

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

Mosaikbildung bei Fanconi-Anämie – eine exemplarische Kasuistik

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Claudia Blaurock  
aus Freiburg i. Br.

Würzburg, November 2001

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn

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

Dekan: Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 08. 01. 2002

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

<u>Einleitung</u>	1
<u>Methoden</u>	4
<u>1. Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie</u>	4
<u>2. Chromosomenbrüchigkeit nach Behandlung mit MMC</u>	5
<u>3. Bestimmung der Komplementationsgruppe durch retroviralen     Gentransfer</u>	5
<u>4. Mutationsanalyse</u>	6
<u>Kasuistik</u>	7
<u>Ergebnisse</u>	16
<u>1. Blutwerte</u>	16
<u>2. Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie</u>	19
<u>Messung vom 31.08.95</u>	19
<u>Messung vom 16.10.97</u>	23
<u>Messung vom 16.10.98</u>	29
<u>3. Chromosomenbrüchigkeit</u>	35
<u>4. Fibroblastenkultur</u>	36
<u>5. Bestimmung der Komplementationsgruppe</u>	37
<u>6. Mutationsanalyse</u>	39
<u>Diskussion</u>	41
<u>Zusammenfassung</u>	47
<u>Literaturverzeichnis</u>	48

# Einleitung

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit (Fanconi 1967), die erstmals 1927 von Fanconi an drei Brüdern beschrieben wurde (Fanconi 1927) und eigentlich einem Syndrom entspricht (Alter 1993). Das Krankheitsbild ist assoziiert mit einem fortschreitenden Knochenmarksversagen, das sich im Verlauf in einer Panzytopenie äußert (Fanconi 1967, German 1973), einem erhöhten Risiko für Leukämie und diversen angeborenen Fehlbildungen. Dazu gehören z.B. vermehrte Hautpigmentierung, Café au lait Flecken, Minderwuchs, Extremitätenmißbildungen wie Aplasie des Daumens oder des Radius, weitere Skelettfehlbildungen, Nierenfehlbildungen, vor allem hypo- bis aplastische oder ektope Nieren (de Kerviler et al. 2000), Mikrocephalie, Taubheit, Strabismus und Herzfehler (German 1973). Außerdem liegen häufig Minderwuchs, ein niedriges Geburtsgewicht (<2500g) und Hypogonadismus vor (Alter 1993). Diese Fehlbildungen kommen in unterschiedlicher Häufung vor oder können auch ganz fehlen. Durch diese große Variabilität des Krankheitsbildes kann die frühzeitige Diagnose erschwert sein. Neben dem erhöhten Risiko, an Leukämie zu erkranken, kommt es im Rahmen von FA auch überdurchschnittlich häufig zu anderen Krebserkrankungen, wie gynäkologischen oder gastrointestinalen Tumoren (Alter 1993) und besonders Plattenepithelkarzinomen, die überwiegend in der Mundhöhle auftreten (Joenje, Patel 2001).

Zur Zeit sind acht verschiedene Komplementationsgruppen der Fanconi-Anämie nachgewiesen worden, (A, B, C, D1, D2, E, F, G), von denen die Gene für die Gruppen FA-A, FA-C, FA-D2, FA-E, FA-F und FA-G identifiziert wurden (Yamashita et al. 2001). Der größte Teil der FA-Patienten (66%) gehört der Komplementationsgruppe A an (Digweed 1999). Der einzige Patient der früher identifizierten Komplementationsgruppe FA-H (Joenje 1997), konnte der Gruppe FA-A zugeordnet werden (Joenje et al. 2000).

Eine eindeutige Diagnose der Krankheit ist durch die erhöhte Brüchigkeit der Chromosomen aus z.B. Lymphozyten in Anwesenheit von DNA-clastogenic agents wie Diepoxybutan (DEB) oder Mitomycin C (MMC) möglich (Auerbach et al. 1989). Ein Zusammenhang zwischen Grad der Chromosomenbrüchigkeit und dem Ausmaß von angeborenen Fehlbildungen konnte nicht hergestellt werden (Auerbach 1995). Aufgrund dieser vermehrten Chromosomenbrüchigkeit ist auch die Pränataldiagnostik möglich. Zu diesem Zweck gewinnt man durch Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie fetale Zellen, die dann bei Vorliegen der Krankheit ebenfalls eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit in Anwesenheit von MMC oder DEB vorweisen (Auerbach 1995). Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, daß bei der FA die Reparatur genetischer Schäden beeinträchtigt ist (Digweed 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Diagnostik ist die Durchflußzytometrie (Seyschab et al. 1993, Seyschab et al. 1995). Mit diesem Verfahren läßt sich eine Zellzyklusanalyse anhand von Lymphozyten aus peripherem Blut durchführen. Bei Patienten mit Fanconi-Anämie ist der Anteil von Zellen in der G2-Phase deutlich erhöht, und die G2-Phasen sind verlängert (Schindler et al. 1987). Der Diagnosezeitpunkt ist, je nach Vorhandensein von angeborenen Mißbildungen, Auftreten der Anämie und betroffenen Geschwistern, sehr unterschiedlich und reicht von der Geburt bis in das Erwachsenenalter (Alter 1993, Auerbach 1995).

Das Knochenmarksversagen beginnt in der Mehrzahl der Fälle zwischen dem 4. und 12. Lebensjahr (German 1973) und äußert sich meist zunächst in einer Thrombozytopenie. Im weiteren Verlauf kommt es dann auch zu einer Anämie, die bis zur Transfusionsbedürftigkeit führen kann, und zu einer Leukopenie. Die einzige Möglichkeit einer Heilung dieses Knochenmarksversagens liegt bisher in der Knochenmarkstransplantation oder der Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut, vorzugsweise mit HLA-identischen Geschwistern als Spender (Auerbach 1995).

Bei einigen Patienten kommt es aber auch zu einem leichteren Verlauf der Krankheit mit stabilen Blutbildverhältnissen. Ein möglicher Grund für diesen milderen Verlauf ist das Auftreten eines Mosaiks. Bei diesen Patienten findet sich neben den MMC-empfindlichen Zellen auch eine Zellreihe, die wie Zellen von gesunden Personen reagiert. Es werden unterschiedliche Mechanismen für die Entstehung eines Mosaiks diskutiert (Lo Ten Foe et al. 1997).

### **Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Das Phänomen der Mosaikbildung ist ein biologisch und medizinisch wichtiges Phänomen, welches bisher in der medizinischen Fachliteratur nur sehr selten beschrieben wurde. Für den betroffenen Patienten ergeben sich durch die Entstehung von genetisch unterschiedlichen Zelllinien innerhalb des blutbildenden Systems eine Reihe von Konsequenzen, welche bisher nur unzureichend erfasst und dokumentiert sind. So kann die Entstehung eines somatischen Mosaiks den Krankheitsverlauf beeinflussen und verändern. Aber auch hinsichtlich der therapeutischen Optionen muß die Möglichkeit der Mosaikbildung in Betracht gezogen werden. Eine Reihe von ungünstig verlaufenden Knochenmarkstransplantationen gehen z.B. mit größter Wahrscheinlichkeit darauf zurück, daß eine Mosaikkonstellation des Patienten nicht erkannt wurde. Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Arbeit, alle verfügbaren Daten zum Krankheitsverlauf eines jungen Patienten mit Fanconi Anämie und Mosaikbildung in systematischer Weise zu erfassen, zu dokumentieren und zu bewerten. Dies schließt die Darstellung der diagnostischen Methoden ein, welche zur Sicherung eines Mosaikbefundes eingesetzt werden.

# Methoden

## 1. Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie

Für Zellzyklusanalysen mittels 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)/Hoechst 33258-Ethidiumbromid (EB) Durchflußzytometrie wurden mononukleäre Blutzellen aus heparinisiertem peripherem Blut mittels der standardisierten Ficoll-Paque Sedimentationstechnik (Dichte, 1,007 g/ml; Pharmacia, Uppsala, Schweden) gewonnen.

Die Zellen ( $10^5$ /ml) wurden in 25-cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gegeben, die 5 ml RPMI 1640 Medium (GIBCO, Grand Island NY), enthielten und ergänzt mit 1% autologem Serum, 15% hitzeinaktiviertem Kälberserum (GIBCO),  $1 \times 10^{-4}$  mol/l 2'-deoxyuridin (Sigma, Deisenhofen),  $2 \times 10^{-5}$  mol/l  $\alpha$ -Monothioglycerol (Sigma) und  $1 \times 10^{-4}$  mol/l BrdU (Sigma). Die Zellen wurden stimuliert mittels 1,8  $\mu$ g/ml Phytohämagglutinin (Wellcome Diagnostics, Burgwedel) und bei 37,5°C in 5% CO<sub>2</sub> unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen inkubiert. Nach 72 h wurden die Proben zentrifugiert und das Sediment in einem Gefriermedium aufgelöst, bestehend aus RPMI 1640, 10% Kälberserum und 10% Dimethylsulphoxid und die Proben bis zur Messung bei -20°C eingefroren.

Vor den durchflußzytometrischen Messungen wurden die Proben aufgetaut und das Sediment mit  $4 \times 10^5$  Zellen/ml in einer Färbe-Pufferlösung aufgelöst, die 0,1 mol/l Tris-HCl, pH 7,4, 154 mmol/l NaCl, 0,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 0,1% NP40 und 0,2% Rinderserum-Albumin (Sigma) enthält. Die Zellen wurden angefärbt mit 1,2  $\mu$ g/ml Hoechst 33258 (Sigma), für 15 min bei 4°C inkubiert, dann gefärbt mit 1,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid (Serva) und weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zwei-Parameter Durchflußzytometrie wurde durchgeführt mit einem Bogenlampen-Durchflußzytometer (ICP-22; Phywe AG, Göttingen), das an einen Personalcomputer angeschlossen war (Seyschab et al. 1995).

## **2. Chromosomenbrüchigkeit nach Behandlung mit MMC**

Lymphozyten wurden aus heparinisiertem peripherem Blut gewonnen. Der Buffy Coat wurde in 40 ml Chromosomenmedium 1A (Biotest-Institut, Berlin) aufgelöst und für 72 h bei 37,5°C in drei verschiedenen Kulturen inkubiert. Eine Kultur blieb unbehandelt, eine weitere mit 50 ng/ml Mitomycin C (Serva, Heidelberg) und die letzte mit 100 ng/ml MMC behandelt. Nach 70 h wurden die Kulturen mit Colcemid behandelt, gefolgt von dem Standardverfahren für Chromosomenpräparation und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Aus jeder Kultur wurden je 100 Metaphasen analysiert und die Bruchereignisse pro Zelle dokumentiert (Seyschab et al. 1995).

## **3. Bestimmung der Komplementationsgruppe durch retroviralen Gentransfer**

Zunächst wurden aus einer Hautstanzbiopsie gewonnene Fibroblasten kultiviert.

In ein Retrovirus wurde entweder die FAA, die FAC oder die FAG cDNA hineingeklont. Die entstandenen Produkte waren LFAPEG, LFCPEG und LFGPEG. Als Kontrollvirus wurde MEG5AB verwendet. Danach wurden die kultivierten Fibroblasten jeweils mit LFAPEG, LFCPEG, LFGPEG und MEG5AB fusioniert. 48 h nach der Fusion wurden die Proben mit MMC (25 ng/ml) behandelt. Eine fünfte Probe ohne Virus wurde ebenfalls als Kontrolle mit MMC behandelt.

Weitere 48 h nach MMC-Gabe wurde die MMC-Empfindlichkeit gemessen. Dazu wurde die Fluoreszenzintensivität der Zellen durch FACScan gemessen und der Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen durch computergestützte Analyse ermittelt.

Wurden die Fibroblasten mit dem Retrovirus fusioniert, das die entsprechende cDNA seiner Gruppe enthielt, also FAA-Fibroblasten mit LFAPEG, wurde die MMC-Empfindlichkeit der Zellen korrigiert, d.h. ihr Anteil der Zellen in der



G2-Phase war im Vergleich zu den übrigen Zellen deutlich erniedrigt und entsprach somit gesunden Zellen (Pulsipher et al. 1998).

#### **4. Mutationsanalyse**

Für Proben der Gruppe FANCA erfolgt die Untersuchung von 43 Exons.

DNA des Patienten wurde aus Heparinblut gewonnen und für die SSCP-Analyse mittels PCR amplifiziert. Zu 2 µl SSCP-Probepuffer wurden 5 µl DNA gegeben und die Proben für 5 Min. bei 95°C denaturiert und auf Eis gelagert. Die SSCP-Gelapparatur wurde auf 15°C vorgekühlt. Das SSCP-Gel bestand aus einem Polyacrylamidgel mit einem 6%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Es folgte die Fixierung des Gels mit Fixierlösung (100 ml 24%iger Ethanol plus 25 ml Fixierstammlösung) und die Färbung mit Silbernitratlösung.

Für die Sequenzierung der auffälligen Fragmente wurde die DNA zunächst mittels eines DNA-Reinigungs-Kits gereinigt. Danach wurden die Reaktionsansätze hergestellt. Pro Ansatz (10 µl) wurden 1 µl Primer, 4-7 µl gereinigtes PCR-Fragment, 3-0 µl gereinigtes Wasser und 2 µl Big Dyes (Enzym-Nukleotid-Puffer-Mix) verwendet. Danach wurde folgender Zyklus 25x durchlaufen: 96°C 30 sec, 59°C 10 sec, 60°C 4 min. Lagerung erfolgte bei 4°C. Anschließend wurde die DNA mittels Ethanolfällung gereinigt und in TSR (Probenpuffer für den automatischen Sequenzer) gelöst. Die gelösten Proben wurden 2 min bei 92°C denaturiert und im automatischen Sequenzer ausgewertet.

## Kasuistik

Der Patient wurde am 11.09.92 als erstes Kind gesunder, nicht blutsverwandter Eltern geboren. Bei einem seit der 35. SSW bestehenden Verdacht auf fetale Retardierung wurde in der 37. SSW eine primäre Sectio caesarea aus Beckenendlage durchgeführt. Das Geburtsgewicht betrug 2590 g, die Körperlänge 46 cm, der Kopfumfang 33,5 cm, der Nabelarterien-pH 7,33, Apgar 9/10/10.

Bei der mütterlichen Blutgruppe A Rh pos. und der kindlichen Blutgruppe AB Rh pos. kam es in den ersten Lebenstagen zu einer Hyperbilirubinämie mit einem Anstieg des Gesamtbilirubins auf 10,3 mg/dl am dritten Lebenstag und zu einem Maximum von 12,0 mg/dl am siebten Lebenstag. Unter Phototherapie fiel der Wert auf 10,0 mg/dl, danach erfolgte ein Spontanabfall.

In der zweiten Lebenswoche kam es zu einer Rotavirusinfektion mit Gewichtsabnahme und Gewichtstagnation bei Müdigkeit und Trinkfaulheit des Kindes, die bis zur vierten Lebenswoche anhielt. Danach gedieh der Patient gut.

Mit 14 Tagen entwickelte der Patient einen Harnwegsinfekt mit Fieber, das sich unter i.v.-Antibiose mit Cefotaxim rasch zurückbildete. Im Ultraschall fiel eine deutliche dysplastische Niere rechts mit atypischem Nierengewebe und eine unauffällige linke Niere auf. Nach einem durchgeführten i.v. Pyelogramm und einem Isotopennephrogramm wurde zunächst der Verdacht auf eine stumme Niere rechts gestellt. Im Miktionscysturothrogramm stellte sich links ein Reflux Grad III dar, so daß eine Reinfektionsprophylaxe mit einem Cephalosporin begonnen wurde, die bis Oktober '94 durchgeführt wurde. Der Reflux bildete sich im Laufe der Jahre ohne Intervention zurück, so daß im April '97 nur noch ein Reflux Grad I li. nachgewiesen werden konnte. Der Verdacht der stummen Niere rechts konnte in späteren Untersuchungen im Januar allerdings nicht bestätigt werden, sondern es fand sich eine dystop gelagerte, strukturell unauffällige rechte Niere im Mittelbauch.

Des Weiteren fiel in den ersten Lebenswochen bereits eine Anämie auf. Bei Geburt betrug der Hb 14,4 g/dl, der Hk 0,43% und die Erythrozyten 3,8 Mio/ $\mu$ l. Mit zwei Wochen betrug der Hb 10,7 g/dl, der Hk 0,32% und die Erythrozyten 3,0 Mio/ $\mu$ l. Mit fünf Wochen bei der Entlassung aus der Klinik waren der Hb auf 7,9 g/dl, der Hk auf 0,23% und die Erythrozyten auf 2,3 Mio/ $\mu$ l gefallen, weshalb eine Therapie mit Ferro 66 2x3 Tropfen zur oralen Eisensupplementation begonnen wurde. Im weiteren Verlauf stabilisierten sich die Blutwerte, so daß der Hb mit vier Monaten 12 g/dl und die Erythrozyten 4,1 Mio/ $\mu$ l betrug.

