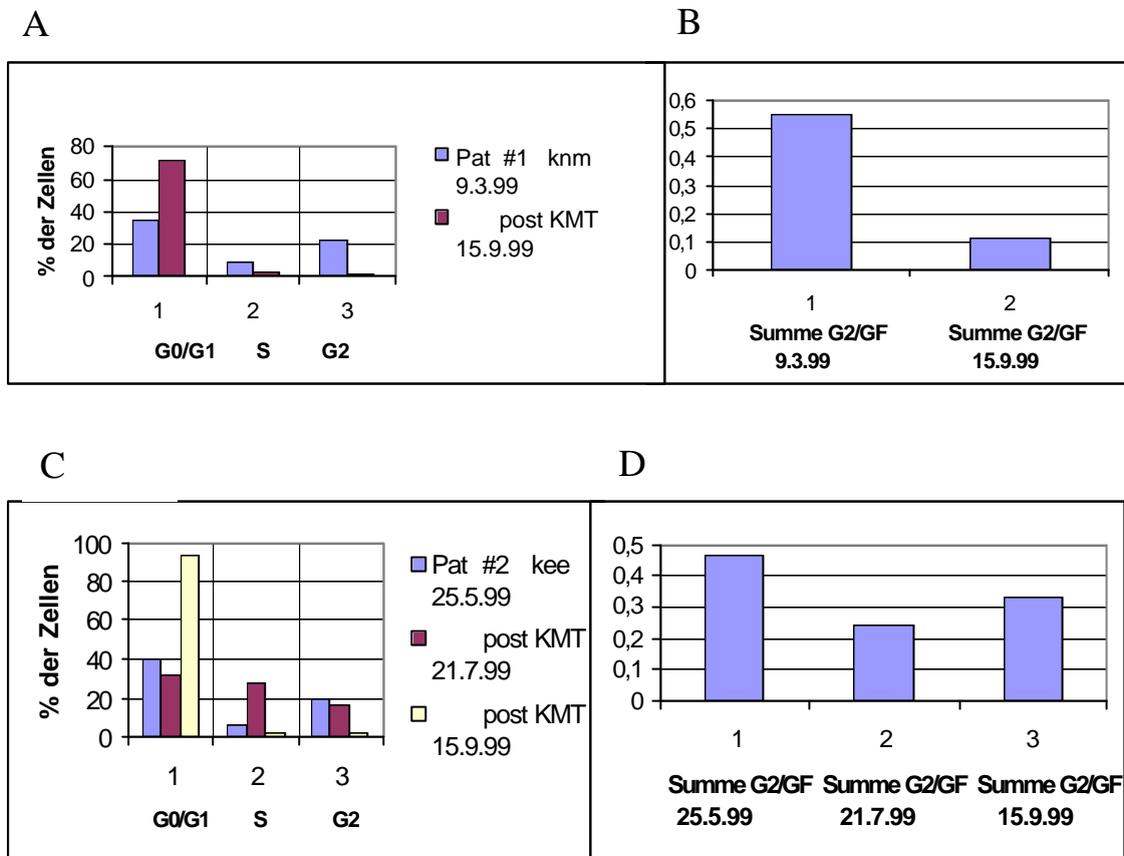
☞ Pat #2 zeigt bei der ersten Kontrolluntersuchung eine Abnahme der G0/G1 Phase Zellen von 39,1 auf 32,4. Bei der zweiten Kontrolluntersuchung steigt auch hier der Wert auf 93,3. Die S Phase erfährt zunächst einen Anstieg von 6,2 auf 28,6. In der zweiten Kontrolluntersuchung ist eine deutliche Abnahme des Wertes auf 2,1 zu sehen.

Die G2 Phase Werte verringern sich bei der ersten Kontrolluntersuchung nur unwesentlich von 19,9 auf 16,2. In der zweiten Kontrolluntersuchung ist jedoch ein signifikanter Rückgang auf 2 zu erkennen. Resultierend wieder die Summe G2/GF von 0,468 bei Diagnosestellung auf 0,243 bei der ersten Kontrolle, jedoch wieder ansteigend auf 0,332 bei der zweiten Kontrolluntersuchung.

Transplantationspatienten				
Kompartiment	G0/G1	S	G2	Summe G2/GF
	Zellen %	Zellen %	Zellen %	
Pat #1 knm 9.3.99	34,6	9,7	23,0	0,548
post KMT 15.9.99	71,9	3,6	1,9	0,108
Pat #2 kee 25.5.99	39,1	6,2	19,9	0,468
post KMT 21.7.99	32,4	28,6	16,2	0,243
Post KMT 15.9.99	93,3	2,1	2,0	0,332

Tabelle 3:

Zellzyklusverteilung

**Abbildung 4:**

Pat #1 Zellzyklusverteilung: Vergleich prä- post KMT

A G0/G1 Phase; S Phase; G2 Phase

B Summe G2/GF

Pat #2 Zellzyklusverteilungen: Vergleich prä- post KMT

C G0/G1 Phase; S Phase; G2 Phase

D Summe G2/GF

3.4.2 Zellzyklusbefunde und Mitomycin C Zytotoxizitätstest bei einem FA Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

In der durchflußzytometrischen Untersuchung des Patienten ergab sich folgende Zellzyklusverteilung:

☞☞ im Kompartiment G0/G1 befanden sich 42,8% der Zellen

☞☞ in der Synthese Phase befanden sich 6,3% der Zellen

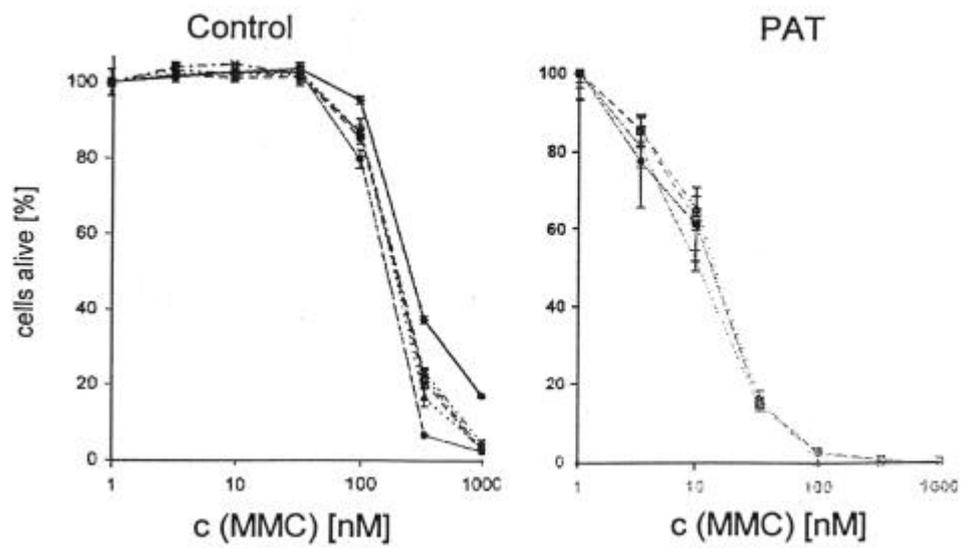
☞☞ die G2 Phase beinhaltete 3,3% der Zellen

☞☞ die Summe G2/GF ergab 0,180.

Es besteht also keine spontane Blockierung des Zellzyklus der proliferierenden Zellen in der G2 Phase. Auch die Ratio Summe G2/GF ist unauffällig.

Wie Abbildung 5 zeigt ergab jedoch die Durchführung des MMC- Zytotoxizitätstestes bei diesem Patienten eine erhöhte MMC Empfindlichkeit mit deutlich reduzierten Lymphozytenüberlebensraten.

Damit bestätigt sich die klinische Verdachtsdiagnose FA, obwohl die Zellzyklusverteilungen der peripheren Blutzellen unauffällig waren.

**Abbildung 5:**

MMC Zytotoxizitätstest bei einem FA Patienten mit
akuter myeloischer Leukämie

4. Diskussion

4.1 Vergleich zwischen Chromosomenanalyse und Zellzyklusanalyse

Die Fanconi Anämie als klinisch und genetisch heterogene Erkrankung wird momentan standardmäßig durch die Chromosomenanalyse diagnostiziert. Dabei wird die für diese Krankheit typische spontane Chromosomenbrüchigkeit und die Hypersensitivität gegenüber DNS Crosslinkbildnern wie Diepoxybutan (DEB) oder Mitomycin C (MMC) beurteilt. (Auerbach AD et al, 1989; Auerbach AD, 1993)

Aufgrund der hohen Kanzerogenität des DEB wurde in vielen Laboratorien dem MMC der Vorzug gegeben, dennoch liefern beide Agentien keine konkordanten Ergebnisse. Zudem erfordert dieser Test ein hohes Maß an Erfahrung im zytogenetischen Bereich, und ein peinlich genaues Einhalten der Kultur- und Sicherheitsbedingungen um valide Ergebnisse zu erhalten. (Seyschab H et al 1995)

Diese Einschränkungen des an sich goldenen Standards der FA Diagnostik macht die Suche nach alternativen Methoden evident.

Die Zellzyklusanalyse stellt solch eine Alternative dar. Basierend auf der Beobachtung, daß FA Zellen typische Muster im Durchlaufen des Zellzyklus bieten, gilt es die Übereinstimmung mit bisher verwendeten Diagnosemethoden zu eruieren.

Die hochsignifikante Akkumulation der Zellen in G2 Phasen wird als diagnostischer Parameter herangezogen (Seyschab H et al, 1993; Kubbies M et al, 1985; Schindler D et al, 1985; Butturini A et al, 1994)

Eine Reihe von Artikeln berichten bereits über das diagnostische Potential der Zellzyklusanalyse für die FA. (Latt SA et al, 1982; Berger R et al, 1993; Miglierina R et al, 1990)

Genauer sollen drei der geführten Studien vorgestellt werden:

In einer 1991 geführten Studie wird die Zuverlässigkeit der Zellzyklusanalyse belegt. Anhand von 10 FA Patienten wurden die Reliabilität der Zellzyklusanalyse getestet. Den Angaben zufolge gelang es eindeutig zwischen FA Patienten und Patienten mit einer Anämie anderer Genese, gesunden Kontrollen und heterozygoten Genträgern zu unterscheiden. Es wird vergleichbare Effektivität und vor allem die Einfachheit und Schnelligkeit der Zellzyklusanalyse hervorgehoben. So wäre die Diagnose der FA auch in Zentren ohne zytogenetisches Labor zu stellen. (Miglierina R et al, 1991)

Eine weitere Bestätigung der Zellzyklusanalyse als reliable diagnostische Methode der FA belegt eine Studie mit dizygoten Zwillingen. In diesem Fall bot die Zellzyklusanalyse typische Muster für FA Patienten, während der DEB Test trotz wiederholter Durchführung zu widersprüchlichen Ergebnissen kam. Das Resultat der Durchflußzytometrie stimmte außerdem mit dem schweren klinischen Befund der Erkrankung überein. (Torraldo R et al, 1998)

In einer Blindstudie wurden erstmals 66 Patienten mit dem klinischen Verdacht auf eine FA auf zwei verschiedenen Diagnosewegen getestet.

Die zytogenetische Diagnosestellung erfolgte durch den Zusatz von DEB und die anschließende Spezifizierung der strukturellen Chromosomenaberrationen. Die Durchflußzytometrische Diagnosestellung erfolgte anhand der BrdU/Hoechst Methode, mit welcher qualitative und quantitative Unterschiede im Zellzyklus bestimmt wurden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen hohe Konkordanz zwischen beiden Methoden. Ein übereinstimmendes Ergebnis wurde in 63 der 66 Fälle erlangt.

Die Studie gelangt zu dem Resultat, daß beide Methoden verläßlich die Diagnose FA bzw. non-FA Zellen zu stellen in der Lage sind. Lymphozyten in Kultur welche eine erhöhte Sensitivität gegenüber DEB bieten werden auch einen G2 Phasen Arrest bieten und vice versa.

Diese Feststellung gilt jedoch nur für nichtleukämische Zellen. Alle der drei nicht übereinstimmenden Fälle, jedoch lediglich einer der konkordanten Fälle zeigte Symptome

einer Leukämie. Es ist denkbar, daß leukämische Zellen die ansonsten für FA Zellen typischen durchflußzytometrischen Parameter nicht bieten. (siehe 4.4 Problematik der Durchflußzytometrie bei bestehender Leukämie)

Abgesehen von dieser Einschränkung stellt die Zellzyklusanalyse eine durchaus wichtige Methode zur Differentialdiagnose kindlicher Anämien dar. Die Geschwindigkeit und Einfachheit dieses Verfahrens läßt ein breiteres Screening von Patienten mit jeglicher Art von Dismorphien oder hämatologischen Störungen zu. Lediglich zur Bestätigung von Fällen die einen G2 Phasen Arrest bieten, könnte ein DEB Test die Diagnose sichern.

Die Kombination aus beiden Verfahren bietet die optimale Diagnostik.
(Seyshab H et al, 1995)

4.2 Ergebnisse der Diagnostik 1999

Um die Durchflußzytometrie als sichere Diagnosemöglichkeit zu etablieren wurden in der vorliegenden Arbeit spezifische Parameter der Zellzyklusanalyse einer Gruppe von FA Patienten verglichen mit einem gesunden Kollektiv.

Unter Gliederungspunkt 3.2 erfolgte die statistische Auswertung der Zellzyklusveränderungen bei beiden Gruppen.

Diese Ergebnisse der quantitativen Zellzyklusanalysen beider Gruppen zeigen signifikante Unterschiede in bestimmten Werten. (vgl. Tab 1A und 1B)

Bereits in der Synthese Phase lassen sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellen. Das p erreicht mit einem Wert von 0,04 jedoch nur marginale Signifikanz. Deshalb wird dieser Parameter nicht für diagnostische Aussagen verwendet. Deutlicher ist Diskrepanz zwischen den Werten der G2 Phasen und der daraus resultierenden Wachstumsfraktionen (Summe G2/GF) zu erkennen. Der t-Test ergab bei beiden Werten ein wesentlich niedrigeres p von $>0,0001$. In diesen Werten kommt die erwartete

te Zellzyklusprogressionsstörung mit Akkumulation der Zellen in den G2 Phasen bei FA Patienten zum Ausdruck. Diese Parameter werden für die Diagnosefindung verwendet.

Zur Veranschaulichung wurden die Meßdaten der FA Patienten in einem Koordinatensystem dargestellt und mit der Gruppe der Kontrollpatienten verglichen. (Abbildung 3) Es entstehen zwei deutlich voneinander getrennte Punktgruppen. Durch die deutlichen Unterschiede in den zur Diagnosestellung verwendeten Werten kommt es zu dieser eindeutigen Diskriminierung.

Eine weitere statistische Auswertung bezüglich des Einfluß von MMC auf Zellen von FA Patienten erfolgt in dieser Arbeit unter Gliederungspunkt 3.3 Wirkung von Mitomycin C auf die G2-Phasen-Fraktion bei FA Patienten .

Die Wirkung von MMC auf die G2 Phase Fraktion bei FA Patienten ist in Tabelle 2 dargestellt.

Der deutliche Anstieg der G2 Phasen Fraktion mit steigender MMC Konzentration widerspiegelt die hohe Sensitivität der FA Zellen gegenüber Crosslinkbildnern. (Digweed M, 1999)

Auch ohne den Zusatz von MMC finden sich hier bereits vergleichsweise hohe Werte. Durch ansteigende Konzentrationen von MMC werden weitere DNS- Schäden gesetzt. Die geschädigten Zellen werden in der G2 Phase arretiert und stehen für die weitere Progression des Zellzyklus nicht mehr zur Verfügung.

Diesen kontinuierlichen Anstieg der G2 Phasen Fraktion bei steigender MMC Konzentration nutzt man ebenfalls zur Bestätigung der Diagnose.

4.3 Spezifische Kasuistiken

Die Knochenmarkstransplantation (KMT) stellt nach wie vor die Therapie der Wahl der FA dar. Wie in der Einleitung dieser Arbeit bereits dargestellt ist es bei FA Patienten besonders wichtig den optimalen Spender (matched sibling donor) für eine Transplantation zu finden, um die Gefahren einer graft versus host Krankheit weitestgehend zu verhindern.

Des Weiteren ist auch ein besonders schonendes Conditioning zur Transplantationsvorbereitung bei FA Patienten von Nöten. Die Hypersensitivität der Chromosomen gegenüber Crosslinkbildnern birgt auch ein erhöhtes Risiko bei zu hohen Dosen an Cyclophosphamid oder Strahlung. Aus diesem Grunde stehen die sog. Minitransplants im Mittelpunkt der aktuellen Therapie. Mit wesentlich geringeren Dosen an Cyclophosphamid in Kombination mit thorako-abdominaler Bestrahlung wurde eine dramatische Steigerung der Überlebensraten nach KMT erlangt.

Fremdtransplantationen sind sehr risikoreich für die Patienten und erfahrungsgemäß sind die Resultate bei weitem nicht so erfolgversprechend. Dennoch ergeben sich aufgrund der neuen Conditioning Regimen auch bei KMT mit alternativen Spendern (HLA mismatched donor) erfolgversprechende Zahlen in der Überlebensstatistik. (Guardiola P et al, 1998; Medeiros C et al, 1999)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Ausgang der KMT bei zwei Patienten anhand der durchflußzytometrischen Meßdaten dargestellt. (Tab. 3, Abb. 4A, 4B, 4C, 4D)

Der Vergleich der Werte zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs läßt eine Prognose über das Resultat der Transplantation zu.

☞☞Patient #1 bietet bei Diagnosestellung das klassische Bild der FA mit G2 Phasen Arrest und entsprechend hoher Summe G2/GF. Nach erfolgter Transplantation gehen die beiden Werte auf ein normal Maß zurück, was für ein gutes Resultat der Transplantation bezogen auf die FA spricht. Die deutlich verringerte Stimulierbarkeit der Lymphozyten - erkennbar am Anstieg der G0/G1 Zellen von 34,6% auf

71,9% - (i.e. der Anteil der proliferierenden Zellen sank von 65,4% auf 28,1%) widerspiegelt die klinisch beobachtete schlechte Markfunktion post transplantationem.

☞ Patient #2 bietet bei Diagnosestellung vergleichbar eindeutige Werte für eine FA.

Bei der ersten Kontrolluntersuchung nach erfolgter KMT findet sich jedoch lediglich ein geringer Rückgang der G2 Phase und entsprechend der Summe G2/GF. Die proliferierenden Zellen zeigten weiterhin eine spontane Zellzyklusblockierung in der G2 Phase des ersten Zyklus und verteilten sich in toto nur auf zwei Zellzyklen. Das noch im Rahmen erscheinende Ergebnis der Ratio $\frac{G2}{GF}$ kommt dadurch zustande, daß sich Zellen nur in der G2 Phase des ersten Zyklus finden, während sich normalerweise die Zellen der G2 Phasen mehrerer durchlaufener Zyklen aufaddieren würden. Der zelluläre FA Phänotyp ist trotz KMT noch erkennbar.