Die nach der Geburt durchgeführten Screening-Tests auf Hypothyreose, Galaktosämie, Phenylketonurie und Lues waren negativ. Es wurden die Vit. K-Gabe und die BCG-Impfung durchgeführt und die Karies-Rachitis-Prophylaxe eingeleitet.

Bei den wiederholten ambulanten Vorstellungen des Patienten zur Kontrolle der Nierenfunktion fiel im Alter von neun Monaten eine geringe Größe und eine anhaltende Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 1, 2) und ein Mikrogenitale auf. Im Rahmen eines stationären Aufenthaltes zur Nierenfunktionsdiagnostik mit 13 Monaten wurden ein grenzwertig erhöhtes TSH und ein erniedrigtes Wachstumshormon festgestellt. Das radiologische Knochenalter entsprach 6 Monaten. Daraufhin wurde im Dezember '93 ein Argininbelastungstest und ein TRH-Test durchgeführt. Das TSH war jetzt unauffällig, im TRH-Test zeigten sich ebenfalls normale Werte, so daß keine hypothyreote Stoffwechsellage nachgewiesen werden konnte. Dafür zeigten IGF-I mit 7,2 ng/ml und IGF-Bindungsprotein-III mit 767,0 ng/ml deutlich erniedrigte Werte im Sinne eines Wachstumshormonmangels. Das Wachstumshormon war basal ebenfalls erniedrigt und zeigte auch im Argininbelastungstest nur unzureichende Werte, so daß die Diagnose eines Minderwuchses infolge Wachstumshormonmangels gestellt und im Januar '94 eine Therapie mit Genotropin eingeleitet wurde. Die Dosis betrug zunächst 0,58 IE tgl. sc. und wurde nach vier

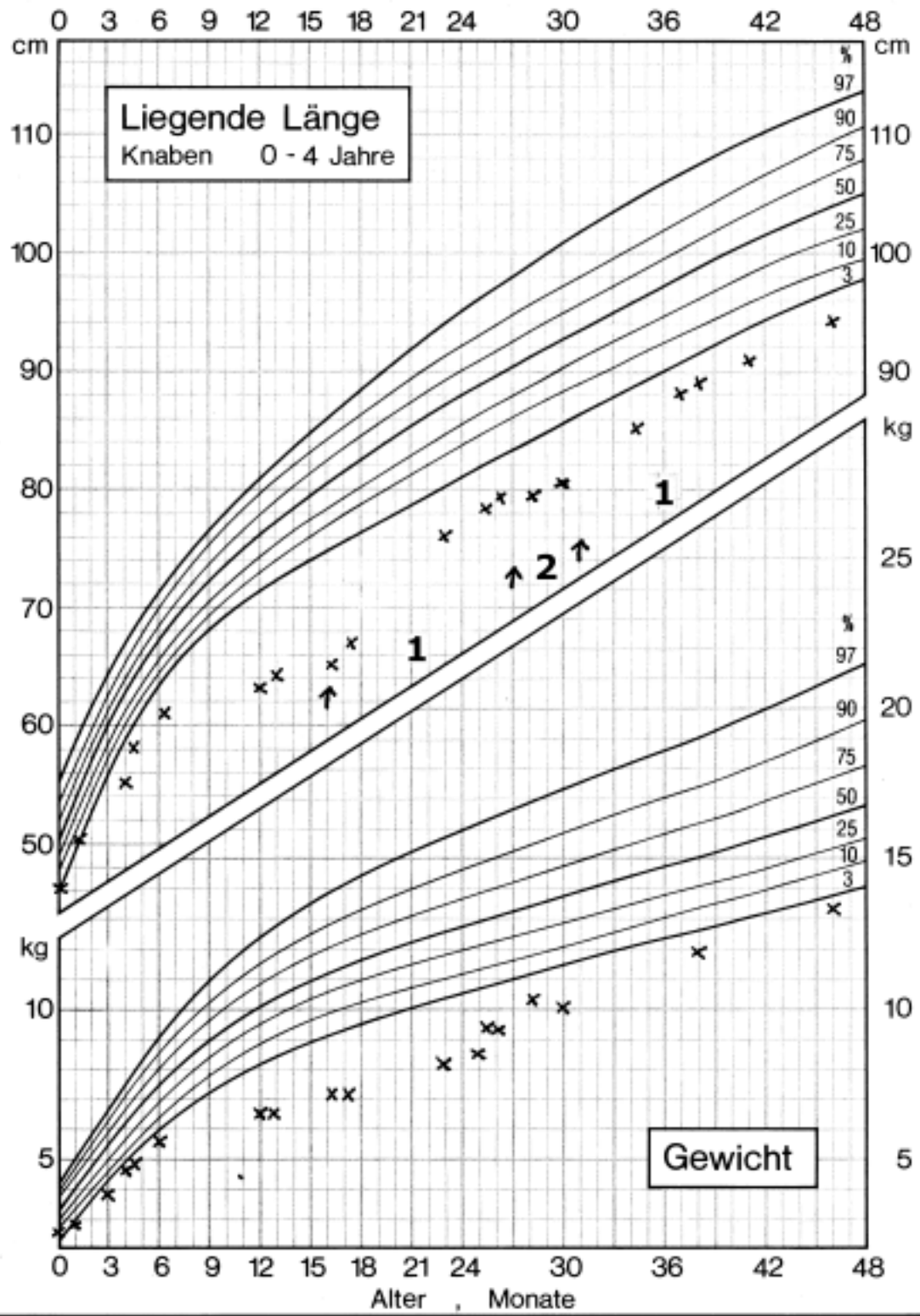


Abb. 1 Wachstumsverlauf in den ersten 48 Monaten  
 1: Therapie mit Genotropin  
 2: Aussetzten der Genotropin-Therapie

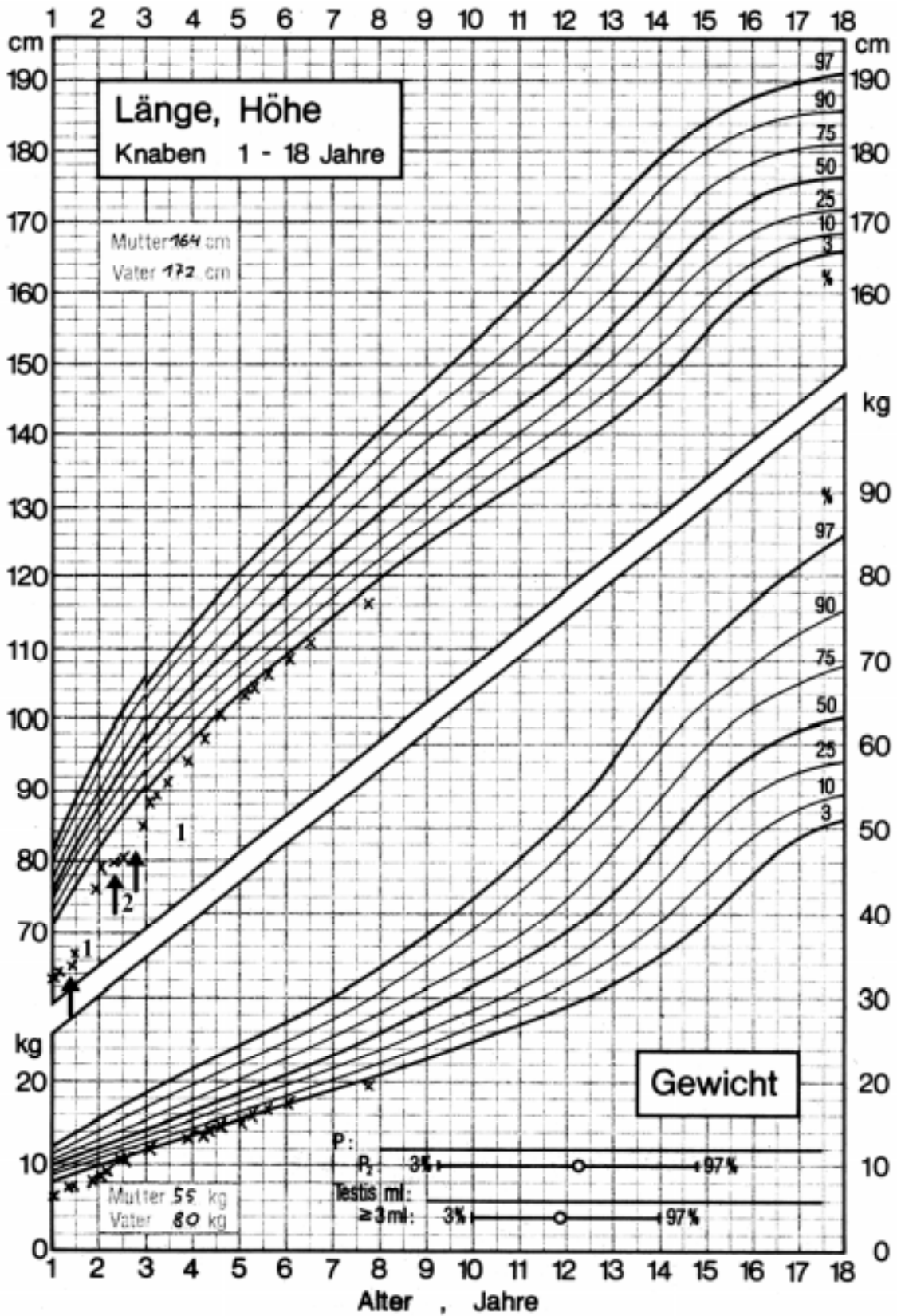


Abb. 2 Wachstumsverlauf  
1: Therapie mit Genotropin  
2: Aussetzten der Genotropin-Therapie

Wochen auf 0,6 IE tgl. gesteigert. Unter dieser Therapie zeigte der Patient eine deutlich zunehmende Wachstumsgeschwindigkeit. Außerdem bekam der Patient zusätzlich L-Thyroxin 50 µg/Tag, da sich unter der Wachstumshormontherapie eine grenzwertig hypothyreote Stoffwechsellage ausbildete. Nach vier Wochen wurde die Dosis auf 25 µg/Tag reduziert, da es im Zusammenhang mit der L-Thyroxin-Gabe zu dünnen, breiigen Stühlen gekommen war. Im März '99 wurde das Genotropin bei verlangsamtem Längenwachstum auf 1 IE erhöht und im Juni '00 noch einmal auf 1,2 IE. Die L-Thyroxin-Dosis wurde unverändert beibehalten.

Zusätzlich fiel im Februar '94 auf einer seitlichen Röntgenaufnahme des Schädels eine Dichteminderung im Bereich der Sella auf, die aber zunächst nicht weiter abgeklärt wurde.

Im August '94 fiel ein schon seit einem Jahr langsam fortschreitender kontinuierlicher Abfall der Thrombozyten auf jetzt 120.000/µl auf. Aufgrund dessen und aufgrund der Nierenfehlbildung wurde im November '94 eine Chromosomenanalyse durchgeführt, die jedoch einen unauffälligen männlichen Chromosomensatz (46, XY) ergab. Auch ein Nachweis für eine Autoimmunthrombozythopenie wurde nicht gefunden. Bei einem weiteren Abfall der Thrombozyten auf 76.000/µl und Nachweis von blastenverdächtigen Zellen im Differentialblutbild wurde im November '94 eine Knochenmarkspunktion durchgeführt. Es zeigte sich in einem stark lymphozytäres Mark mit 4,2% atypischen blastenverdächtigen Zellen, einer deutlich verminderten und rechtsverschobenen Myelopoese, einer reduzierten Erythropoese und kaum Megakaryozten das Bild einer Panmyelopathie. Ein Anhalt für eine akute Leukämie wurde nicht gefunden, ebenso konnte die Ursache der Thrombozytopenie nicht eindeutig geklärt werden. In einer im Februar '95 durchgeführten Hämoglobinelektrophorese zeigte sich ein stark erhöhtes HbF (10,9%), während das HbA2 mit 1,9% im Normbereich lag.

Ab Dezember '94 wurde die Wachstumshormontherapie unterbrochen, um einen Zusammenhang zwischen der Therapie und der Thrombozytopenie auszuschließen, wobei sich jedoch im Verlauf kein Anstieg der Thrombozyten zeigte. Gleichzeitig wurde zum ersten Mal der Verdacht auf eine Fanconi-Anämie geäußert. Im Februar '95 wurde im Institut für Humangenetik in Heidelberg eine vermehrte Chromosomenbrüchigkeit unter Behandlung von Lymphozytenkulturen mit Mitomycin C und Diepoxybutan festgestellt und somit die Diagnose Fanconi-Anämie gestellt.

Im einzelnen lagen folgende Befunde vor:

In der Standardlymphozytenkultur fand sich bei 100 ausgewerteten Metaphasen keine Aberration. Nach Behandlung mit MMC waren von 81 Metaphasen 30 mit multiplen Chromatiden- und Chromosomenaberrationen versehen (37%). Nach Behandlung mit Diepoxybutan wiesen von 46 Metaphasen 30 (65%) Aberrationen auf. Die Betroffenheit der einzelnen aberranten Zellen betrug nach MMC 3,3 und nach DEB 4,5, die Indizes Bruch/Zelle bei MMC >1,54 und bei DEB >3,85.

Im März '95 wurde ein cranielles MRT durchgeführt mit der Frage nach hypophysären Auffälligkeiten. Dabei zeigte sich eine congenitale hypophysäre Dysplasie und schwierig zu differenzierende supraselläre Strukturen, die als eine ektope Neurohypophyse oder ein rudimentärer Hypophysenstil gedeutet wurden. Dieser Befund wurde als Ursache für den weiterhin vorhandenen Wachstumshormonmangel mit deutlich verminderten IGF I (4,5ng/ml) und IGF-Bindungsprotein-III (758ng/ml) interpretiert. Daraufhin wurde die Wachstumshormontherapie am 26.04.95 mit 0,8 IE Genotropin wieder fortgesetzt, worunter es zu einem regelrechten Längenwachstum kam.

Ende April '95 waren die Thrombozyten im Rahmen von Infekten auf 41.000/ $\mu$ l abgefallen, weshalb für 7 Tage 15 mg Leucoverin und Folsäure verabreicht wurden. Auch in den nächsten Monaten blieben die Thrombozyten auf einem

Niveau um 50.000/ $\mu\text{l}$ , es bestanden keine klinischen Auffälligkeiten, der Hb war dabei stabil. In den nächsten Monaten waren die Blutbilder stabil.

Im Mai '95 wurde bei einer zweiten Schwangerschaft der Mutter eine Pränataldiagnostik durchgeführt, welche einen gesunden Feten zeigte, der am 16.12.95 mit einem Geburtsgewicht von 3670 g und einer Größe von 52 cm zur Welt kam.

Ende August '95 führte das Humangenetische Institut Würzburg eine zytokinetische Untersuchung von Lymphozytenkulturen des Patienten durch, wobei die Diagnose Fanconi-Anämie bestätigt werden konnte. Weitere Untersuchungen folgten im Oktober '97 und im Oktober '98.

Ab April '96 begannen die Eltern des Patienten zusätzlich eine Homöopathische Therapie. Von Januar bis Dezember '97 wurde außerdem aufgrund des vorhandenen Mikrogenitale eine Lokalbehandlung mit dehydrotestosteronhaltiger Salbe durchgeführt, was zu einem Längenwachstum des Penis führte. Bei einer erneuten Behandlung im Mai '98, diesmal mit testosteronhaltiger Salbe, kam es allerdings zu einem Haarwachstum im Bereich des Penisschaftes, weshalb diese Therapie abgebrochen wurde. Aufgrund des Mikropenis und der beidseits nicht deszendierten Hoden wurde im November '98 die Frage gestellt, ob bei dem Patienten ein Mangel an Testosteron oder eine hypophysäre Störung der LH/FSH-Regulation bestehe. Eine außerdem vorliegende Phimose wurde im Februar '99 operiert.

Am 14.10.97 wurde, nachdem das Blutbild in den letzten Monaten stabil gewesen war (Thrombozyten um 110.000/ $\mu\text{l}$ , Hb um 12,1 g/dl), eine Knochenmarkspunktion durchgeführt. Bei dieser Punktion zeigte sich ein normozelluläres Mark mit regulärer Myelopoese und Erythropoese und ausreichend Megakaryozyten. Es fanden sich keine atypischen Zellen und keine Blastenvermehrung, also insgesamt ein unauffälliges Knochenmark. Bei einer weiteren Untersuchung des Knochenmarks wurde ebenfalls ein unauffälliger männlicher Chromosomensatz und keine klonalen Chromosomenveränderungen nachgewiesen.



Auch im weiteren Verlauf war das Blutbild stabil, lediglich im Rahmen von Infekten kam es im April '98 zu einem Abfall der Thrombozyten auf 41.000/ $\mu$ l, wobei der Hb aber weiterhin stabil blieb. Im Januar '98 untersuchte das humangenetische Institut Würzburg eine Fibroblastenkultur, wobei die Proliferation der Zellen in Anwesenheit von MMC und Sauerstoff untersucht wurde. Dabei kam es zu einer markanten Reduktion des Zellwachstums bereits bei geringen MMC-Konzentrationen, was die Diagnose FA erhärtete. Unter dem Verdacht einer Mosaikkonstellation wurde im Oktober '98 erneut Blut für eine flowzytometrische Untersuchung abgenommen. Dabei fanden sich fast normale Werte, so daß von einer Mosaikkonstellation ausgegangen werden konnte. Im Februar '00 konnte in Würzburg durch Untersuchung von Fibroblasten die Zugehörigkeit des Patienten zur Komplementationsgruppe A festgelegt werden, was durch frühere Untersuchungen von Lymphozyten aufgrund der Mosaikkonstellation im Blut nicht möglich gewesen war.

Im Juni '01 wurde im humangenetischen Institut Würzburg außerdem eine Mutationsanalyse durchgeführt, wobei die erste Mutation des Patienten entdeckt werden konnte. Es fand sich auf Exon 10 ein Austausch von Glutaminsäure durch ein Stopcodon (862G>T, E288X).

Im Februar '99 wurde im Rahmen der Phimosen-OP eine dritte Knochenmarkspunktion durchgeführt, die ebenfalls ein normales Knochenmark ergab. Bei der Chromosomenanalyse fand sich ein unauffälliger männlicher Chromosomensatz, sowie eine leicht erhöhte Chromosomenbrüchigkeit, die jedoch für einen FA-Patienten als vergleichsweise niedrig eingestuft wurde.

Bei dem Patienten wurden zeitgerecht alle üblichen Impfungen und zusätzlich eine Varizellenimpfung durchgeführt, die allesamt gut vertragen wurden.



**Abb. 3 Der Patient mit 6  $\frac{3}{4}$  Jahren (re.) und sein gesunder Bruder (3  $\frac{1}{2}$  J.)**

Da bei dem Patienten eine Störung der Sprachentwicklung bestand, wurde von '97-'00 eine logopädische Therapie durchgeführt, unter der sich die Sprache deutlich besserte. Ab '98 besuchte der Patient den Kindergarten und seit August '00 die Schule. Vor der Schule wurde eine Ergotherapie durchgeführt, um die motorische Entwicklung des Kindes zu unterstützen.

# Ergebnisse

## 1. Blutwerte

Im Blutbild des Patienten zeigte sich bis zum 2. Quartal '95 ein kontinuierlicher Abfall der Thrombozyten bis auf ein Minimum von 41.000/ $\mu\text{l}$  im April '95 im Zusammenhang mit mehreren Infekten. Danach erfolgte wieder ein Anstieg, wobei sich die Thrombozyten ab dem 2. Quartal '96 um 100.000/ $\mu\text{l}$  stabilisierten. Ein weiterer Abfall auf 41.000/ $\mu\text{l}$  im Januar '98 erfolgte wiederum im Rahmen von mehreren Infekten, danach stiegen die Thrombozyten wieder auf Werte um 100.000/ $\mu\text{l}$ . (Abb. 4)

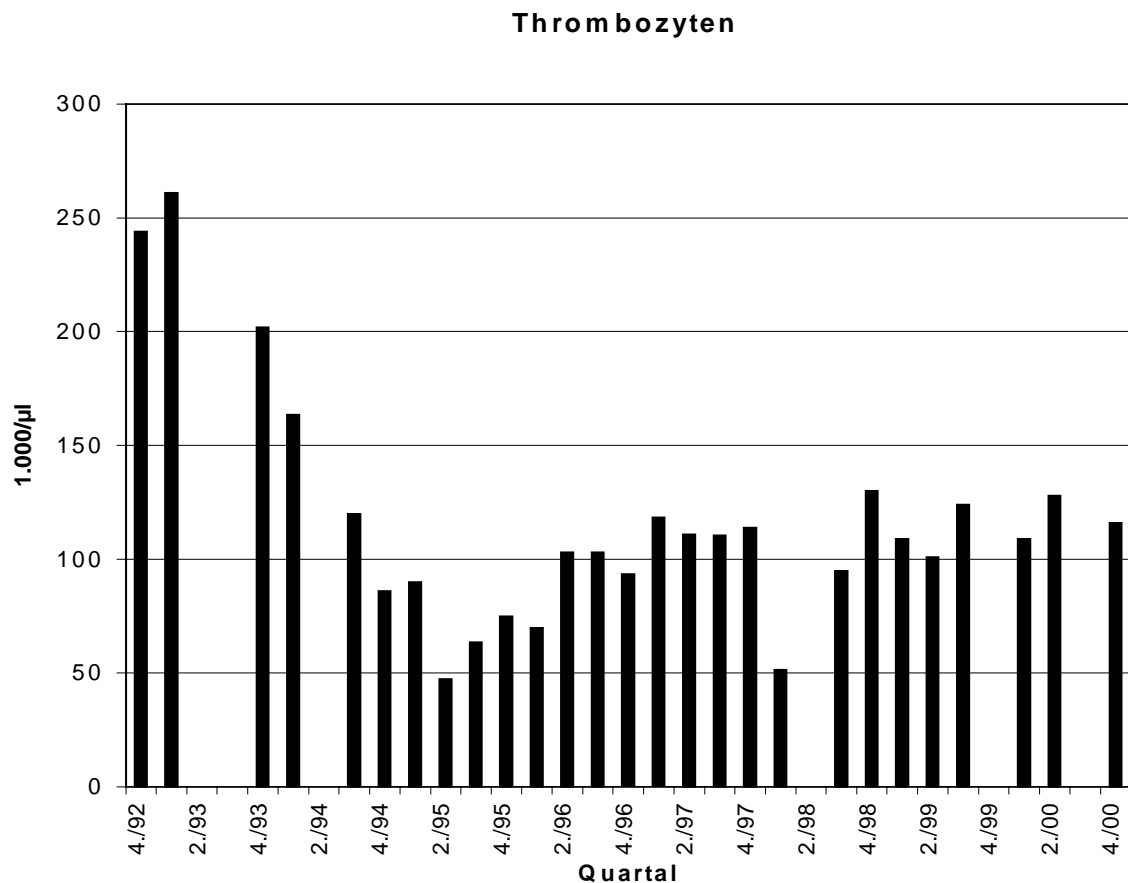


Abb. 4

Die übrigen Blutwerte (Leukozyten, Erythrozyten, Hb und Hämatokrit) zeigen sich im gesamten Verlauf stabil, wobei die Leukozyten sich im Schnitt auf 7000-8000/ $\mu$ l hielten (Abb. 5).

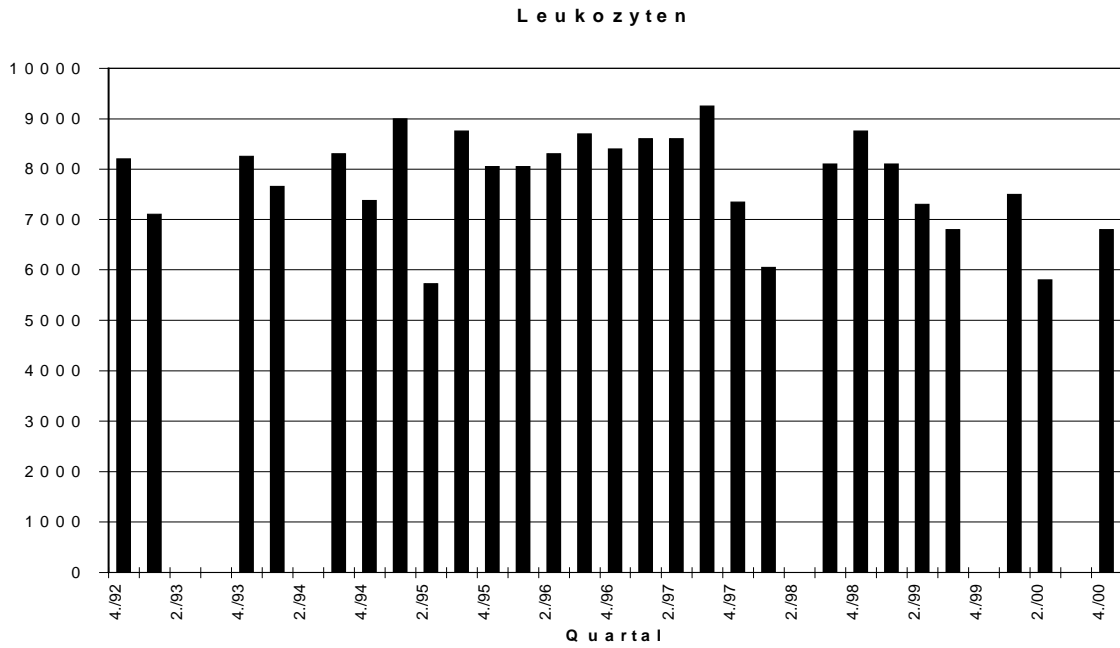


Abb. 5

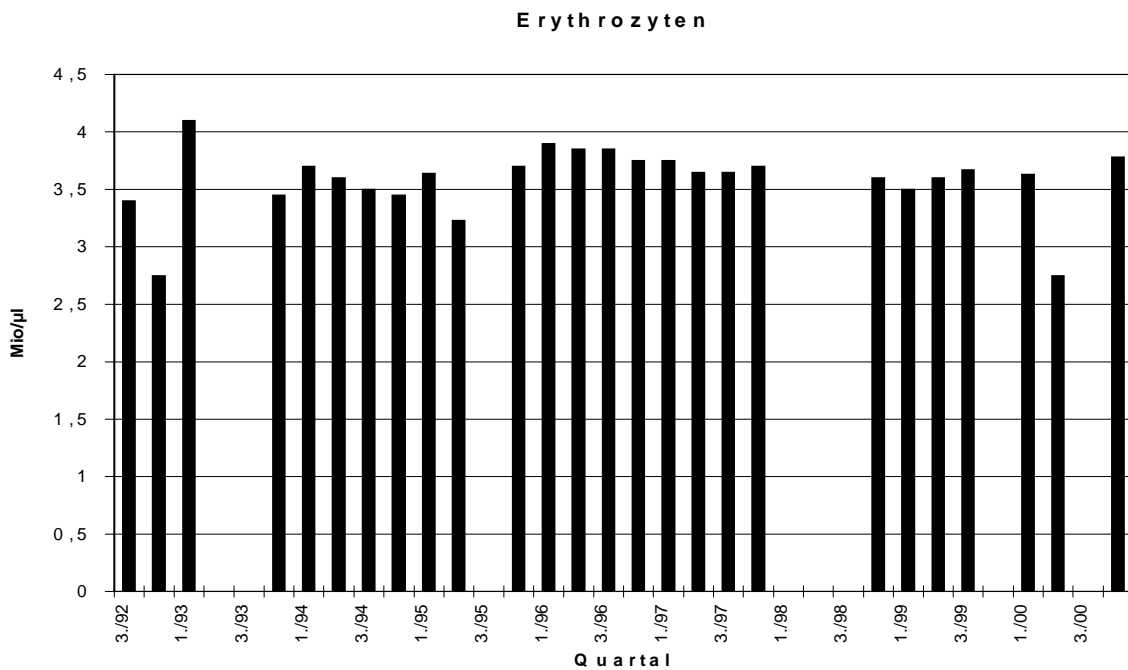


Abb. 6

Die Erythrozyten blieben im Schnitt bei 3-4 Mio/ $\mu$ l (Abb. 6), der Hb bei 11-12 g/dl (Abb. 7) und der Hämatokrit bei 32-37% (Abb. 8).

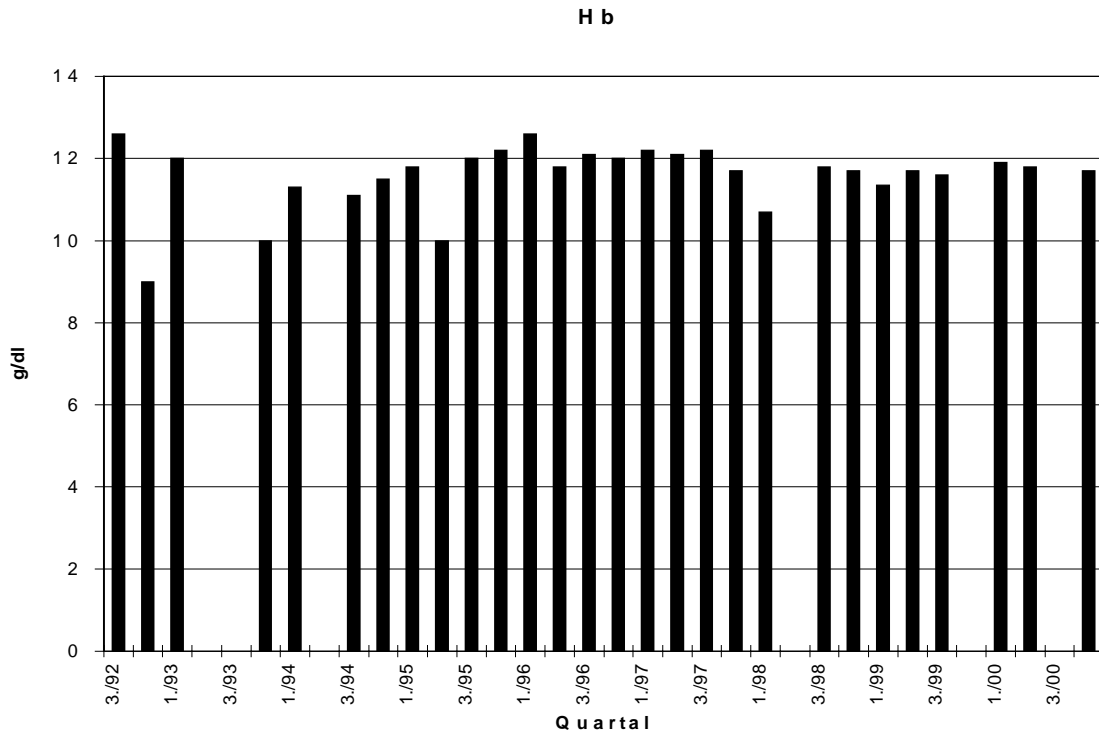


Abb. 7

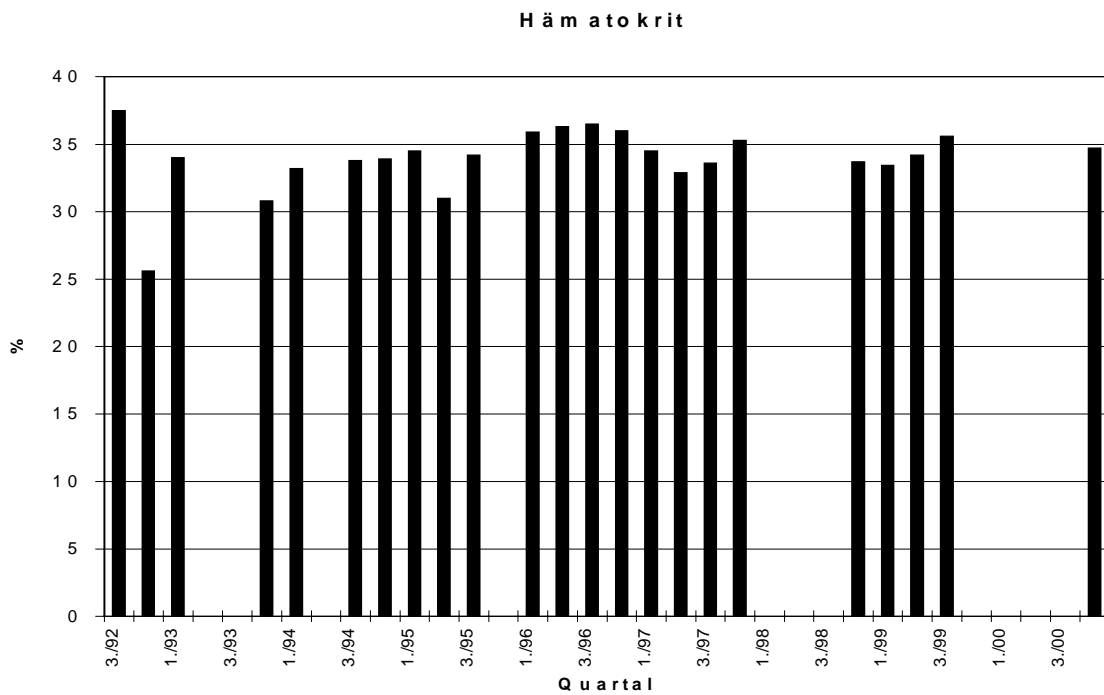


Abb. 8

## 2. Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie

Bei dem Patienten wurden im Laufe von drei Jahren drei zellkinetische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut PHA-stimuliert, kultiviert, nach 72 h geerntet, angefärbt und die Zellkerne durchflußzytometrisch vermessen (siehe Kap. Methoden). Die so erhaltenen Zellzyklusverteilungen wurden elektronisch analysiert.