Die zweite Kontrolluntersuchung ergab zwar einen deutlichen Rückgang der G2 Phase, auch durchliefen die Zellen drei bis vier vollständige Zyklen ohne spontane Blockierung, die extrem stark verringerte Stimulierbarkeit und Proliferation der Zellen (lediglich 6,7% der proliferierenden Zellen) ist jedoch auffällig. Möglicherweise ist dieses Phänomen medikamentös bedingt. Das Ergebnis der Ratio $\frac{G2}{GF}$ liegt zwischen Kontrollen und FA Patienten.

Über Erfolg und Mißerfolg der Transplantation können die Werte der Zellzyklusanalyse Auskunft geben.

Positiv zu bewerten ist der Anstieg der Stimulierbarkeit der Zellen post KMT also ein geringer Wert im Kompartiment G0/G1 Zellen. Des weiteren als Erfolg zu sehen sind die Abnahme der G2 Phase Zellen mit daraus resultierender Ratio $\frac{G2}{GF}$ was die Aufhebung der Zellzyklusprogressionsstörung verdeutlicht.

4.4 Problematik der Durchflußzytometrie bei bestehender Leukämie

Wie bereits unter Gliederungspunkt 4.1 erwähnt ergibt sich eine gewisse Schwierigkeit der FA Diagnostik durch die Durchflußzytometrie bei einer bestehenden akuten myeloischen Leukämie oder einer Myelodysplasie. Die prinzipiell als reliabel geltende Zellzyklusanalyse kommt bei Knochenmarkserkrankungen zu widersprüchlichen Ergebnissen. (Berger R et al, 1993; Seyshab H et al, 1995)

Leukämische Zellen scheinen die ansonsten für FA Zellen charakteristischen Zellzyklusprogressionsstörungen nicht aufzuweisen. Der selektive Wachstumsvorteil von malignen Zellen ist nicht in Einklang zu bringen mit einer schweren Progressionsstörung des Zellzyklus. Die leukämischen Zellen verändern die Aufteilung der untersuchten Zellen in die einzelnen Kompartimente, so daß die diagnostischen Parameter nicht mehr aussagekräftig sind.

Auch die Untersuchungsergebnisse in dieser Arbeit stellten einen Widerspruch in einem Fall fest.

Die Zellzyklusanalyse des Patienten ergab wie unter Gliederungspunkt 3.4.2. dargestellt keine Auffälligkeiten und stand nicht im Einklang mit der Diagnose FA. Der ansonsten typische FA zelluläre Phänotyp, mit G2 Phasen Arrest war nicht zu finden. (Tabelle 3; Abbildung 4)

Erst durch die zusätzliche Untersuchung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber MMC konnte die klinische Verdachtsdiagnose FA bestätigt werden. (Abb.5)

Bei bestehender akuter myeloischer Leukämie müssen zur Diagnosesicherung zusätzlich zur durchflußzytometrischen Untersuchung Maßnahmen ergriffen werden.

Die Durchflußzytometrie ist nicht in der Lage leukämische Zellen zu differenzieren – das Resultat sind falsch negative Ergebnisse.

Da Tumorzellen erhöhte Proliferationsraten aufweisen kaschieren sie die Progressionsstörung der FA Zellen und verfälschen das Resultat. Erst durch zusätzliche Diagnostik, zum Beispiel anhand des MMC Zytotoxizitätstest, läßt sich die klinische Verdachtsdiagnose sichern.

Die erhöhte Sensitivität gegenüber MMC liegt in leukämischen Zellen nicht vor.

Bei bestehender Leukämie muß zusätzlich zur Durchflußzytometrie ein Zytotoxizitätsnachweis geführt werden um den Verdacht einer FA zu erhärten oder auszuschließen.

5. Literaturverzeichnis

1. Alter BP, Knobloch ME, Weinberg RS: Erythropoiesis in Fanconi's anemia. *Blood* 78:602-608, 1991
2. Alter BP: Fanconi's anaemia and its variability. *Br J Haematol* 85:9, 1993
3. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM; International Fanconi Anemia Registry: Relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* 73:391, 1989
4. Auerbach AD: Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp Hematol* 21:731, 1993
5. Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H: Fanconi anemia, pp. 317-332. In Vogelstein B, Kinzler KW (eds.), *The genetic bases of human cancer*. McGraw-Hill, Inc., New York 1998
6. Burdach S, Nishinakamura R, Dirksen U, Murray R: The physiologic role of interleukin-3, interleukin-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and the beta c receptor system. *Curr Opin Hematol* 5:177-180, 1998
7. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD: Haematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 84:1650-1655, 1994
8. Butturini A, Gale RP: Long-term bone marrow culture in persons with Fanconi anemia and bone marrow failure. *Blood* 83:336, 1994.
9. Berger R, Le Coniat M, Gendron MC: Fanconi anemia. Chromosome breakage and cell cycle studies. *Cancer Genet Cytogenet* 1993 Aug; 69(1):13-6

10. Daneshbod-Skibba G, Martin J, Shahidi NT: Myeloid and erythroid colony growth in non-anemic patients with Fanconi's anaemia. *Br J Haematol* 44:33-38, 1980
11. Dawson JP: Congenital pancytopenia associated with multiple congenital anomalies (Fanconi type). *Pediatrics* 15:325-333, 1995
12. de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, Van Berkel CGM, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H: The Fanconi anemia group G gene is identical with human XRCC9. *Nat Genet* 20:281-283, 1998
13. de Winter JP, Leveille F, van Berkel CG, Rooimans MA, van Der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H: Isolation of a cDNA Representing the Fanconi Anemia Complementation Group E Gene. *Am J Hum Genet* Sept 19:67(5), 2000
14. Digweed M: Molecular basis of Fanconi's anemia. *Klin Padiatr* Jul- Aug; 211 (4):192-7, 1999
15. Dirksen U, Moritz T, Burdach S, Flasshove M, Hanenberg H: Fanconi anemia and beta c deficiency-associated pulmonary alveolar proteinosis as two hereditary diseases of childhood which are potentially curable by stem cell gene therapy but require different therapeutic approaches. *Klin Padiatr* Jul-Aug; 211 (4): 329-35, 1999
16. Fanconi G: Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Zeitschrift f. Kinderheilkunde* 117: 257-280, 1927
17. Fanconi G: Familial constitutional panmyelocytopeny, Fanconi's anemia (FA). I. Clinical aspects. *Semin. Hematol.* 4:233-240, 1967

18. Flowers M, Zanis J, Storb R et al: Bone marrow transplantation in 32 patients with Fanconi's anemia after conditioning with cyclophosphamide. *Blood* 82 (Suppl 1): 344a, 1993
19. Glanz A, Fraser FC: Spectrum of anomalies in Fanconi anemia. *J. Med. Genet.* 19:412-416, 1982
20. Gillio AP, Verlander PC, Batish SD, Giampietro PF, Auerbach AD: Phenotypic consequences of mutations in the Fanconi anemia FAC gene: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 90:105, 1997
21. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA: Hematopoietic reconstruction in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321:1174, 1989.
22. Gluckman E: Bone marrow transplantation in Fanconi's anemia. *Stem Cells* 11 (suppl 2):180, 1993.
23. Gluckman E: Allogenic bone marrow transplantation in Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant.* 18 Suppl 2:140-144, 1996
24. Guardiola P, Socie G, Pasquini R, Dokal I, Ortega JJ, van Weel-Sipman M, Marsh J, Locatelli F, Souillet G, Cahn JY, Ljungman P, Miniero R, Shaw J, Vermynen C, Archimbaud E, Bekassy AN, Kriven G, Di Bartolomeo P, Bacigalupo A, Gluckman E: Allogenic stem cell transplantation for Fanconi Anaemia. Severe Aplastic Anaemia Working Party of the EBMT and EUFAR. European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* Apr; 21 Suppl 2:24-27, 1998

25. Guinan EC, Lopez KD; Huhn RD, Felser JM, Nathan DG: Evaluation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of pancytopenia in children with Fanconi anemia. *J Pediatr* 124:144, 1994.
26. Joenje H, Lo Ten Foe JR, Oostra AB, Van Berkel CGM, Rooimans MA, Schroeder-Kurth T, Wegner R-D, et al: Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype. *Blood* 86: 2156-2160, 1995
27. Joenje H, Oostra AB, Wijker M, di Summa FM, van Berkel CG, Rooimans MA, Ebell W, van Weel M, Pronk JC, Buchwald M, Arwert F: Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. *Am J Hum Genet* 1997 Oct; 61(4):940-4
28. Kohli-Kumar M, Morris C, DeLaat C, Sambrano J, Masterson M, Mueller R, Shahidi NT, Yanik G, Desantes K, Firedman DJ, Auerbach AD, Harris RE: Bone marrow transplantation in Fanconi anemia using matched sibling donors. *Blood* 84:2050-2054, 1994
29. Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS: Endogenous blockage and delay of the chromosome cell cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent endomitosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet* 37:1022, 1985
30. Latt SA, Kaiser TN, Lojewski A, Dougherty L, Juergens L, Brefach S, Sahar E, Gustashaw K, Schreck RR, Powers M, Lalande M: Cytogenetic and flow cytometric studies of cells from patients with Fanconi's anemia. *Cytogenet Cell Genet* 33:133, 1982
31. Liu JM: Gene transfer for the eventual treatment of Fanconi's anemia. *Semin Hematol* 1998 Apr; 35(2):168-79

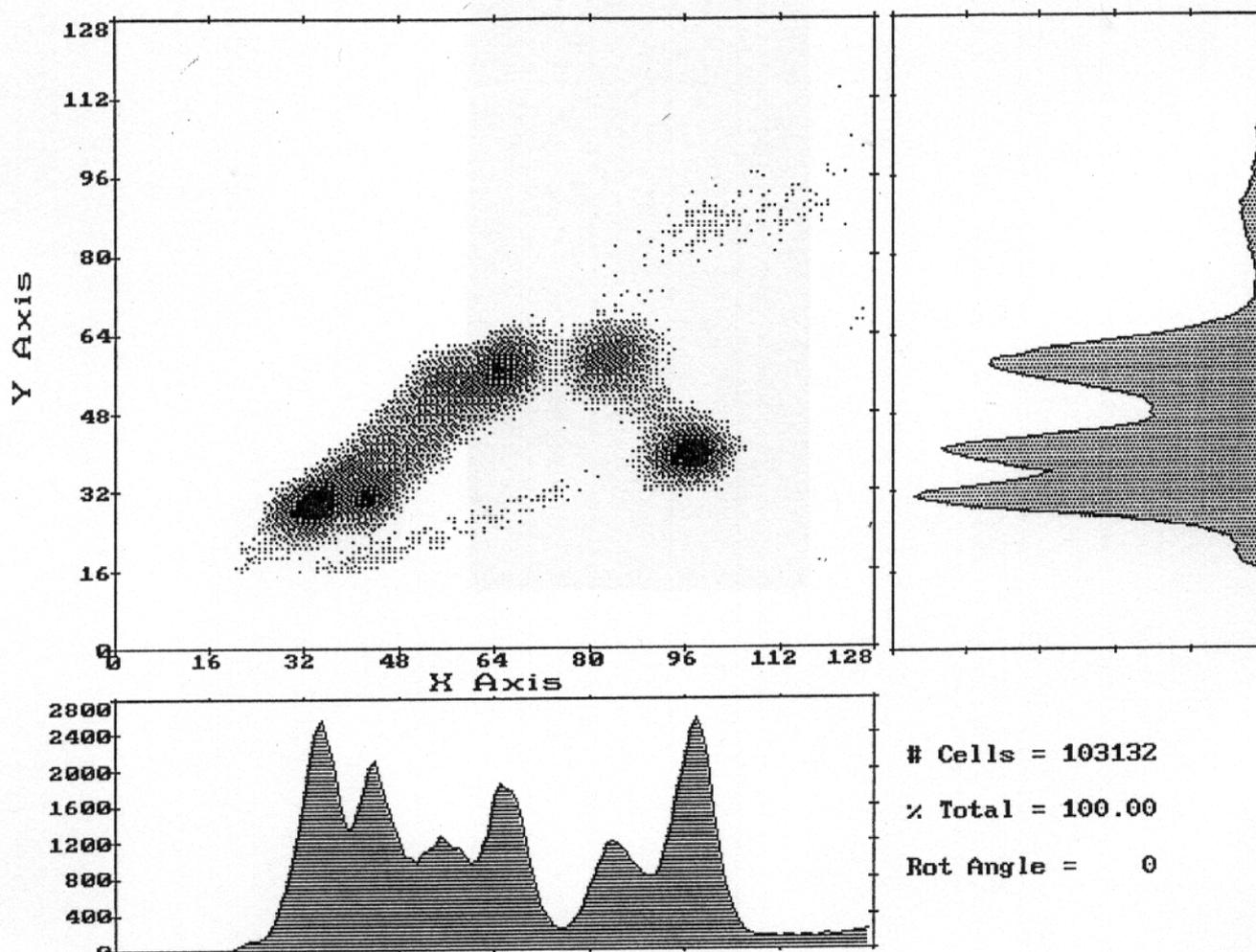
32. Medeiros C, Zanis-Neto J, Pasquini R: Bone marrow transplantation for patients with Fanconi anemia: reduced doses of cyclophosphamide without irradiation as conditioning. *Bone Marrow Transplant* 1999 Oct; 24(8):849-52
33. Miglierina R, Le Coniat M, Gendron MC, Berger R: Diagnosis of Fanconi anemia by flow cytometry. *Nouv Rev Fr Hematol* 32:391, 1990
34. Miglierina R, Le Coniat M, Berger R: A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow cytometry. *Anal Cell Pathol Mar*; 3(2):111-8, 1991
35. Rabinovitch PS, Kubbies M, Chen YC, Schindler D, Hoehn H: BrdU-Hoechst flow cytometry: A unique tool for quantitative cell cycle analysis. *Exp Cell Res* 174:309, 1988
36. Savino M, Ianzano L, Strippoli P, Ramenghi U, Arslanian A, Bagnara GP, Joenje H, Zelante L, Savoia A: Mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Italian patients. *Am J Hum Genet* 61:1246-1253, 1997
37. Schindler D, Kubbies M, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS: Presymptomatic diagnosis of Fanconi's anemia. *Lancet* 1:937, 1985
38. Schroeder TM, Anshütz F, Knopp A: Spontane Chromosomenabberationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik* 1:194-196, 1964
39. Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, Hentze S, Schroeder-Kurth T: Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 1995 Apr 15; 85(8):2233-7
40. Socie G, Gluckman E, Raynal B, et al: Bone marrow transplantation for Fanconi anemia using low-dose cyclophosphamide/thoracoabdominal irradiation as conditioning regimen: chimerism study by polymerase chain reaction. *Blood* 82: 2249-56, 1993

41. Toraldo R, Canino G, Tolone C, D'Avanzo M, Porfirio B, Hoehn H, Schroeder-Kurth T, Pistoia V: Variable response to the diepoxybutane test in two dizygotic twins with Fanconi's anemia and flow cytometry for diagnosis confirmation. *Pediatr Hematol Oncol* Jan-Feb; 15(1):45-54 , 1998
42. Verlander PC, Lin JD, Udono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG, Auerbach AD: Mutation analysis of the Fanconi Anaemia Gene FACC. *Am J Hum Genet* 54:595-601, 1994
43. Weisburger JH: Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants, and carotenoids. *Am J Clin Nutr* 53:226S-237S, 1991
44. Wijker M, Morgan S, Herterich S, Van Berkel CGM, Tipping AJ, Gross HJ, Gille JJP, Pals G, Savino M, Altay C, Mohan S, Dokal I, Cavenagh J, Marsh J, Van Weel M, Ortega JJ, Schuler D, Samochalova E, Karwacki M, Bekassy AN, Abecasis M, Ebell W, Kwee ML, de Ravel T, Gibson A, Gluckman E, Arwen F, Joenje H, Savioa H, Hoehn H, Pronk JC, Mathew CG: Heterogeneous Spectrum of Mutations in the Fanconi Anaemia group A gene. *Eur J Hum Genet* 7:52-59, 1999
45. Yamashita T, Wu N, Kupfer G, Corless C, Joenje H, Grompe AD, Andrea D: Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood* 87:4424, 1996

6. Anhang

Darstellungen der durchflußzytometrischen Untersuchungen aller in den Tabellen aufgeführten FA Patienten.