### *Messung vom 31.08.95*

Bei dieser Messung (Tab. 1, Abb. 9-14) fanden sich 56,1% proliferierende Zellen. Es zeigte sich eine deutliche Erhöhung von Zellen in der G2-Phase (Abb. 9), was typisch für FA-Patienten ist. Auch die Verteilung der Zellen in den übrigen Phasen entsprach der von FA-Patienten (Abb. 12-14). Die Ratio  $\Sigma G2/GF$  (Summe der G2-Phasen/growth fraction) ergab 0,378 (Abb. 10), ein Wert, der im Bereich von FA-Patienten liegt (Normbereich 0,13-0,27) (Schindler, Höhn 1999).

Das gleiche galt für  $(G2+G2')/GF$  (Abb. 11).

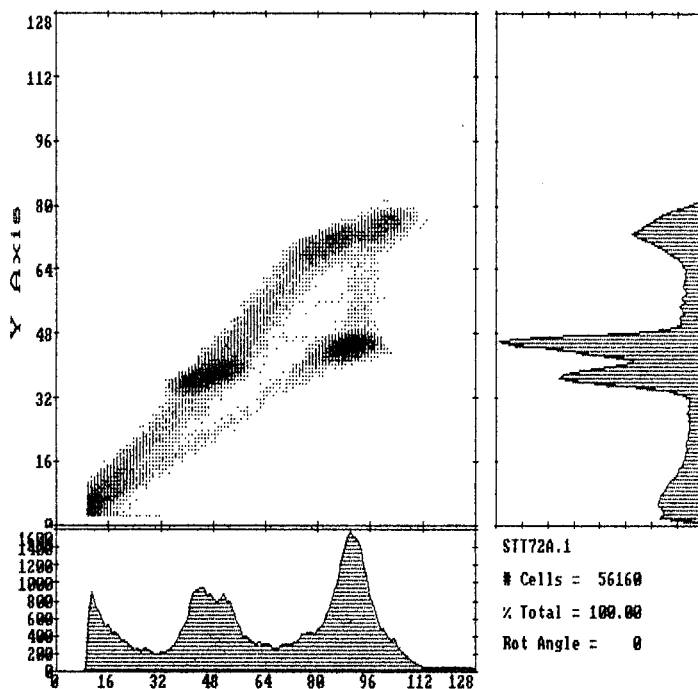


Abb. 9 Zellzyklusverteilung, unbehandelt

31.08.95						
Compartment	G0/G1	S	G2	G1'	S'	G2'
%Plot-Zellen	66,8	11,2	22,0	38,0	38,5	23,5
%Real-Zellen	28,2	4,7	9,3	11,8	11,9	7,3
%Orig-Zellen	43,9	7,4	14,5	9,1	9,3	5,7
Compartment	G1''	S''	G2''	G1'''	S'''	G2'''
%Plot-Zellen	53,1	36,0	10,9	100,0	0,0	0,0
%Real-Zellen	13,5	9,2	2,8	1,4	0,0	0,0
%Orig-Zellen	5,3	3,6	1,1	0,3	0,0	0,0
Zyklus 1	Zellzahl =	18349	%Real-Zellen:	42,3	%Orig-Zellen=	65,8
Zyklus 2	Zellzahl =	13435	%Real-Zellen:	30,9	%Orig-Zellen=	24,1
Zyklus 3	Zellzahl =	11045	%Real-Zellen:	25,4	%Orig-Zellen=	9,9
Zyklus 4	Zellzahl =	595	%Real-Zellen:	1,4	%Orig-Zellen=	0,3
%Increased Cells =		155,6				
%Growth-Fraction =		56,1	S/G1-Ratio =	1,38		
G2/GF =	0,258	G2'/GF =	0,101	G2/G1-Ratio =	1,45	
G2''/GF =	0,019	G2'''/GF =	0,000	(S+G2)/G1-Ratio =	2,82	
Summe G1=	14,7%	Summe S =	20,2%	Summe G2 =	21,2%	
S+S' =	16,6%	S+S'+S'' =	20,2%	Summe G2/GF =	0,378	

Tab. 1 Anteile der Zellphasen

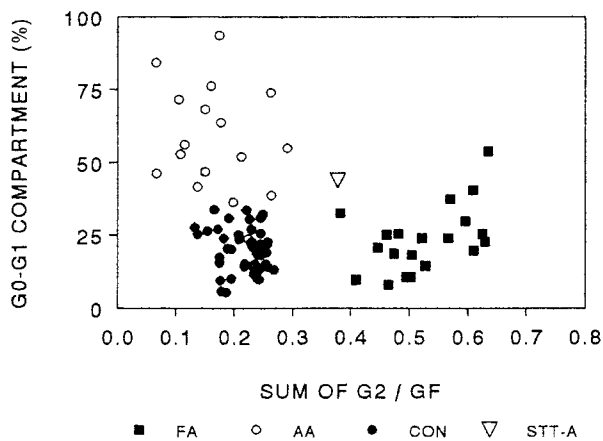


Abb. 10 Ratio  $\Sigma G2/GF$

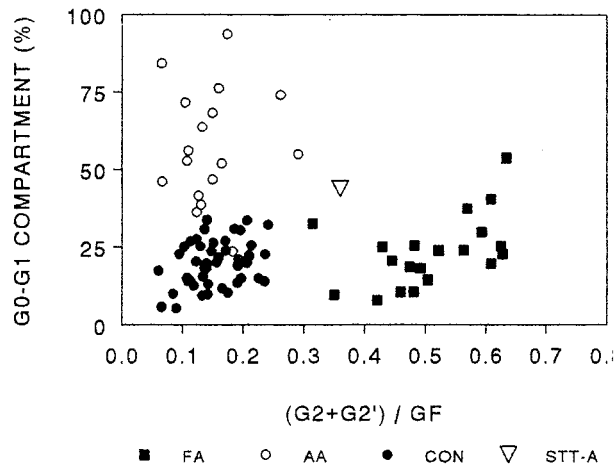
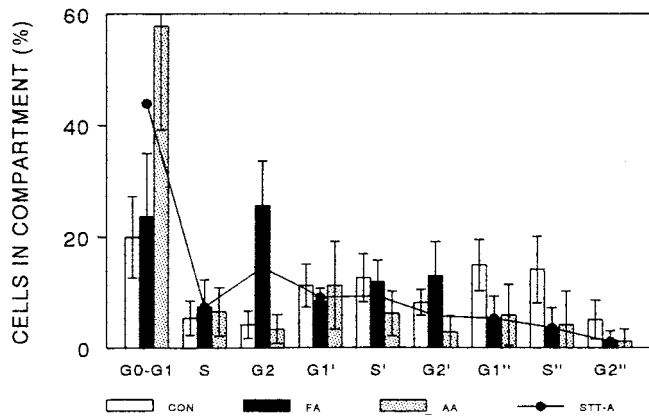


Abb. 11 (G2+G2'/GF)



FA = Fanconi Anämie  
 AA = Aplastische Anämie  
 CON = Kontrollgruppe

Abb. 12 Anteile der Zellen in den einzelnen Phasen

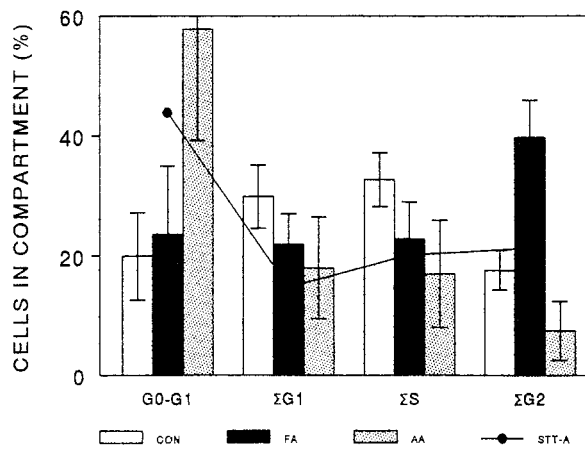


Abb. 13 Anteile der Zellen an den Σ der Phasen



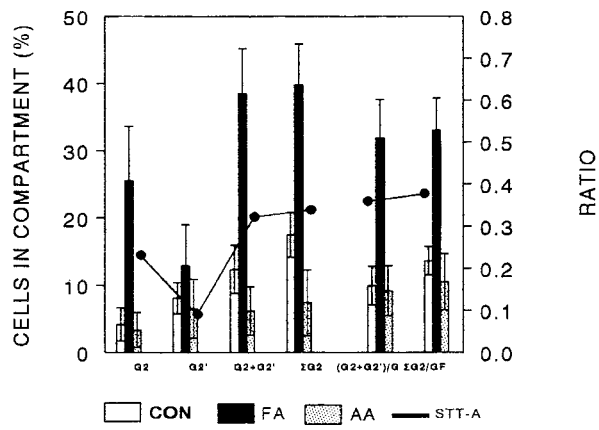
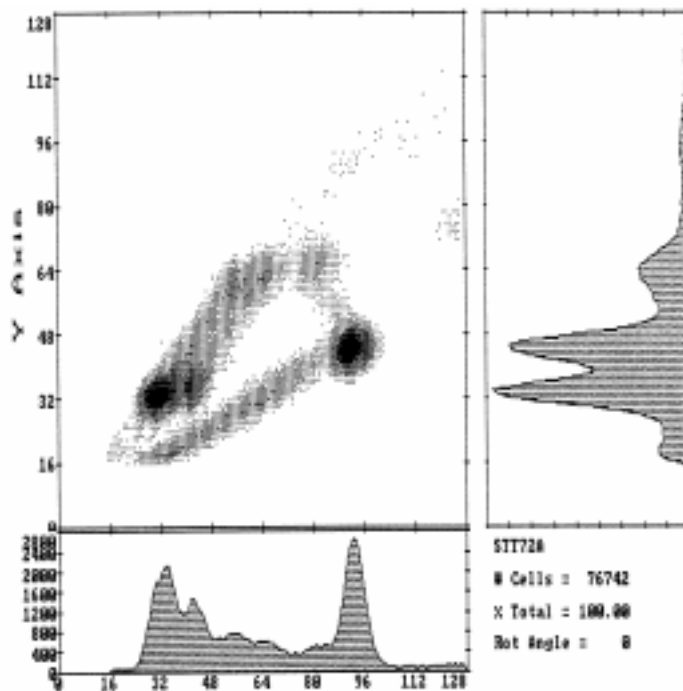


Abb. 14 Anteile der Zellen an G2, G2', G2+G2', Σ G2, (G2+G2')/GF und ΣG2/GF

*Messung vom 16.10.97*

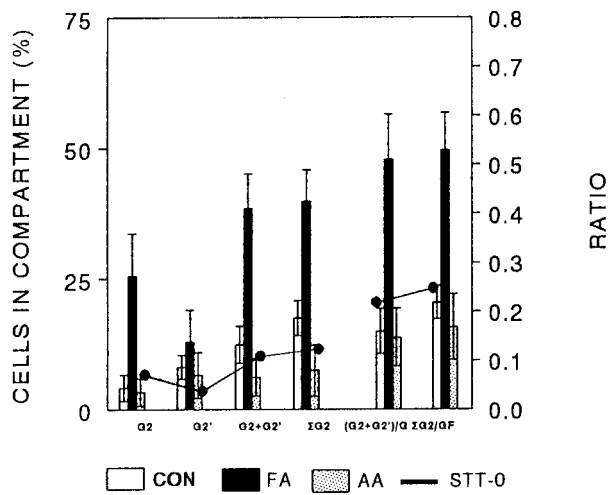


Bei der zweiten Messung wurde außerdem eine Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit 10 bzw. 50 ng/ml Mitomycin C durchgeführt (Abb. 15-24).

Abb. 15 Zellzyklusverteilung, unbehandelt

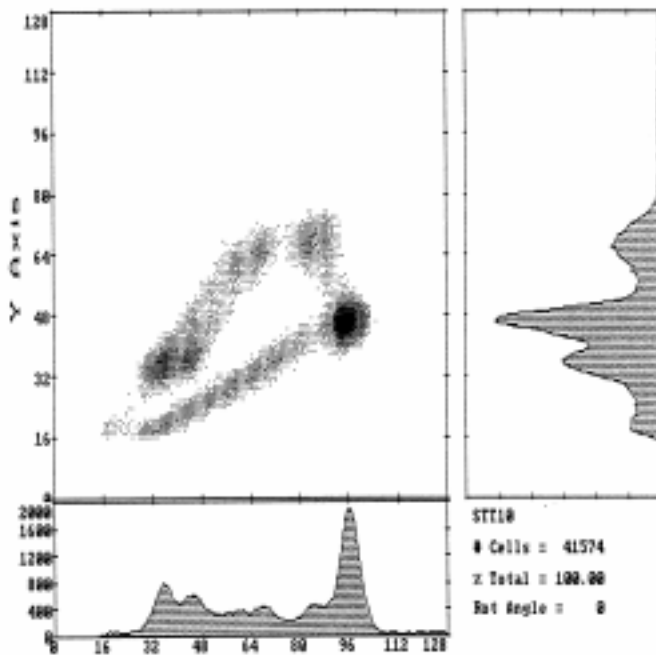
16.10.97 stt0						
Compartment	G0/G1	S	G2	G1'	S'	G2'
%Plot-Zellen	80,6	9,3	10,1	42,6	37,4	20,0
%Real-Zellen	30,5	3,5	3,8	8,5	7,4	4,0
%Orig-Zellen	53,3	6,2	6,7	7,4	6,5	3,5
Compartment	G1''	S''	G2''	G1'''	S'''	G2'''
%Plot-Zellen	55,8	34,8	9,4	98,0	2,0	0,0
%Real-Zellen	18,4	11,5	3,1	9,2	0,2	0,0
%Orig-Zellen	8,1	5,0	1,4	2,0	0,0	0,0
Zyklus 1	Zellzahl =	24441	%Real-Zellen:	37,8	%Orig-Zellen=	66,2
Zyklus 2	Zellzahl =	12828	%Real-Zellen:	19,8	%Orig-Zellen=	17,4
Zyklus 3	Zellzahl =	21323	%Real-Zellen:	33,0	%Orig-Zellen=	14,4
Zyklus 4	Zellzahl =	6065	%Real-Zellen:	9,4	%Orig-Zellen=	2,0
%Increased Cells =		175,0				
%Growth-Fraction =		46,7	S/G1-Ratio =	1,01		
G2/GF =	0,143	G2'/GF =	0,074	G2/G1-Ratio =	0,66	
G2''/GF =	0,029	G2'''/GF =	0,000	(S+G2)/G1-Ratio =	1,67	
Summe G1=	17,5%	Summe S =	17,7%	Summe G2 =	11,5%	
S+S' =	12,6%	S+S'+S'' =	17,7%	Summe G2/GF =	0,247	

Tab. 2 Anteile der Zellphasen, unbehandelt



Bei der Zellzyklusanalyse ohne MMC fanden sich 46,7% stimulierbare Zellen. Diesmal zeigte sich eine völlig normale Summe von Zellen in den G2-Phasen (Abb. 15,16), vor allem im ersten Zellzyklus, wobei  $\Sigma G2/GF = 0,247$  betrug. (Tab. 2, Abb. 21).

Abb. 16 Zellanteile G2, G2', G2+G2', ΣG2, (G2+G2')/GF, ΣG2/GF, unbehandelt



Unter Behandlung mit 10ng MMC erreichten noch 14,1% der Zellen den dritten Zyklus (Tab. 3). Auch die Erhöhung von G2-Phasen-Anteilen war nur durchschnittlich (Abb. 17, 18), wobei  $\Sigma G2/GF = 0,388$  betrug (Abb. 21).