<u>Patient</u>	<u>Filename</u>
Pat #1	arn00a
Pat #2	get00a
Pat #3	kee00a
Pat #4	ans00a
Pat #5	van00a
Pat #6	sta00a
Pat #7	tmm00a
Pat #8	lea00a
Pat #9	psp00a
Pat #10	mrf00a
Pat #11	hgk00a
Pat #12	sgka00a
Pat #13	sgaa00a
Pat #14	kRm00b
Pat #15	tmsn00a
Pat #16	mrcn00a
Pat #17	mrt00a
Pat #18	fica0a
Pat #19	knm00b
Pat #20	otk00a
Pat #21	klm00a
Pat #22	akm00a
Pat #23	akn00a
Pat #24	scp00a
Pat #25	crs00a



Filename : arn00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	53.5	16.0	30.5	33.5	35.0	31.5	79.5	18.5	2.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	24.0	7.2	13.7	14.1	14.8	13.3	10.4	2.4	0.3	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	34.7	10.4	19.8	10.2	10.7	9.6	3.7	0.9	0.1	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl = 77230	%Real-Zellen = 44.8	%Orig-Zellen = 64.8
Zyklus 2 :	Zellzahl = 72673	%Real-Zellen = 42.2	%Orig-Zellen = 30.5
Zyklus 3 :	Zellzahl = 22469	%Real-Zellen = 13.0	%Orig-Zellen = 4.7
Zyklus 4 :	Zellzahl = 0	%Real-Zellen = 0.0	%Orig-Zellen = 0.0

%Increased Cells = 144.6

%Growth-Fraction = 65.3

G2/GF = 0.303	G2./GF = 0.147
G2../GF = 0.001	G2.../GF = 0.000
ä G1 = 14.0%	ä S = 21.9%
S+S. = 21.0%	S+S.+S.. = 21.9%

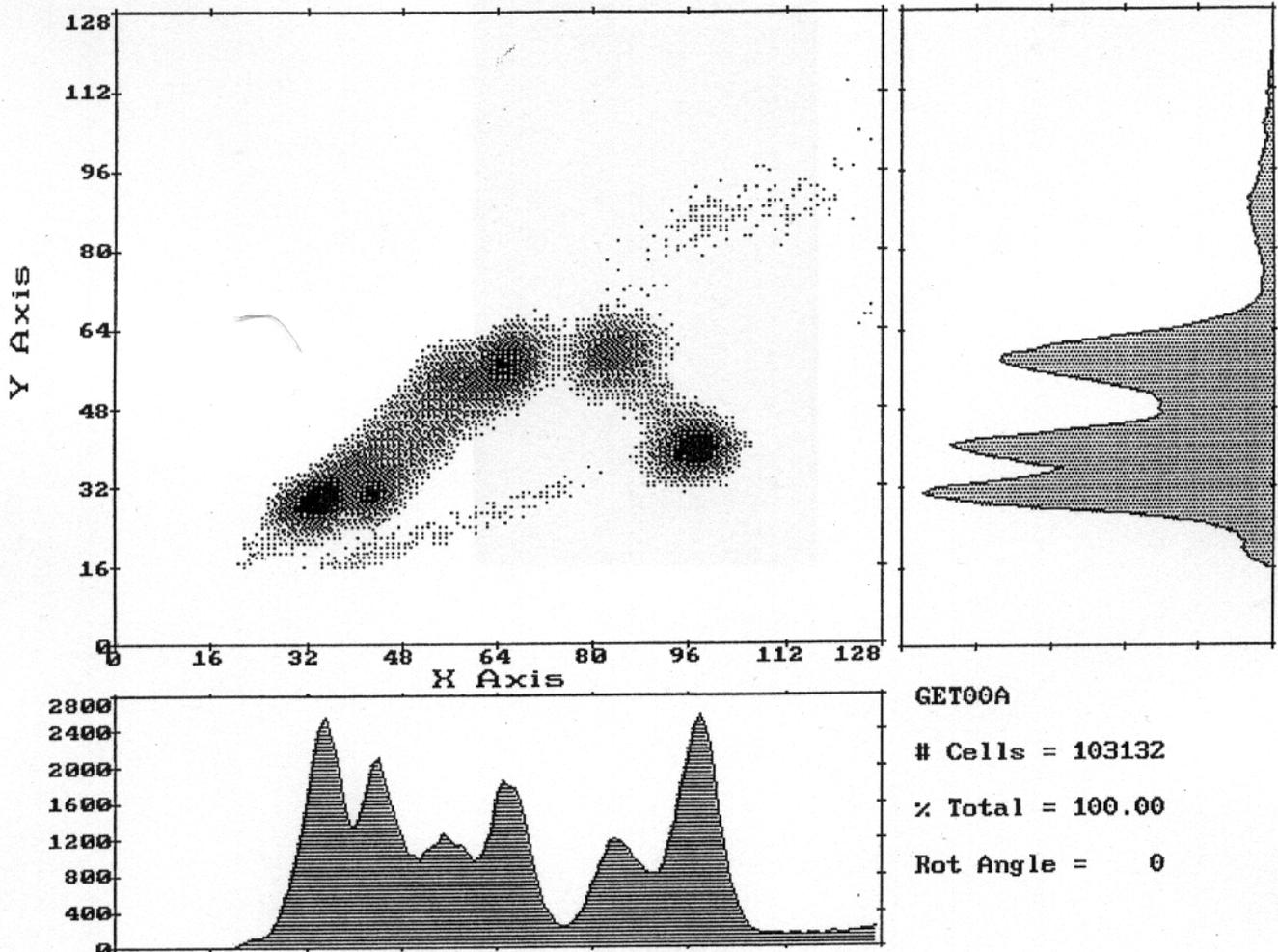
S/G1 - Ratio = 1.57

G2/G1 - Ratio = 2.11

(S+G2)/G1 - Ratio = 3.68

ä G2 = 29.5%

ä G2/GF = 0.451



Filename : get00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	55.5	16.2	28.3	28.2	21.8	50.0	46.8	41.0	12.2	92.3	7.6	0.1
%Real-Zellen:	18.5	5.4	9.5	8.6	6.7	15.3	15.4	13.5	4.0	2.9	0.2	0.0
%Orig-Zellen:	32.4	9.4	16.5	7.5	5.8	13.3	6.7	5.9	1.7	0.6	0.1	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	30940	%Real-Zellen =	33.4	%Orig-Zellen =	58.3
Zyklus 2 :	Zellzahl =	28314	%Real-Zellen =	30.6	%Orig-Zellen =	26.7
Zyklus 3 :	Zellzahl =	30438	%Real-Zellen =	32.9	%Orig-Zellen =	14.3
Zyklus 4 :	Zellzahl =	2944	%Real-Zellen =	3.2	%Orig-Zellen =	0.7

%Increased Cells = 174.5

%Growth-Fraction = 67.6

G2/GF = 0.244 G2./GF = 0.197

G2../GF = 0.026 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 14.9% ä S = 21.2%

S+S. = 15.3% S+S.+S.. = 21.1%

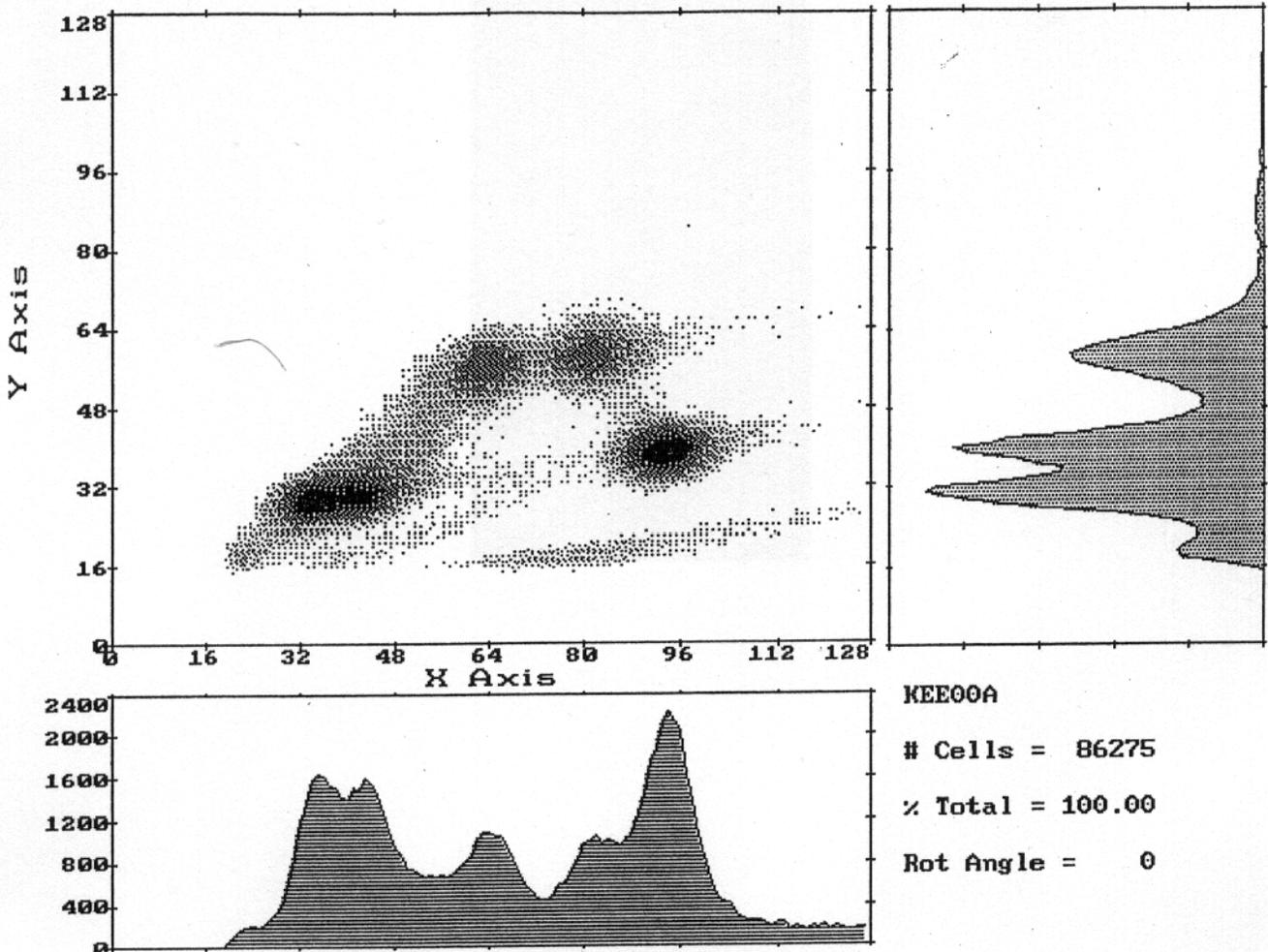
S/G1 - Ratio = 1.42

G2/G1 - Ratio = 2.12

(S+G2)/G1 - Ratio = 3.55

ä G2 = 31.6%

ä G2/GF = 0.467



Filename : kee00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	60.0	9.5	30.5	40.0	28.0	32.0	69.0	25.0	6.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	25.3	4.0	12.9	13.1	9.2	10.5	17.3	6.3	1.5	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	39.1	6.2	19.9	10.1	7.1	8.1	6.7	2.4	0.6	0.0	0.0	0.0

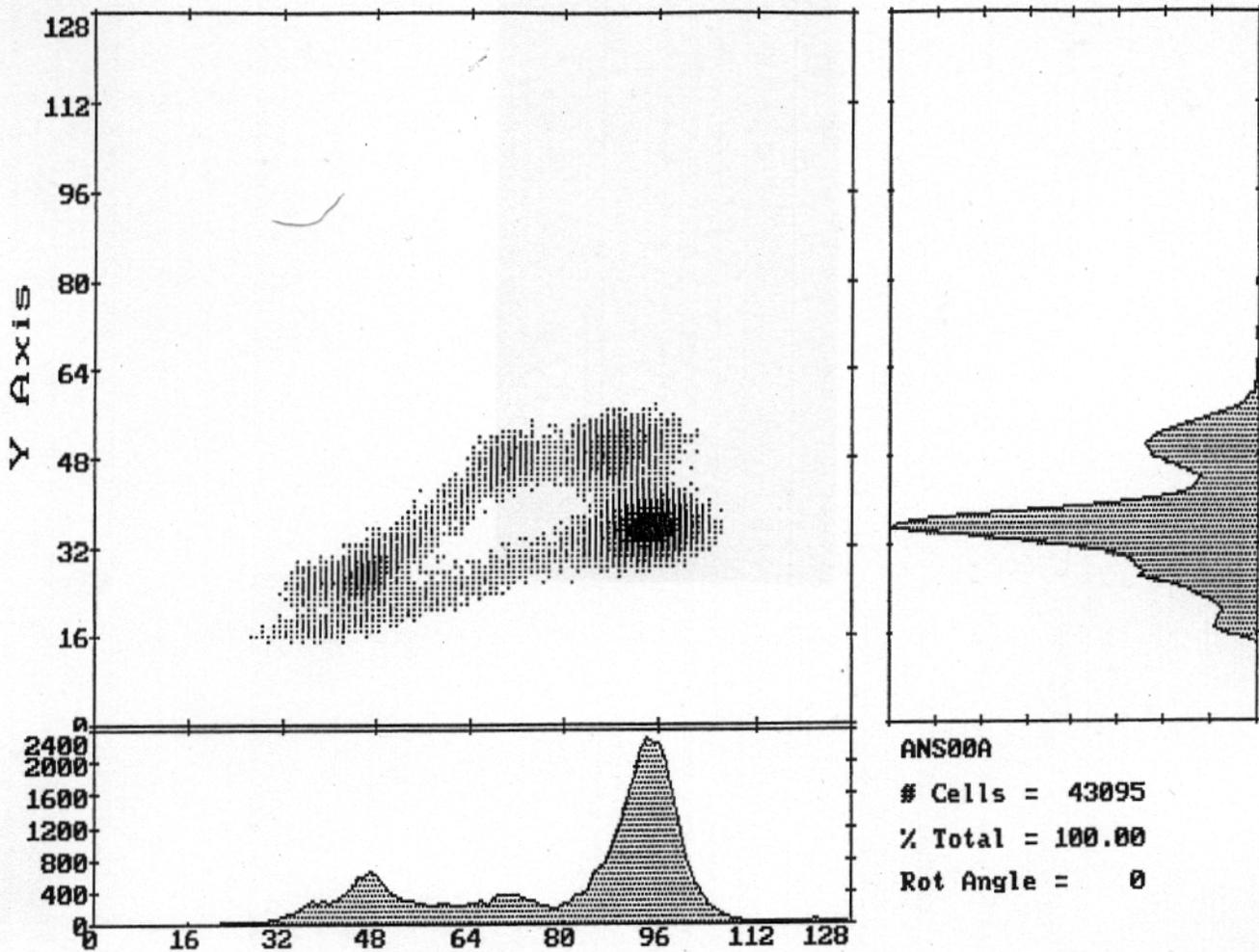
Zyklus 1 :	Zellzahl =	30957	%Real-Zellen =	42.2	%Orig-Zellen =	65.1
Zyklus 2 :	Zellzahl =	24014	%Real-Zellen =	32.7	%Orig-Zellen =	25.2
Zyklus 3 :	Zellzahl =	18368	%Real-Zellen =	25.0	%Orig-Zellen =	9.7
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 154.2

%Growth-Fraction = 60.9

G2/GF = 0.326	G2./GF = 0.133
G2../GF = 0.010	G2.../GF = 0.000
ä G1 = 16.8%	ä S = 15.7%
S+S. = 13.3%	S+S.+S.. = 15.7%

S/G1 - Ratio	=	0.93
G2/G1 - Ratio	=	1.70
(S+G2)/G1 - Ratio	=	2.64
ä G2	=	28.5%
ä G2/GF	=	0.468



Filename : ans00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	70.3	10.1	19.6	44.6	37.7	17.7	80.4	19.1	0.5	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	51.0	7.3	14.2	10.6	9.0	4.2	3.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	59.8	8.6	16.7	6.2	5.2	2.5	0.9	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0

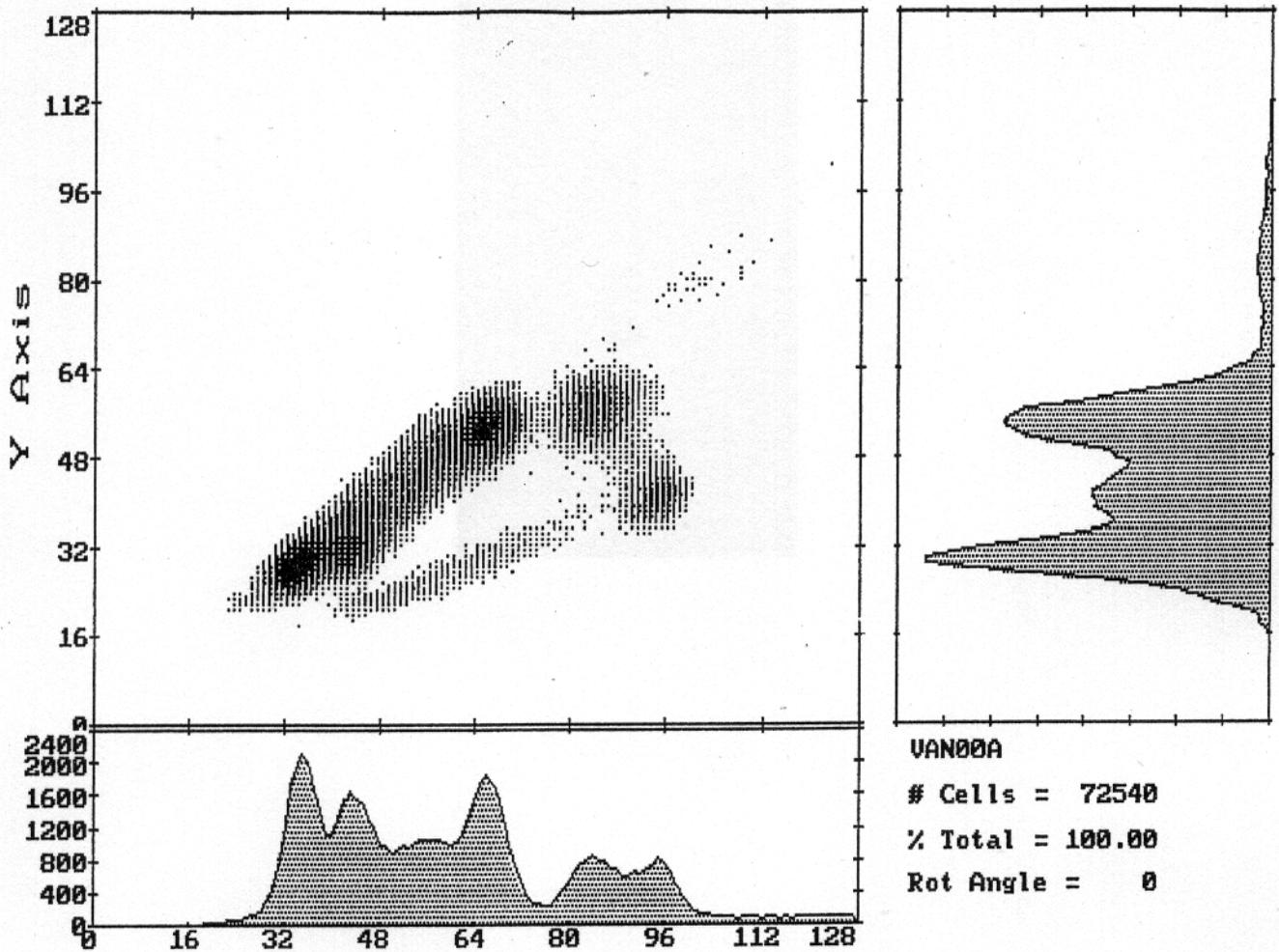
Zyklus 1 :	Zellzahl =	27508	%Real-Zellen =	72.5	%Orig-Zellen =	85.0
Zyklus 2 :	Zellzahl =	9010	%Real-Zellen =	23.8	%Orig-Zellen =	13.9
Zyklus 3 :	Zellzahl =	1407	%Real-Zellen =	3.7	%Orig-Zellen =	1.1
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 117.2

%Growth-Fraction = 40.2

G2/GF = 0.414	G2./GF = 0.061
G2../GF = 0.000	G2.../GF = 0.000
ä G1 = 7.1%	ä S = 14.0%
S+S. = 13.8%	S+S.+S.. = 14.0%

S/G1 - Ratio	=	1.98
G2/G1 - Ratio	=	2.70
(S+G2)/G1 - Ratio	=	4.68
ä G2	=	19.1%
ä G2/GF	=	0.475



Filename : van00a +

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	28.0	19.3	52.7	21.3	46.2	32.5	58.1	35.1	6.8	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	5.6	3.8	10.5	10.2	22.2	15.6	18.7	11.3	2.2	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	10.7	7.4	20.2	9.8	21.3	15.0	9.0	5.4	1.1	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	13176	%Real-Zellen =	19.9	%Orig-Zellen =	38.3
Zyklus 2 :	Zellzahl =	31761	%Real-Zellen =	48.0	%Orig-Zellen =	46.2
Zyklus 3 :	Zellzahl =	21249	%Real-Zellen =	32.1	%Orig-Zellen =	15.5
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 192.6