Abb. 17 Zellzyklusverteilung, 10 ng MMC

16.10.97 stt10						
Compartment	G0/G1	S	G2	G1'	S'	G2'
%Plot-Zellen	72,2	10,9	16,9	44,9	33,0	22,1
%Real-Zellen	41,3	6,2	9,7	9,2	6,8	4,5
%Orig-Zellen	56,6	8,6	13,3	6,3	4,7	3,1
Compartment	G1''	S''	G2''	G1'''	S'''	G2'''
%Plot-Zellen	60,1	33,6	6,3	100,0	0,0	0,0
%Real-Zellen	12,7	7,1	1,3	1,1	0,0	0,0
%Orig-Zellen	4,4	2,4	0,5	0,2	0,0	0,0
Zyklus 1	Zellzahl =	18305	%Real-Zellen:	57,2	%Orig-Zellen=	78,5
Zyklus 2	Zellzahl =	6577	%Real-Zellen:	20,6	%Orig-Zellen=	14,1
Zyklus 3	Zellzahl =	6773	%Real-Zellen:	21,2	%Orig-Zellen=	7,3
Zyklus 4	Zellzahl =	348	%Real-Zellen:	1,1	%Orig-Zellen=	0,2
%Increased Cells =		137,2				
%Growth-Fraction =		43,4	S/G1-Ratio =	1,44		
G2/GF =	0,306	G2'/GF =	0,072	G2/G1-Ratio =	1,55	
G2''/GF =	0,011	G2'''/GF =	0,000	(S+G2)/G1-Ratio =	2,99	
Summe G1=	10,9%	Summe S =	15,6%	Summe G2 =	16,8%	
S+S' =	13,2%	S+S'+S'' =	15,6%	Summe G2/GF =	0,388	

Tab. 3 Anteile der Zellphasen, 10 ng MMC

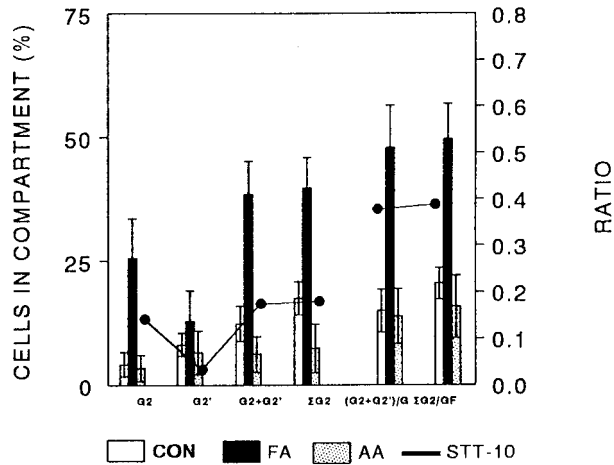
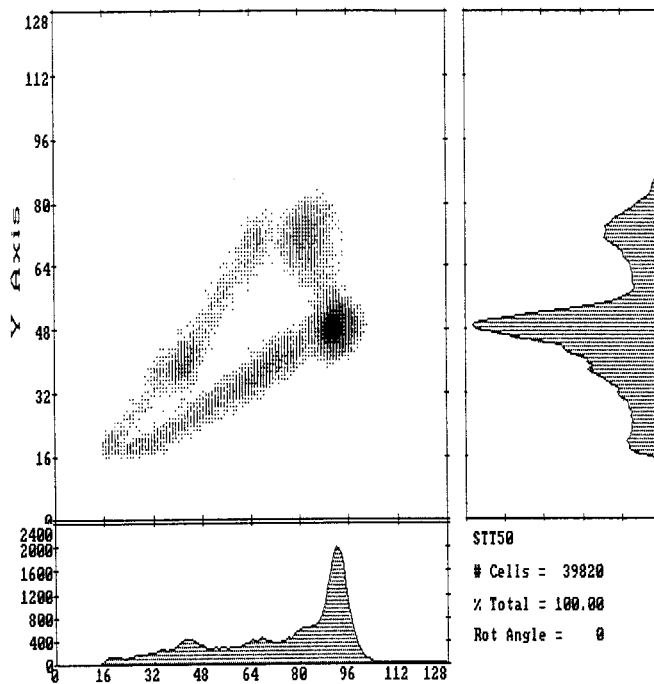


Abb. 18 Zellanteile G2, G2', G2+G2', ΣG2, (G2+G2')/GF, ΣG2/GF 10 ng MMC



Unter Behandlung mit 50 ng MMC erreichten 11,6% der Zellen den dritten Zyklus (Tab. 4). Auch hier war die Erhöhung von Zellen in der G2-Phase nur durchschnittlich (Abb. 19, 20). Diesmal galt  $\Sigma G2/GF=0,453$  (Tab. 4, Abb. 21).

Abb. 19 Zellzyklusverteilung, 50 ng MMC

16.10.97 stt50						
Compartment	G0/G1	S	G2	G1'	S'	G2'
%Plot-Zellen	65,3	14,1	20,6	34,6	52,6	12,8
%Real-Zellen	49,7	10,7	15,7	7,0	10,6	2,6
%Orig-Zellen	57,0	12,3	18,0	4,0	6,1	1,5
Compartment	G1''	S''	G2''	G1'''	S'''	G2'''
%Plot-Zellen	78,0	21,6	0,4	0,0	0,0	0,0
%Real-Zellen	3,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
%Orig-Zellen	0,9	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Zyklus 1	Zellzahl = 21511		%Real-Zellen: 76,1	%Orig-Zellen: 87,3		
Zyklus 2	Zellzahl = 5699		%Real-Zellen: 20,1	%Orig-Zellen: 11,6		
Zyklus 3	Zellzahl = 1074		%Real-Zellen: 3,8	%Orig-Zellen: 1,1		
Zyklus 4	Zellzahl = 0		%Real-Zellen: 0,0	%Orig-Zellen: 0,0		
%Increased Cells = 114,8						
%Growth-Fraction = 43,0			S/G1-Ratio = 3,84			
G2/GF = 0,419	G2'/GF = 0,034		G2/G1-Ratio = 4,01			
G2''/GF = 0,000	G2'''/GF = 0,000		(S+G2)/G1-Ratio = 7,85			
Summe G1 = 4,9%	Summe S = 18,6%		Summe G2 = 19,5%			
S+S' = 18,4%	S+S'+S'' = 18,6%		Summe G2/GF = 0,453			

Tab. 4 Anteile der Zellphasen, 50 ng MMC

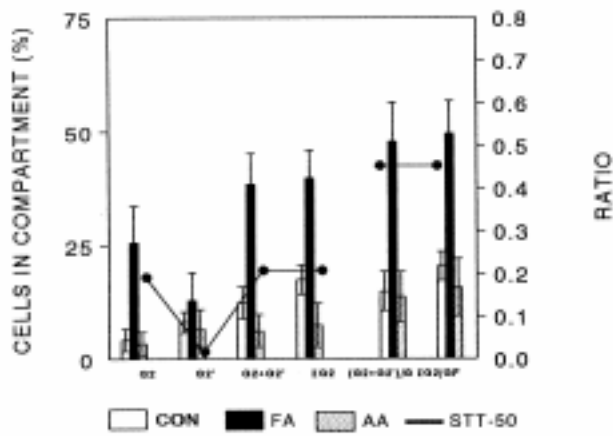


Abb. 20 Zellanteile G2, G2', G2+G2', ΣG2, (G2+G2')/GF, ΣG2/GF, 50 ng MMC

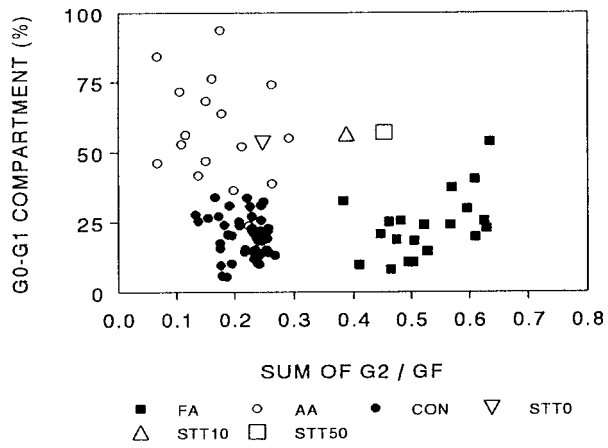


Abb. 21 ΣG2/GF unter 0, 10, 50 ng MMC

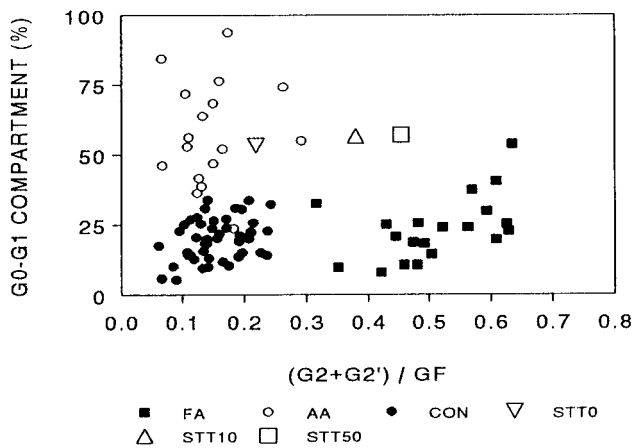


Abb. 22 (G2+G2')/GF unter 0, 10, 50 ng MMC

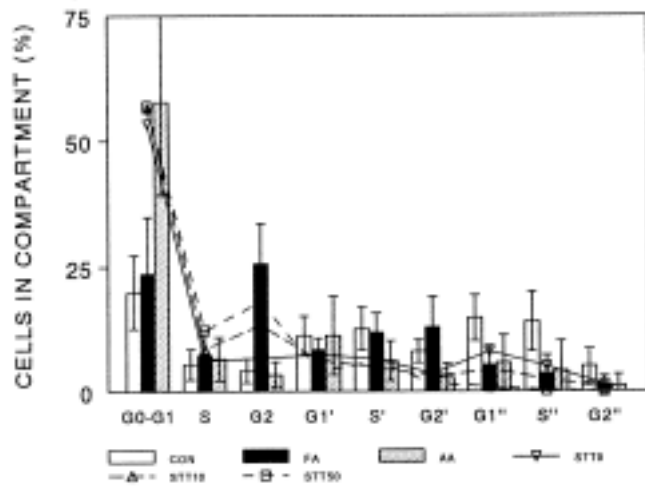


Abb. 23 Anteile der Zellen in den einzelnen Phasen unter 0, 10, 50 ng MMC

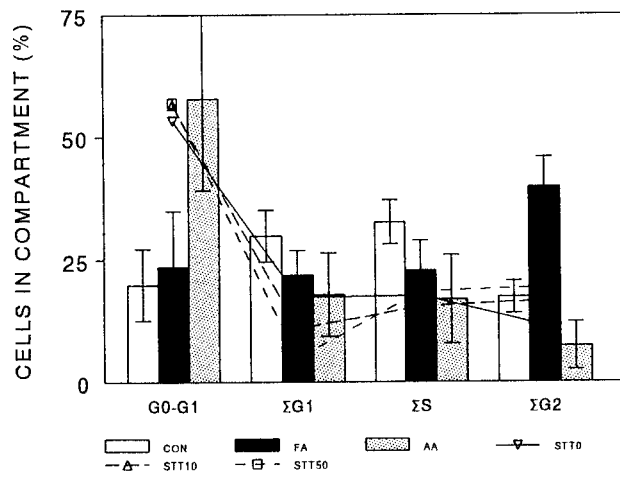


Abb. 24 Anteile der Zellen an den Σ der einzelnen Phasen unter 0, 10, 50 ng MMC

## Messung vom 16.10.98

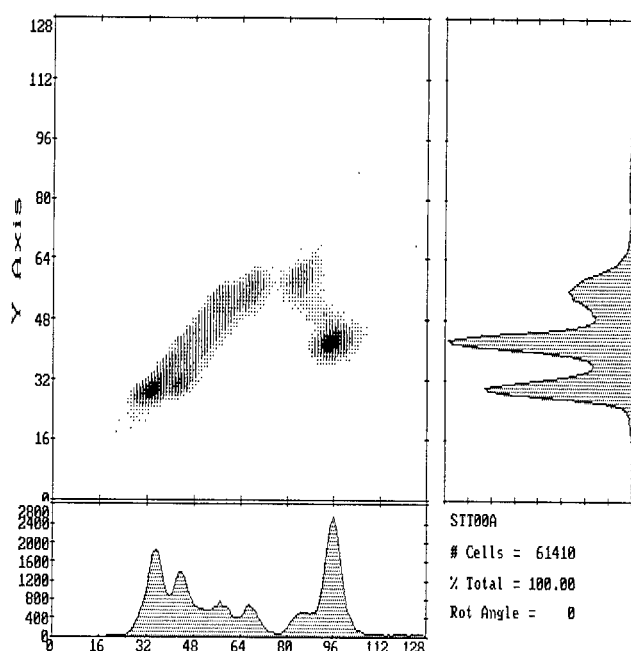


Abb. 25 Zellzyklusverteilung, unbehandelt

Bei der dritten Messung wurden Zellzyklusanalysen ohne, mit 5, 10 und 50 ng/ml MMC durchgeführt (Abb 25-32).

Diesmal fanden sich unbehandelt 53,6% proliferierende Zellen, und 18,8% der Zellen erreichten den dritten Zyklus (Tab. 5). Die G2-Phasen-Anteile waren nur geringfügig erhöht (Abb. 25, 26).

$$\Sigma G2/GF=0,324,$$

16.10.98 stt0						
Compartment	G0/G1	S	G2	G1'	S'	G2'
%Plot-Zellen	71,8	13,3	14,9	34,7	33,3	32,0
%Real-Zellen	27,0	5,0	5,6	7,6	7,3	7,0
%Orig-Zellen	46,4	8,6	9,6	6,5	6,3	6,0
Compartment	G1''	S''	G2''	G1'''	S'''	G2'''
%Plot-Zellen	39,1	49,9	11,0	94,3	5,7	0,0
%Real-Zellen	14,3	18,2	4,0	3,7	0,2	0,0
%Orig-Zellen	6,1	7,8	1,7	0,8	0,0	0,0
Zyklus 1	Zellzahl =	22312	%Real-Zellen:	37,6	%Orig-Zellen=	64,6
Zyklus 2	Zellzahl =	13005	%Real-Zellen:	21,9	%Orig-Zellen=	18,8
Zyklus 3	Zellzahl =	21720	%Real-Zellen:	36,6	%Orig-Zellen=	15,7
Zyklus 4	Zellzahl =	2352	%Real-Zellen:	4,0	%Orig-Zellen=	0,9
%Increased Cells =		172,0				
%Growth-Fraction =		53,6	S/G1-Ratio =	1,69		
G2/GF =	0,180	G2'/GF =	0,112	G2/G1-Ratio =	1,29	
G2''/GF =	0,032	G2'''/GF =	0,0	(S+G2)/G1-Ratio =	2,98	
Summe G1=	13,5%	Summe S =	22,8%	Summe G2 =	17,4%	
S+S' =	14,9%	S+S'+S'' =	22,7%	Summe G2/GF =	0,324	

Tab. 5 Anteile der Zellphasen, unbehandelt



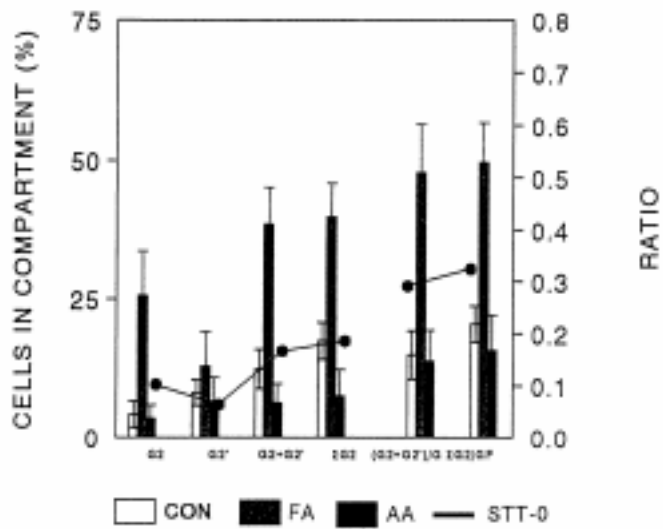


Abb. 26 Zellanteile G2, G2', G2+G2', ΣG2, (G2+G2')/GF, ΣG2/GF, unbehandelt

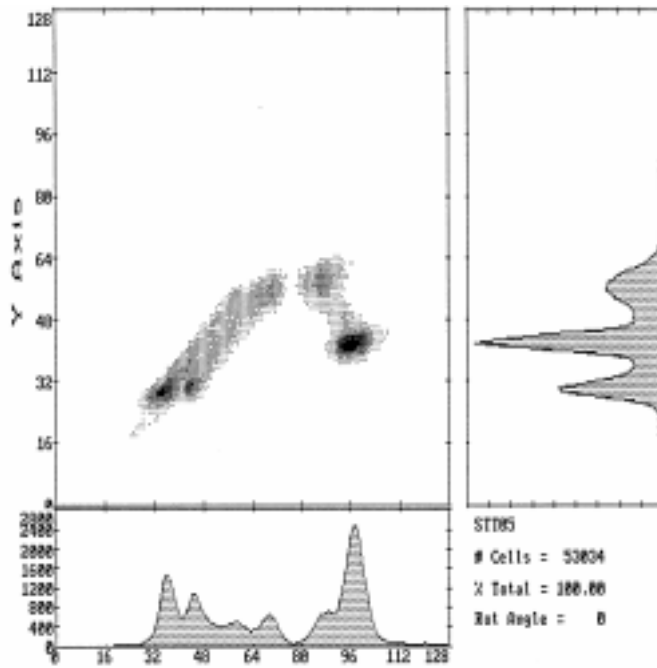


Abb. 27 Zellzyklusphasen, 5 ng MMC

Unter 5 ng MMC erreichten 17,5% der proliferierenden Zellen den dritten Zyklus (Tab. 6). Der Anteil von Zellen in der G2-Phase war ebenfalls nur leicht erhöht (Abb. 27, 28). Außerdem war  $\Sigma G2/GF=0,395$  (Tab. 6).

16.10.98 stt05

Compartment	G0/G1	S	G2	G1'	S'	G2'
%Plot-Zellen	67,2	13,0	19,8	26,5	43,5	30,0
%Real-Zellen	31,3	6,0	9,2	6,1	10,0	6,9
%Orig-Zellen	47,8	9,2	14,1	4,6	7,6	5,2
Compartment	G1''	S''	G2''	G1'''	S'''	G2'''
%Plot-Zellen	41,9	46,2	11,9	100,0	0,0	0,0
%Real-Zellen	12,2	13,4	3,5	1,6	0,0	0,0
%Orig-Zellen	4,6	5,1	1,3	0,3	0,0	0,0
Zyklus 1	Zellzahl =	24147	%Real-Zellen:	46,5	%Orig-Zellen=	71,1
Zyklus 2	Zellzahl =	11878	%Real-Zellen:	22,9	%Orig-Zellen=	17,5
Zyklus 3	Zellzahl =	15057	%Real-Zellen:	29,0	%Orig-Zellen=	11,1
Zyklus 4	Zellzahl =	832	%Real-Zellen:	1,6	%Orig-Zellen=	0,3
%Increased Cells =		152,9				
%Growth-Fraction =		52,2	S/G1-Ratio =	2,29		
G2/GF =	0,270	G2'/GF =	0,101	G2/G1-Ratio =	2,15	
G2''/GF =	0,025	G2'''/GF =	0,000	(S+G2)/G1-Ratio =	4,45	
Summe G1=	9,6%	Summe S =	22,0%	Summe G2 =	20,6%	
S+S' =	16,9%	S+S'+S'' =	22,0%	Summe G2/GF =	0,395	

Tab. 6 Anteile der Zellphasen, 5 ng MMC

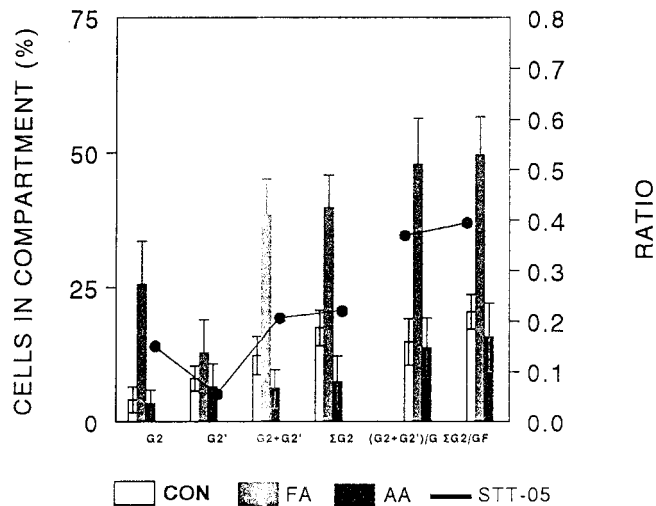
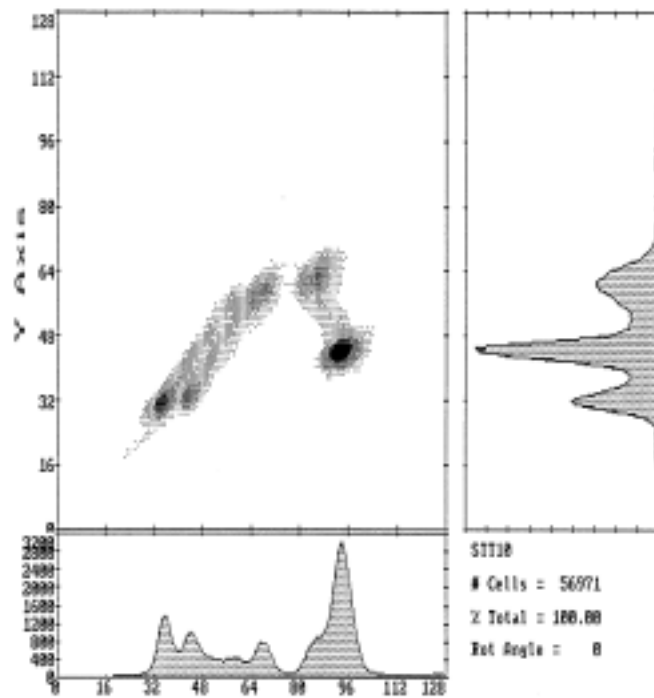


Abb. 28 Zellanteile G2, G2', G2+G2', ΣG2, (G2+G2')/GF, ΣG2/GF, 5 ng MMC



Unter der Behandlung mit 10 ng MMC erreichten 17,2% der Zellen den dritten Zyklus. Der Anteil der Zellen in den G2-Phasen war ebenfalls nur leicht erhöht (Abb. 29, 30) und  $\Sigma G2/GF = 0,417$ .

Abb. 29 Zellzyklusverteilung, 10 ng MMC

16.10.98 stt10						
Compartment	G0/G1	S	G2	G1'	S'	G2'
%Plot-Zellen	65,6	14,4	20,0	24,4	41,6	34,0
%Real-Zellen	34,1	7,5	10,4	5,9	10,0	8,2
%Orig-Zellen	48,8	10,7	14,9	4,2	7,2	5,9
Compartment	G1''	S''	G2''	G1'''	S'''	G2'''
%Plot-Zellen	50,7	41,3	8,0	100,0	0,0	0,0
%Real-Zellen	11,8	9,6	1,9	0,7	0,0	0,0
%Orig-Zellen	4,2	3,4	0,7	0,1	0,0	0,0
Zyklus 1	Zellzahl = 28597	%Real-Zellen: 52,0	%Orig-Zellen= 74,3			
Zyklus 2	Zellzahl = 13262	%Real-Zellen: 24,1	%Orig-Zellen= 17,2			
Zyklus 3	Zellzahl = 12783	%Real-Zellen: 23,2	%Orig-Zellen= 8,3			
Zyklus 4	Zellzahl = 397	%Real-Zellen: 0,7	%Orig-Zellen= 0,1			
%Increased Cells =	143,1					
%Growth-Fraction =	51,2			S/G1-Ratio =	2,49	
G2/GF = 0,290	G2'/GF = 0,114			G2/G1-Ratio =	2,50	
G2''/GF = 0,013	G2'''/GF = 0,000			(S+G2)/G1-Ratio =	5,00	
Summe G1= 8,5%	Summe S = 21,3%			Summe G2 =	21,4%	
S+S' = 17,9%	S+S'+S'' = 21,3%			Summe G2/GF =	0,417	

Tab. 7 Anteile der Zellphasen, 10 ng MMC

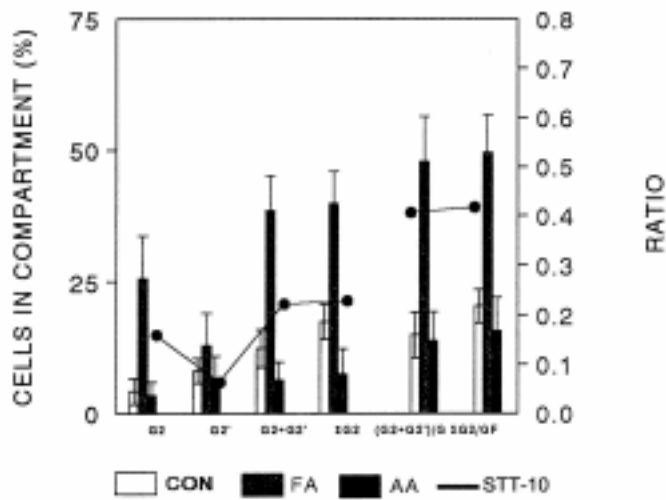


Abb. 30 Zellanteile G2, G2', G2+G2', ΣG2, (G2+G2')/GF, ΣG2/GF

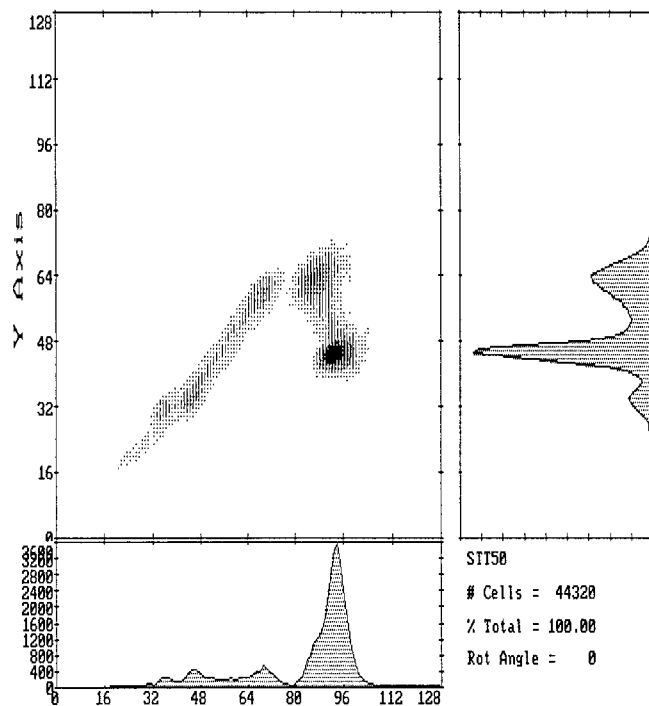


Abb. 31 Zellzyklusverteilung, 50 ng MMC

Auch unter der Behandlung mit 50 ng MMC zeigte sich nur eine durchschnittliche Erhöhung der G2-Phasen (Abb. 31, 32). Es erreichten 12,3% der Zellen den dritten Zyklus (Tab. 8).  $\Sigma G2/GF=0,496$ .

16.10.98 stt50						
Compartment	G0/G1	S	G2	G1'	S'	G2'
%Plot-Zellen	58,0	17,3	24,7	19,3	53,4	27,3
%Real-Zellen	43,2	12,9	18,4	4,1	11,4	5,8
%Orig-Zellen	50,1	15,0	21,4	2,4	6,6	3,4
Compartment	G1''	S''	G2''	G1'''	S'''	G2'''
%Plot-Zellen	76,7	22,6	0,7	0,0	0,0	0,0
%Real-Zellen	3,2	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
%Orig-Zellen	0,9	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
Zyklus 1	Zellzahl =	31746	%Real-Zellen:	74,5	%Orig-Zellen=	86,5
Zyklus 2	Zellzahl =	9064	%Real-Zellen:	21,3	%Orig-Zellen=	12,3
Zyklus 3	Zellzahl =	1775	%Real-Zellen:	4,2	%Orig-Zellen=	1,2
Zyklus 4	Zellzahl =	0	%Real-Zellen:	0,0	%Orig-Zellen=	0,0
%Increased Cells =		116,0				
%Growth-Fraction =		49,9	S/G1-Ratio =	6,59		
G2/GF =	0,428	G2'/GF =	0,068	G2/G1-Ratio =	7,47	
G2''/GF =	0,000	G2'''/GF =	0,000	(S+G2)/G1-Ratio =	14,07	
Summe G1=	3,3%	Summe S =	21,8%	Summe G2 =	24,7%	
S+S' =	21,5%	S+S'+S'' =	21,8%	Summe G2/GF =	0,496	

Tab. 8 Anteile der Zellphasen, 50 ng MMC

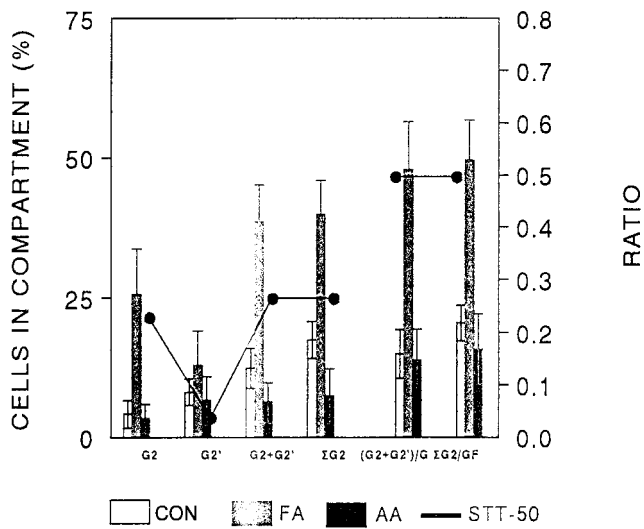
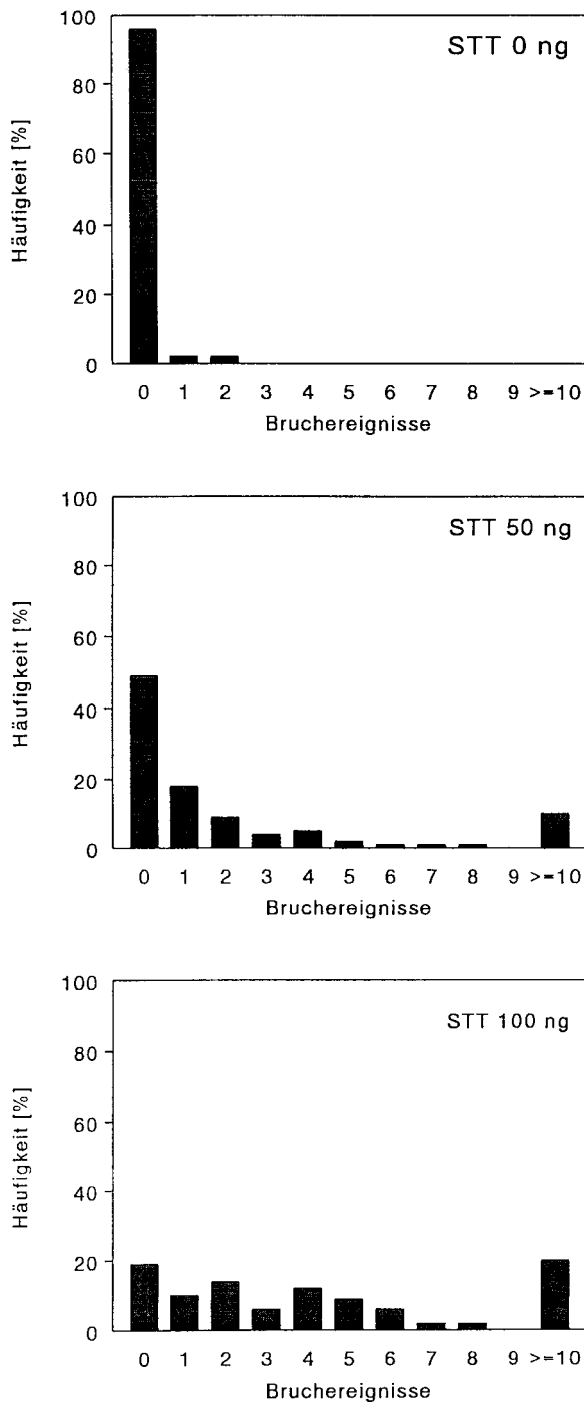


Abb. 32 Zellanteile G2, G2', G2+G2', ΣG2, (G2+G2')/GF, ΣG2/GF, 50 ng MMC

### 3. Chromosomenbrüchigkeit



Zusätzlich zu der Zellzyklus-Diagnostik wurde im Oktober '98 die Häufigkeit von Chromosomenbrüchen nach Behandlung der Lymphozyten mit 0, 50 und 100 ng/ml MMC gemessen. Dabei waren ohne MMC kaum Brüche vorhanden. Nach Behandlung mit 50 ng MMC und ebenfalls nach Behandlung mit 100 ng MMC fanden sich sowohl Zellen mit  $\geq 10$  Brüchen als auch Zellen, die nur wenige, bzw. gar keine Bruchereignisse aufwiesen. (Abb. 33)

Abb. 33 Brüchigkeit der Chromosomen unter MMC

#### 4. Fibroblastenkultur

Im Januar '98 wurde ein Haut-Stanzbiopsat des Patienten untersucht, um die Diagnose Fanconi-Anämie zu verifizieren, nachdem die Zellzyklusanalyse im Oktober '97 Hinweise auf eine Mosaikkonstellation gegeben hatte. Unter Zugabe von 0,5 und 1 ng/ml MMC zeigte sich im Vergleich zu der unbehandelten Probe eine markante Reduktion des Zellwachstums (Abb. 34), sowohl unter 5% als auch unter 20% Sauerstoff.