%Growth-Fraction = 89.3

G2/GF = 0.226 G2./GF = 0.168

G2../GF = 0.012 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 18.8% ä S = 34.2%

S+S. = 28.7% S+S.+S.. = 34.2%

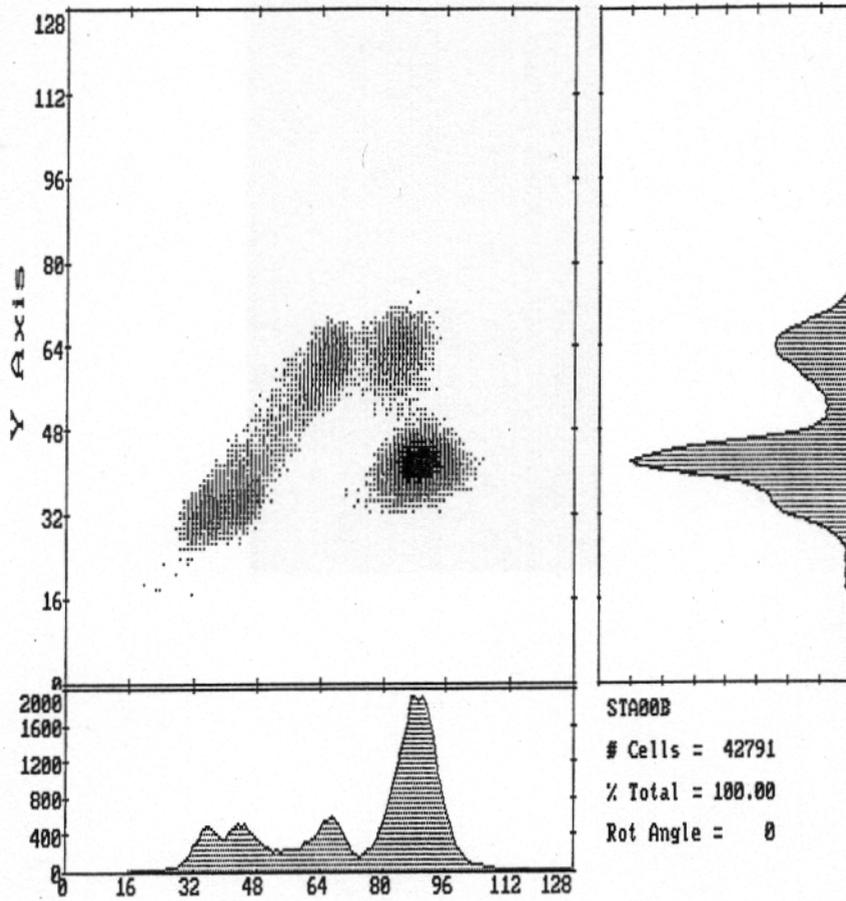
S/G1 - Ratio = 1.82

G2/G1 - Ratio = 1.93

(S+G2)/G1 - Ratio = 3.74

ä G2 = 36.3%

ä G2/GF = 0.406



Filename : sta00b

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2
%Plot-Zellen:	73.3	8.6	18.1	24.5	38.6	36.9	57.5	37.9	4.6	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	45.8	5.4	11.3	6.2	9.7	9.3	7.1	4.7	0.6	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	58.6	6.9	14.5	3.9	6.2	5.9	2.3	1.5	0.2	0.0	0.0	0.0

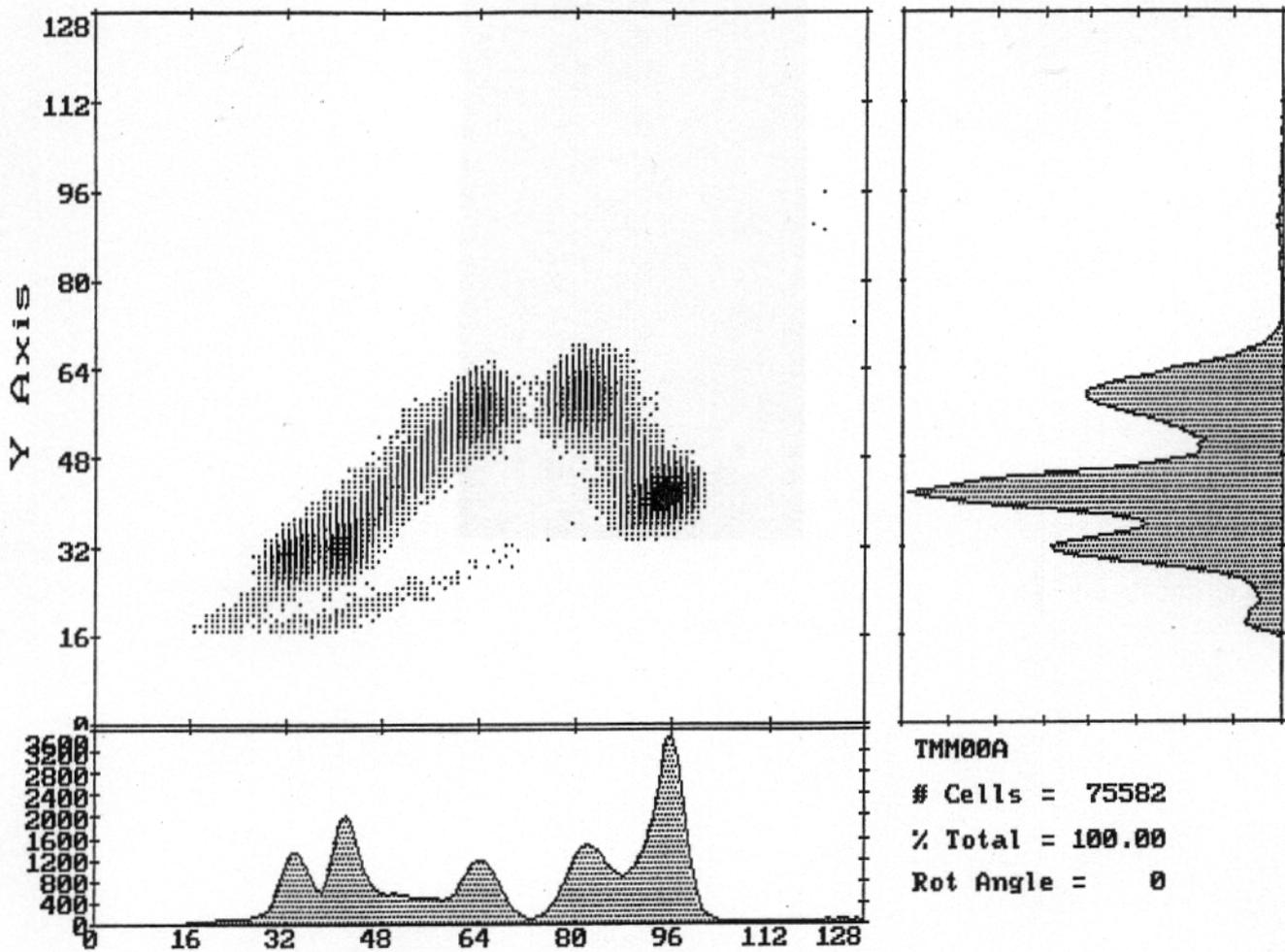
Zyklus 1 :	Zellzahl =	25674	%Real-Zellen =	62.6	%Orig-Zellen =	80.0
Zyklus 2 :	Zellzahl =	10312	%Real-Zellen =	25.1	%Orig-Zellen =	16.1
Zyklus 3 :	Zellzahl =	5059	%Real-Zellen =	12.3	%Orig-Zellen =	3.9
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 127.9

%Growth-Fraction = 41.4

G2/GF = 0.350	G2./GF = 0.143
G2../GF = 0.004	G2.../GF = 0.000
σ G1 = 6.2%	σ S = 14.6%
S+S. = 13.1%	S+S.+S.. = 14.6%

S/G1 - Ratio	=	2.35
G2/G1 - Ratio	=	3.32
(S+G2)/G1 - Ratio	=	5.67
σ G2	=	20.6%
σ G2/GF	=	0.498



Filename : tmm00a v

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	56.2	17.1	26.7	34.4	38.2	27.4	73.5	24.1	2.4	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	29.6	9.0	14.1	11.4	12.6	9.1	10.5	3.4	0.3	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	40.7	12.4	19.3	7.8	8.7	6.2	3.6	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0

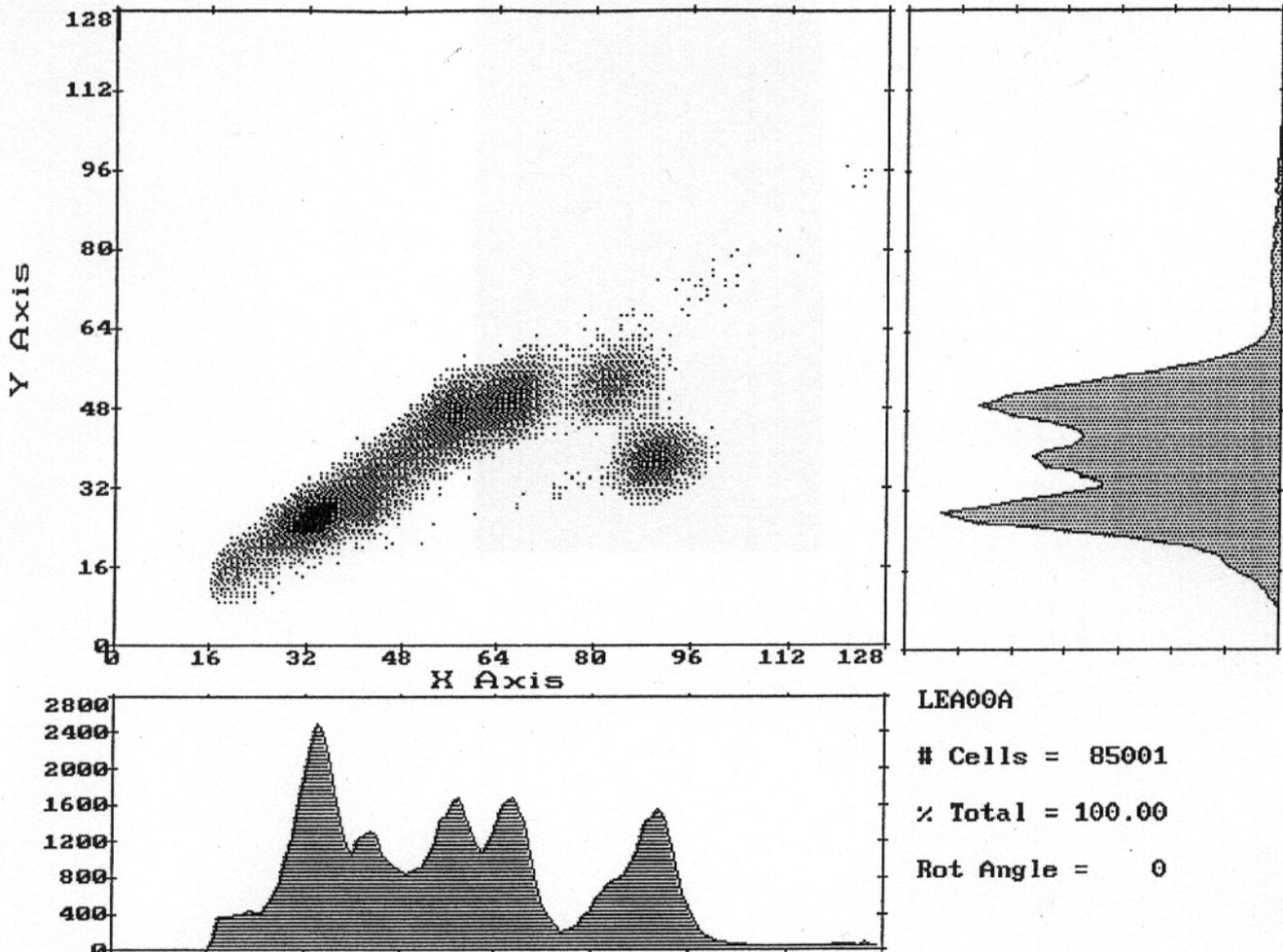
Zyklus 1 :	Zellzahl =	37487	%Real-Zellen =	52.7	%Orig-Zellen =	72.4
Zyklus 2 :	Zellzahl =	23514	%Real-Zellen =	33.0	%Orig-Zellen =	22.7
Zyklus 3 :	Zellzahl =	10173	%Real-Zellen =	14.3	%Orig-Zellen =	4.9
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 137.4

%Growth-Fraction = 59.3

G2/GF = 0.326	G2./GF = 0.105
G2../GF = 0.002	G2.../GF = 0.000
ä G1 = 11.4%	ä S = 22.2%
S+S. = 21.1%	S+S.+S.. = 22.2%

S/G1 - Ratio	=	1.95
G2/G1 - Ratio	=	2.25
(S+G2)/G1 - Ratio	=	4.19
ä G2	=	25.7%
ä G2/GF	=	0.433



Filename : lea00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	58.7	9.3	32.0	23.2	13.6	63.2	42.7	31.2	26.1	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	13.1	2.1	7.1	6.2	3.7	17.0	21.7	15.8	13.3	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	27.0	4.3	14.7	6.4	3.8	17.6	11.2	8.2	6.8	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	17154	%Real-Zellen =	22.3	%Orig-Zellen =	46.0
Zyklus 2 :	Zellzahl =	20717	%Real-Zellen =	26.9	%Orig-Zellen =	27.8
Zyklus 3 :	Zellzahl =	39056	%Real-Zellen =	50.8	%Orig-Zellen =	26.2
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 206.4

%Growth-Fraction = 73.0

G2/GF = 0.202

G2./GF = 0.241

S/G1 - Ratio = 0.92

G2/G1 - Ratio = 2.22

G2../GF = 0.094

G2.../GF = 0.000

(S+G2)/G1 - Ratio = 3.14

ä G1 = 17.6%

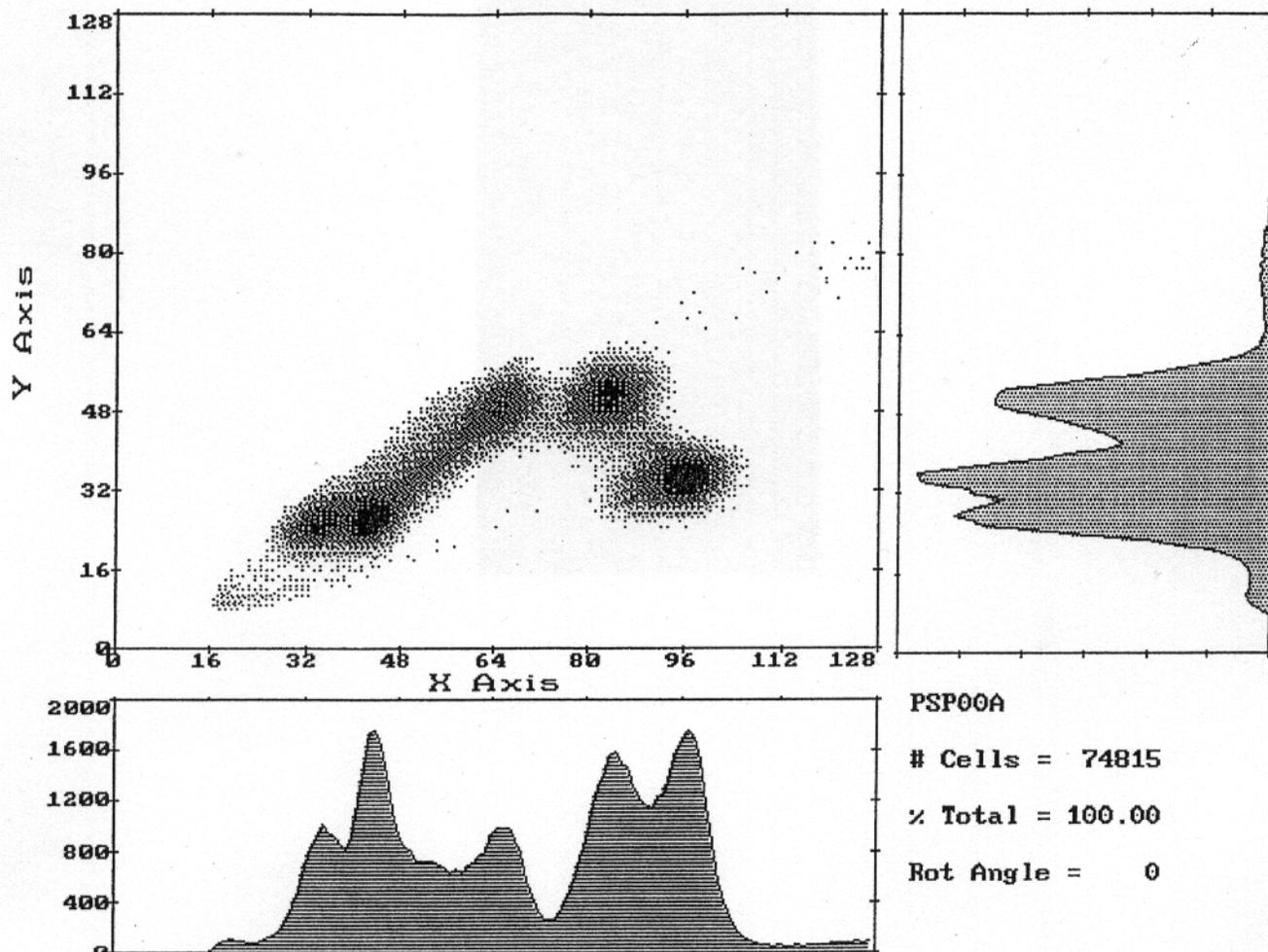
ä S = 16.2%

ä G2 = 39.1%

S+S. = 8.1%

S+S.+S.. = 16.2%

ä G2/GF = 0.536



PSP00A

Cells = 74815

% Total = 100.00

Rot Angle = 0

Filename : psp00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	45.8	15.7	38.5	32.4	42.0	25.6	65.0	27.2	7.8	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	21.0	7.2	17.6	12.7	16.5	10.0	9.7	4.1	1.2	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	30.3	10.4	25.5	9.2	11.9	7.3	3.5	1.5	0.4	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	32973	%Real-Zellen =	45.8	%Orig-Zellen =	66.3
Zyklus 2 :	Zellzahl =	28193	%Real-Zellen =	39.2	%Orig-Zellen =	28.3
Zyklus 3 :	Zellzahl =	10764	%Real-Zellen =	15.0	%Orig-Zellen =	5.4
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 144.6

%Growth-Fraction = 69.7

G2/GF = 0.366 G2./GF = 0.104

G2../GF = 0.006 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 12.7% ä S = 23.8%