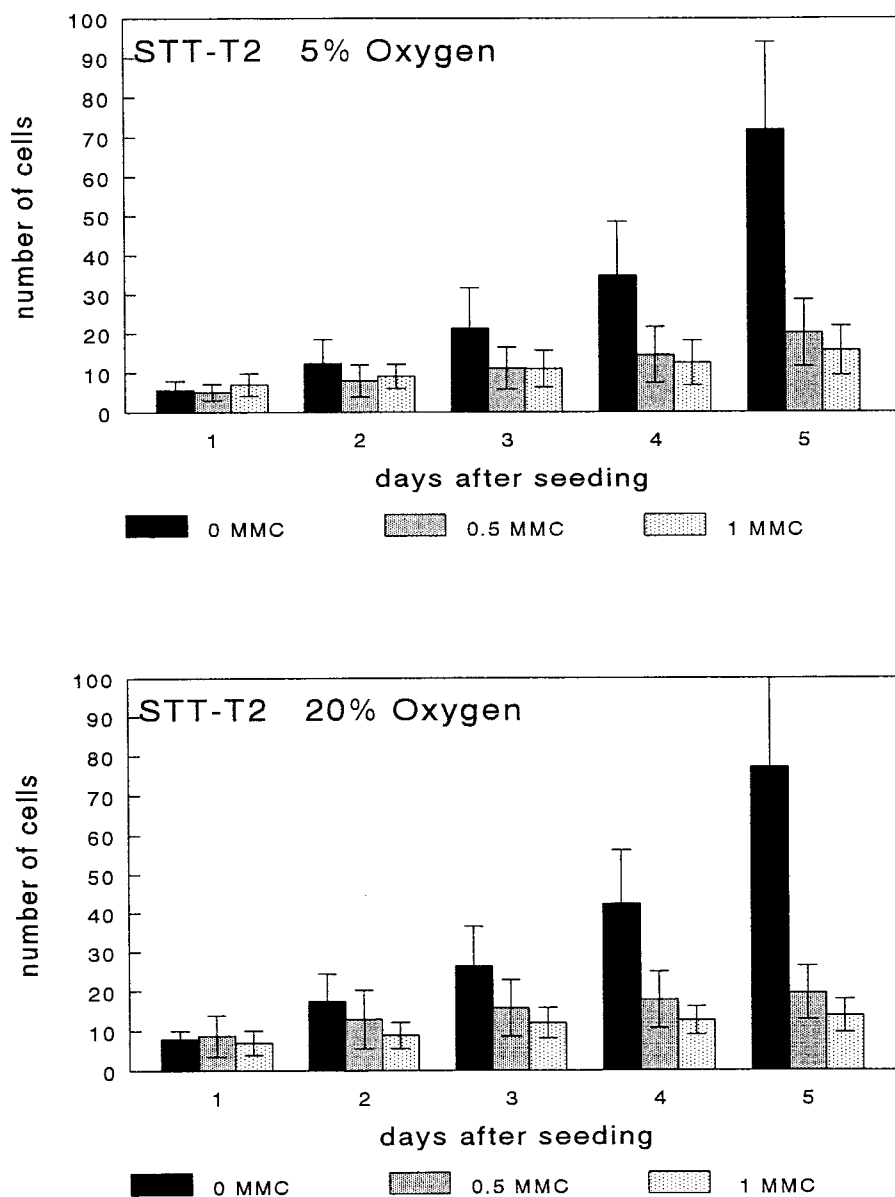


Abb. 34 Wachstum der Fibroblasten unter MMC

## 5. Bestimmung der Komplementationsgruppe

Im Februar '00 konnte aus Fibroblastenkulturen die Komplementationsgruppe des Patienten bestimmt werden (Tab. 9, Abb. 35).

Bei Fusion der Fibroblasten mit LFAPEG zeigte sich eine Abnahme der MMC-Sensitivität. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase war im Gegensatz zu den übrigen Proben vermindert. In der graphischen Darstellung zeigt sich dies mit einem verminderten G2-Gipfel, der deutlich niedriger ist als der vorangehende G1-Gipfel. Nach Fusion mit LFCPEG und LFGPEG war, ebenso wie bei Fusion mit MEG5AB und ohne Virus, der G2-Gipfel deutlich erhöht (Abb. 35).

STT 17.02.2000								
NAME	NEG			POS			NEG zu POS	
MEG5AB								
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M		
MMC+	29,5	8,4	62,1	29,0	7,3	63,7	58	39
LFAPEG								
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M		
MMC+	29,1	23,8	47,1	47,6	11,4	41,0	32	57
LFCPEG								
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M		
MMC+	24,7	16,5	58,8	28,6	6,0	65,5	54	41
LFGPEG								
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M		
MMC+	31,2	5,8	63,0	28,2	12,5	59,3	40	53

Tab. 9



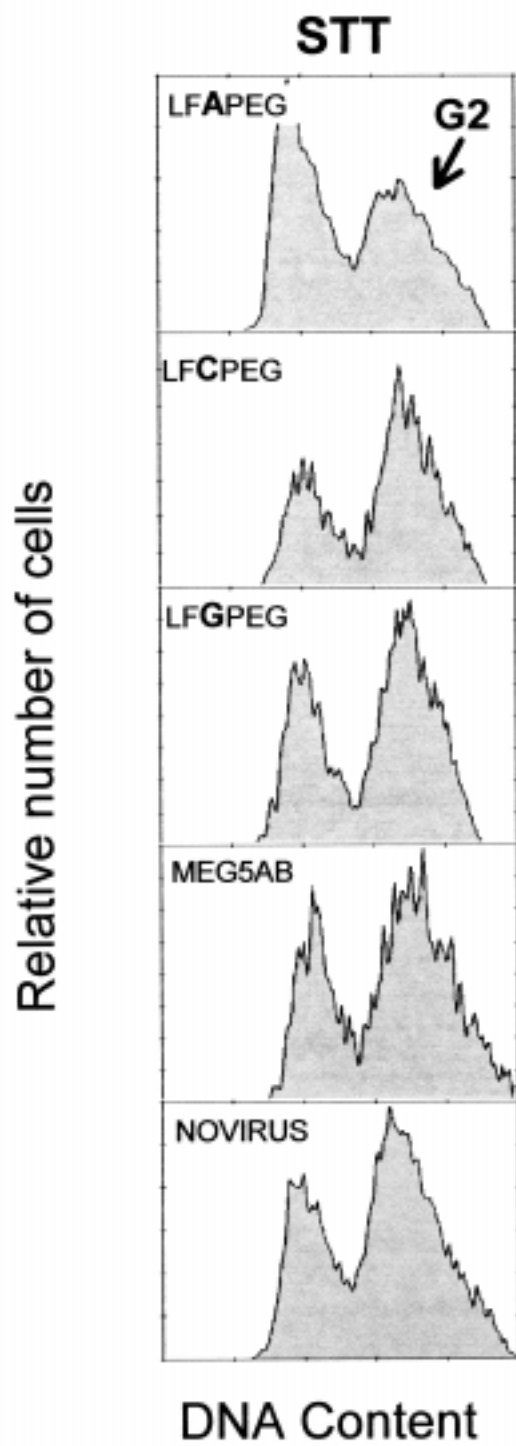


Abb. 35 Anteil der G2-Phasen nach Fusion mit unterschiedlichen Vektoren.

## 6. Mutationsanalyse

Im Juni '01 wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt, wobei die erste Mutation des Patienten bestimmt werden konnte (Abb. 36, 37). Die Anzahl der Exons der bisher bestimmten FA-Gene liegen zwischen 1 (FANCF) und 44 (FANCD2). Das FANCA besteht aus 43 Exons. (Joenje, Patel 2001)

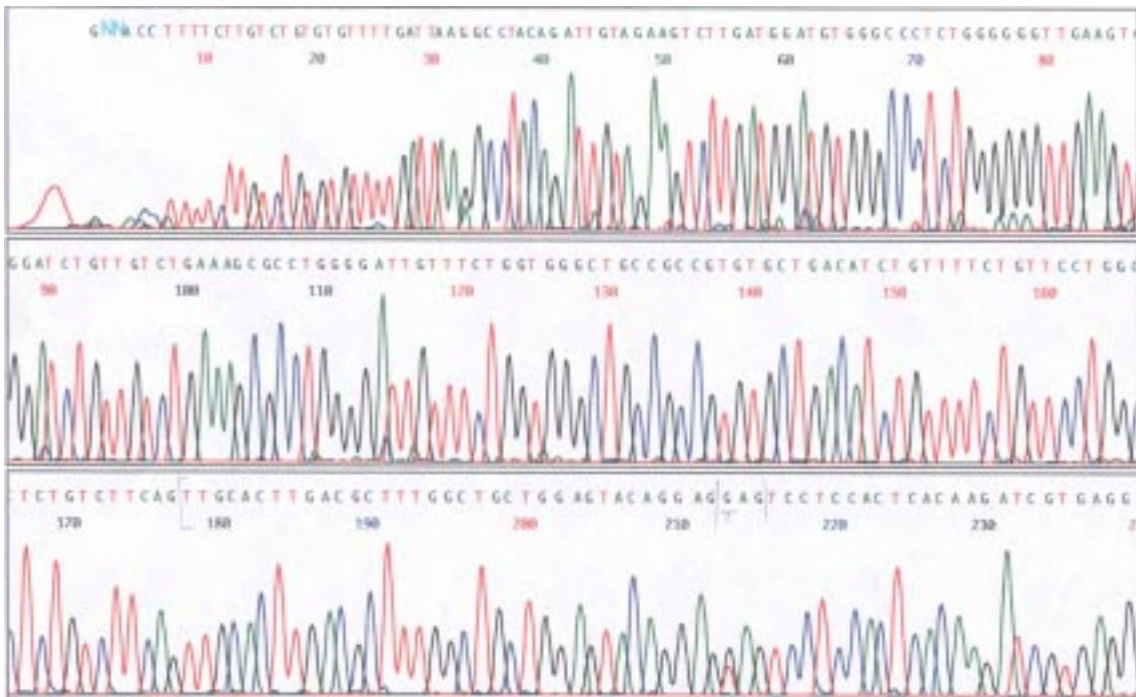


Abb. 36 Mutationsanalyse des Exon 10

Bei einer Untersuchung des FANCA-Gens fand sich in Exon 10 die Mutation 862G>T, E288X, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hatte. Die Base Glutamin wurde durch Tyrosin ersetzt, was zur Bildung des Basentriplets TAG (Stopcodon) anstelle von GAG (Glutaminsäure) führte (Abb. 37).

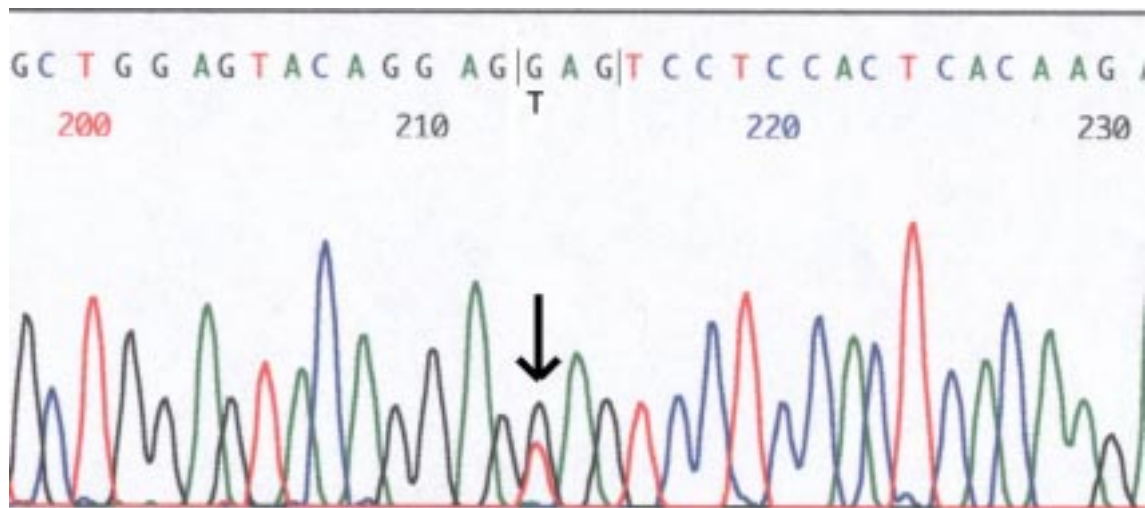


Abb. 37 Ersatz von Glutamin durch Tyrosin in Exon 10

## Diskussion

Bei der Fanconi-Anämie handelt es sich um eine Krankheit mit starker klinischer Heterogenität (Auerbach 1995). Daher ist es schwierig, von einem typischen Verlauf der Krankheit zu sprechen. Mißbildungen kommen in großer Vielfalt und unterschiedlicher Ausprägung vor. Die häufigsten sind Café au lait Flecken, Minderwuchs, Skelettmißbildungen vornehmlich der Hand und des Radius, hypo- bis aplastische und ektope Nieren, Hypogonadismus, Mikrocephalie und Fehlen der Art. Radialis (de Kerviler et al. 1999). Liegen keine typischen Fehlbildungen vor, wird die Diagnose oft erst mit dem Beginn der Aplastischen Anämie mit Thrombozytopenie und Panzytopenie gestellt, die im Schnitt mit 7 Jahren auftritt, wobei die Spannweite sehr groß ist (German 1973, Auerbach 1995). Im Verlauf entwickelt eine große Anzahl der Patienten ein myelodysplastisches Syndrom oder akute myeloische Leukämie (Auerbach 1995).

Bei dem hier beschriebenen Patienten wurde im Alter von 2 ½ Jahren im März '95 die Diagnose Fanconi-Anämie gestellt. Dies geschah durch Nachweis einer vermehrten Chromosomenbrüchigkeit nach Behandlung mit DEB und MMC im humangenetischen Institut in Heidelberg. Zu diesem Zeitpunkt wies der Patient einen kontinuierlichen Thrombozytenabfall (bis 76.000/ $\mu$ l), einen Minderwuchs durch Wachstumshormonmangel und eine Dystopie der rechten Niere auf.

Eine Knochenmarkspunktion im November '94 hatte ein stark lymphozytäres Mark mit einer deutlich verminderten und rechtsverschobenen Myelopoese, einer verminderten Erythropoese und kaum Megakaryozyten ergeben. Die Diagnose FA konnte bei einer Zellzyklusanalyse von Lymphozyten am humangenetischen Insitut Würzburg fünf Monate später bestätigt werden. Bei den dortigen Untersuchungen fand sich eine Akkumulation von unbehandelten Zellen in der G2-Phase ( $\Sigma$ G2/GF=0,378), was ein typischer Befund bei FA ist (Schindler et al. 1987). Nachdem die Thrombozyten bis Mitte '95 bis auf ein Mi-

nimum von 41.000/ $\mu$ l zunächst kontinuierlich abgefallen waren, stabilisierten sie sich dann auf Werten um 100.000/ $\mu$ l, abgesehen von einem Abfall im Rahmen von einigen Infekten auf 41.000/ $\mu$ l im Januar/Februar '98. Dabei ist bemerkenswert, daß nur die Thrombozyten einen Abfall aufwiesen, die restlichen Blutwerte befanden sich durchweg im Normbereich. So war der Hb im Bereich  $> 10$  g/dl, die Leukozyten in der Regel  $> 6000$ / $\mu$ l und die Erythrozyten  $> 3,5$  Mio/ $\mu$ l.

Eine weitere Knochenmarkspunktion im Oktober '97 ergab ein normozelluläres Mark. Eine weitere, zur gleichen Zeit durchgeführte Zellzyklusanalyse zeigte jetzt einen normalen Anteil von unbehandelten Zellen in den G2-Phasen ( $\Sigma G2/GF=0,247$ ) und nur eine durchschnittliche Erhöhung nach Behandlung mit MMC, was als Hinweis auf eine mögliche Mosaikkonstellation verstanden wurde.

Um auszuschließen, daß diese Normalisierung der Blutwerte auf eine frühere Fehldiagnose zurückzuführen und der Patient eventuell gar kein FA-Patient sei, wurde im Januar 1998 eine Haut-Fibroblastenkultur untersucht. Bei Mosaikpatienten betrifft die Veränderung die Stammzellen im Blut, der Defekt bleibt in anderen Zellen, wie z.B. den Fibroblasten, erhalten. So zeigte sich auch bei diesem Patienten eine für FA typische Reduktion des Zellwachstums der Fibroblasten unter Anwesenheit von MMC, sowohl unter 5% als auch unter 20% Sauerstoff. Damit konnte der Patient eindeutig als FA-Patient zugeordnet werden. Eine weitere Zellzyklusanalyse im Oktober '98 bestätigte das Ergebnis von vor einem Jahr. Diesmal war der Anteil von Zellen in der G2-Phase allerdings leicht erhöht ( $\Sigma G2/GF=0,324$ ). Eine mögliche Erklärung für die Normalisierung dieser und der Blutwerte ist das Vorliegen einer Mosaikkonstellation bei dem Patienten und somit das gleichzeitige Vorhandensein einer gesunden und einer kranken Zellpopulation.