S+S. = 22.3% S+S.+S.. = 23.8%

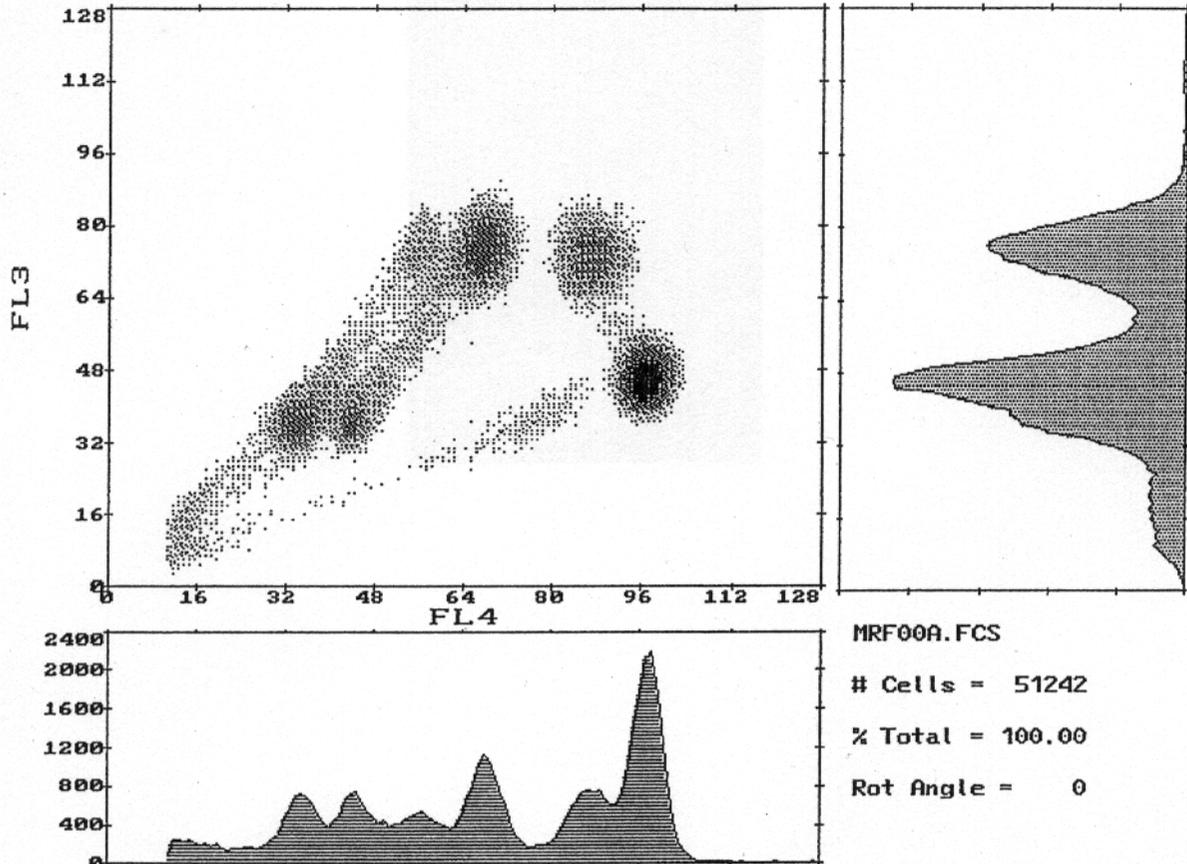
S/G1 - Ratio = 1.87

G2/G1 - Ratio = 2.61

(S+G2)/G1 - Ratio = 4.49

ä G2 = 33.2%

ä G2/GF = 0.476



Filename : mrf00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	60.9	10.6	28.5	19.0	32.2	48.8	36.7	46.2	17.1	100.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	28.1	4.9	13.2	5.8	9.9	15.0	8.1	10.1	3.8	1.1	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	41.9	7.3	19.6	4.3	7.4	11.2	3.0	3.8	1.4	0.2	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	20426	%Real-Zellen =	46.2	%Orig-Zellen =	68.7
Zyklus 2 :	Zellzahl =	13593	%Real-Zellen =	30.7	%Orig-Zellen =	22.9
Zyklus 3 :	Zellzahl =	9718	%Real-Zellen =	22.0	%Orig-Zellen =	8.2
Zyklus 4 :	Zellzahl =	508	%Real-Zellen =	1.1	%Orig-Zellen =	0.2

%Increased Cells = 148.9

%Growth-Fraction = 58.1

G2/GF = 0.337 G2./GF = 0.192

G2../GF = 0.024 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 7.6% ä S = 18.4%

S+S. = 14.7% S+S.+S.. = 18.4%

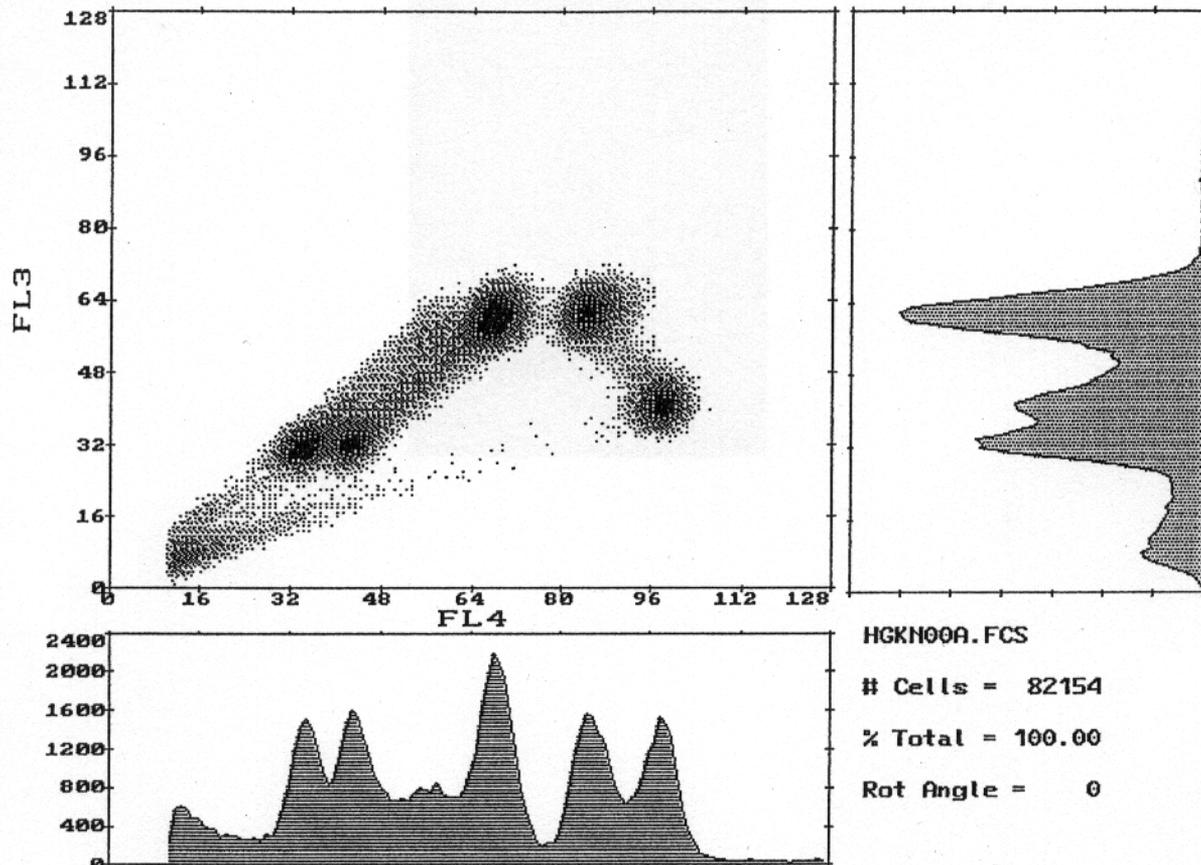
S/G1 - Ratio = 2.44

G2/G1 - Ratio = 4.25

(S+G2)/G1 - Ratio = 6.69

ä G2 = 32.2%

ä G2/GF = 0.553



Filename : hgk00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	37.0	14.2	48.8	21.5	34.0	44.5	54.6	34.1	11.3	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	12.6	4.8	16.6	9.7	15.3	20.0	11.5	7.2	2.4	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	20.3	7.8	26.8	7.8	12.4	16.2	4.7	2.9	1.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	24089	%Real-Zellen =	33.9	%Orig-Zellen =	55.0
Zyklus 2 :	Zellzahl =	31926	%Real-Zellen =	45.0	%Orig-Zellen =	36.4
Zyklus 3 :	Zellzahl =	15003	%Real-Zellen =	21.1	%Orig-Zellen =	8.6
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 162.1

%Growth-Fraction = 79.7

G2/GF = 0.337 G2./GF = 0.204

G2../GF = 0.012 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 12.5% ä S = 23.1%

S+S. = 20.2% S+S.+S.. = 23.1%

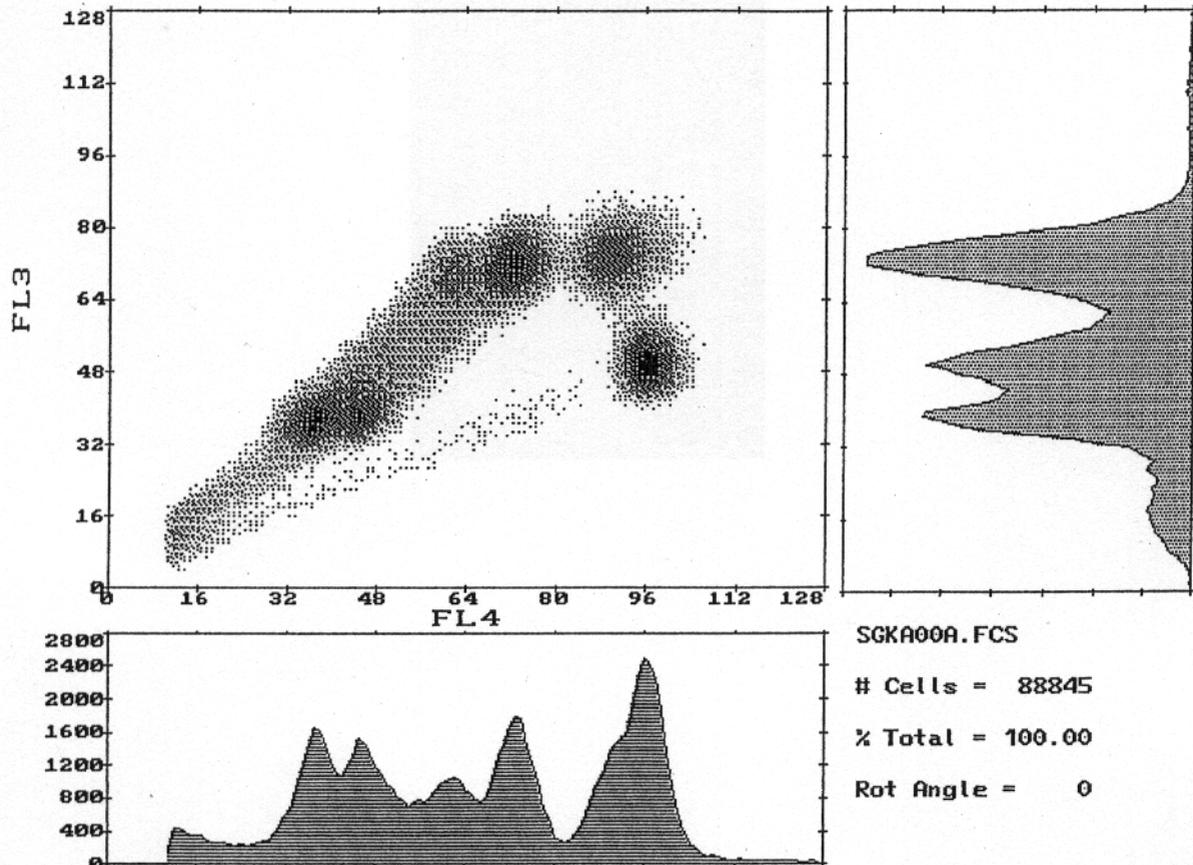
S/G1 - Ratio = 1.85

G2/G1 - Ratio = 3.52

(S+G2)/G1 - Ratio = 5.37

ä G2 = 44.0%

ä G2/GF = 0.553



Filename : sgka00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	44.0	12.0	44.0	21.7	29.4	48.9	34.5	46.5	19.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	15.5	4.2	15.5	7.1	9.6	15.9	11.1	14.9	6.1	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	26.1	7.1	26.1	5.9	8.0	13.3	4.6	6.3	2.6	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	27889	%Real-Zellen =	35.3	%Orig-Zellen =	59.2
Zyklus 2 :	Zellzahl =	25683	%Real-Zellen =	32.5	%Orig-Zellen =	27.3
Zyklus 3 :	Zellzahl =	25364	%Real-Zellen =	32.1	%Orig-Zellen =	13.5
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 167.7

%Growth-Fraction = 73.9

G2/GF = 0.353 G2./GF = 0.180

G2../GF = 0.035 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 10.6% ä S = 21.4%

S+S. = 15.1% S+S.+S.. = 21.4%

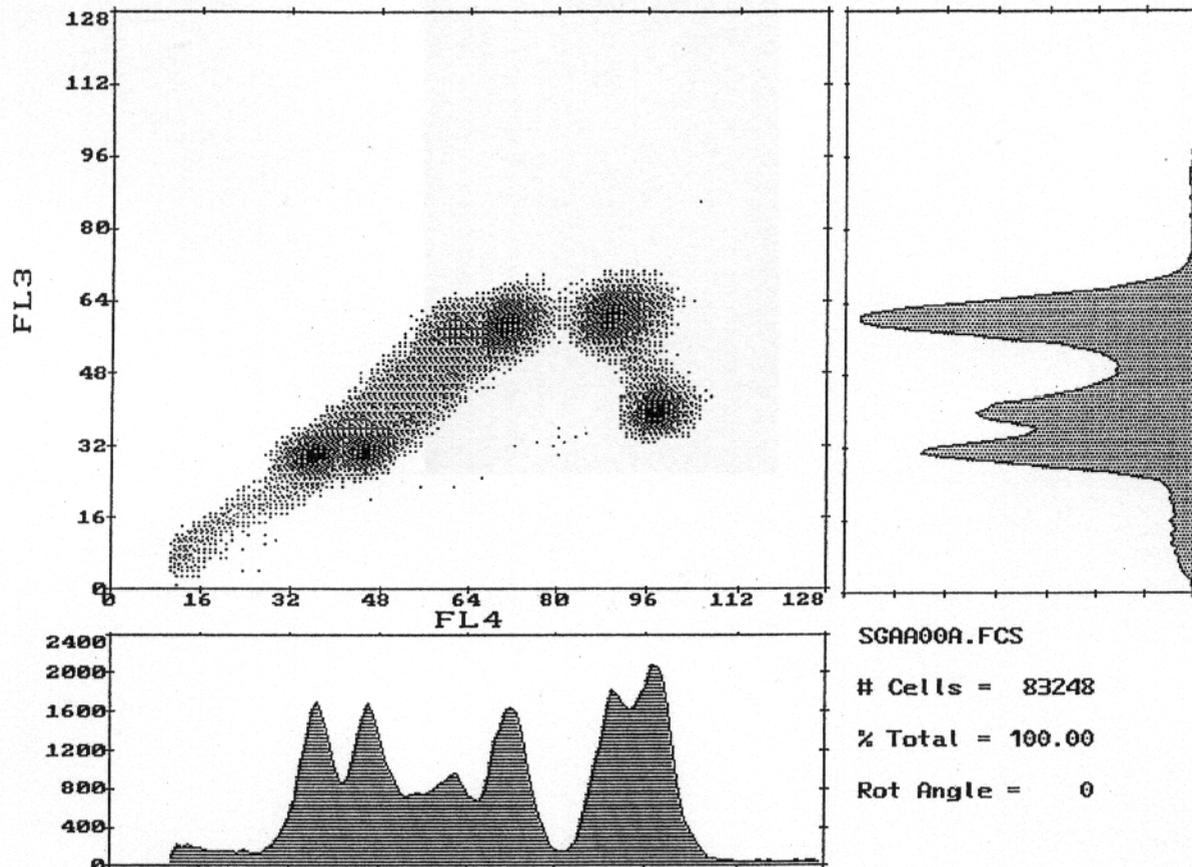
S/G1 - Ratio = 2.02

G2/G1 - Ratio = 3.97

(S+G2)/G1 - Ratio = 6.00

ä G2 = 42.0%

ä G2/GF = 0.568



Filename : sgaa00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	35.5	11.0	53.5	27.4	27.6	45.0	38.3	46.6	15.1	100.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	12.8	4.0	19.3	9.3	9.3	15.2	11.4	13.9	4.5	0.4	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	21.2	6.6	31.9	7.7	7.7	12.6	4.7	5.7	1.9	0.1	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	28108	%Real-Zellen =	36.1	%Orig-Zellen =	59.7
Zyklus 2 :	Zellzahl =	26323	%Real-Zellen =	33.8	%Orig-Zellen =	27.9
Zyklus 3 :	Zellzahl =	23167	%Real-Zellen =	29.7	%Orig-Zellen =	12.3
Zyklus 4 :	Zellzahl =	330	%Real-Zellen =	0.4	%Orig-Zellen =	0.1

%Increased Cells = 165.4

%Growth-Fraction = 78.8

G2/GF = 0.405 G2./GF = 0.160

G2../GF = 0.024 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 12.5% ä S = 20.0%

S+S. = 14.3% S+S.+S.. = 20.0%

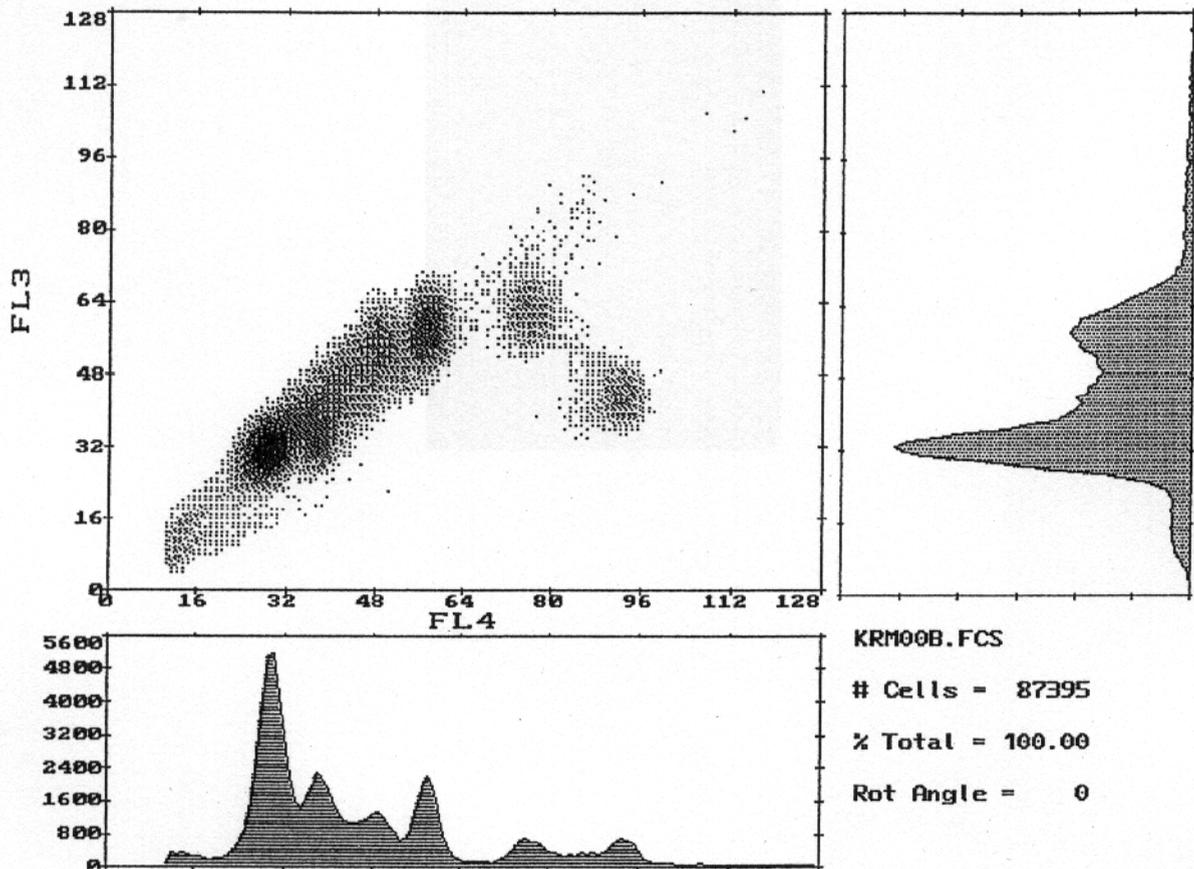
S/G1 - Ratio = 1.61

G2/G1 - Ratio = 3.72

(S+G2)/G1 - Ratio = 5.33

ä G2 = 46.4%

ä G2/GF = 0.588



KRM00B.FCS
 # Cells = 87395
 % Total = 100.00
 Rot Angle = 0

Filename : kRm00B(v)

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	37.2	21.3	41.5	30.4	24.1	45.5	56.7	36.3	7.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	4.5	2.6	5.0	8.7	6.9	13.1	33.5	21.5	4.1	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	10.9	6.3	12.2	10.6	8.4	15.9	20.3	13.0	2.5	0.0	0.0	0.0

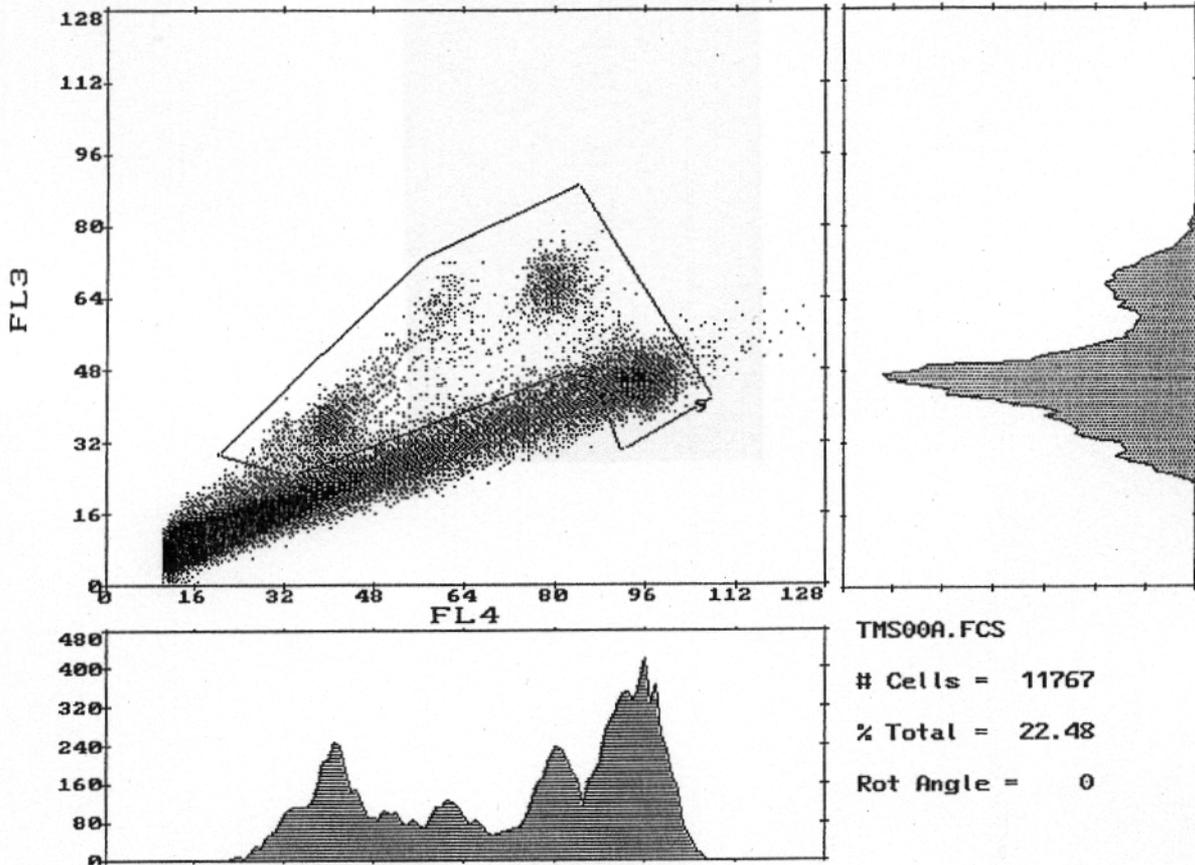
Zyklus 1 :	Zellzahl =	9574	%Real-Zellen =	12.1	%Orig-Zellen =	29.3
Zyklus 2 :	Zellzahl =	22731	%Real-Zellen =	28.8	%Orig-Zellen =	34.8
Zyklus 3 :	Zellzahl =	46734	%Real-Zellen =	59.1	%Orig-Zellen =	35.8
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 242.3

%Growth-Fraction = 89.1

G2/GF = 0.137	G2./GF = 0.178
G2../GF = 0.028	G2.../GF = 0.000
ä G1 = 30.9%	ä S = 27.6%
S+S. = 14.6%	S+S.+S.. = 27.6%

S/G1 - Ratio = 0.89
G2/G1 - Ratio = 0.99
(S+G2)/G1 - Ratio = 1.88
ä G2 = 30.5%
ä G2/GF = 0.343



Filename : tmsn00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	66.7	14.2	19.1	53.1	36.1	10.8	77.7	22.0	0.3	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	44.6	9.5	12.8	14.6	9.9	3.0	4.4	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	54.4	11.6	15.6	8.9	6.0	1.8	1.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	7034	%Real-Zellen =	66.9	%Orig-Zellen =	81.5
Zyklus 2 :	Zellzahl =	2889	%Real-Zellen =	27.5	%Orig-Zellen =	16.7
Zyklus 3 :	Zellzahl =	599	%Real-Zellen =	5.7	%Orig-Zellen =	1.7
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 121.9

%Growth-Fraction = 45.6

G2/GF = 0.341 G2./GF = 0.040

G2../GF = 0.000 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 10.2% ä S = 18.0%

S+S. = 17.6% S+S.+S.. = 18.0%

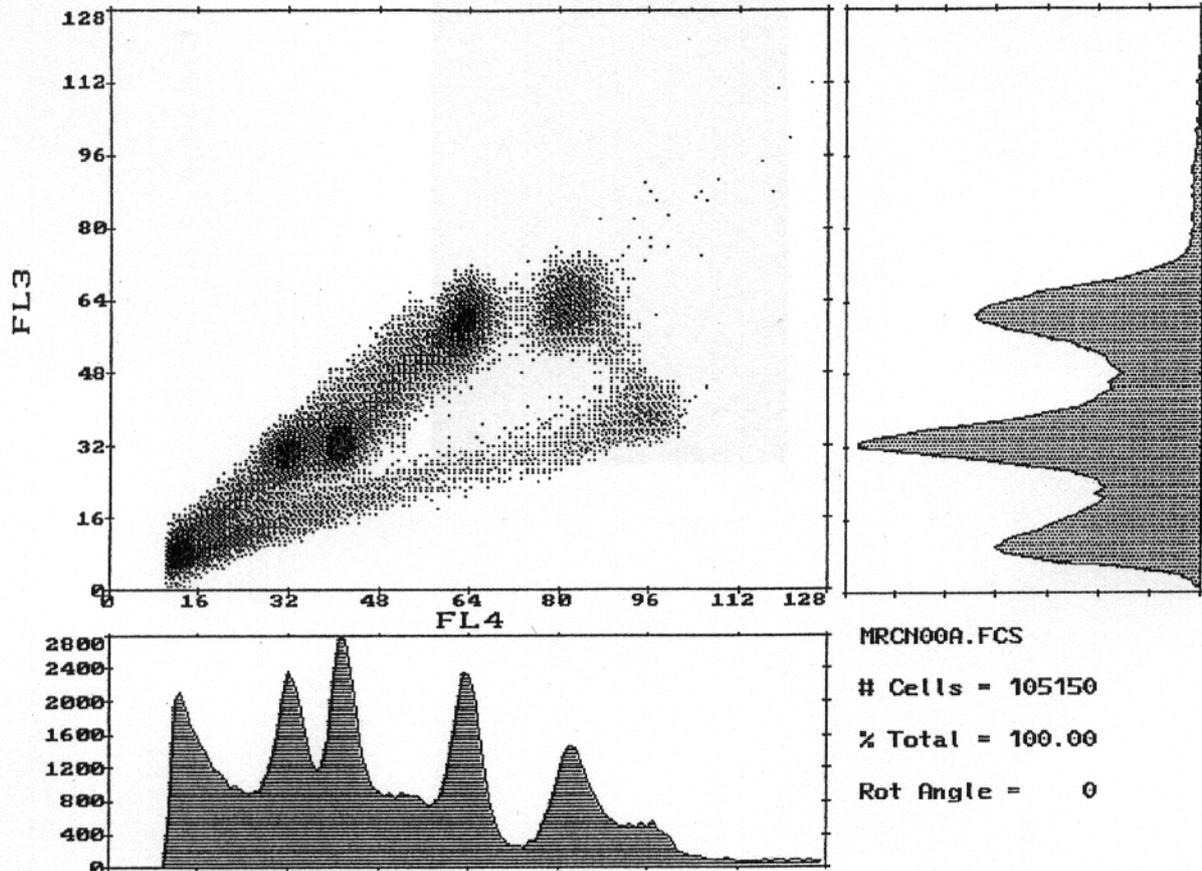
S/G1 - Ratio = 1.76

G2/G1 - Ratio = 1.70

(S+G2)/G1 - Ratio = 3.46

ä G2 = 17.4%

ä G2/GF = 0.381

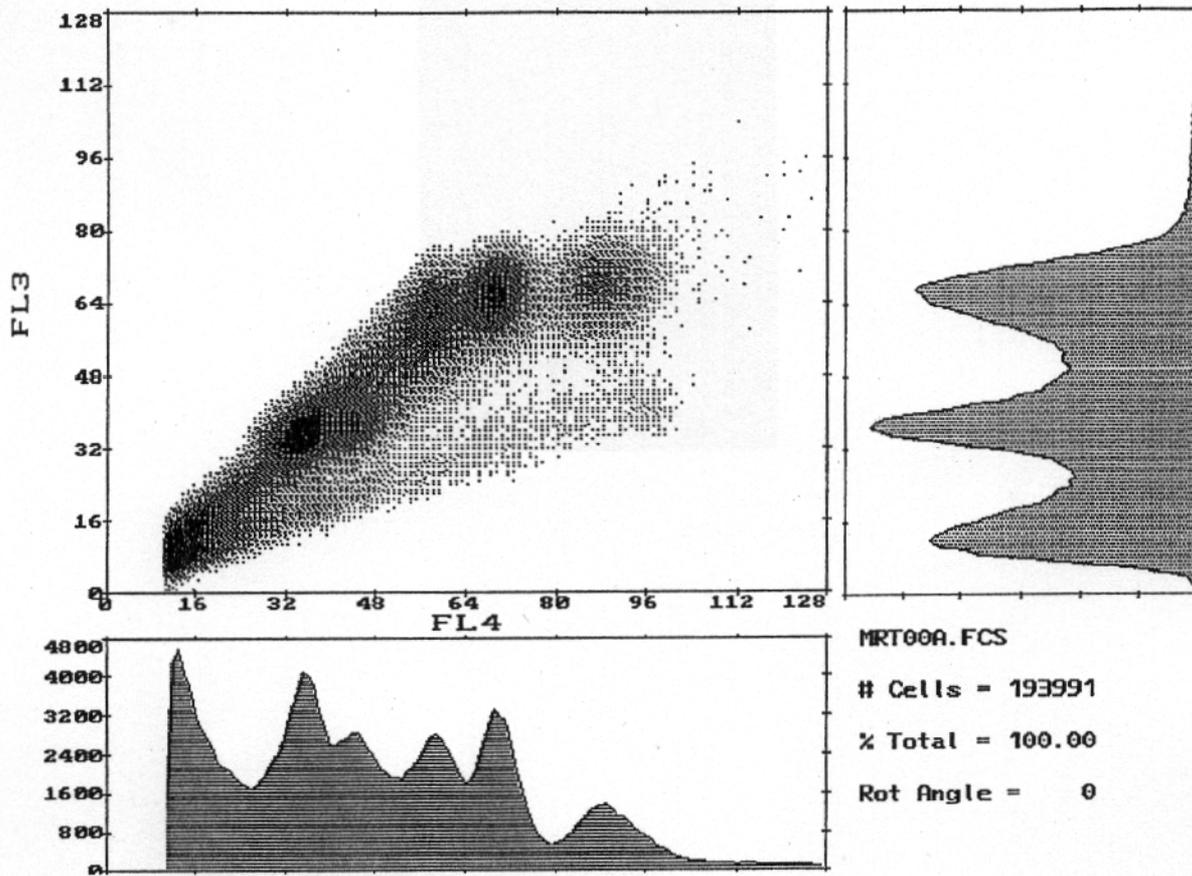


Filename : mrcn00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	25.4	14.1	60.5	34.7	29.9	35.4	61.9	28.5	9.6	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	6.1	3.4	14.5	16.4	14.1	16.7	17.8	8.2	2.8	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	11.1	6.2	26.5	15.0	12.9	15.3	8.1	3.7	1.3	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl = 17802	%Real-Zellen = 24.0	%Orig-Zellen = 43.7
Zyklus 2 :	Zellzahl = 35083	%Real-Zellen = 47.2	%Orig-Zellen = 43.1
Zyklus 3 :	Zellzahl = 21410	%Real-Zellen = 28.8	%Orig-Zellen = 13.2
Zyklus 4 :	Zellzahl = 0	%Real-Zellen = 0.0	%Orig-Zellen = 0.0

%Increased Cells = 182.6		S/G1 - Ratio = 0.99	
%Growth-Fraction = 88.9		G2/G1 - Ratio = 1.86	
G2/GF = 0.298	G2./GF = 0.172	(S+G2)/G1 - Ratio = 2.85	
G2../GF = 0.014	G2.../GF = 0.000	ä G2 = 43.0%	
ä G1 = 23.1%	ä S = 22.8%	ä G2/GF = 0.484	
S+S. = 19.1%	S+S.+S.. = 22.8%		



Filename : mrt00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	5.6	15.8	78.6	25.5	26.2	48.3	29.7	50.9	19.4	93.0	7.0	0.0
%Real-Zellen:	0.7	2.1	10.2	8.8	9.1	16.7	14.0	24.0	9.1	4.9	0.4	0.0
%Orig-Zellen:	1.7	4.8	23.9	10.3	10.6	19.6	8.2	14.0	5.3	1.4	0.1	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl = 17445	%Real-Zellen = 13.0	%Orig-Zellen = 30.4
Zyklus 2 :	Zellzahl = 46419	%Real-Zellen = 34.6	%Orig-Zellen = 40.5
Zyklus 3 :	Zellzahl = 63094	%Real-Zellen = 47.1	%Orig-Zellen = 27.5
Zyklus 4 :	Zellzahl = 7083	%Real-Zellen = 5.3	%Orig-Zellen = 1.5

%Increased Cells = 233.9

%Growth-Fraction = 98.3

G2/GF = 0.243 G2./GF = 0.199

G2../GF = 0.054 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 19.9% ä S = 29.5%

S+S. = 15.4% S+S.+S.. = 29.4%

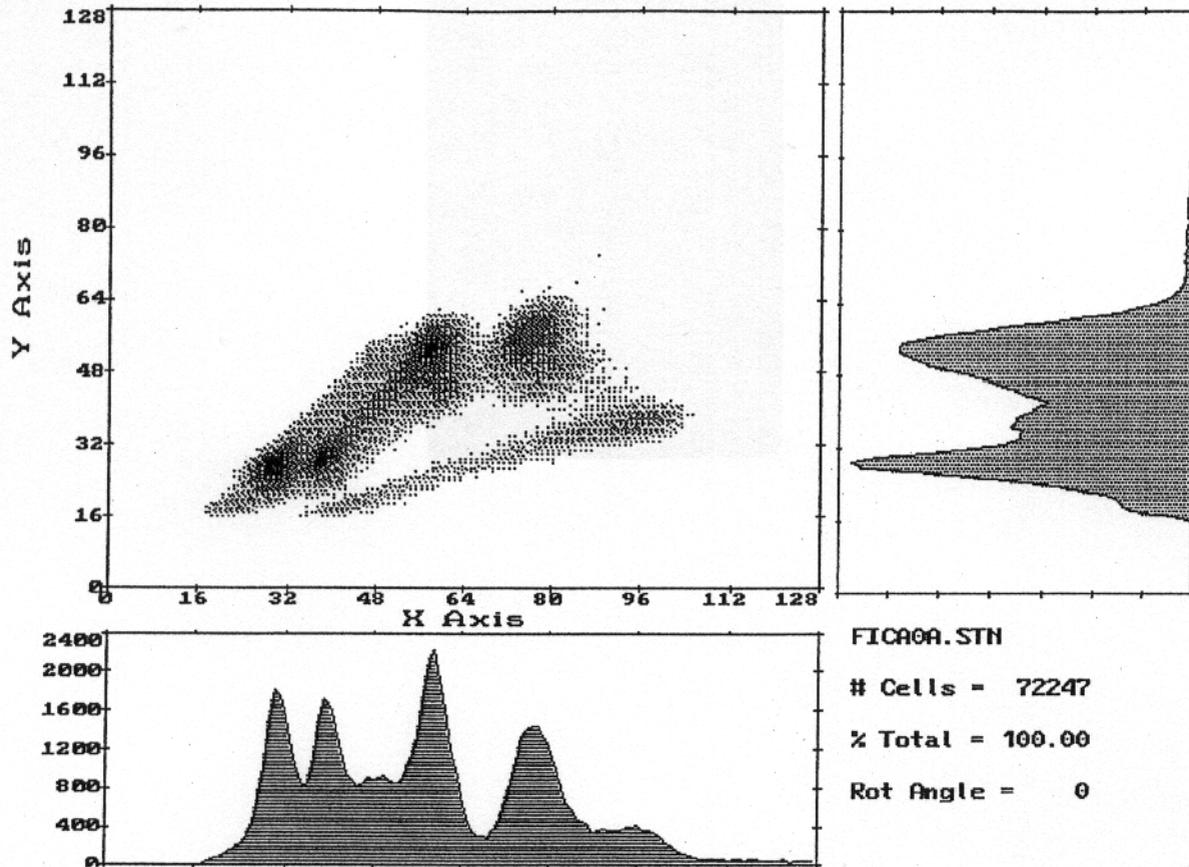
S/G1 - Ratio = 1.48

G2/G1 - Ratio = 2.45

(S+G2)/G1 - Ratio = 3.93

ä G2 = 48.8%

ä G2/GF = 0.497



Filename : fica0a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	21.5	10.0	68.5	23.7	33.6	42.7	59.5	34.0	6.5	100.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	6.3	2.9	20.0	10.4	14.8	18.8	14.7	8.4	1.6	2.1	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	10.9	5.1	34.6	9.1	12.8	16.3	6.4	3.7	0.7	0.4	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	18392	%Real-Zellen =	29.1	%Orig-Zellen =	50.6
Zyklus 2 :	Zellzahl =	27815	%Real-Zellen =	44.1	%Orig-Zellen =	38.2
Zyklus 3 :	Zellzahl =	15628	%Real-Zellen =	24.8	%Orig-Zellen =	10.7
Zyklus 4 :	Zellzahl =	1304	%Real-Zellen =	2.1	%Orig-Zellen =	0.4

%Increased Cells = 173.6

%Growth-Fraction = 89.1

G2/GF = 0.389 G2./GF = 0.183

G2../GF = 0.008 G2.../GF = 0.000

ä G1 = 15.9% ä S = 21.6%

S+S. = 17.9% S+S.+S.. = 21.6%

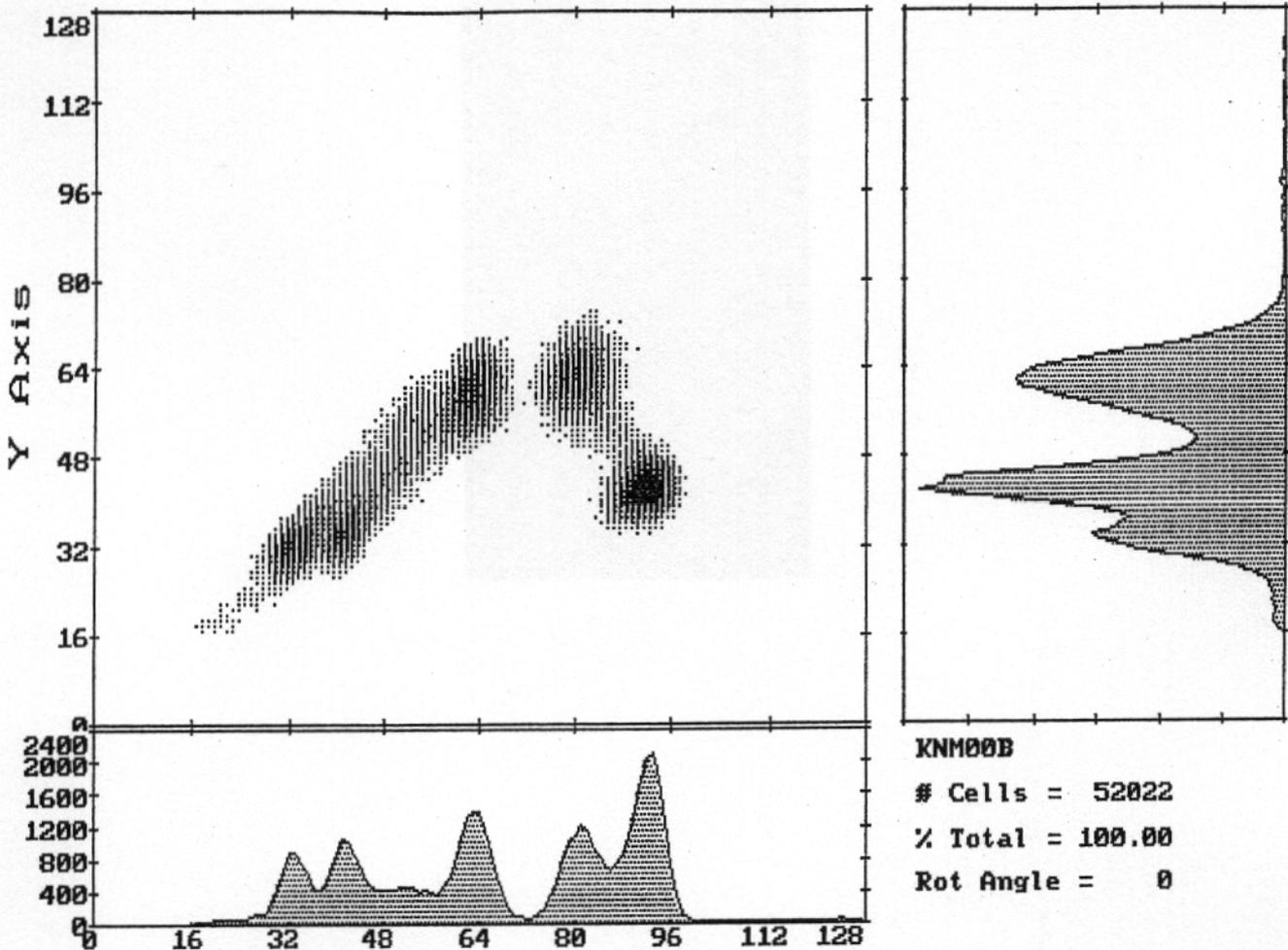
S/G1 - Ratio = 1.36

G2/G1 - Ratio = 3.25

(S+G2)/G1 - Ratio = 4.60

ä G2 = 51.7%

ä G2/GF = 0.580



Filename : knm00b

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	51.4	14.4	34.2	21.1	32.4	46.5	46.5	43.7	9.8	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	23.8	6.7	15.8	7.6	11.7	16.7	8.3	7.8	1.7	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	34.6	9.7	23.0	5.5	8.5	12.2	3.0	2.8	0.6	0.0	0.0	0.0

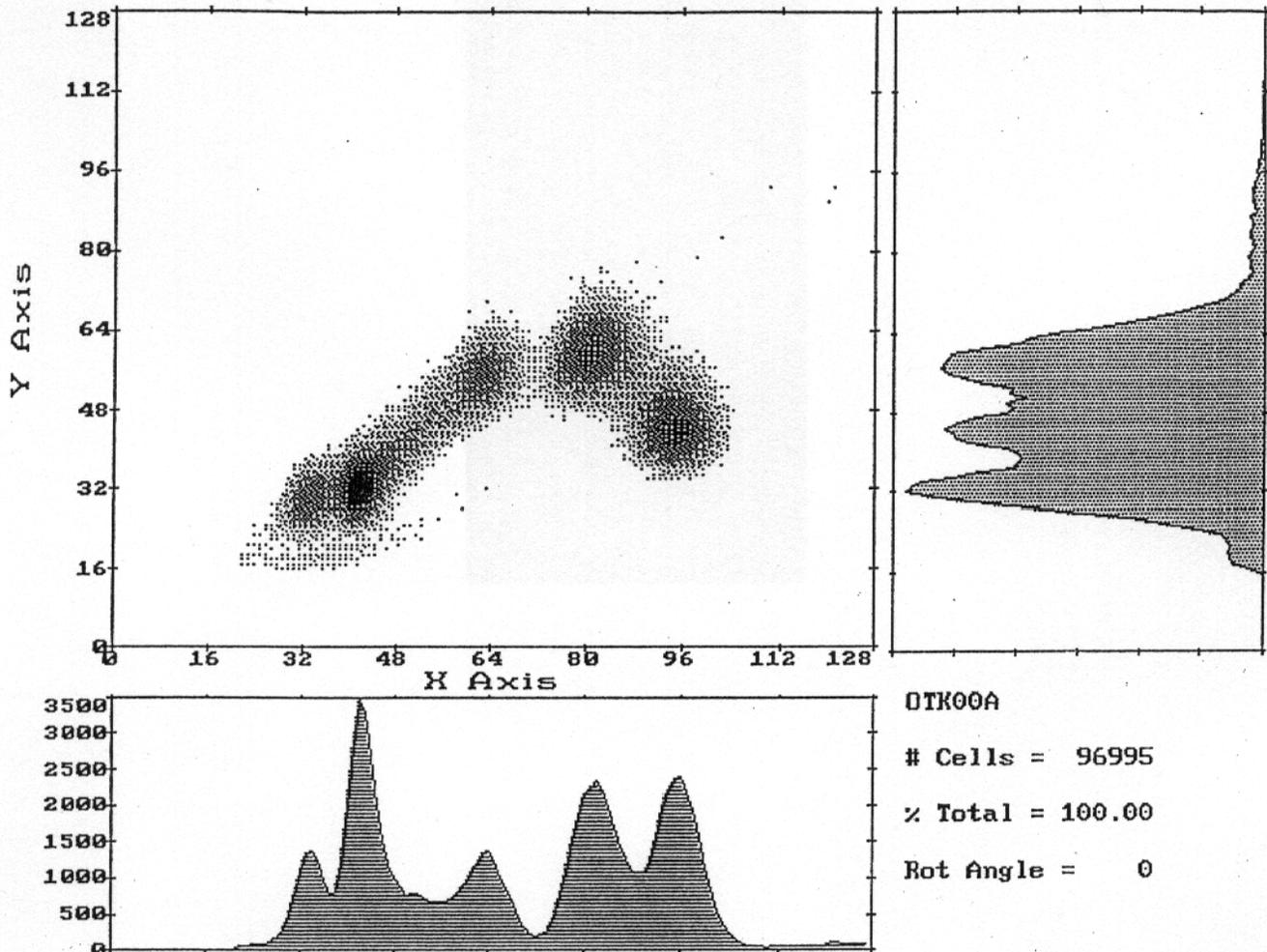
Zyklus 1 :	Zellzahl =	23669	%Real-Zellen =	46.2	%Orig-Zellen =	67.3
Zyklus 2 :	Zellzahl =	18409	%Real-Zellen =	36.0	%Orig-Zellen =	26.2
Zyklus 3 :	Zellzahl =	9100	%Real-Zellen =	17.8	%Orig-Zellen =	6.5
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 145.6

%Growth-Fraction = 65.4

G2/GF = 0.352	G2./GF = 0.186
G2../GF = 0.010	G2.../GF = 0.000
ä G1 = 8.5%	ä S = 21.0%
S+S. = 18.2%	S+S.+S.. = 21.0%

S/G1 - Ratio	=	2.46
G2/G1 - Ratio	=	4.20
(S+G2)/G1 - Ratio	=	6.66
ä G2	=	35.8%
ä G2/GF	=	0.548



Filename : otk00a

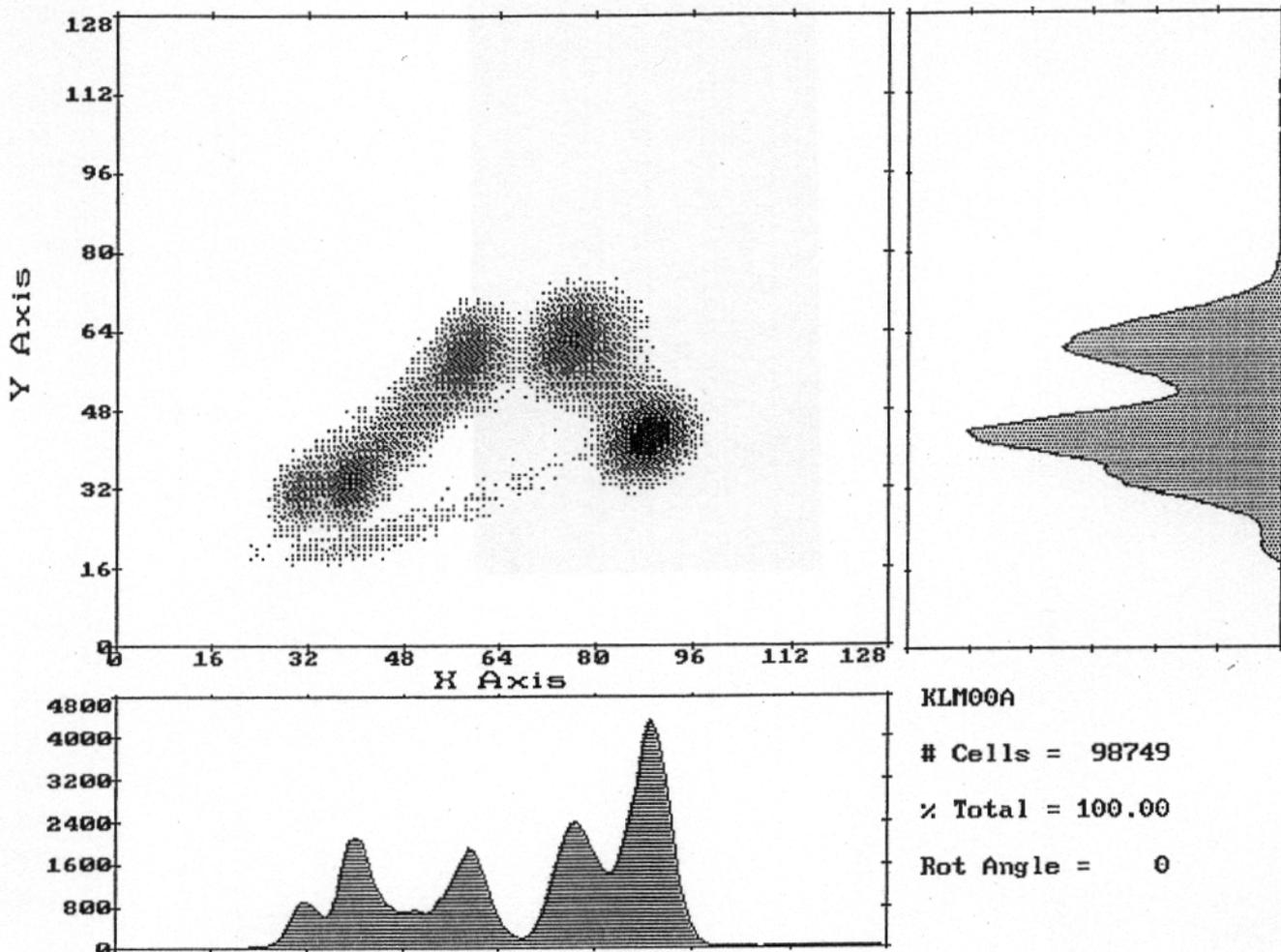
Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	38.3	20.3	41.4	43.4	38.7	17.9	87.3	12.5	0.2	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	18.2	9.7	19.7	18.2	16.2	7.5	9.2	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	25.6	13.6	27.7	12.8	11.4	5.3	3.2	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	43935	%Real-Zellen =	47.6	%Orig-Zellen =	66.9
Zyklus 2 :	Zellzahl =	38573	%Real-Zellen =	41.8	%Orig-Zellen =	29.4
Zyklus 3 :	Zellzahl =	9707	%Real-Zellen =	10.5	%Orig-Zellen =	3.7
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 140.5

%Growth-Fraction = 74.4

G2/GF = 0.373	G2./GF = 0.071	S/G1 - Ratio = 1.59
G2../GF = 0.000	G2.../GF = 0.000	G2/G1 - Ratio = 2.06
ä G1 = 16.0%	ä S = 25.4%	(S+G2)/G1 - Ratio = 3.65
S+S. = 25.0%	S+S.+S.. = 25.4%	ä G2 = 33.0%
		ä G2/GF = 0.443



Filename : klm00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	52.3	16.6	31.1	28.7	42.2	29.1	73.8	23.2	3.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	30.3	9.6	18.0	9.9	14.5	10.0	5.7	1.8	0.2	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	39.3	12.5	23.4	6.4	9.4	6.5	1.8	0.6	0.1	0.0	0.0	0.0

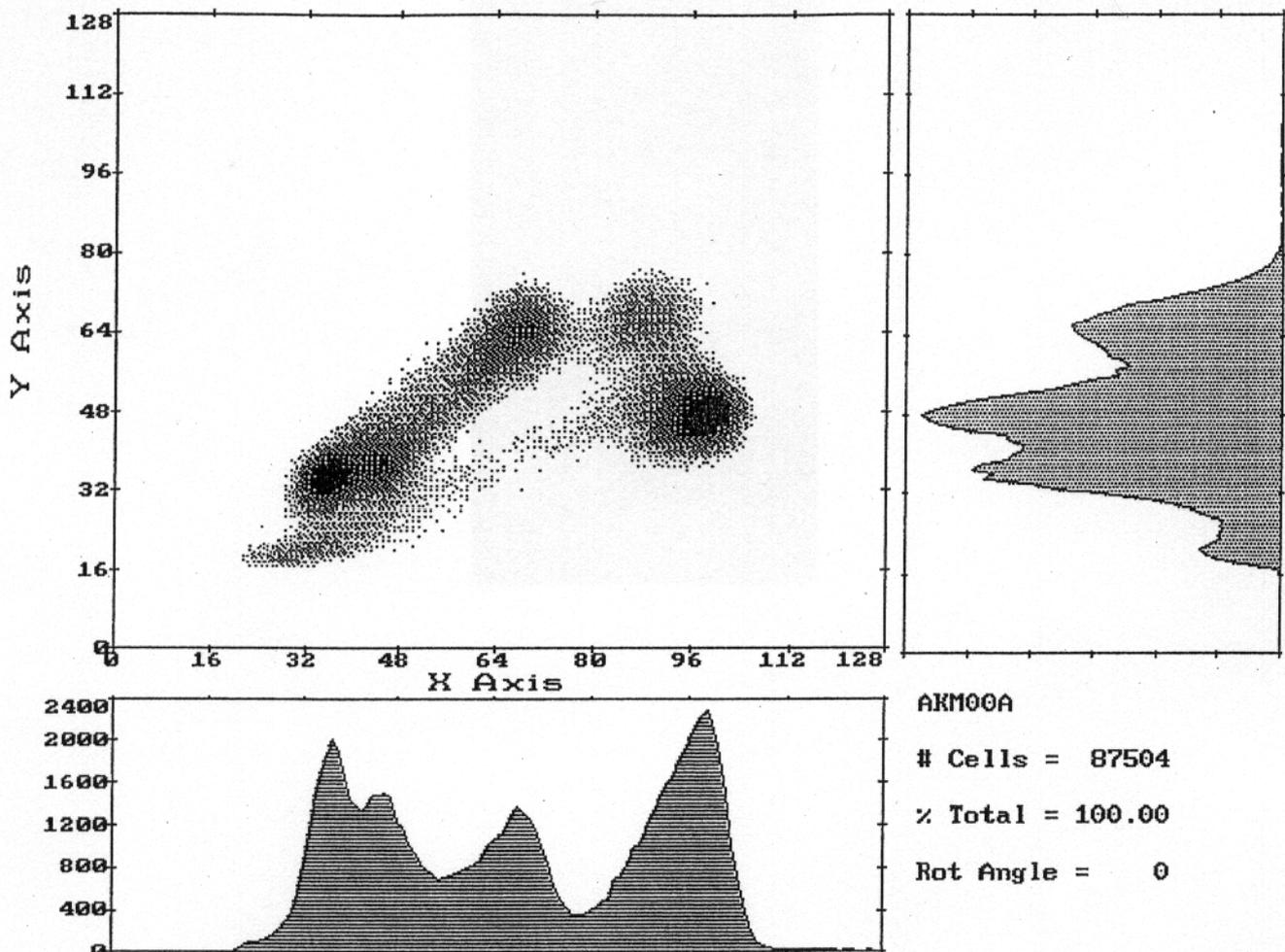
Zyklus 1 :	Zellzahl =	55170	%Real-Zellen =	57.9	%Orig-Zellen =	75.2
Zyklus 2 :	Zellzahl =	32749	%Real-Zellen =	34.4	%Orig-Zellen =	22.3
Zyklus 3 :	Zellzahl =	7313	%Real-Zellen =	7.7	%Orig-Zellen =	2.5
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 129.8

%Growth-Fraction = 60.7

G2/GF = 0.385	G2./GF = 0.107
G2../GF = 0.001	G2.../GF = 0.000
ä G1 = 8.2%	ä S = 22.5%
S+S. = 21.9%	S+S.+S.. = 22.5%

S/G1 - Ratio	=	2.73
G2/G1 - Ratio	=	3.63
(S+G2)/G1 - Ratio	=	6.36
ä G2	=	30.0%
ä G2/GF	=	0.494



Filename : akm00a

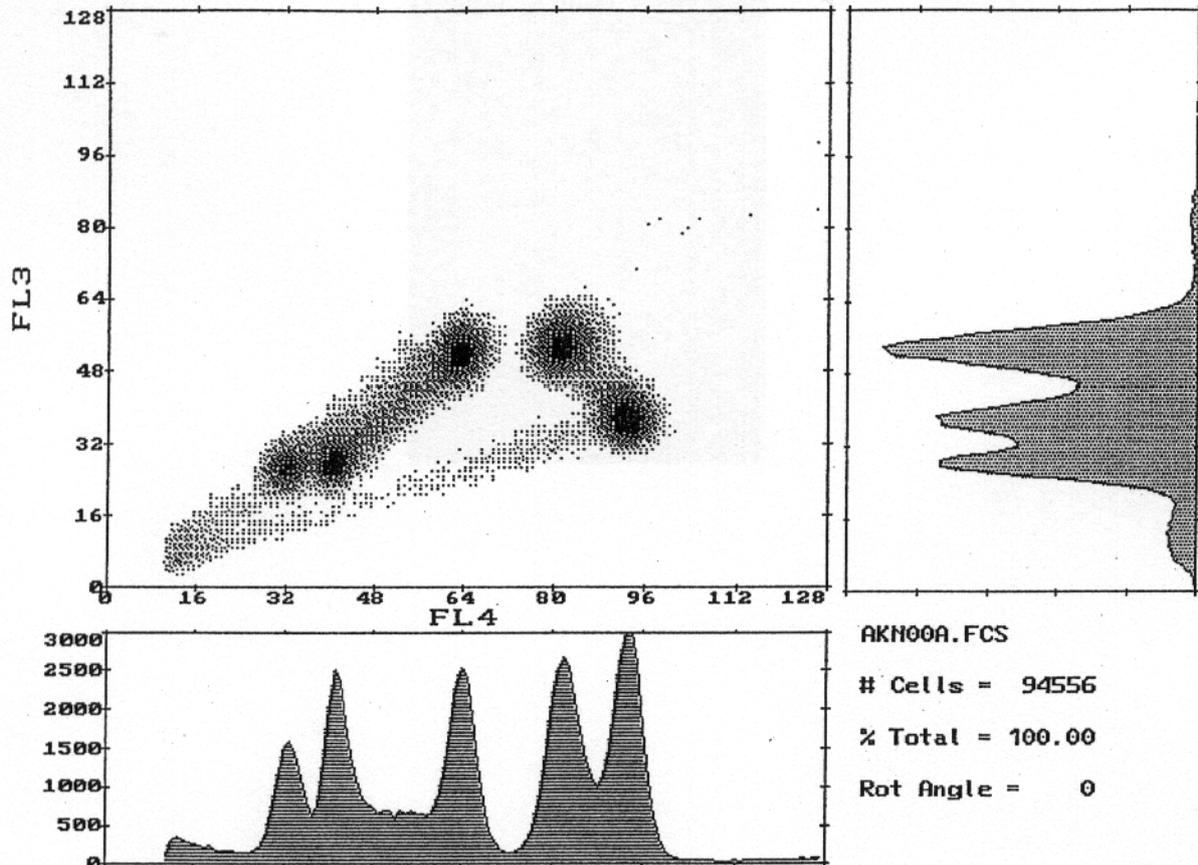
Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	62.6	20.9	16.5	23.5	38.8	37.7	62.5	35.0	2.5	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	25.2	8.4	6.6	8.0	13.2	12.8	16.2	9.0	0.6	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	39.5	13.2	10.4	6.3	10.3	10.1	6.3	3.6	0.3	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	31165	%Real-Zellen =	40.2	%Orig-Zellen =	63.2
Zyklus 2 :	Zellzahl =	26314	%Real-Zellen =	33.9	%Orig-Zellen =	26.7
Zyklus 3 :	Zellzahl =	20042	%Real-Zellen =	25.9	%Orig-Zellen =	10.2
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 157.1

%Growth-Fraction = 60.5

G2/GF = 0.172	G2./GF = 0.166	S/G1 - Ratio = 2.15
G2../GF = 0.004	G2.../GF = 0.000	G2/G1 - Ratio = 1.64
ä G1 = 12.6%	ä S = 27.1%	(S+G2)/G1 - Ratio = 3.79
S+S. = 23.6%	S+S.+S.. = 27.1%	ä G2 = 20.7%
		ä G2/GF = 0.343



Filename : akn00a

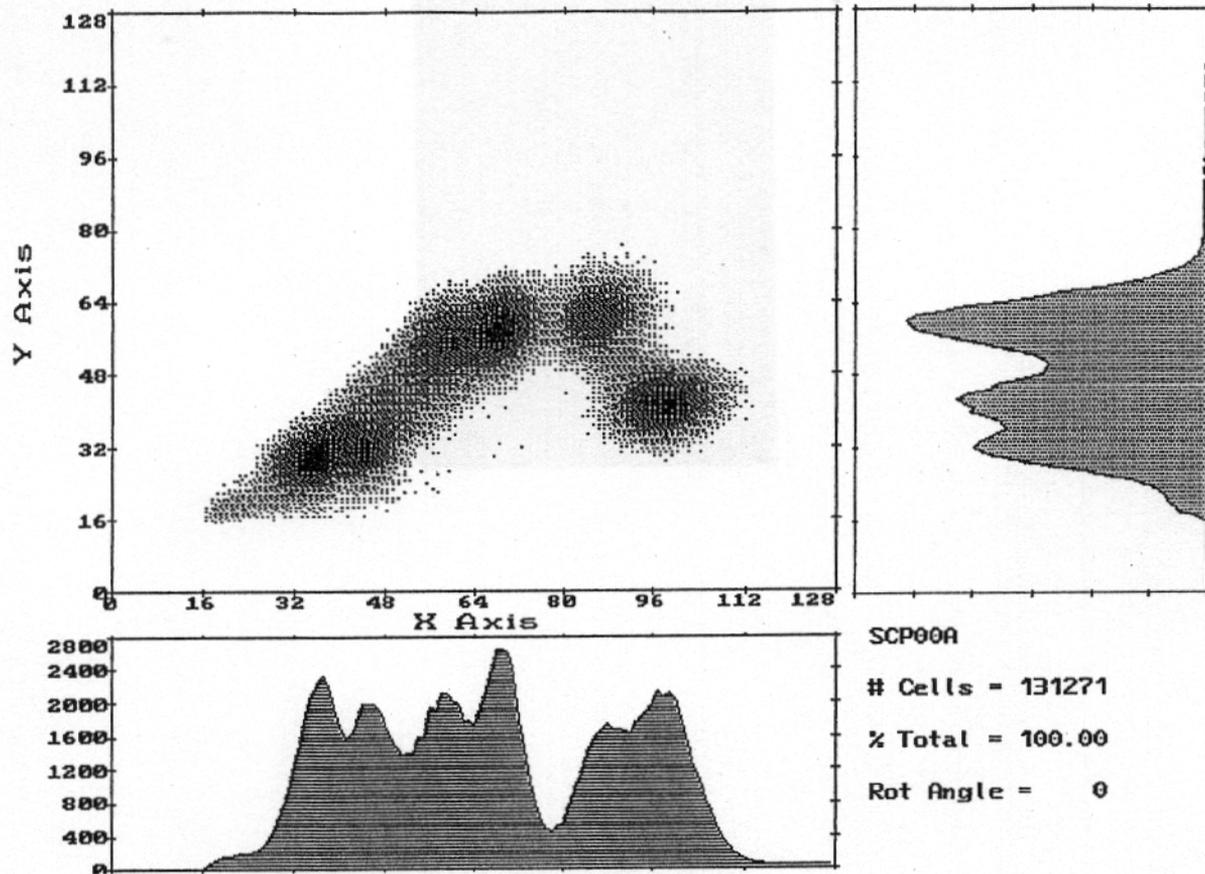
Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	42.8	10.2	41.5	29.0	36.5	34.5	82.0	17.0	1.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	19.8	4.7	19.2	12.4	15.6	14.8	11.1	2.3	0.1	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	28.9	6.9	28.0	9.1	11.4	10.8	4.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	38708	%Real-Zellen =	43.6	%Orig-Zellen =	65.1
Zyklus 2 :	Zellzahl =	35867	%Real-Zellen =	42.8	%Orig-Zellen =	30.1
Zyklus 3 :	Zellzahl =	11374	%Real-Zellen =	13.6	%Orig-Zellen =	4.8
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 144.5

%Growth-Fraction = 71.1

G2/GF = 0.394	G2./GF = 0.152	S/G1 - Ratio = 1.46
G2../GF = 0.001	G2.../GF = 0.000	G2/G1 - Ratio = 2.96
ä G1 = 13.1%	ä S = 19.1%	(S+G2)/G1 - Ratio = 4.42
S+S. = 18.3%	S+S.+S.. = 19.1%	ä G2 = 38.8%
		ä G2/GF = 0.546



Filename : scp00a

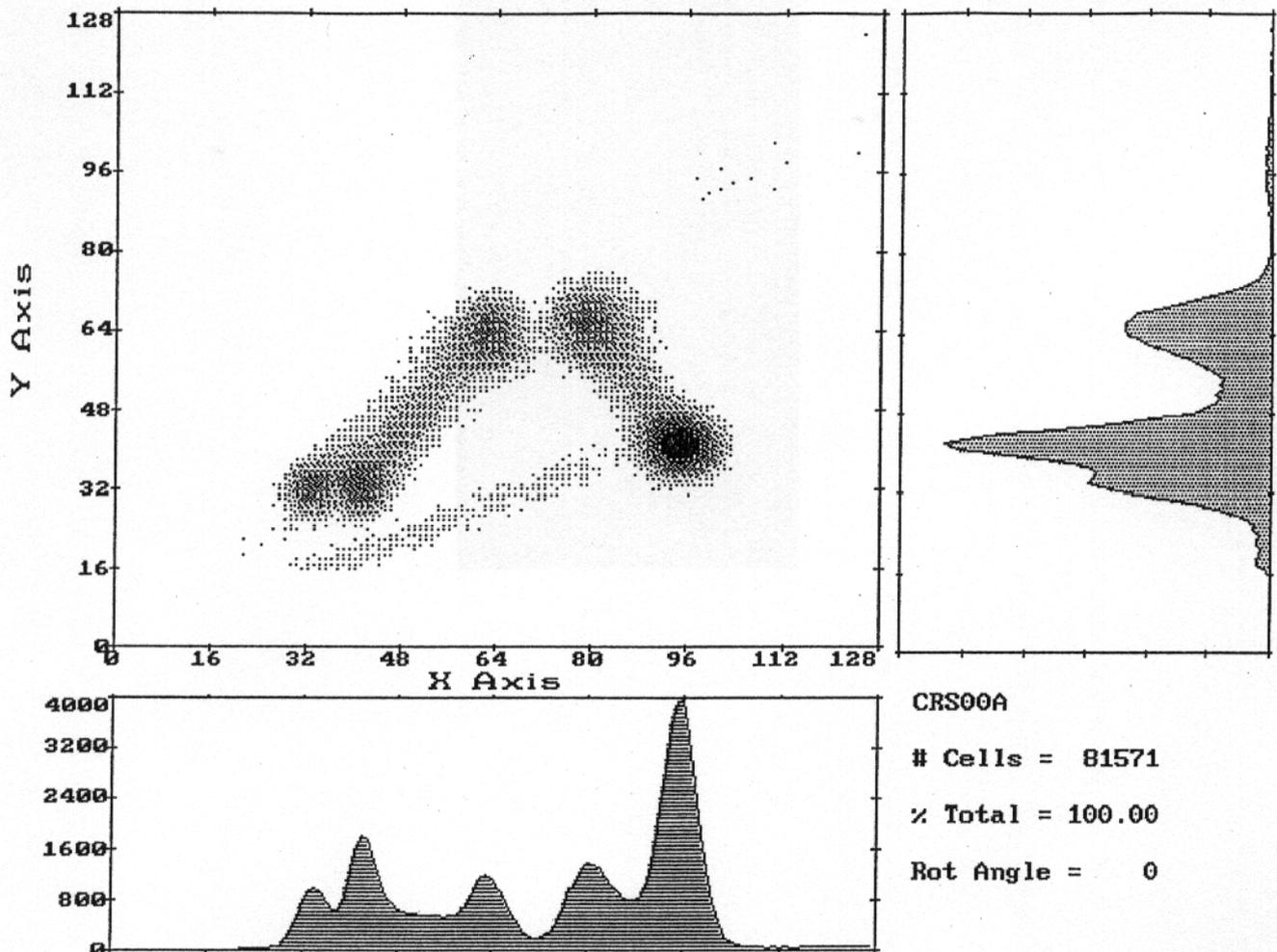
Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	49.8	16.0	34.2	21.6	30.6	47.8	34.6	37.5	27.9	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	16.3	5.2	11.2	7.2	10.1	15.8	11.8	12.8	9.5	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	28.2	9.1	19.4	6.2	8.8	13.7	5.1	5.5	4.1	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	42514	%Real-Zellen =	32.7	%Orig-Zellen =	56.6
Zyklus 2 :	Zellzahl =	43069	%Real-Zellen =	33.1	%Orig-Zellen =	28.7
Zyklus 3 :	Zellzahl =	44361	%Real-Zellen =	34.1	%Orig-Zellen =	14.8
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 172.9

%Growth-Fraction = 71.8

G2/GF = 0.269	G2./GF = 0.191	S/G1 - Ratio = 2.07
G2../GF = 0.057	G2.../GF = 0.000	G2/G1 - Ratio = 3.29
ä G1 = 11.3%	ä S = 23.4%	(S+G2)/G1 - Ratio = 5.36
S+S. = 17.8%	S+S.+S.. = 23.4%	ä G2 = 37.2%
		ä G2/GF = 0.517



Filename : crs00a

Compartment :	G0/G1	S	G2	G1.	S.	G2.	G1..	S..	G2..	G1...	S...	G2...
%Plot-Zellen:	60.8	15.7	23.5	33.0	40.0	27.0	75.0	24.0	1.0	0.0	0.0	0.0
%Real-Zellen:	34.9	9.0	13.5	10.7	13.0	8.8	7.6	2.4	0.1	0.0	0.0	0.0
%Orig-Zellen:	45.8	11.8	17.7	7.0	8.5	5.7	2.5	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0

Zyklus 1 :	Zellzahl =	44061	%Real-Zellen =	57.4	%Orig-Zellen =	75.4
Zyklus 2 :	Zellzahl =	24882	%Real-Zellen =	32.4	%Orig-Zellen =	21.3
Zyklus 3 :	Zellzahl =	7804	%Real-Zellen =	10.2	%Orig-Zellen =	3.3
Zyklus 4 :	Zellzahl =	0	%Real-Zellen =	0.0	%Orig-Zellen =	0.0

%Increased Cells = 131.3

%Growth-Fraction = 54.2

G2/GF = 0.327	G2./GF = 0.106	S/G1 - Ratio = 2.22
G2../GF = 0.001	G2.../GF = 0.000	G2/G1 - Ratio = 2.47
ä G1 = 9.5%	ä S = 21.1%	(S+G2)/G1 - Ratio = 4.69
S+S. = 20.3%	S+S.+S.. = 21.1%	ä G2 = 23.5%
		ä G2/GF = 0.434

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Höhn, meinem Doktorvater, für die Überlassung dieses Themas, seine Betreuung und logistische Unterstützung.

Lebenslauf

Name	Carolin Josephine Franziska Orlitsch	
Geburtsdatum	19.09.1975	
Geburtsort	München	
Eltern	Dr. jur. Georg Orlitsch Brigitte Orlitsch	
Geschwister	Florian Orlitsch	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Familienstand	ledig	
Konfession	römisch – katholisch	
Schulbildung	1981 – 1985	Besuch der Torquato-Tasso Grundschule in München
	1985 – 1994	Besuch des Lion-Feuchtwanger Gymnasiums in München
	Juli 1994	Abschluß mit allgemeiner Hochschulreife
	ab Herbst 1994	Freiwilliges soziales Jahr im Kreiskrankenhaus Starnberg
Studium	ab Herbst 1995	Vorklinischer Teil des Studiums der Humanmedizin an der Universität Regensburg
	August 1997	Ärztliche Vorprüfung

ab Herbst 1997	Klinischer Teil des Studiums der Humanmedizin an der Universität Würzburg
August 1998	erster Teil der ärztlichen Prüfung
April 2001	zweiter Teil der ärztlichen Prüfung
ab April 2001	Praktisches Jahr als Studentin der Ludwig-Maximilians-Universität in München
April 2002	dritter Teil der ärztlichen Prüfung