Zusätzlich wurden bei einer erneuten Analyse der Chromosomenbrüchigkeit von Lymphozyten unter Behandlung von MMC im Oktober '98 unter 100 ng

MMC Zellen mit  $\geq 10$  Brüchen gefunden, was typisch für FA ist, gleichzeitig waren aber auch Zellen mit deutlich weniger bzw. gar keinen Brüchen vorhanden. Dies weist auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen hin, von denen sich die eine wie FA-Zellen, die andere wie gesunde Zellen verhält. Das Auftreten einer gesunden Lymphozytenpopulation könnte gut durch Entstehung eines Mosaiks erklärt werden.

Für das Entstehen eines Mosaiks werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert:

Eine Möglichkeit wäre intragenes Crossover bei compound heterozygoten Patienten, d.h. Patienten die gemischerbig für den Defekt sind, was bei der überwiegenden Zahl der FA-Patienten der Komplementationsgruppe A der Fall ist (Digweed 1999). Bei diesen Patienten befinden sich die Mutationen auf unterschiedlichen Stellen der beiden Allele. So kann es in Stammzellen des hämatopoetischen Systems entweder zu einem Austausch der Mutationen kommen und so ein gesundes Allel und ein Allel, das beide Mutationen trägt, entstehen, was in einem Fall beschrieben wurde (Lo Ten Foe et al. 1997). Andererseits kann es durch Genkonversion zum Verlust einer pathogenen Mutation kommen, so daß ebenfalls ein gesundes Allel entsteht. Die so entstandene funktionell heterozygote und damit intakte Stamzelle kann die defekten Blutzellen nach und nach ersetzen und so zu einer Normalisierung bzw. Besserung der Blutwerte führen. In den anderen Zellen, wie z.B. den Fibroblasten, bleibt der Defekt weiterhin erhalten, weshalb durch Untersuchungen dieser Zellen eine Diagnose weiterhin möglich ist. (Lo Ten Foe et al. 1997)

Neben der Mosaikbildung bei compound heterozygoten Patienten kann es aber auch bei homozygoten Patienten zur Mosaikbildung kommen. In diesem Fall wird die ererbte Mutation „vor Ort“, d.h. direkt im Genom korrigiert, indem fehlende Basenpaare ersetzt bzw. überflüssige Basenpaare entfernt werden. Auch bei diesen Patienten zeigen sich anschließend normale Blutzellen, so daß die Lymphozyten nicht mehr empfindlich gegen MMC sind, während die übrige

gen Zellen, wie die Haut-Fibroblasten, ebenfalls weiterhin die für FA typischen Veränderungen zeigen. Drei Fälle mit unterschiedlichen Mutationen und kompensatorischen Basenveränderungen sind beschrieben worden. (Waisfisz et al. 1999)

In einem weiteren publizierten Fall, bei dem ebenfalls ein Mosaik vorlag, kam es zu einer spontanen somatischen Reversion in einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, die verantwortlich gemacht wurde für das Auftreten einer gesunden Lymphozytenpopulation (Gregory et al. 2001).

Bei Vorliegen von zwei Lymphozytenpopulationen durch Mosaikbildung wurde ein signifikant erhöhtes Risiko für das Versagen von Knochenmarkstransplantationen beschrieben, verursacht durch die gesunde Lymphozytenpopulation. Aufgrund dessen ist in diesen Fällen eine deutlich stärkere Immunsuppression nach Knochenmarkstransplantation nötig (Mac Millan et al. 2000). Andererseits wird das Auftreten eines Mosaiks als „natürliche Gentherapie“ angesehen, die als Modell für den Erfolg von gezielter Gentherapie betrachtet werden kann, da ein Selektionsvorteil für das *in vivo* Wachstum der veränderten Zellen deutlich wird (Gregory et al. 2001).

Ist die Komplementationsgruppe des Patienten bekannt und gehört er einer Gruppe an, deren Gen identifiziert worden ist, besteht die Möglichkeit, durch molekulargenetische Analyse den Mechanismus der Mosaikbildung zu identifizieren (Lo Ten Foe et al. 1997).

Bisher wurden die Gene der Gruppen FA-A, FA-C, FA-D2, FA-E, FA-F und FA-G identifiziert, die teilweise auf unterschiedlichen Chromosomen liegen (Digweed 1999, Joenje, Patel 2001). Innerhalb der einzelnen Gruppen existieren ebenfalls viele unterschiedliche Mutationen. Bei den unterschiedlichen Gruppen wurden unterschiedliche Verläufe und Ausprägungen beobachtet, wobei es auch Unterschiede innerhalb einzelner Gruppen abhängig von der aufgetretenen Mutation gab, weshalb der Mutation auf die Ausprägung der Krankheit ein größerer Einfluß zugeschrieben wurde als der Komplementationsgruppe (Jo-

enje, Patel 2001). Es wurde versucht, eine Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp festzustellen. Dabei wurde in der Gruppe FA-G und bei Null-Mutationen der Gruppe FA-A ein schwererer hämatologischer Verlauf beschrieben, während in der Gruppe FA-C ein leichter Verlauf vorherrschte. (Faivre et al. 2000)

Innerhalb der Gruppe FA-A wurden zahlreiche Mutationen beschrieben, die mit unterschiedlicher Häufigkeit in bestimmten ethnischen Gruppen auftreten (Tamary et al. 2000).

Bei dem hier beschriebenen Patienten konnte im Februar 2000 die Komplementationsgruppe durch Analyse von Fibroblastenkulturen bestimmt werden, wobei der Patient der Gruppe A zugeordnet wurde. Die erste Mutation wurde im Juni '01 bestimmt. Im Exon 10 fand sich die Mutation 862G>T, E288X, was zur Bildung eines Stoppcodons anstelle von Glutaminsäure führt. Damit ist zu erwarten, daß die Funktion zumindest dieses Allels stark eingeschränkt ist. Der genaue Mechanismus der Mosaikbildung bei dem hier beschriebenen Patienten lässt sich allerdings erst dann klären, wenn auch die Mutation auf dem zweiten Allel gefunden worden ist.

Im Zusammenhang mit FA wird häufig ein Minderwuchs erwähnt (Auerbach 1995, Alter 1993). Dabei wurden jetzt zehn Fälle von FA mit schwerem Minderwuchs in Zusammenhang mit Wachstumshormonmangel und PSIS (pituitary stalk interruption syndrome) beschrieben, die erfolgreich auf eine Wachstumshormontherapie ansprachen (Dupuis-Girod et al. 2001). Auch in dem dargestellten Fall kam es zu einem schweren Minderwuchs, der auf einen Wachstumshormonmangel in Verbindung mit einer dysplastischen Hypophyse zurückgeführt werden konnte. Es zeigte sich ebenfalls ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit Wachstumshormon. Dies könnte ebenfalls auf die Assoziation von FA mit PSIS schließen lassen.

Gleiches wurde in einer weiteren Studie festgestellt, bei der ein häufiges Auftreten von Endokrinopathien, hauptsächlich Wachstumshormonmangel, Hypothyreose und Störungen des Glucosestoffwechsels bei FA beschrieben wur-



den, wobei auch wieder hier ein Zusammenhang zwischen Komplementationsgruppe und endokriner Störung auffiel (Wajnrajch et al. 2001).

## **Epikrise**

Am Beispiel eines jungen Patienten mit FA wurde gezeigt, daß klinisches Bild, Krankheitsverlauf und Prognose der Krankheit ganz entscheidend von der Art des betroffenen Gens und der spezifischen Konstellation der zu Grunde liegenden Mutation abhängen. Defekte in den FA Genen bedingen genetische Instabilität, welche insbesondere das erhöhte Neoplasie-Risiko der Patienten bestimmen. Umgekehrt kann sich die genetische Instabilität jedoch auch, wie im vorliegenden Falle, zum Wohle des Patienten auswirken, indem in Stammzellen des Knochenmarks durch Vorgänge wie intragenes Crossover, Genkonversion und kompensatorische Mutation eine „Selbstkorrektur“ des Gendefektes stattfindet. Den daraus entstehenden heterozygoten und damit funktionell intakten Zellen kommt offensichtlich ein Selektionsvorteil zu gute, so daß im besten Falle das gesamte Knochenmark durch die selbstkorrigierte Population ersetzt wird. Dieses „Experiment der Natur“ führt zu einer ganz entscheidenden Verbesserung der Prognose des Krankheitsverlaufs. Darüberhinaus stimmt es insbesondere hinsichtlich der Möglichkeit einer Gentherapie hoffnungsvoll, da genetisch korrigierte Zellen bereits in vivo einen eindeutigen Wachstumsvorteil gezeigt haben.

## Zusammenfassung

Die Fanconi-Anämie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die mit progredientem Knochenmarksversagen, Fehlbildungen und Tumoren einhergeht. Diagnostiziert wird diese Krankheit durch eine vermehrte Chromosomenbrüchigkeit nach Behandlung mit Diepoxybutan oder Mitomycin C oder durch einen erhöhten Anteil von Zellen in der G2-Phase in der Durchflußzytometrie. Bei einigen Patienten wurden Verläufe mit stabilen Blutbildern beschrieben. Als Erklärung wurde das Vorhandensein einer Mosaikkonstellation bei diesen Patienten diskutiert.

Hier wird ein FA-Patient der Komplementationsgruppe A beschrieben, bei dem es im Alter von 2 Jahren zu einer Thrombozytopenie kam und ein dysplastisches Knochenmark vorlag. Zusätzlich liegt bei dem Patienten noch ein Wachstumshormonmangel bei dysplastischer Hypophyse vor. Im Alter von 3 ½ Jahren kam es zu einer deutlichen Stabilisierung des Blutbildes; auch fand sich bei wiederholten Knochenmarkspunktionen ein normozelluläres Mark.

Nachdem zuvor die Diagnose FA mittels Chromosomenbruchanalyse und Durchflußzytometrie gestellt und später durch Untersuchung von Fibroblasten bestätigt worden war, stellte sich jetzt die Frage eines Mosaiks. Weitere Zellzyklusanalysen ergaben annähernd normale Befunde. Bei einer weiteren, im Alter von 6 Jahren durchgeführten Chromosomenbruchanalyse zeigte sich eine bimodale Verteilung der MMC-Sensitivität. Auf Grund dieser Bimodalität, also der Koexistenz von defekten und intakten Zellen, kann von der Existenz einer Mosaikkonstellation ausgegangen werden, die für das Auftreten intakter Zellen verantwortlich ist und dadurch zu einer Stabilisierung des Blutbildes geführt hat. Die erste Mutation des Patienten wurde auf Exon 10 gefunden, wo anstelle von Glutaminsäure ein Stopcodon gebildet wird. Ob die Mosaikkonstellation im vorliegenden Fall durch intragenes Crossover oder Genkonversion entstanden ist, kann erst nach der Identifizierung der Mutation auf dem zweiten Allel des Patienten abgeklärt werden.

## Literaturverzeichnis

Alter BP. **Annotation, Fanconi's anaemia and its variability.** *British Journal of Haematology* 1993; 85: 9-14

Auerbach AD, Royatko A, Schroeder-Kurth TM. **International Fanconi Anemia Registry: Relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity.** *Blood* 1989; 73: 391-396

Auerbach AD. **Fanconi Anemia.** *Dermatologic clinics* 1995; 13: 41-48

de Kerviler E, Guerhazi A, Zagroski AM, Gluckman E, Frija J. **The Clinical and Radiological Features of Fanconi's Anaemia.** *Clinical Radiology* 2000; 55: 340-345

Digweed M. **Molekulare Grundlagen der Fanconi-Anämie.** *Klinische Pädiatrie* 1999, 221: 192-197

Dupuis-Girod S, Gluckman E, Souberbielle JC, Brauner R. **Growth hormone deficiency caused by pituitary stalk interruption in Fanconi's anemia.** *The Journal of Pediatrics* 2001; 138(1): 129-133

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. **Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia.** *Blood* 2000; 96: 4064-4070

Fanconi G. **Familial Constitutional Panmyelocytopenia, Fanconi's Anemia (F.A.). I. Clinical aspects.** *Seminars in Hematology* 1967; 4: 233-240

Fanconi G. **Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution).** *Jahrbuch für Kinderheilkunde* 1927; 117: 257-280

German J. **Genetic disorders associated with chromosomal instability and cancer.** *The Journal of Investigative Dermatology* 1973, 60: 427-434

Gregory JJ, Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD. **Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA* 2001; 98: 2532-2537

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. **Complementation Analysis in Fanconi Anemia: Assignment of the Reference FA-H Patient to Group A.** *American Journal of Human Genetics* 2000; 67: 759-762

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.** *American journal of Human genetics* 1997; 61: 940-944

Joenje H, Patel KJ. **The emerging genetic and molecular basis of Fanconi Anaemia.** *Nature reviews genetics* 2001; 2: 446-457

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. **Somatic Mosaicism in Fanconi Anemia: Molecular Basis and Clinical Significance.** *European Journal of Human Genetics* 1997; 5: 137-148

Mac Millan MC, Auerbach AD, Davies SM, Defor TE, Gillio A, Giller R, Harris R, Cairo M, Dusenbery K, Hirsch B, Ramsay NK, Weisdorf DJ, Wagner JE. **Haematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anaemia using alternate donors: results of a total body irradiation dose escalation trial.** *British Journal of Haematology* 2000; 109: 121-129

Pulsipher M, Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Lee JS, Jakobs P, Grompe M, Joenje H, Sieff C, Guinan E, Mulligan R, D'Andrea AD. **Subtyping Analysis of Fanconi Anemia by Immunoblotting and Retroviral Gene Transfer.** *Molecular Medicine* 1998; 4: 468-479

Schindler D, Hoehn H. **Flow Cytometric Testing for Syndromes with Chromosomal Instability, Aplastic Anemia and Related Hematological Disorders.** *Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual*, Editor: R-D Wagner, Springer Verlag Berlin 1999; 269-281

Schindler D, Kubbies M, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch MD. **Confirmation of Fanconi's Anemia and Detection of a Chromosomal Aberration (1Q 12-32) Triplication Via BRDU/Hoechst Flow cytometry.** *The American journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1987; 9: 172-177

Seyschab H, Friedl R, Yujie S, 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; 85: 2233-2237

Seyschab H, Sun Y, Friedl R, Schindler D, Hoehn H. **G2 phase cell cycle disturbance as a manifestation of genetic cell damage.** *Human Genetics* 1993; 92: 61-68

Tamary H, Bar-Yam R, Shalmon L, Rachavi G, Krostichevsky M, Elhasid R, Barak Y, Kapelushnik J, Yaniv I, Auerbach AD, Zaizov R. **Fanconi anaemia group A (FANCA) mutations in Israeli non-Ashkenazi Jewish patients.** *British Journal of Haematology* 2000; 111: 338-343

Waisfisz Q, Morgan N, Savino M, de Winter J, van Berkel C, Hoatlin M, Ianzano L, Gibson R, Arwert F, Saviona A, Mathew C, Pronk J, Joenje H. **Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism.** *Nature Genetics* 1999; 22: 379-383

Wajnrajch MP, Gertner JM, Huma Z, Popovic J, Lin K, Verlander PC, Batish SD, Giampietro PF, Davis JG, New MI, Auerbach AD. **Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry.** *Pediatrics* 2001; 107: 744-754

Yamashita T, Nakahata T. **Current knowledge on the pathophysiology of Fanconi anemia: from genes to phenotypes.** *International Journal of Hematology* 2001; 74: 33-41

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt dem kleinen Patienten und seiner Familie. Ihre Hilfe und Geduld beim Beantworten aller meiner Fragen haben diese Arbeit ermöglicht.

Weiterhin danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Holger Höhn für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung.

Priv.-Doz. Dr. med. Detlev Schindler danke ich für die Übernahme des Korreferates und für die freundliche Überlassung von Daten. Dafür danke ich ebenfalls Frau Michaela Thiel und Herrn Richard Friedl.

Meinen Eltern danke ich für ihre ganze Unterstützung und meinem Bruder für die geduldige Hilfe bei allen Computerproblemen.

Zuletzt möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mir bei dieser Arbeit mit Ansporn und Aufmunterung zur Seite gestanden haben.

## Lebenslauf

Name: B l a u r o c k  
Vorname: Claudia Sibylle  
Geburtsdatum/-ort: 25.06.1975, Freiburg i. Br.  
Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung:

1981 - 1984	Grundschule Gießen
1984 - 1985	Grundschule Göttingen
1985 - 1987	Orientierungsstufe Göttingen
1987 - 1994	Max-Planck-Gymnasium Göttingen
Januar - Juni 1992	Kent College Pembury (England)
09.06 1994	Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

WS 1994/95 - SS 1996	Studium der Medizin an der Georg-August-Universität Göttingen
09.09.1996	Ärztliche Vorprüfung
WS 1996/97 - SS 2001	Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
28.08.1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.04.2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.2000 - 03.2001	Praktisches Jahr: Medizinische Klinik Uniklinik Würzburg Institut für Diagnostische Radiologie Uniklinik Würzburg Chirurgische Klinik Uniklinik Würzburg
18.04.2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit SS 2001	Studium der Rechtswissenschaften an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg