

Aus der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
des Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Professor Dr. rer. nat. R. Schneppenheim

**Bedeutung des Fanconi-Anämie F-Gens
für die Entstehung hämatologischer Malignome im Kindesalter und
Etablierung eines halbautomatisierten Screeningverfahrens für die
Fanconi-Anämie Gene A, C, F und G mittels DHPLC**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Jan Wierzbinski

aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 12.1.2009

Veröffentlichung mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Schneppenheim

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. A. Gal

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. P. Tschentscher

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung	3
1.1 Fragestellung und Arbeitshypothese	3
1.2 Die Fanconi-Anämie	4
1.2.1 Klinik	4
1.2.2 Diagnostik	6
1.2.3 Therapie.....	9
1.3 Genetik der Fanconi-Anämie.....	12
1.3.1 FA-Gene	12
1.3.2 Genotyp-Phänotyp-Vergleich	14
1.4 Das Fanconi-Gen der Komplementationsgruppe F (FANCF)	17
1.5 Interaktion und Funktion der Fanconi-Proteine.....	19
1.5.1 Die Fanconi-Proteine.....	19
1.5.2 Der Fanconi-Core-Komplex.....	27
1.5.3 Funktion des FA-Core-Komplexes und der FA-Proteine.....	29
1.5.4 Fanconi-Anämie und oxidativer Stress	30
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Vorgehensweise	32
2.2 Patientengut.....	32
2.3 DNA-Isolierung.....	33
2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	34
2.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	35
2.6 Silberfärbung	35
2.7 Aufreinigung.....	36
2.8 Sequenzierung.....	37
2.9 Denaturierende-High-Performance-Liquid-Chromatography (DHPLC)	38
3 Ergebnisse	40
3.1 Genauigkeit des Screenings durch die DHPLC.....	40
3.2 Gefundene Sequenzabweichung im Fanconi-F-Gen	40
3.3 PCR-Bedingungen zum Mutationsscreening Fanconi-Gene A, C, F und G	42
3.4 Bestimmung der Analysetemperatur für die DHPLC	44
3.5 Evaluation der softwaregestützten Analysetemperaturvorhersage	48
3.6 Sequenzabweichungen bei T-ALL-Patienten	48
4 Diskussion.....	67
4.1 Genauigkeit der Vorhersage von Sequenzvarianten durch das Screening	67
4.2 Genauigkeit der Vorhersage der Analysetemperatur.....	68
4.3 Bewertung der gefundenen Aberration im Fanconi-F-Gen	69
4.4 Zusammenfassung der Bewertung des Screenings mittels DHPLC	69
4.5 Heterozygotie im Fanconi-F-Gen als Risikofaktor für die Entstehung einer AML ?	70
5 Zusammenfassung.....	72

6	Literaturverzeichnis	74
7	Anhang.....	88
7.1	Verzeichnisse von Tabellen und Abbildungen.....	88
7.1.1	Tabellenverzeichnis	88
7.1.2	Abbildungsverzeichnis.....	89
7.2	Material- und Geräteliste.....	92
7.3	Rezepte / Ansätze / Protokolle.....	94
7.3.1	DNA-Isolierung.....	94
7.3.2	PCR	95
7.3.3	PAGE.....	96
7.3.4	Silberfärbung.....	97
7.3.5	DHPLC.....	98
7.3.6	Sequenziergel	98
7.3.7	Sequenzierung.....	99
7.4	PCR-Bedingungen der verschiedenen Exons	100
7.5	Oligonukleotide (Primer)	102
7.6	EDV-Software	104
7.7	Patientendaten, soweit bekannt	105
7.8	Abkürzungsverzeichnis	109
7.9	Danksagung.....	111
7.10	Eidesstattliche Versicherung	112

1 Einleitung

1.1 Fragestellung und Arbeitshypothese

Fanconi-Anämie-Patienten haben ein erhöhtes Malignitätsrisiko. Die Frage, ob auch Heterozygotie in den Fanconi-Genen als signifikanter Risikofaktor für die Entstehung einer malignen Erkrankung zu werten ist, wird in der Literatur nicht einheitlich beantwortet. Falls heterozygot vorliegende Mutationen, die in homozygoter Form zur Ausbildung einer Fanconi-Anämie (FA) führen, ein erhöhtes Malignitätsrisiko bedeuten würden, könnten heterozygote Veränderungen gehäuft in einem Kollektiv mit Kindern, die an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) beziehungsweise einem myelodysplastischen Syndrom (MDS), den häufigsten malignen Folgeerkrankungen bei FA-Patienten, erkrankt sind, vorkommen. Ein entsprechendes Kollektiv wurde in verschiedenen bekannten Fanconi-Genen auf Mutationen untersucht; in dieser Arbeit erfolgte ein Screening des Fanconi-F-Gens. Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es, ein vereinfachtes Screeningverfahren für die Fanconi-Gene A, C, F und G zu etablieren. Eine Sequenzanalyse durch direktes Sequenzieren ist gerade in den teilweise hochpolymorphen Fanconi-Genen zeitaufwändig und teuer. Eine hohe Spezifität und Sensitivität der denaturierenden High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) konnte in Studien belegt werden. Die Verwendung eines Temperatur-Gradienten-Cyclers für die Polymerasekettenreaktion (PCR) soll eine gleichzeitige Amplifikation aller Abschnitte der oben genannten Gene auf einer mit der DHPLC kompatiblen Mikrotiterplatte ermöglichen.

1.2 Die Fanconi-Anämie

Die Fanconi-Anämie ist eine seltene, überwiegend autosomal-rezessiv vererbte, genetisch und phänotypisch heterogene Erkrankung, die erstmalig von dem Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi 1927 beschrieben wurde.

1.2.1 Klinik

Das klinische Bild ist vielseitig: Häufig sind Anomalien wie Mikrozephalie, Wachstumsverzögerung, Hautveränderungen, Skelett-, Nieren-, gastrointestinale und urogenitale Veränderungen schon bei Geburt auffällig; es folgen bösartige hämatologische sowie solide Tumorerkrankungen. Tabelle 1 zeigt die bei FA typischen Anomalien (Favre et al. 2000); einen Überblick über die malignen Erkrankungen gibt Tabelle 2.

Betroffenes System	Spezifische Veränderung	Prozent des Auftretens
Haut	Hyper-, Hypopigmentierung	71
Statur	Minderwuchs	59
Kopf	Mikrozephalie, -gnathie	56
Obere Extremität	Radialstrahl-, Daumenaplasie	47
Nieren	Nierenanomalien	22
Skelett	Skelettanomalien außer der oberen Extremität	18
Urogenitaltrakt	Ureteranomalien, Reflux, Hypogonadismus	12
Gastrointestinaltrakt	Gastrointestinalatresien, tracheoösophageale Fisteln, Meckel-Divertikel, Analatresie	13
Mentale Retardierung		12
Herz	Angeborene Herzfehler	10
Ohren	Dysplasien, Mittelohrdefekte, Taubheit	9.3
ZNS		4.5

Tabelle 1: Typische Anomalien bei FA-Patienten und ihre Häufigkeit

Maligne Erkrankungen bei Fanconi-Anämie-Patienten

häufig	selten vorkommend (<1%)
hämatologisch	
AML	CMML
MDS	Burkitt-Lymphom
akute T-Zell-Leukämie	
nichthämatologisch	
Kopf-/Halstumore	
Lebertumore	
Ösophagus	
Vulva,Zervix	
Wilms Tumor	Nierenzellkarzinom
Medulloblastome	Astrozytome
Hauttumore	Mammakarzinom

Tabelle 2: Maligne Erkrankungen bei Fanconi-Anämie-Patienten (Kutler 2003, A20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR))

Da bei einem gewissen Prozentsatz kongenitale Anomalien fehlen bzw. schwach ausgeprägt sind, wird die Fanconi-Anämie in diesen Fällen erst mit dem Auftreten von hämatologischen Erkrankungen, in der Regel zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr (Median 7. Lebensjahr) erkannt (Wagner 2004). Die hämatologischen Erkrankungen sind die ernstesten und beständigsten klinischen Zeichen der FA (Tischkowitz 2004). Alter et al. (2003) nahmen aufbauend auf drei Quellen (Literatur review, einer Umfrage von 145 nordamerikanischen FA-Patienten und der International Fanconi Registry (IFAR) Studie) an, die kumulative Häufigkeit hierfür betrage 90%, die Häufigkeit für therapiebedürftiges Knochenmarksversagen ungefähr 60%. Hierzu passen die Ergebnisse einer früheren IFAR-Studie (Butturini et al. 1994), die ein Risiko für die Entwicklung einer hämatologischen Erkrankung im Alter von 40 Jahren von 98% zeigten. Das Risiko einer Panzytopenie im Alter

von 20 Jahren betrug 82%, das einer AML bzw. eines MDS (die Erkrankungen wurden nicht gesondert berücksichtigt) im Alter von 40 Jahren 50%.

Das Knochenmarksversagen betrifft alle drei Zellreihen, wobei Thrombozytopenie und Anämie der Leukopenie häufig vorausgehen, die Entwicklung eines MDS oder einer AML können der aplastischen Phase folgen (Young, Alter 1994).

Das Risiko von FA-Patienten, an soliden Tumoren zu erkranken, steigt mit dem Alter. Das kumulative Risiko beträgt im Alter von 45 Jahren ca. 30 % (Alter et al. 2003). Junge Erwachsene haben ein erhöhtes Risiko für Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich, Tumore des Ösophagus, des Gehirns, der Nieren, der Leber sowie für gynäkologische Tumore. Lebertumore finden sich besonders bei Patienten mit aufgrund eines Knochenmarksversagens eingesetzter Androgentherapie. Mit dem Konditionierungsregime vor Knochenmarkstransplantation (KMT) verbunden ist das Risiko des Auftretens von malignen Erkrankungen. Das Risiko für Plattenepithelkarzinome im Kopf-, Halsbereich und Ösophagus bei FA-Patienten nach KMT war in der Studie von Rosenberg et al. 2005 gegenüber Nicht-Transplantierten erhöht.

Die Häufigkeit der Fanconi-Anämie beträgt ca. 1 auf 360.000 Geburten; das durchschnittlich erreichte Lebensalter beträgt 24 Jahre (Kutler et al. 2003),.

1.2.2 Diagnostik

Zellen von FA-Patienten weisen bereits eine spontan erhöhte Chromosomenbrüchigkeit auf; zusätzlich haben sie eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNA-alkylierenden Substanzen wie Diepoxybutan (DEB), Mitomycin C (MMC), Cyclophosphamid, Cisplatin, 8-Methoxy-Psoralen plus UV-A (PUVA) und hexavalenten Chromverbindungen (Ahmad 2006, 82). Die Empfindlichkeit gegenüber MMC und DEB wird in jüngeren Studien aber eher der Beeinflussung des Redox-Zyklus als einer direkten Interaktion mit der DNA zugeschrieben (Korkina et al. 2000, Pagano et al. 2003 und 2005) und weist auf die Rolle von oxidativem Stress als Grund für die Entstehung der Fanconi-Anämie (siehe Fanconi-Anämie und oxidativer Stress) hin.

FA-Zellen zeigen weiterhin eine Fehlfunktion des Zellzyklus: Sie verbleiben länger in der G2-Phase, was (nach Sala-Trepat et al. 2000) die zelluläre Antwort auf das Ansammeln von DNA-Schäden während der S-Phase ist, da FA-Zellen im Gegensatz zu normalen Zellen keine Verlängerung der S-Phase nach Induktion von DNA-Schäden durch PUVA zeigen und nachfolgend in der G2-Phase länger versuchen, Deletionen und Brüche der nicht-untersuchten DNA-Replikation in der S-Phase zu beheben.

Auch eine erhöhte Empfindlichkeit der FA-Zellen gegenüber Sauerstoff konnte nachgewiesen werden: In vitro zeigen FA-Fibroblasten unter einer Sauerstoffumgebungskonzentration von 20% ein fast stagnierendes Wachstum sowie verlängerte G2-Phasen gegenüber normalen Fibroblasten; unter reduzierter Sauerstoffspannung (5%) ist das Wachstum von FA-Zellen aber nahezu normal (Schindler, Hoehn 1988).

Weiterhin zeigen sich bei FA-Patienten deutlich erhöhte 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin-Spiegel nach H₂O₂-Exposition als Zeichen der oxidativen DNA-Schädigung (Takeuchi et al. 1993), einer spontanen chromosomalen Instabilität entsprechend erhöhte 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin-Spiegel in Leukozyten (Korkina et al. 1992, Degan et al. 1995, Pagano et al. 2004) und erhöhte 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin-Spiegel im Urin als Zeichen eines in vivo stattfindenden Abräumens und Ausscheidens geschädigter DNA.

Weiterhin auffallend sind die exzessiv erhöhten Plasmawerte von Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ) bei FA-Patienten (Dufour et al. 2003, Pearl-Yafe et al. 2003, Schulz et al. 1993).

Diese Daten zusammenfassend scheint ein Zustand von „oxidativem Stress“ bzw. ein prooxidativer Status bei FA vorzuliegen, in dem eine Ungleichheit zwischen der Erzeugung von aktivierten Sauerstoffradikalen und der antioxidativen Verteidigung vorliegt. Hierzu passend konnten Antioxidantien in vitro die Zellschädigung der alkylierenden und radikalbildenden Substanzen limitieren bzw. korrigieren (Nordenson 1977, Dallapiccola et al. 1985, Nagasawa et al. 1983, Saadatzadeh et al. 2004).

Für die Diagnostik wird vor allem die Empfindlichkeit der FA-Zellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen genutzt; bereits niedrige Konzentrationen alkylierender Substanzen wie DEB und MMC zeigen eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit in kultivierten FA-Lymphozyten, FA-Fibroblasten, FA-Amniozyten und FA-Chorionzottenzellen an (Auerbach 1993).

Die in FA-Zellen erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit ist auch bei verschiedenen anderen genetischen Syndromen wie z.B. Bloom-Syndrom oder Ataxia teleangiectasia zu finden und kann daher nicht als diagnostisch angesehen werden, außerdem bestehen Überschneidungen bezüglich der spontanen Chromosomenbrüchigkeit zwischen FA- und gesunden Zellen. In der Metaphasenanalyse werden die Brüche pro Zelle als einziger Parameter gezählt, bei dem keine Überschneidungsbereiche zwischen gesunden und FA-Zellen vorliegen, und der daher zuverlässiger als die Parameter „Zahl der Brüche aufweisenden Zellen“ bzw. „Brüche pro aberrante Zelle“ ist (Auerbach et al. 1989).

Eine ebenso zuverlässige, aber zügigere Feststellung dieser Empfindlichkeit ist auch durch Flowcytometrie nach Polyhydroxyalkanoat- (PHA-) Stimulation möglich (Miglierina et al. 1991). Wichtig bleibt zu beachten, dass sowohl Metaphasenanalyse als auch Flowcytometrie bei bereits bestehender klonaler Erkrankung der Blutstammzellen diskrepante bzw. falsch-negative Befunde zeigen. In solchen Fällen kann die MMC-Sensitivität in der Fibroblastenkultur durchgeführt werden, die immer diagnostisch ist (Rischewski et al. 2001, unpublished).

Im Hinblick auf die Diagnosestellung ist bei diesen Methoden zu beachten, dass sie sich bei heterozygoten Trägern aufgrund des großen Überlappungsbereichs zwischen heterozygoten FA- und gesunden Kontrollzellen nicht eignet und bei Patienten mit zellulärem Mosaizismus unzuverlässig ist bzw. falsch-negative Ergebnisse hervorbringen kann (Dokal et al. 1996). Bei ungefähr 30% der FA-Patienten fehlen kongenitale Fehlbildungen (Giampietro et al. 1997). Bei Verdacht auf FA in jungen Jahren und erhöhter Wahrscheinlichkeit, dass noch keine aplastische Anämie zu sehen ist, hängt die Diagnose von anderen Auffälligkeiten wie

Mikrozephalie, Wachstumsverzögerung und Hautveränderungen ab und wird durch DEB-/MMC-Test bestätigt.

Auch Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) zeigen klinische Auffälligkeiten wie FA-Patienten wie z.B. Mikrozephalie und Hautveränderungen. In einer vor kurzem erschienenen Veröffentlichung konnte bei einem Patienten, bei dem im Alter von zwei Jahren FA diagnostiziert wurde, eine homozygote NBS1-Mutation festgestellt werden (New et al. 2005). Dieser Patient wies keine aplastische Anämie auf, zeigte aber Mikrozephalie, Hautveränderungen, milde Lymphopenie, Thrombozytose, wiederkehrende Infektionen der oberen Atemwege und eine erhöhte DEB-induzierte Chromosomenbrüchigkeit. Neben NBS-Zellen konnte auch in Zellen von Patienten mit ataxia teleangiectasia like disorder (ATLD) eine erhöhte DEB-Empfindlichkeit nachgewiesen werden (Nakanishi et al. 2002). Der Test ist also nicht spezifisch für FA. Bei Patienten mit aplastischer Anämie und kongenitalen Anomalien kann trotzdem der positive DEB-/MMC-Test die Diagnose FA sichern. Eine weitere Zuordnung in eine Komplementationsgruppe ist durch die Tests nicht möglich; diese kann z. B. durch eine Transfektion mittels eines FANC-Gen enthaltenden Retrovirus erfolgen (Shimamura et al. 2002). Nach Zuordnung zu einer Komplementationsgruppe kann dann die gewünschte Mutationssuche in einem der FANC-Gene erfolgen. Bei fehlender aplastischer Anämie sollte bei o.g. klinischen Veränderungen nach positivem DEB-Test eine weitere Diagnostik in Bezug auf NBS durchgeführt werden.

1.2.3 Therapie

Die Behandlung der Fanconi-Anämie zielt auf die hämatologischen Manifestationen insbesondere der aplastischen Anämie als Haupttodesursache. Die Stammzelltransplantation ist die Therapie der Wahl der aplastischen Anämie. Solange kein passender Spender gefunden ist, bzw. bei nur gering veränderten hämatologischen Parametern, kommen supportive Therapien wie Androgene und hämatopoetische Wachstumsfaktoren sowie Transfusionen zum Einsatz. Unter der Androgentherapie steigen Hämoglobin sowie die Zahl der Neutrophilen und Thrombozyten. Als Nebenwirkungen treten Maskulinisierung,

Akne, Wachstumsverstärkung und prämaturer Schluss der Epiphysenfugen und Hepatotoxizität auf, bei langer Therapiedauer wurden Lebertumore beobachtet. In einigen Fällen werden zusätzlich Kortikosteroide eingesetzt, um dem anabolischen Effekt der Androgene entgegenzutreten.

Non-responder der Androgentherapie werden mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie G-CSF behandelt, bei den meisten Patienten wird ein Anstieg der Neutrophilen beobachtet. Bezüglich des Einsatzes dieser Wachstumsfaktoren wird eine Beschleunigung der Knochenmarkerschöpfung und eine mögliche Begünstigung der Formierung leukämischer Klone diskutiert.

Bei der Knochenmarkstransplantation ist es schwierig, ein geeignetes Konditionierungsregime zu finden. Häufig werden Cyclophosphamid und ionisierende Strahlung eingesetzt. In der üblichen Dosis von Cyclophosphamid zeigte sich bei FA-Patienten jedoch eine erhöhte transplantationsbezogene Sterblichkeit, ebenso sind die Patienten empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung (Gluckman et al. 1980, 1983). In reduzierter Dosis zeigte sich ein erfolgreiches engraftment sowie eine geringe Toxizität. Weiter erbrachte die zusätzliche Gabe von Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) während der Konditionierung und nach Transplantation eine Verringerung der Sterblichkeit (Kohli-Kumar, 1994). Unter diesem Regime ist eine 2-Jahresüberlebensrate von 60-70% bei verwandten HLA-kompatiblen Spendern zu sehen, bei nicht-verwandten HLA-kompatiblen Spendern beträgt diese nur 29-34% (Gluckman et al. 1995, Guardiola et al. 2000). Eine retrospektive Studie von 1985 bis 1998 an 69 FA-Patienten, die mit nicht-verwandten HLA-kompatiblen Spendern transplantiert wurden, zeigte ein 3-Jahres-Überleben von 33%, die Wahrscheinlichkeit für ein höhergradiges graft-versus-host-disease von 34% und eine transplantationsbezogene (100. Tag) Mortalität von 39%. In der Studie konnte eine Korrelation zwischen ausgeprägtem klinischen Phänotyp und erhöhter Sterblichkeit festgestellt werden, ebenso waren die Verläufe schlechter bei Patienten mit positiver Zytomegalievirus- (CMV-) Serologie, vorangegangener Androgentherapie und weiblichen Spendern.

Zur Verbesserung des Outcomes bei nicht-verwandten HLA-kompatiblen Transplantationen wurde T-Zell-Verringerung zur Vermeidung von Graft-versus-host-disease (GVHD) eingesetzt. Damit war eine erhöhte Anzahl von Transplantatabstoßungen assoziiert. Für das Purinanalogon Fludarabin jedoch wurden in mehreren Studien bei FA-Patienten keine erhöhten Transplantatabstoßungen ermittelt, außerdem zeigten sich in diesem Konditionierungsregime eine geringe Toxizität und keine schweren transplantationsbezogenen Komplikationen (Aker et al. 1999, Boulad et al. 2000, Rossi et al. 2003).

Häufige Komplikation der KMT sind opportunistische Infektionen und bei FA-Patienten die erhöhte Inzidenz sekundärer maligner Erkrankungen, vor allem solider Tumore und hier insbesondere Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses.

Aufgrund der trotz veränderter Regime weiterhin schlechten Überlebensrate für Transplantierte von nicht-verwandten Spendern bzw. für Patienten, für die keine HLA-kompatiblen Knochenmarkspender vorhanden sind, könnten Gen- bzw. möglicherweise auch Proteintransfers Therapiealternativen sein. In der Gentherapie werden rekombinante virale Vektoren ex vivo nach Entnahme von Stammzellen aus Knochenmark oder peripherem Blut eingesetzt. In vitro konnten virale Vektoren normale FANC-Kopien in FA-Zellreihen überführen; die Zellen wiesen hiernach keine erhöhte MMC-Empfindlichkeit auf. Außerdem war auch der Gentransfer in vivo im Tiermodell erfolgreich. Probleme bereiten die aktuellen Gentherapie-Protokolle im Hinblick auf die geringe Effizienz der Transduktion der Stammzellen und die möglicherweise Begünstigung einer nach Gentherapie auftretenden Leukämie (Check 2003).

Eine Therapiealternative ohne die Gefahr der Begünstigung der Mutagenese könnte der Transfer von FA-Proteinen in die FA-defizienten Zellen sein, die in vitro nach Transfer eine normale MMC-Sensitivität zeigten (Youssoufian 1999, Holmes 2001). Hier müssen weitere Studien bezüglich der in-vivo-Funktion bei kurzer Halbwertszeit und einem eventuell notwendigen targeting auf hämatopoetische Stammzellen folgen.

1.3 Genetik der Fanconi-Anämie

1.3.1 FA-Gene

Die FA ist eine sowohl autosomal- als auch x-chromosomal rezessive Erbkrankheit, deren Klinik wie oben beschrieben vielseitig ist. Die zum Ausbruch der Erkrankung führenden Defekte können auf verschiedenen Genen liegen.

Allen dreizehn bekannten FA-Komplementationsgruppen (FA-A,-B,-C,-D1,-D2, -E,-F,-G,-I,-J,-L, -M und -N) ist ein Gen zugeordnet (FANCA, B, C, BRCA2/entsprechend D1, D2, E, F, G, J, L, M und N); das 1997 beschriebene FANCH-Gen konnte 2000 der Komplementationsgruppe FA-A zugeordnet werden (Joenje et al. 2000). Tabelle 3 gibt einen Überblick über die bekannten FA-Gene.

Gen	Lokalisation	Exons	Aminosäuren	Proteinprodukt, kD
FANCA	16q24.3	43	1455	163
FANCB	Xp22.31	10	859	95
FANCC	9q22.3	14	558	63
FANCD1(BRCA2)	13q12.3	27	3418	384
FANCD2	3p25.3	44 (1 stummes)	1451	155/162
FANCE	6p21.3	10	536	60
FANCF	11p15	1	374	40
FANCG	9p13	14	622	48
FANCI	15q25-26	38	1328	146
FANCI (BRIP)	17q22-q24	20	1249	140
FANCL (PHF9)	2p16.1	11	373	43
FANCM(FAAP250)	14q21.3	23	2048	232
FANCN (PALB2)	16p12.1	13	1186	140

Tabelle 3: FANC-Gene mit ihren Lokalisationen, Exons, AS sowie Molekulargewichten

Die meisten Fanconi-Gene und ihre Produkte weisen keine Homologien zueinander oder zu anderen bekannten Proteinen auf, so dass die Sequenzanalysen keinen Schluss auf die molekularen Funktionen zulassen. Da auch in Intervertebraten keine ähnlichen Proteine nachgewiesen werden konnten, gelten die Fanconi-Gene bezogen auf die Evolution als junge Gene. Hiervon abweichend sind Teile der Sequenzen des FANCD2-Gens hochkonserviert in „Nicht-Vertebraten“ zu finden. Bezüglich der Funktion der FA-Proteine treten zwei Themen in der Literatur wiederholt auf: Schutz vor genotoxischem Stress und Erleichterung der Aktivierung von FANCD2 sowie Interaktion mit anderen Proteinen zur Überwachung von komplexen zellulären Funktionsbereichen.

Das am häufigsten Mutationen aufweisende Gen ist FANCA. Es finden sich beim Sequenzieren in großer Anzahl Deletionen, Insertionen und Missense-, Nonsense-, Splicing- und Frameshift-Mutationen. Lokalisiert ist es vor allem im Nukleus, in niedrigerer Menge im Zytoplasma. Mutationen in diesem Gen sind für ca. 65% aller FA-Fälle verantwortlich, die Prävalenz variiert abhängig von der geographischen und ethnischen Zugehörigkeit. So liegen bei 94% der FA-Patienten in Tunesien Mutationen in FANCA vor.

Eine Ausnahme bildet das FANCB-Gen, das als einziges von den bisher bekannten FA-Genen x-chromosomal vererbt wird, die weiteren bekannten Gene werden autosomal-rezessiv vererbt.

Das Vorkommen der Fanconi-Anämie kann sich regional in isolierten Populationen deutlich unterscheiden. So tritt bei Ashkenazy-Juden die FA mit einer Heterozygotenfrequenz von > 1:100 bedingt durch eine Founder-Mutation im FANCC-Gen deutlich häufiger auf (Verlander et al. 1995). In Südafrika ist ebenso aufgrund einer Founder-Mutation im FANCA-Gen eine höhere Inzidenz wahrscheinlich.

In Deutschland finden sich Cluster von FA-Vorfahren im Raum Stuttgart, im westlichen Ruhrgebiet sowie in Sachsen. Insgesamt wird die Zahl der FA-Erkrankten in Deutschland auf 200-300 geschätzt, genaue Zahlen existieren hierzu nicht. Die Komplementationsgruppe FA-A bildet mit ca. 60-65% die größte Gruppe.

In den Niederlanden dominiert bedingt durch zwei Cluster und eine Founder-Mutation die Komplementationsgruppe FA-C.

1.3.2 Genotyp-Phänotyp-Vergleich

Die meisten Fanconi-Proteine sind Mitglieder des FA-Core-Komplexes, der für die Aktivierung von FANCD2 notwendig ist. Es erscheint daher möglich, dass Veränderungen in den entsprechenden Genen zu einer Destabilisierung des Komplexes und klinisch zu einander ähnelnden Bildern führen. Jedoch könnten auch andere Funktionen der FA-Proteine außerhalb des Core-Komplexes zu entsprechend unterschiedlicher Phänotypausbildung führen. Von den nicht „upstream“ des Core-Komplexes agierenden FA-Proteinen (FANCD1/BRCA2, FANCD2, FANCI) sind aufgrund ihrer Lage im Fanconi-Stoffwechselweg andere Phänotypen zu erwarten. Insgesamt ist wegen der Seltenheit der FA das Erreichen von signifikanten Unterschieden bezüglich des Phänotyps schwierig. Von den zum Core-Komplex gehörenden Proteinen kommen Betroffene der Komplementationsgruppen FA-E und FA-F seltener vor, so dass hier die Feststellung von signifikanten Unterschieden noch problematischer ist als in den häufiger zu findenden Komplementationsgruppen FA-A, -C und -G. Kongenitale und insbesondere ZNS-Malformationen sind bei diesen Patientengruppen möglicherweise häufiger anzutreffen (Faivre et al. 2000). In den Komplementationsgruppen FA-A, -C und -G wurde für FA-C-Patienten eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein frühes Auftreten eines Knochenmarksversagens sowie eine höhere Sterblichkeit angenommen, jedoch gibt es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der kumulativen Inzidenz von AML und MDS in diesen Komplementationsgruppen (Kupfer et al. 2003). Zusätzlich trat eine erhöhte Mortalität für FANCC-Patienten mit der Founder-Mutation in Intron 4 (IVS4+4A>T) und einer Mutation in Exon 14 auf (Kupfer et al. 2003, Gillio et al. 1997). Abweichend hiervon zeigte ein Report über europäische Fanconi-Patienten (Faivre et al. 2000) Unterschiede bezüglich des Alters der Erstmanifestation von hämatologischen Erkrankungen in diesen

Komplementationsgruppen. Außerdem wiesen in diesem Bericht FA-G-Patienten eine höhere Inzidenz für das Auftreten von AML und MDS gegenüber FA-A und FA-C-Patienten auf. Abgesehen von der oben genannten Founder-Mutation (IVS2+4A>T, hier ist es umgekehrt) traten bei FA-C-Patienten weniger kongenitale Veränderungen als bei FA-G- und FA-A-Patienten auf. Innerhalb der FA-A-Patienten haben Patienten mit homozygoten Nullmutationen ein vermehrt frühes Auftreten von hämatologischen Erkrankungen und eine kürzere Lebenserwartung nach der Diagnosestellung als Patienten, die einige mutierte FANCA-Proteine produzieren, und entwickeln häufiger ein MDS oder eine AML (Faivre et al. 2000).

Es gibt nur wenige Patienten mit Mutationen in der Komplementationsgruppe FA-D2, ca. 8 von 241 FA-Familien (Levitus et al. 2004). Patienten dieser Gruppe haben häufiger und schwerere kongenitale Fehlbildungen als Patienten aus den zum Core-Komplex gehörenden Komplementationsgruppen (Faivre et al. 2000, Soulier et al. 2005).

Auch für FA-J-Patienten wird durch seine Lage im FA-pathway ein schwerer Phänotyp erwartet (Soulier et al. 2005).

Patienten der Komplementationsgruppe FA-D1 (BRCA2) mit homozygoten Mutationen weisen einen schweren Phänotyp auf, die Prädisposition bezogen auf ein frühes Auftreten von Tumoren ist im Vergleich zu den anderen Komplementationsgruppen höher (Wagner et al. 2004, Hirsch et al. 2004, Offit et al. 2003). In zwei Studien mit insgesamt elf Patienten wurde ein erhöhtes Risiko für hämatologische (sechs Fälle von AML, zwei Fälle von T-Zell-Leukämie) sowie für solide Tumore (einschließlich zweier Fälle von Medulloblastomen und dreier Fälle von Wilms-Tumor) herausgearbeitet (Wagner et al. 2004, Hirsch et al. 2004). Alle elf Patienten entwickelten Tumore vor dem fünften Lebensjahr, zwei entwickelten zwei Tumore. Eine Leukämie trat im Median mit 2,2 Jahren ein, bei anderen FA-Patienten liegt er bei 13,4 Jahren (Wagner et al. 2004). Schwere kongenitale Fehlbildungen waren in dieser Gruppe weitgehend nicht vorhanden, Knochenmarksversagen trat nur in vier Fällen auf. Der Phänotyp von Patienten der Komplementationsgruppe FA-N ähnelt in der schweren Ausprägung mit frühem Auftreten von Malignomen dem Phänotyp von FA-D1-Patienten. Es

treten weiter aber typische FA-Veränderungen wie kongenitale Fehlbildungen und Wachstumsverzögerung auf (Reid et al. 2007).

Die Genotyp-Phänotyp-Vergleiche zeigen keine Konstanz, sondern lediglich Tendenzen.

Selbst in zwei verwandten Familien mit vier betroffenen Kindern - alle mit der gleichen homozygoten Deletion FANCA Exon 43 - zeigte sich ein merklicher Unterschied zwischen dem Schweregrad der kongenitalen Veränderungen (Koc et al. 1999). Die auch in Japan vorkommende Mutation in FAC (IVS4+4A>T), die bei Ashkenazy-Juden einen schweren Phänotyp auslöst, ist bei japanischen Patienten mit einem leichteren Phänotyp assoziiert (Futaki et al. 2000).

1.4 Das Fanconi-Gen der Komplementationsgruppe F (FANCF)

In dieser Arbeit wurde von den Fanconi-Genen vor allem die Rolle des Fanconi-F-Gens bezüglich der Prädisposition von heterozygoten Merkmalsträgern für die Entstehung maligner Erkrankungen untersucht. Das Fanconi F-Gen (FANCF) wurde 1997 zusammen mit den Genen FANCG und FANCH durch Komplementationsanalyse entdeckt (Joenje et al. 1997).

FANCF ist vornehmlich im Zellkern (teilweise auch im Zytoplasma) zu finden. Es ist auf Chromosom 11p15 lokalisiert und kodiert ein Protein mit 374 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 42 kD. Es finden sich keine Introns. FANCF interagiert mit FANCA, FANCC, FANCE und FANCG. Der C-Terminus von FANCF interagiert direkt mit FANCG und ist für die stabile Interaktion mit FANCA und FANCC/-E notwendig (Leveiller et al. 2004). Der N-Terminus scheint die Bindung von FANCA/FANCG zu stabilisieren und ist essentiell für die Bindung von FANCC/FANCE. Somit scheint FANCF ein Schlüsselprotein für die Vereinigung des FA-Core-Komplexes zu sein, da es die Subkomplexe FANCA/-G/-B/-L und FANCC/-E zusammenfügt.

Die FANCF-Struktur scheint sehr flexibel und stabil zu sein, da Aminosäuren-Austausche im N-Terminus-Bereich und sogar Deletionen im Bereich des C-Terminus toleriert werden. In einer Mutagenese-Studie zeigen sich aber verschiedene kritische, für die korrekte Funktion von FANCF notwendige Regionen.

Die zum RNA-bindenden Protein ROM homologe Region hat keine dementsprechende Funktion, da Mutationen in dieser Region die Funktion von FANCF nicht beeinträchtigen (de Winter et al. 2000).

Mutationen in FANCF sind in ca. 2,5% für das Auftreten einer FA verantwortlich (Faivre et al. 2000). Die meisten beschriebenen Mutationen in FANCF sind Deletionen, außerdem werden nonsense-Mutationen beschrieben (Ahmad et al. 2006), missense-Mutationen sind bisher nicht bekannt.

FANCF scheint eine wichtige Rolle in der Entstehung von Ovar-, Lungen- und Zervixtumoren zu spielen.

1.5 Interaktion und Funktion der Fanconi-Proteine

1.5.1 Die Fanconi-Proteine

Die Gemeinsamkeiten bezüglich des klinischen Bildes und des zellulären Phänotyps bei verschiedenen Fanconi-Komplementationsgruppen haben zu der Annahme geführt, dass die Vielzahl der FA-Genprodukte in einem gemeinsamen biochemischen Pfad agieren.

Diese Hypothese wurde erstmals nach Klonierung des zweiten FA-Gens (FANCA) durch Kupfer et. al. (1997) bestätigt, die über einen von FANCC und FANCA im Zytoplasma gebildeten Komplex berichteten, der sich in den Zellkern verlagern konnte, obwohl FANCC vornehmlich im Zytoplasma zu finden ist. Es konnte weiterhin von den damals bekannten Komplementationsgruppen (FA-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G) durch Yamashita et al. 1998 gezeigt werden, dass die Interaktion und Akkumulation im Zellkern von FANCA und FANCC nicht nur durch FA-A- und FA-C-Zellen, sondern auch von FA-B-, FA-E-, FA-F-, und FA-G-Zellen ausgeschaltet wurde, aber nicht von FAD-Zellen. Hierauf basierend wurde ein Modell eines FA-pathway erstellt, in dem FANCA, -B, -C, -E, -F und -G in einem gemeinsamen pathway oder einem Komplex interagieren während FANCD downstream agiert bzw. unabhängig von diesem pathway ist.

Dass eine direkte Interaktion zwischen FANCA und FANCC in einem Yeast 2-hybrid-System nicht gefunden wurde, spricht für die gemeinsame Anwesenheit in einem Komplex, in dem FANCA und FANCC nicht direkt miteinander verbunden sind (Medhurst et al. 2001).

Durch Co-Immunopräzipitation und Yeast 2-hybrid-System konnte eine direkte Interaktion von FANCA und FANCG entdeckt werden. Die in allen FA-Komplementationsgruppen vorhandene Interaktion zeigt an, dass der FANCA-FANCG-Subkomplex einer der ersten Schritte auf dem Weg zum sogenannten FA-Core-Komplex ist (de Winter et al. 2001, Waisfisz et al. 1999, Garcia-Higuera et al. 1999, Gordon et al. 2003, Huber et al. 2000, Kruyt et al. 1999, Reuter et al. 2000).

FANCA ist sowohl zytoplasmatisch als auch im Zellkern lokalisiert. Für die nukleäre Lokalisation ist eine N-terminale, zweiteilige NLS- Sequenz (nuclear localization signal) in

Kombination mit Sequenzen am C-Terminus notwendig. Aufgrund der vornehmlich zytoplasmatischen Lokalisation von FANCA in FA-B-Zellen und dem Fehlen von phosphoryliertem FANCA in Zellen aller Komplementationsgruppen außer FA-D1 wurde FANCB als für die Ansammlung von phosphoryliertem FANCA notwendige Kinase angesehen (de Winter et al. 2000, Yamashita et al. 1998). Da FANCB keine Domäne einer Proteinkinase enthält und FANCA in allen Komplementationsgruppen, die den Core-Komplex beeinflussen, nicht phosphoryliert ist, ist die Phosphorylierung von FANCA durch FANCB unwahrscheinlich und vielmehr der gesamte Core-Komplex an der Modifikation bzw. der Stabilisierung der modifizierten Form von FANCA beteiligt (Levitus et al. 2006).

Bei Abwesenheit von FANCB im Nukleus fehlt auch FANCL; beide binden im mammalian two.hybrid-assay direkt aneinander, so dass möglicherweise FANCB mit seiner NLS-Sequenz FANCL beim Transport in den Nukleus hilft. Da FANCA auch für die Anhäufung von FANCL im Nukleus notwendig ist, und der FANCB/FANCL-Subkomplex mit FANCA bindet, ist ein gemeinsames Eindringen von FANCB und FANCL mit FANCA und FANCG möglich (Meetei et al. 2003). Denkbar ist aber auch, dass FANCA/FANCG und FANCB/FANCL einzeln durch ihre NLS-Sequenzen in den Zellkern eintreten und erst hier den Subkomplex bilden und dieser größere Komplex dann im Nukleus verbleibt (Levitus et al. 2006).

FANCG ist wie FANCA sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert. FANCG enthält sieben sogenannte tetratricopeptide repeat motifs (TPR), von denen angenommen wird, dass sie an Protein-Protein-Bindungen beteiligt sind. Die Unterbrechung dieser TPRs führt zu einer reduzierten FANCA Bindung, so dass diese TPRs als wichtig für die Interaktion von FANCA und FANCG angesehen werden (Blom et al. 2004). Zwischen FANCA und FANCG besteht eine direkte Bindung durch die N-terminale NLS-Sequenz von FANCA. Der C-Terminus von FANCG bindet vermutlich mit FANCC, da die Deletion der letzten 39 Aminosäuren die Rekrutierung von FANCC in den Core-Komplex durch FANCG verhindert (Kuang et al. 2000). Direkte Bindungen zwischen FANCC und FANCG konnten aber nicht gefunden werden. Wahrscheinlich bildet FANCF die Verbindung zwischen FANCC und

FANCG durch Bindung des FANCF-C-Terminus mit FANCG und des FANCF-N-Terminus mit FANCC und FANCE (Leveille et al. 2004). Außerdem bindet FANCG direkt mit FANCD1/BRCA2 am N- und C-Terminus (Hussain et al. 2003). Die genauen Auswirkungen hieraus sind aktuell nicht bekannt, jedoch zusammen mit den Ergebnissen, die eine direkte Bindung von FANCA und FANCI mit BRCA1, FANCD2 mit FANCD1/BRCA2 sowie die Ko-lokalisierung von FANCD2 und BRCA1 bei DNA-Schäden zeigen, erhärtet sich die Schlussfolgerung, dass der Fanconi-pathway mit dem BRCA-pathway verbunden ist und möglicherweise an der Reparatur durch homologe Rekombination beteiligt ist (Folias et al. 2002, Levitus et al. 2005, Wang et al. 2004).

Neben der oben erwähnten Bindung von FANCC mit FANCA interagiert das vornehmlich im Zytoplasma lokalisierte FANCC auch mit anderen FA-Proteinen vor allem direkt mit FANCE. Da FANCE ein vorwiegend im Nukleus lokalisiertes Protein ist, wird angenommen, dass FANCE die nukleäre Lokalisation von FANCC unterstützt. Bei Abwesenheit von FANCE werden geringere Level von FANCC in Zytoplasma und Nukleus beobachtet, die durch Zugabe von FANCE-Protein normalisiert werden können; zusätzlich können C-terminale FANCC-Mutanten nicht an FANCE binden und verlieren ihre Fähigkeit, mit FANCE in den Zellkern zu wandern (Taniguchi et al. 2002, Pace et al. 2002). Da FANCC wahrscheinlich nicht an dem im Zytoplasma lokalisierten Komplex von FANCA, -B, -G, und -L bindet und eine NLS-Sequenz fehlt, kann FANCC möglicherweise aufgrund seiner relativ kleinen Größe durch Diffusion in den Zellkern eindringen. Alternativ ist die nukleäre Lokalisation aber auch durch ein carrier protein wie z.B. FANCE oder eine bisher nicht identifizierte NLS-Sequenz denkbar (Levitus et al. 2006). FANCE fördert die Lokalisation von FANCC im Zellkern, da in FA-E-Zellen, in denen FANCE fehlt, nur im Zytoplasma FANCC zu finden ist. (Gordon et al. 2003, Hoatlin et al. 1998). FANCE interagiert in Co-Immunopräzipitation-Studien außerdem mit FANCA und FANCG, jedoch besteht im yeast 2-Hybrid System nur eine schwache direkte Bindung zwischen FANCE und FANCA/-G, so dass dies möglicherweise Ausdruck einer nur indirekten Bindung ist, die von anderen Proteinen abhängig ist (Medhurst et al.

2001). FANCE bindet mit seinem C-Terminus direkt an den N-Terminus von FANCD2 und verbindet so FANCD2 mit dem FA-Core-Komplex (Gordon et al. 2003, Pace et al. 2002).

FANCF (siehe Kapitel FANCF)

FANCL wurde durch Proteinaufreinigung mit Antikörpern gegen FANCA identifiziert, es findet sich sowohl im Zytoplasma als auch in Zellkern (Meetei et al. 2003). Es wird angenommen, dass FANCL mit seiner RING-Domäne für die Mono-Ubiquitylierung von FANCD2 verantwortlich ist (Meetei et al. 2004). Trotz der logischen Annahme, dass FANCD2 und FANCL eine direkte Bindung eingehen, konnte diese bisher nicht nachgewiesen werden. Direkte Bindungen konnten für FANCL mit FANCA und FANCB nachgewiesen werden, wobei zunächst FANCL und FANCB aneinander binden, bevor FANCA mit beiden interagieren kann (Medhurst et al. 2006).

FANCM besitzt wie FANCL und FANCI funktionale Domänen. Die DEAH-Box Helicase Domäne scheint ATP-abhängige DNA-Translokase an FANCM abzugeben sowie eine Endonuklease Domäne, die ERCC4/XPF ähnelt. FANCM scheint zusätzlich ein menschliches Ortholog des archaischen DNA-Reparatur-Protein Hef zu besitzen (Meetei et al. 2005, Mosedale et al. 2005). FANCM ist wahrscheinlich in der initialen Phase an der Bildung des Core-Komplex beteiligt, da in Abwesenheit von FANCM die Interaktion von FANCA und FANCI beeinträchtigt ist. FANCM kann allein in den Zellkern übertreten. Es finden sich hier bei FA-M-Zellen geringere Konzentrationen von FANCA und FANCL, was neben der Lokalisation im Zellkern auch für die Stabilisierung des Core-Komplexes durch FANCM spricht (Meetei et al. 2005).

FAAP100 (Fanconi anemia associated proteins, 100kD) wurde gleichzeitig mit FANCB,-L,-M durch Proteinaufreinigung mit Antikörpern gegen FANCA entdeckt und ist somit ein mögliches neues FA-Gen beziehungsweise eine neue Komplementationsgruppe. Bisher wurden keine FA-Patienten mit Mutationen in FAAP100 gefunden.

Eines der erst kürzlich entdeckten Fanconi-Gene ist das der Komplementationsgruppe FA-I. Durch die Ergebnisse der Untersuchung von FA-Zelllinien konnten aber bereits zuvor Rückschlüsse auf Funktion und Position im FA-Pathway gezogen werden. In FA-I-Zellen ist

der FA-Core-Komplex regelrecht aufgebaut, so dass FANCI nicht zum Core-Komplex gehört, sondern seine Funktion entweder downstream oder unabhängig vom Core-Komplex ist (Levitus et al. 2006). Da FANCD2-S im Zellkern von FA-I-Zellen reduziert ist, könnte auf eine Funktion von FANCI hinweisen, dass FANCI die Bindung von FANCD2-S an Chromatin unterstützt und FANCD2-L stabilisiert (Levitus et al. 2004). Das Protein FANCI konnte 2007 identifiziert werden. Es hat Sequenzähnlichkeit mit FANCD2, mit dem es zusammen den ID-Komplex bildet, der an Chromatin im Rahmen der Antwort auf DNA-Schäden bindet. Sowohl die Ubiquitylierung von FANCI als auch von FANCD2 ist für einen funktionsfähigen ID-Komplex notwendig (Smogorzewska et al. 2007)

Die FA-D-Komplementationsgruppe wurde in zwei Gruppen unterteilt, nachdem bei zwei von vier FA-Patienten, die dieser Gruppe zugeordnet worden waren, keine Mutationen gefunden wurden. Für die FA-D1- Gruppe konnte später ein Defekt in BRCA2 nachgewiesen werden (siehe unten), die zweite Gruppe (FA-D2) korrespondierte mit dem Krankheitsgen auf Chromosom 3p. Dass in FA-D-Zellen der Core-Komplex intakt ist, zeigt, dass das defekte Protein downstream von dem Komplex agiert (de Winter et al. 2000). Im Gegensatz zu den anderen FA-Proteinen, die als jung zu betrachten sind, ist das FANCD2 Genprodukt hochkonserviert in der Evolution. Es wurden homologe Gene in *Drosophila C. elegans* und *Arabidopsis thaliana* gefunden. FANCD2 ist in zwei unterschiedlichen Zustandsformen zu finden. Die inaktivierte Form FANCD2-S (155 kDA, „short“) kann durch Ubiquitylierung von Lysin561 in die aktivierte Form FANCD2-L (162 kDA, „long“) überführt werden. Die Ubiquitylierung ist von einem intakten FA-core-Komplex abhängig, da in Zellen, denen der Komplex fehlt, nur FANCD2-S zu finden ist. Die Aktivierung von FANCD2 scheint ein entscheidender Schritt im FA-Pathway zu sein, nach welchem FANCD2 subnukleär mit anderen Proteinen wie FANCD1/BRCA2, BRCA1 und RAD51 lokalisiert ist (Garcia-Higuera et al. 2001, Taniguchi et al. 2002, Wang et al. 2004). Der N-Terminus von FANCD2 bindet außer an FANCE an den C-Terminus von FANCD1/BRCA2, der C-Terminus von FANCD1/BRCA2 bindet außerdem an FANCG (Gordon et al. 2003, Hussain et al.

2004/2003). Die Interaktion von BRCA2 und FANCD2 scheint für das Einschleusen von FANCD1/BRCA2 in einen Chromatin-Komplex notwendig zu sein (Wang et al. 2004). Die Aktivierung von FANCD2 und das Koloalisieren mit RAD52, BRCA1 und FANCD1/BRCA2 ist S-Phasen-spezifisch, so dass der FA-pathway eine Rolle in der Reparatur von interstrand cross-links (ICL) – möglicherweise durch homologe Rekombination – spielt. Diese Vorstellung wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass das DNA-Reparatur-Protein ATR (fehlerhaft im Seckel-Syndrom) für die Ubiquitylierung von FANCD2 notwendig ist (Andreassen et al. 2004). Eine direkte Interaktion zwischen FANCD2 und ATR konnte zwar nicht gezeigt werden, jedoch zeigte sich bei ATR-mutierten Zelllinien keine FANCD2 Ubiquitylierung.

FANCD2 hat wahrscheinlich eine breitere Funktion außer dem Fanconi pathway. Es wird durch ATM, einer Proteinkinase, die fehlerhaft bei Ataxia telangiectasia-Patienten ist, ebenso wie NBS1 und BRCA1 phosphoryliert. NBS1 bindet direkt an FANCD2 und scheint die Phosphorylierung zu unterstützen. Die Unterbrechung von ATM beziehungsweise eines seiner Substrate endet in einer durch ionisierende Strahlung aktivierten fehlerhaften S-Phase. Die Phosphorylierung von FANCD2 geschieht unabhängig von der Ubiquitylierung, da sie auch in FA-G-Zellen stattfindet, und unabhängig von MMC-induziertem Schaden, aber sie ist abhängig von ionisierender Strahlung. Unterstrichen wird dies durch die Beobachtung, dass FA-D2-Zellen im Gegensatz zu den anderen Komplementationsgruppen empfindlich gegenüber ionisierender Strahlung sind (Nakanishi et al. 2002, Taniguchi et al. 2002).

Das FANCD1-Gen wurde im Rahmen eines Mutationsscreenings von FA-D1-Patienten im BRCA2-Gen identifiziert. Hierbei fanden sich gehäuft bi-allelische Mutationen und dadurch die Identifizierung von BRCA2 als FANCD1. FANCD1 arbeitet downstream im Fanconi-Pathway, seine Hauptfunktion scheint aber eine Beteiligung bei der homologen Rekombination zu sein. FANCD1/BRCA2 besitzt acht BRC Motive, die im zentralen Anteil des Proteins liegen und von denen mindestens sechs scheinbar an der Bindung von RAD51

als zentralem Protein der homologen Rekombination beteiligt sind (Siddique et al. 2001, Venkitaraman 2002, Wong et al. 1997). Die homologe Rekombination startet mit der Trennung der DNA-Stränge durch den MRN-Komplex, der aus MRE11, NBS1 und RAD51 besteht, in 3'-Überhang Einzelstrang-DNA (Sancar et al. 2004). Diese Einzelstrang-DNA-Überhänge werden durch das Protein RPA geschützt, welches vor Beginn der homologen Rekombination von der Einzelstrang-DNA gelöst werden muss. Wie dies genau geschieht, ist bisher unklar. In vitro hilft bei der Ablösung RAD52, und der C-Terminus von FANCD1/BRCA2 scheint durch seine oligoneukleotide/-saccharide „Bindungs-Falten“ (binding folds, OBS) daran beteiligt zu sein. Durch diese Domänen, die auch in RPA zu finden sind, kann FANCD1/BRCA2 Einzelstrang-DNA binden. RAD51 beschichtet Einzelstrang-DNA-Substrate, welche dann ein helicales Nukleoproteinfilament bilden können, das essentiell für die Rekombination ist. Die RAD51-beschichtete Einzelstrang-DNA löst die Stranginvasion aus und somit kann die Rekombination der DNA-Stränge beginnen. Es wird angenommen, dass die Bindungen mit den zentralen BRC-Wiederholungen von FANCD1/BRCA2 die RAD51-Filamentformation von Einzelstrang-DNA leiten, da die Einführung von den BRC-Repeats ähnelnden Peptiden die RAD51-Filamentformation blockiert. Bestehende RAD51-Filamentformationen werden gleichsam durch BRC-Repeats gelöst, so dass eine Rolle von FANCD1/BRCA2 bei der Entfernung von RAD51 in der späteren Phase der homologen Rekombination angenommen werden kann (Davies et al. 2001).

FANCD1 bindet direkt an die FA-Proteine FANCG, FANCD2 und immunopräzipitiert mit FANCE (Hussain et al. 2003, 2004, Wang 2004). Der C-Terminus von FANCD1 interagiert mit FANCD2 und scheint abhängig von der ubiquitinylierten Form (FANCD2-L) zu sein, da in FA-G-Zellen, die diese Form nicht besitzen, die Interaktion nicht stattfindet. Außerdem ist FANCD2-L für das Einbringen von FANCD1 in beschädigtes Chromatin erforderlich (Wang 2004). Die Bindung mit FANCG kann sowohl am N- wie am C-Terminus von FANCD1 auf beiden Seiten der zentralen BRC Domänen stattfinden. Die in Protein-Protein-Bindungen einbezogene TPR Motive in FANCG scheinen optimal geeignet für die Bindung mit Alpha-

Helices. Zehn dieser Alpha-Helices in der Tertiärstruktur des C-Terminus von FANCD1 sind identifiziert und in die Bindung mit FANCG einbezogen (Hussain et al. 2003, Blom et al. 2004). Eine direkte Bindung zwischen FANCG und RAD51 besteht nicht, jedoch konnte im yeast-2-Hybrid-Assay eine Kollokalisierung in schadensinduzierten Foci festgestellt werden, die eine durch FANCD1/BRCA2 mediierte indirekte Interaktion bedeuten könnte (Hussain 2003).

Zusammenfassend ergeben diese Interaktionen ein Modell der homologen Rekombination, in dem durch DNA-Schaden die FANCD1/BRCA2-abhängige RAD51-Translokation zu den betroffenen Stellen stattfindet. Zuerst bindet FANCD1/BRCA2 in einem inaktiven Status, möglicherweise indem die BRC-Repeats die RAD51-Ringstruktur umhüllen. Dadurch werden n- und C-Terminus von FANCD1 einander nahegebracht und FANCG könnte an beiden Regionen von FANCD1 gleichzeitig binden und damit die Bindung von FANCD1 und RAD51 stabilisieren, bis ein Signal durch DNA-Schaden RAD51 freigibt, und RAD51 die für die homologe Rekombination notwendige DNA-Proteinfilamentstruktur formen kann.

Möglicherweise hilft FANCD2 dem FANCD1/RAD51/FANCG-Komplex beim Einbringen in das Chromatin der beschädigten DNA (Wang et al. 2004). RPA wird dann von der Einzelstrang-DNA (eventuell durch OB Domänen) von FANCD1 entfernt. Als nächster Schritt wird RAD51 durch ein Signal abgeladen. FANCD2 könnte ein Teil dieses Signals sein, indem es FANCG aus der C-terminalen Region von FANCD1 verdrängt und das Aufladen von RAD51 auf die Einzelstrang-DNA unterstützt (Hussain et al. 2004). FANCD1 reguliert dann die Anordnung des RAD51-Nukleoproteinfilaments auf der Einzelstrang-DNA, die zur Stranginvasion benötigt wird. Nach Beendigung der Reparatur erlischt das Signal des DNA-Schadens und FANCD könnte die RAD51-Filamentstrukturen unterbrechen und von der DNA entfernen.

FANCD1/BRIP1 bindet durch seine DEAH-Box Helicase Domäne an DNA (Levitus et al. 2005). Es entwindet DNA/DNA- und DNA/RNA Substrate in 5'-3'-Richtung (Cantor et al. 2004) und gehört zu der Familie der RecQ DEAH Helicasen, die vor allem non-Watson-Crick-DNA-Strukturen wie Holliday junctions, die während der homologen Rekombination

auftreten, und blockierte Replikationsgabeln (Risinger et al. 2004) entwinden. Die Entwindung der DNA-Helices in einer blockierten Replikationsgabel durch FANCI erlaubt DNA-Reparaturproteinen das Erreichen der beschädigten Stelle und erleichtert die Reparatur von „interstrand crosslinks“ (ICL). Zusätzlich besitzt FANCI C-terminal eine BRCA1-Bindungsdomäne, die erneut die Verknüpfung von FA-pathway und der homologen Rekombination zeigt.

Sowohl in der FA-J- und FA-D1-Komplementationsgruppe ist der Fanconi-Core-Komplex vorhanden, so dass FANCD1 und FANCI keine echten Fanconi-Gene, sondern nur assoziiert zum Fanconi-pathway sein könnten. FA-J-Patienten weisen jedoch klinische Merkmale wie Patienten aller anderen Gruppen (außer FA-D1) auf, und FANCI wurde bisher mit noch keinem anderen Stoffwechselweg assoziiert. Hieraus wird eine Funktion von FANCI „downstream“ im FA-pathway angenommen (Levitus et al. 2006).

Als letzte der 13 bekannten FA-Komplementationsgruppen konnte FA-N identifiziert werden. Reid et al. (2007) entdeckten pathogene, homozygote Mutationen in PALB2/FANCF in sieben Familien mit schwerem Phänotyp und hohem Risiko für kindliche Tumore, während heterozygote Mutationen das Brustkrebsrisiko erhöhen. FANCF interagiert zusammen mit FANCD1 und FANCI downstream des ID-Komplexes oder in einem anderen Stoffwechselweg, da Zellen, denen eines dieser Proteine fehlt, normale Mengen an aktiviertem FANCD2 besitzen (Wang W 2007).

1.5.2 Der Fanconi-Core-Komplex

Aus den bekannten Daten von direkten und indirekten Interaktionen der Fanconi-Proteine kann ein Modell des Fanconi-pathway abgeleitet werden. In diesem Modell sind die meisten Funktionen der FA-Proteine im Nukleus lokalisiert, die ersten Schritte zum gemeinschaftlichen Komplex finden aber im Zytoplasma statt. Von den im Cytoplasma gefundenen FANCA, -B, -C, -G und -L interagieren FANCA und FANCG direkt miteinander und müssen aufgrund der Größe des Komplexes durch aktiven Transport in den Nukleus verlagert werden. Hierfür ist eine NLS-Sequenz erforderlich, die jedoch zunächst durch die

Bindung mit FANCG verborgen ist und erst nach Konformationsänderung von der FANCA/-G-Bindung freigelegt wird. Dieser Schritt könnte durch die Bindung von FANCB und FANCL induziert werden, da in Zellen, denen FANCB fehlt (FA-B-Zellen) FANCA vornehmlich zytoplasmatisch lokalisiert ist (Andreasson et al. 2004, Levitus et al. 2006).

Im Nukleus lagern sich die beiden Subkomplexe (FANCA/FANCG und FANCB/FANCL) um FANCM an. In Zellen, die kein FANCM hervorbringen, ist keine Bindung von FANCA, FANCG und FANCL vorhanden (Medhurst et al. 2006). FANCG stabilisiert die Bindung zwischen FANCA und FANCL. Die Anordnung zu diesem Komplex bindet FANCL an FANCD2 über die Interaktion mit dem Subkomplex FANCC/FANCE. FANCF scheint den gesamten Komplex durch die Interaktion mit den FANCC/FANCE- und FANCA/FANCG-Subkomplexen zu stabilisieren (Leveille et al. 2004). Die folgende Abbildung illustriert diesen Weg zum FA-Core-Komplex.

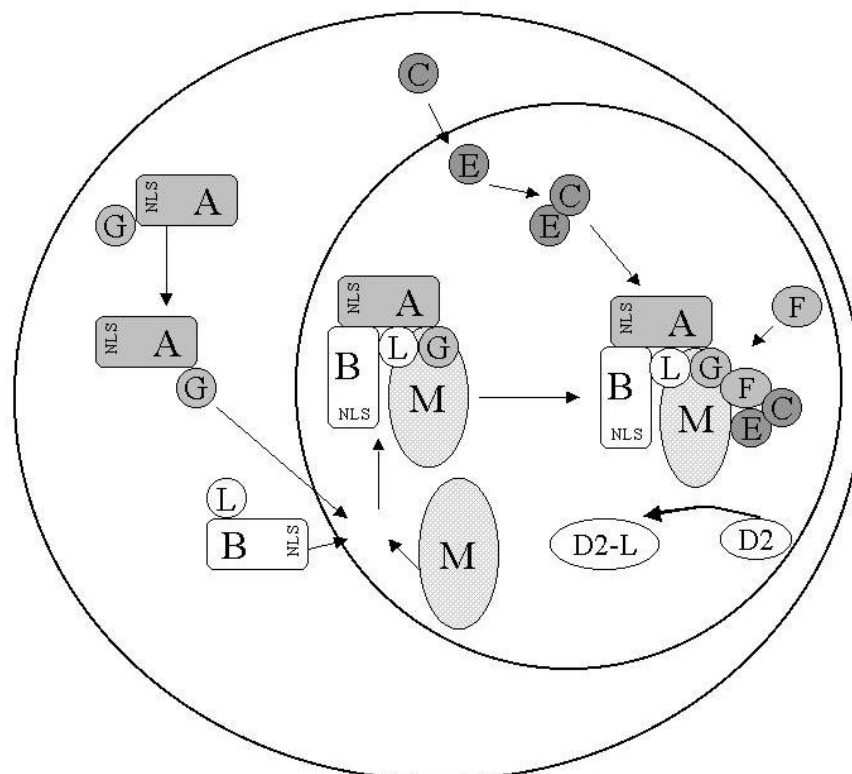


Abbildung 1: FA-Core-Komplex nach Medhurst et al. 2006: Der äußere Kreis begrenzt die Zelle mit dem Zytoplasma, der innere den Zellkern; NLS: nuclear localization sequence. FANCB und -L können ebenso wie FANCA und -G nur gemeinsam in den Zellkern übertreten; der Komplex von FANCB/L kann an FANCA binden, für diese Bindung ist FANCM erforderlich; die Stabilität dieser Verbindung ist wiederum von der Bindung von FANCM zu dem Komplex bestehend aus FANCC/E/F abhängig. Der nun geformte FA-Core-Komplex ermöglicht die Aktivierung von FANCD2 in FANCD2-L.

1.5.3 Funktion des FA-Core-Komplexes und der FA-Proteine

Die genaue Funktion des FA-pathway ist trotz der ausgedehnten Forschung weiterhin unklar. Es gibt aber viele Hinweise auf das Einwirken des FA-pathways auf die Genomstabilität und auf die Antwort auf DNA-Schädigung mit direkter enzymatischer DNA-Aufarbeitung, Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen, die bei homologer Rekombination (HR) oder translesion synthesis (TLS) beteiligt sind, und die Aktivierung von Kontrollpunkten des Zellzyklus.

Die Fanconi-Proteine FANCI und FANCM besitzen DNA-Helicase-Domänen. Außerdem binden BLM und Topoisomerase I an den FA-Core-Komplex (Meetei et al. 2003). Diese Proteine sind am Entwinden der DNA sowie mutmaßlich in der Antwort auf ein Arrest der Replikationsgabel beteiligt (Wu et Hickson 2003). Wie oben bereits erwähnt, kolokalisiert FANCD2 mit NBS1, einem Mitglied des MRN-Komplex (MRE11/RAD50/NBS1), der 3'-5'-Exonukleasaktivität besitzt und für DNA-Aufarbeitung vor DNA-Reparatur durch HR verantwortlich ist (Nakanishi et al. 2002). Dem Verlust der Funktion des FA-Pathway folgt ein Fehler in der Formierung des MRN-Komplexes um DNA-Schaden-Foci (Pichierri et al. 2002). Aktiviertes FANCD2 bindet wie oben beschrieben mit BRCA1, BRCA2, RAD51 und NBS1 und ist für die Relokalisierung von BRCA2 an Chromatin und die folgende Formation von RAD51-Foci erforderlich (Hussain et al. 2004, Wang et al. 2004). Es scheint daher wahrscheinlich, dass FANCD2 ebenso an homologer Rekombination beteiligt ist. Diese Hypothese wird durch die Entdeckung, dass FA-defiziente Zelllinien eine fehlerhafte homologe Rekombination aufweisen (Yamamoto et al. 2003, Nakanishi et al. 2005), gestützt. Unterbrechungen von FA-Proteinen, die „upstream“ agieren, führen zu milderer Defekten als Unterbrechungen von BRCA2/FANCD1. Nach Niedzwiedz et al. 2004 ist der FA-Pathway auch in der TLS involviert, da der FA-Pathway bei der Reparatur von abasischen DNA-Sites entweder HR oder TLS unterstützt, und somit ein Fehlen des FA-Pathway in einer uneffizienten DNA-Reparatur und damit chromosomaler Instabilität enden kann.

1.5.4 Fanconi-Anämie und oxidativer Stress

Nach aktueller Studienlage wird die Verknüpfung von Fanconi-Anämie und einer fehlerhaften Antwort auf DNA-Schäden immer deutlicher. Diese Schäden können endogen entstehen oder durch exogene Schadstoffe wie Mitomycin C (MMC), Diepoxybutan (DEB), Cisplatin, Cyclophosphamide, hexavalente Chromverbindungen und 8-Methoxypsoralen mit ultraviolettem Licht (PUVA) hervorgerufen werden (Alter 1993, 1996; Auerbach, Wolman 1976; Ishida, Buchwald, 1982 Moustacchi, Diattloff-Zito 1985; Taniguchi, D'Andrea. 2002; Vilcheck et al. .2002; Wang, D'Andrea 2004). Die Empfindlichkeit gegenüber DEB und MMC wird jedoch einer Störung des Redox-Zyklus zugeordnet und weist auf die Rolle von oxidativem Stress in der Ausbildung der FA hin (Pagano et al. 2003, 2005).

Verschiedene FANC-Proteine interagieren mit Proteinen, die Funktionen in Redox-Stoffwechselwegen haben. FANCC interagiert mit NADPH cytochrom P450 Reduktase (Kruyt et al. 1998) und Glutathion-S-transferase (Cumming et al., 2001). FANCG interagiert mit Cytochrom P450 2E1, das an der Redox-Biotransformation von Fremdstoffen beteiligt ist (Futaki et al. 2002). Neben den Interaktionen sind auch in vivo und in vitro Hinweise auf oxidativen Stress in FA-Zellen vorhanden. Es werden erhöhte Konzentrationen von 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OhdG) in weißen Blutzellen sowie im Urin gefunden (Pagano et al. 2004) und es zeigt sich eine erhöhte Sensitivität gegenüber Sauerstoff und freiem Eisen (Poot et al., 1996). Auffallend sind zusätzlich die stark erhöhten Plasmakonzentrationen von Tumornekrosefaktor α (Emerit et al. 1995) und Interferon γ (Pearl-Yafe et al. 2003). Wichtiges Merkmal als Hinweis auf einen sogenannten prooxidanten Status beziehungsweise oxidativen Stress in FA-Zellen ist die Korrektur chromosomaler Veränderungen (Nordenson 1977, Nagasawa, Little 1983; Dallapiccola et al. 1985) und die Verringerung der Apoptoseneigung durch Antioxidantien (Saadatzadeh et al. 2004). Inwieweit dieser oxidative Stress das klinische Bild und den Progress der Erkrankung beeinflusst, ist aktuell noch nicht klar. Aufgrund des bei über 80% der FA-Patienten auftretenden Endokrinopathien einschließlich Diabetes mellitus und der hierfür bisher fehlenden wissenschaftlichen Erklärung stellen Pagano und Ahmad (Pagano, Ahmad 2006)

eine Verbindung her zwischen oxidativem Stress und dem klinischen Phänotyp der FA einschließlich des Fortschreitens der Panzytopenie, der bösartigen Erkrankungen sowie den weiteren klinischen Komplikationen wie Diabetes mellitus, für dessen Entstehung in der Literatur Verbindungen zu oxidativem Stress nachgewiesen wurden. Auch die Hautveränderungen bei FA-Patienten könnten in diesen Zusammenhang eingebunden werden, da die Melaninsynthese einen oxidativen Prozess bedingt (Memoli et al. 1997).

2 Material und Methoden

2.1 Vorgehensweise

Patienten mit hämatologischen Erkrankungen wurden in dieser Arbeit auf Mutationen im Fanconi-F-Gen untersucht; die DNA wurde aus peripheren Leukozyten gewonnen. Das Gen wurde aufgrund seiner Größe in fünf Abschnitte unterteilt und diese mit spezifischen Primern mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfacht. Die Produkte wurden in der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) als Banden dargestellt, bevor das eigentliche Mutationsscreening mittels denaturierender High-Performance-Liquid-Chromatographie (DHPLC) erfolgte. Auffällige und nicht eindeutige Ergebnisse wurden dann sequenziert. Bei unbekanntem Sequenzabweichungen wurde ein Kontrollkollektiv aus 96 gesunden Kindern zur Bestimmung der Allelfrequenz und Unterscheidung von Polymorphismen untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein halbautomatisiertes Screeningverfahren mittels DHPLC für das Fanconi-A-Gen um die Fanconi-Gene FA-C, -F und -G erweitert. Die insgesamt 75 Fragmente, die die 72 Exons der vier Gene enthalten, wurden bei unterschiedlichen Temperaturen auf einer Mikrotiterplatte amplifiziert und anschließend auf Mutationen mittels DHPLC untersucht. Auffällige Proben wurden ebenfalls sequenziert. Anschließend wurden zehn T-ALL-Patienten mit dieser Methode in den 72 Exons einschließlich flankierender Intronsequenzen untersucht.

2.2 Patientengut

Es wurden 186 Patienten im Fanconi-F-Gen sowie zehn T-ALL-Patienten in allen Exons von FA-A, -C, -F und -G untersucht. Unter den 186 Patienten finden sich 109 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), 25 mit myelodysplastischem Syndrom (MDS), 21

Patienten mit CML/CMML/JMML und 24 mit anderen, primär nicht bösartigen hämatologischen Erkrankungen wie Fanconi-Anämie, teilweise schwerer aplastischer Anämie, unklaren Erkrankungen, VACTERL-Assoziation oder Nijmegen-Breakage-Syndrom. Vier Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und drei mit der Diagnose Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) wurden ebenfalls eingeschlossen. Der Anhang enthält eine Patientenliste mit Probennummern und den genaueren Erkrankungen. 96 gesunde Kinder bilden das Normalkollektiv zur Kontrolle.

2.3 DNA-Isolierung

Die vor der Untersuchung auf genetische Veränderungen notwendige DNA-Isolierung aus Zellen erfolgte mit geringen Abweichungen nach Standardprotokollen, deren Auswahl von dem vorliegenden Material abhing.

Lag 5-10 ml EDTA-Vollblut als Ausgangsmaterial vor, wurden im ersten Schritt die Erythrozyten durch Red Cell Lysis Buffer (RCLB, Rezepte finden sich im Anhang) lysiert. Es folgte die Isolierung der Leukozyten durch Zentrifugation und deren Verdauung über zwei Stunden bei 65°C in SDS-haltigem TNE-Puffer und Proteinase K. Anschließend wurde das Material durch Phenol-Chloroform-Extraktion von der Proteinfraction gereinigt und die in der wässrigen Phase vorliegende DNA durch Zusatz von viermolarem Lithiumchlorid und eisgekühltem Ethanol (98%) gefällt. Die nun präzipitierte DNA wurde mittels eines Glashakens aufgewickelt, in ein Probengefäß überführt und in TE-Puffer gelöst.

Alternativ wurde eine DNA-Isolierung mittels eines Promega-Kits durchgeführt. Hierbei werden ebenso zunächst die Erythrozyten lysiert, gefolgt von der Lyse der Leukozyten und der Nuklei. Im Gegensatz zur oben genannten Methode erfolgt die Entfernung der Proteine nicht durch Phenol-Chloroform-Extraktion, sondern durch Salz-Präzipitation. Die Fällung der DNA findet nach Überführung des DNA-haltigen Überstands in Isopropanol statt, die die

DNA sichtbar macht. Nach Zentrifugation und Abgießen des Isopropanols und nachfolgender Trocknung kann die DNA in TE-Puffer überführt werden.

Bei geringen Mengen an Ausgangsmaterial von 0,2-1,0ml Vollblut oder Buffy Coat fand die DNA-Isolierung mit dem QIAGEN Blood DNA Kit über das QIAamp Spinsäulen-Verfahren statt. Nach Zelllyse durch Inkubation bei 70°C nach Zugabe von Protease/Proteinase K zum Material (Vollblut oder Buffy Coat) wurde das Lysat in die im Kit enthaltene QIAamp Spinsäule überführt, in der die DNA während eines Zentrifugationsvorgangs an die Silica-Gelmembran der Säule bindet. Anschließend wurde diese durch einen zweimaligen Waschvorgang aufgereinigt und mit Hilfe eines Elutionspuffers aus der Membran eluiert.

2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Vervielfältigung der so gewonnenen DNA wurde durch die Polymerase-Ketten-Reaktion erzielt. Diese Methode ist seit Mitte der achtziger Jahre bekannt; K. Mullis erhielt für die Entdeckung 1993 den Nobelpreis. Durch die große Anzahl von Kopien eines spezifischen DNA-Abschnitts kann dieser molekularbiologisch weiter untersucht werden (Mullis et al., 1986, Saiki et al., 1988). Der Ablauf einer PCR besteht aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Für das in fünf überlappende Abschnitte unterteilte Fanconi-F-Gen wurden spezifische Primer gewählt, für die Primersequenzen der Fanconi-Gene A, C und G konnte auf die Daten der Kodoktoranden zurückgegriffen werden. Die Synthesebedingungen wie Annealing-Temperatur, Synthesezeit und gegebenenfalls erforderliche Zusätze für eine gesteigerte Produktausbeute wurden für die einzelnen Abschnitte des Fanconi-F-Gens optimiert, ebenso waren teilweise Optimierungen für die anderen drei Fanconi-Gene aufgrund der begrenzten Kapazität der Mikrotiterplatte für das gemeinsame Screening der Fanconi-Gene A, C, F und G notwendig. Die entsprechenden Bedingungen und Primersequenzen sind im Anhang zu finden. Zur Vermeidung von Kondensation des PCR-

Ansatzes am Deckel des Reaktionsgefäßes wurde ein Thermocycler mit Heizdeckel verwandt. Bei jeder Amplifizierung wurde zur Qualitätssicherung eine Negativkontrolle ohne Zugabe von DNA durchgeführt.

2.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Nach Durchführung der PCR wurden die PCR-Produkte zur Kontrolle auf ein sechsprozentiges Polyacrylamid-Dünnschichtgel aufgetragen. Zur Vorbereitung wurde auf einer von zwei Glasplatten eine Trägerfolie durch einen Wasserfilm angebracht und an den Seiten und unten Spacer aufgelegt. An der zweiten Glasplatte wurden an der gegenüberliegenden Seite Klebefilmstreifen zur Erzeugung von kleinen Vertiefungen (Slots) im zu erzeugenden Gel angeklebt und eine Glasplatte an die andere geklemmt. Das Gel wurde dann nach dem Rezept im Anhang gefertigt und zwischen die durch die Spacer getrennten Platten gegossen. Nach 30-minütigem Polymerisieren des Gels konnte es mit der Trägerfolie entnommen und in die auf 8°C vorgekühlte Elektrophoresekammer überführt werden. Die Seite mit den Slots wurde kathodennah platziert und in die Slots wurden je 1,25µl des PCR-Produkts aufgetragen. Um den Kontakt zwischen Gel und Elektroden sicherzustellen, wurden in Tris-Borat-Puffer getränkte Filterpapierstreifen auf das Gel gelegt. Anschließend erfolgte über 30 Minuten die Auftrennung der PCR-Produkte nach Größe bei einer Leistung von 14 Watt, wobei die kleineren Fragmente schneller im elektrischen Feld und somit weiter auf dem Gel laufen. Zur Größenkontrolle wurde zusätzlich bei jedem Lauf mindestens ein Standard-DNA-Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

2.6 Silberfärbung

Nach Durchführung der Auftrennung der PCR-Produkte in der Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Gel zum Sichtbarmachen der entstandenen Banden der Fragmente in

einer Silberlösung gefärbt. Initial wurde die DNA über zehn Minuten durch zehnprozentiges Ethanol im Gel fixiert. Es folgten eine dreiminütige Oxidierung durch einprozentige Salpetersäure und eine mindestens zwanzigminütige Inkubation in 0,1-prozentiger Silbernitratlösung. Danach wurde in Natriumbikarbonat-Formalinlösung reduziert, bis die DNA-Fragmente gut sichtbar waren. Anschließend wurde diese Reaktion durch zehnprozentige Essigsäure über ungefähr fünf Minuten abgestoppt. Das Gel wurde abschließend mit Wasser ausgewaschen und danach getrocknet.

2.7 Aufreinigung

Vor der Sequenzierung mussten die PCR-Produkte von unspezifischen DNA-Fragmenten gereinigt werden, um eine saubere Sequenzierung zu gewährleisten. Hierzu wurden Enzyme oder eine Aufreinigung über ein Agarose-Gel verwandt.

Zur Enzymaufreinigung wurde Shrimp Alkaline Phosphatase und Exonuclease 1 zu einem Anteil von 7µl des PCR-Produkts gegeben und für 15 Minuten bei zunächst 37°C und anschließend 80°C inkubiert. Der entstandene Ansatz konnte direkt zum Sequenzieren verwandt werden.

Bei unzureichender Aufreinigung durch die Enzyme konnte die Aufreinigung mittels eines Agarose-Gels durchgeführt werden. Hierzu wurde auf ein zweiprozentiges, mit Ethidiumbromid versetztes Agarose-Gel ein Ansatz aus 45µl PCR-Produkt mit 5µl Gel Loading Buffer III aufgetragen und bei einer Spannung von 70 Volt für ungefähr 1,5 Stunden aufgetrennt. In jedem Lauf wurde auch ein Größenstandard zur Identifizierung der Produkte aufgetragen. Unter UV-Licht sichtbar gemacht konnten so die größen-spezifischen Banden der DNA-Fragmente mit einem möglichst kleinen, sie umgebenden Agarosegel-Block ausgeschnitten werden. Diese Blöcke wurden dann in Millipore-Säulen überführt, die daraufhin zentrifugiert wurden. Dadurch konnte die DNA in TAE-Puffer gelöst gewonnen

werden. Das so gereinigte PCR-Produkt konnte dann direkt zum Sequenzieren verwendet werden.

2.8 Sequenzierung

Zur Bestimmung der exakten Nukleotidsequenz wurden die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Verfahren von Sanger (Sanger et al., 1977). Die wie oben beschrieben aufgereinigten PCR-Produkte wurden direkt sequenziert; als Sequenzierprimer dienten die PCR-Primer, deren Sequenzen im Anhang zu finden sind. Anschließend wurde mit einem Sequenzier-Kit (Thermo Sequenase, usw.) mit radioaktiv markierten Terminatoren (^{33}P -substituierte ddNTPs) gearbeitet, im Falle von teilweise auftretenden Kompressionen wurde der dGTP-Mix durch ein dITP-Mix ersetzt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Zunächst wurden die Terminator-Ansätze hergestellt, in die anschließend der Reaktionsansatz mit gereinigtem PCR-Produkt, Reaktionspuffer, Primer, destilliertes Wasser und die DNA-Polymerase (Thermo Sequenase) gegeben wurde. Im Thermocycler erfolgte dann über 45 Reaktionszyklen der Einbau der radioaktiv-markierten Terminatoren, bevor die Reaktion durch Zugabe von Stop-Lösung beendet wurde und die gel-elektrophoretische Auftrennung erfolgte.

Hierfür wurde ein Polyacrylamid-Gel in der Größe 40cm x 35cm x 0,5mm (Rezept im Anhang) zwischen zwei mit Spacern auf Abstand gehaltene Glasplatten gegossen, das über mindestens zwei Stunden polymerisierte. Die Reaktionsprodukte wurden nach einer Denaturierungsphase von fünf Minuten bei 70°C und anschließender Lagerung auf Eis in die mit Kämmen in das Gel gebrachten Taschen geladen. Der Lauf fand mit einer angelegten Leistung der Kammer von 50 Watt mit 1x Tris-Taurin-EDTA (TTE) als Laufpuffer über eine Laufzeit von 90 bis 180 Minuten statt. Anschließend wurde das Gel von den vorbehandelten Glasplatten gelöst und auf ein Filterpapier übertragen, bevor es für 90 bis 120 Minuten in einem Vakuumtrockner gehärtet wurde. Das getrocknete Gel wurde in eine Röntgenkassette gegeben und der Film über ungefähr 24 Stunden belichtet. Die Entwicklung des Films

erfolgte in einem Standard-Entwicklungsautomaten für Röntgen-Filme (Kodak RP X-OMAT Processor). Anschließend fand eine Auswertung der Filme im Vergleich zur Wildtyp- (WT-) Sequenz statt.

2.9 Denaturierende-High-Performance-Liquid-Chromatography (DHPLC)

Das Mutationsscreening wurde mit der denaturierenden High-Performance-Liquid-Chromatography (DHPLC) nach dem Protokoll von Oefner und Underhill (Oefner, Underhill, 1998) durchgeführt. Die Mutationsdetektion ist bei dieser Methode über die Formation und Diskriminierung von Homoduplices und Heteroduplices von DNA-Molekülen möglich, die durch Änderung in der DNA-Sequenz entstehen. Es wurden 7 μ l der jeweiligen Probe in eine vorerhitzte C18 „reverse phase“ auf einer aus nicht-porösen polystyren-divinylbenzen Partikeln basierenden Säule injiziert. Die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA binden über sogenannte „Brückenmoleküle“ aus Triethylammoniumacetat (TEAA) an die hydrophobe Oberfläche der Säule. Die Polymermatrix der Säule dient hierbei als stationäre Phase. Die Probe ist zunächst in einem linearen Acetonitril (ACN)-Gradienten, der aus sogenanntem Puffer A (0,1M Triethylammoniumazetat (TEAA)) und Puffer B (0,1M TEAA, 25% ACN) besteht, gelöst, dessen Acetonitril-Gehalt um 2% pro Minute ansteigt. Durch die im Verlauf sinkende TEAA-Konzentration wird die DNA mit der flüssigen Phase aus der Säule eluiert. Da Heteroduplices weniger hydrophobe Bindungen mit der Säule haben, werden sie vor den Homoduplices aus der Säule eluiert. Am Schmelzpunkt (T_n) des PCR-Produkts liegt definitionsgemäß 50% des Produktes als Einzelstrang vor. Durch Hitzedenaturierung und langsames Re-Annealen der Einzelstränge bilden sich Homo- und Heteroduplices aus, wenn eine Heterozygotie vorliegt. Der Einzelstranganteil ist in der Nähe des Schmelzpunktes durch die dort vorliegende Fehlpaarung beider Stränge erhöht. Durch den höheren Einzelstranganteil entsteht eine stärkere räumliche Trennung der DNA-Oberflächenladung, und die Heteroduplices eluieren im linearen TEAA/ACN-Gradienten früher als Homoduplices. Unterschiedliche Homoduplices denaturieren zu verschiedenen

Zeitpunkten und ermöglichen eine Unterscheidung durch die veränderten Retentionszeiten zwischen einem Wildtyp und einer homozygoten Mutanten. Werden Wildtyp und Mutante gemischt, bilden sich durch Denaturierung und Re-Annaeling Heteroduplices, die dann detektiert werden können. Die Retentionszeit wird online über die UV-Absorption im Eluat erfasst. Das Analyseergebnis wird in Absorptionsintensität in Millivolt gegen Retentionszeit in Minuten nach Injektion in die Säule aufgetragen.

Eine Optimierung der Analysebedingungen fand in mehreren Schritten statt. Zunächst wurde softwaregestützt (WAVEMAKER, Transgenomic) der Schmelzpunkt der Wildtypsequenz vorhergesagt. Es folgte die Erstellung eines Schmelzprofils durch mehrfache Injektion eines bekannten Wildtyp-PCR-Produkts bei unterschiedlichen Temperaturen, einschließlich 50°C, bei der die DNA komplett doppelsträngig, und 70°C, bei der die DNA komplett einzelsträngig vorliegt. Anschließend wurde die wahrscheinliche Analysetemperatur kontrolliert. Hierzu wurden bei drei aufeinander folgenden Temperaturen Wildtyp-PCR-Produkt und eine heterozygote Probe untersucht und die Temperatur mit der besten Diskriminierung ausgewählt. Die PCR-Produkte wurden alle vor der Analyse mittels DHPLC bei 95°C über fünf Minuten denaturiert und anschließend um 1°C pro Minute abgekühlt, um Heteroduplexformation bei vorliegender Heterozygotie zu induzieren. Falls keine bekannte humane heterozygote Probe vorlag, wurden PCR-Produkte aus der DNA der afrikanischen Meerkatze verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Genauigkeit des Screenings durch die DHPLC

Es wurden zur Abschätzung der Genauigkeit der DHPLC-Analyse in jedem der fünf definierten Fanconi-F-Abschnitte mindestens zwei in der PAGE und DHPLC-Analyse unauffällige Banden- beziehungsweise Retentionsmuster sequenziert. Alle diese sequenzierten Proben ergaben die Wildtyp-Sequenz. Die durch Sequenzierung bekannt aberranten PCR-Produkte, beziehungsweise (wenn keine bekannten Positivkontrollen vorlagen) die PCR-Produkte der cos7-DNA (Affenzelllinie) zeigten im DHPLC-Screening durchgehend eindeutig auffällige Retentionsmuster.

3.2 Gefundene Sequenzabweichung im Fanconi-F-Gen

Gegenüber der Wildtypsequenz konnte eine Sequenzabweichung identifiziert werden. Bei insgesamt drei AML-Patienten (HA 103, HA 124, HA 119) des Kollektivs trat heterozygot im Exon an Position 959 ein Basentaustausch Cytosin nach Thymin auf, das entsprechende Codon codiert für Leucin anstelle von Prolin. Eine Veränderung konnte in der PAGE und DHPLC-Analyse nachgewiesen werden und wurde in der Sequenzierung bestätigt.

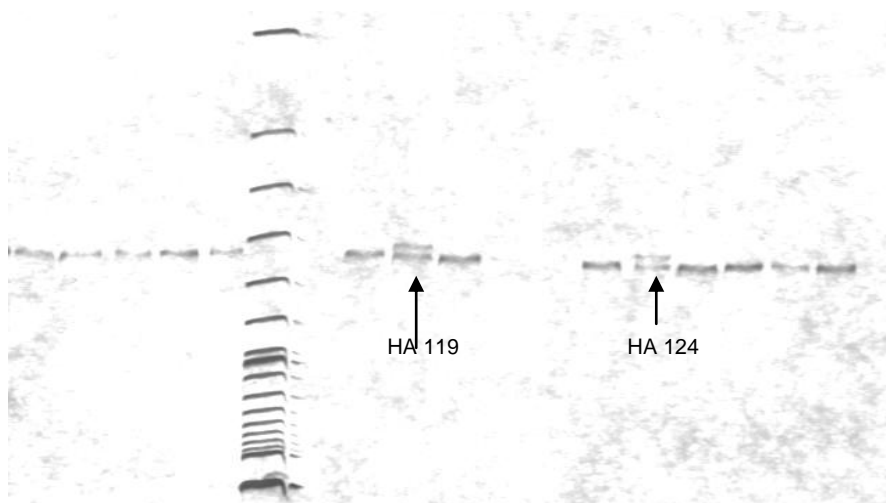


Abbildung 2: Veränderung im Fanconi-F-Gen, dargestellt in der PAGE

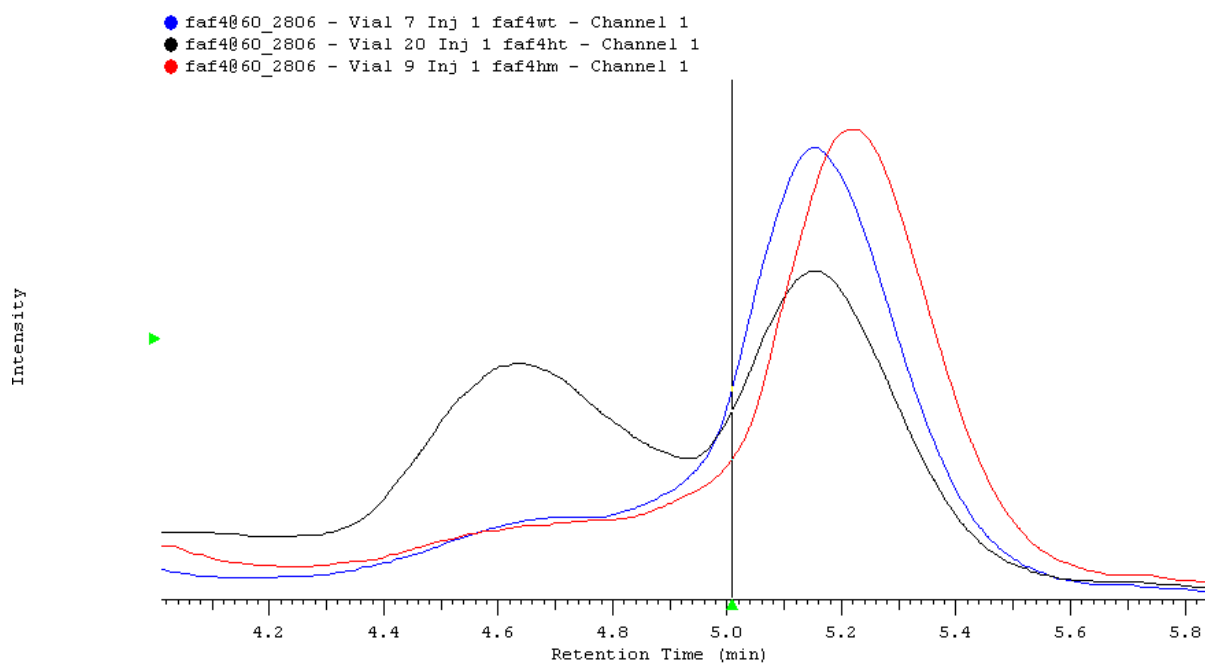


Abbildung 3: Darstellung des Basentausches 959 C>T im Fanconi-F-Gen in der DHPLC

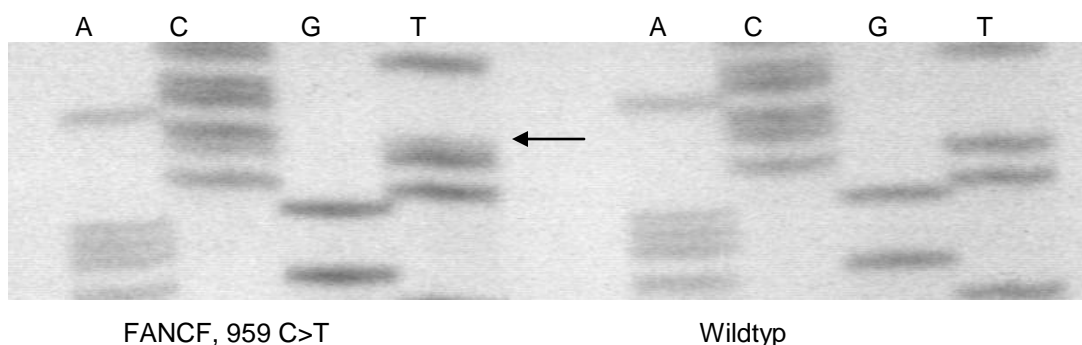


Abbildung 4: Sequenziergel mit Darstellung des Basentausches 959 C>T im Fanconi-F-Gen

Diese Sequenzabweichung wurde zuvor nicht beschrieben und zeigte sich sowohl im Patienten- als auch im Kontrollkollektiv. Es ergaben sich folgende Allelfrequenzen im Patienten- bzw. Kontrollkollektiv:

Allel	C-Allel	f(C)	T-Allel	f(T)	2n
Patienten	369	0,9919	3	0,0081	372
Kontrollen	189	0,984	3	0,016	192
gesamt	558	0,9894	6	0,0106	564

Tabelle 4: FAF 959, C>T-Allelfrequenzen im Patienten- und Kontrollkollektiv

Bei Vergleich der Ergebnisse von Patienten- und Kontrollkollektiv mithilfe des χ^2 -Test zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Frequenz des Auftretens des Polymorphismus in beiden Gruppen ($\chi^2=0,688$; entsprechend $p=0,407$ bei einem Freiheitsgrad (d.f.=1); berechnet aus Tabelle 4).

Die folgende Tabelle zeigt die Genotypfrequenzen:

Genotyp	AA (o)	AC (o)	CC (o)	n	Het	χ^2	D.F.	P
Patienten	183	3	0	186	0,016	0,012	2	0,994
Kontrollen	93	3	0	96	0,031	0,025	2	0,988
gesamt	276	6	0	282				
Genotyp	AA (e)	AC (e)	CC (e)					
Patienten	182,999	2,989	0,012					
Kontrollen	92,953	3,023	0,025					
gesamt	275,952	6,012	0,037					

Tabelle 5: Genotypfrequenzen 959 C>T im Fanconi-F-Gen im Patienten- und Kontrollkollektiv
(o) = observed, (e) = expected, Het = Heterozygotie-Rate

Die erwarteten Genotypfrequenzen wurden aus den Allelfrequenzen berechnet. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorausgesetzt zeigen die Genotypfrequenzen im Patienten- und Kontrollkollektiv keine signifikanten Unterschiede ($\chi^2=0,012$ bzw. $0,025$, $p=0,994$ bzw. $0,988$).

3.3 PCR-Bedingungen zum Mutationsscreening Fanconi-Gene A, C, F und G

Die Fanconi-Gene A, C, F und G konnten nach Optimierung auf einer mit entsprechenden Primern vorbeladenen Mikrotiterplatte für jedes Exon temperaturspezifisch gemeinsam amplifiziert werden. Die folgende Tabelle zeigt die Platzierung der Primer sowie die ansteigenden Annealingtemperaturen.

Temp. (°C)	52	51,8	52,6	53,4	55,3	56,8	58,2	59,6	61,1	62,4	63,2	63,5
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		FAA 39	FAA 5	FAA 22	FAA 12	FAA 24	FAA 9	FAA 10	FAA 3	FAA 1 (DMSO)	FAA 16	FAA 13 (DMSO)
B		FAC 11	FAA 4	FAA 23	FAA 14	FAA 8	FAA 6	FAA 25	FAA 26	FAA 28	FAA 37	FAA 43
C		FAC 12	FAG 1	FAA 29	FAA 17	FAG 5	FAA 19/20	FAA 36	FAA 18	FAA 40	FAA 15	FAC 6
D		FAC 1	FAG 9	FAC 13	FAA 30	FAC 4	FAA 21	FAA 38	FAA 41	FAF 3	FAA 7	FAC 9
E				FAC 3	FAG 10	FAC 7	FAA 32	FAA 11	FAA 42 (100µl)	FAG 8	FAA 2	FAG 2
F				FAG 7	FAC 2	FAF 5	FAA 33	FAA 27	FAG 11	FAG 4	FAF 1	FAG 3
G				FAC 8	FAG 6		FAA 34	FAA 31	FAC14	FAC 5		FAG 12
H					FAF 4		FAA 35	FAG 14 (DMSO)	FAC 10	FAF 2		FAG 13

Tabelle 6: Mikrotiterplatte mit Position der Primer im Temperaturgradienten

Die Platte kann direkt nach der PCR in den WAVE zur DHPLC überführt werden. Falls die DNA zur Heteroduplex-Induktion mit einer weiteren Probe gemischt werden soll, ist eine vorherige Darstellung des PCR-Erfolgs sinnvoll. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch die Darstellung der amplifizierten Abschnitte in der PAGE nach Silberfärbung.

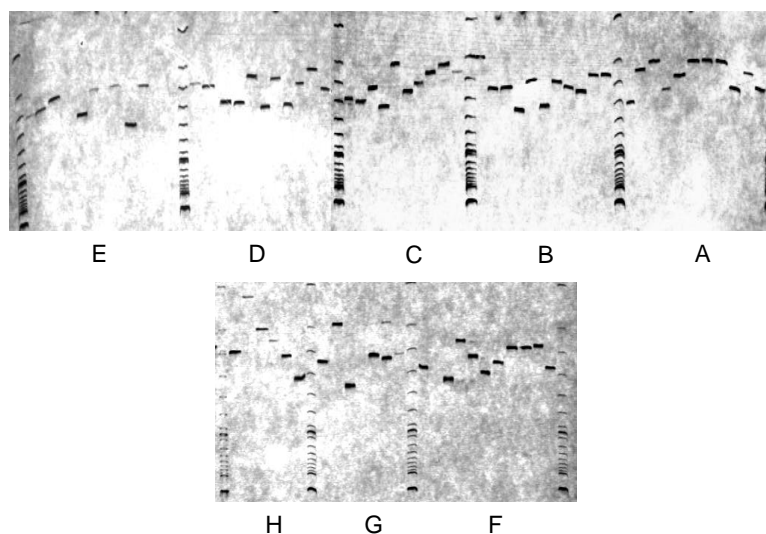


Abbildung 5: amplifizierte Exons der Fanconi-Platte nach Auftrennung in der PAGE, Silberfärbung

3.4 Bestimmung der Analysetemperatur für die DHPLC

Zur Bestimmung der optimalen Analysetemperatur wurden Läufe unter verschiedenen Säulentemperaturen für die Fanconi-Gene C, F und G durchgeführt. Für das Fanconi-A-Gen konnte auf vorhandene Daten zurückgegriffen werden. Die Abbildung 6 zeigt beispielhaft die daraus resultierenden Retentionskurven für den Abschnitt vier des Fanconi-F-Gens.

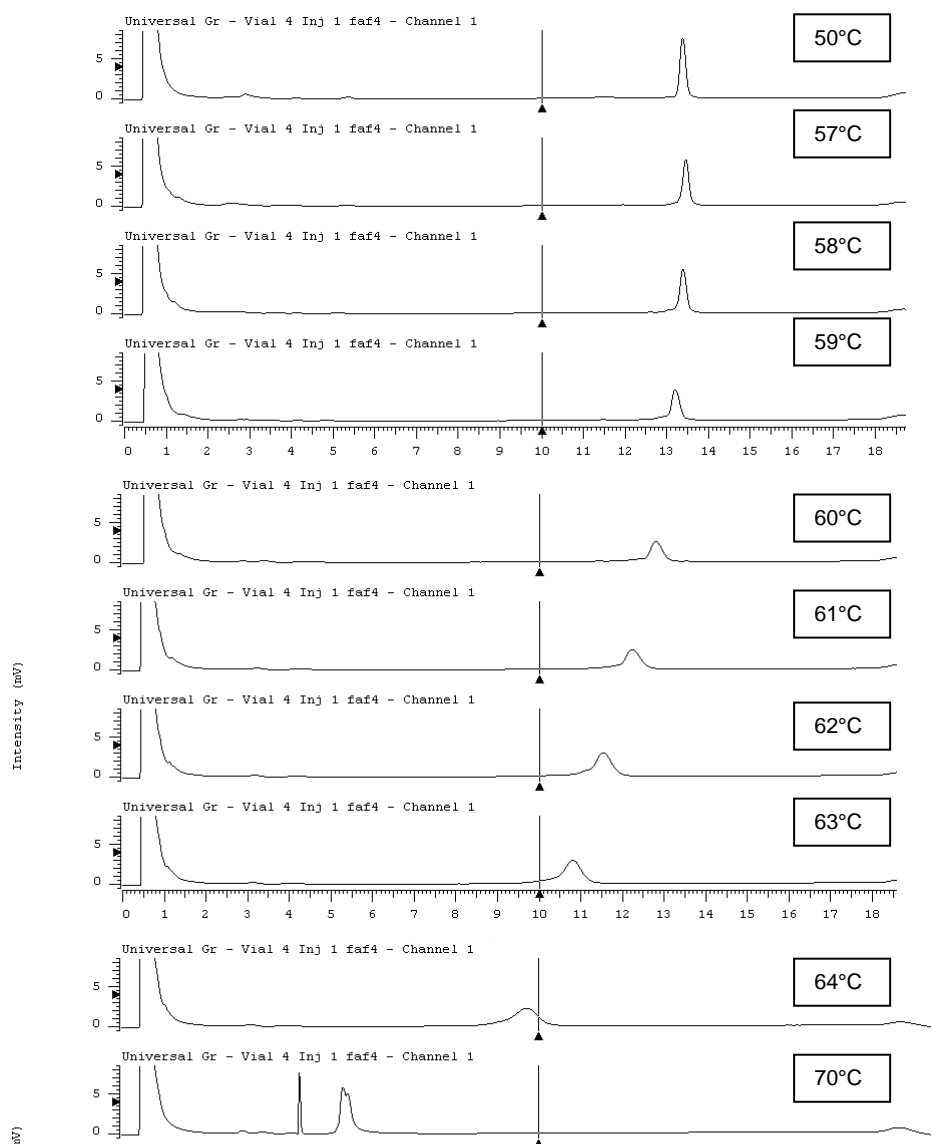


Abbildung 6: Retentionskurven bei verschiedenen Säulentemperaturen in der DHPLC am Beispiel von Abschnitt 4 des Fanconi-F-Gens

Aus den erhobenen Eluationszeiten/-peaks der Retentionskurven wurde die Schmelzkurve wie in folgender Abbildung abgeleitet.

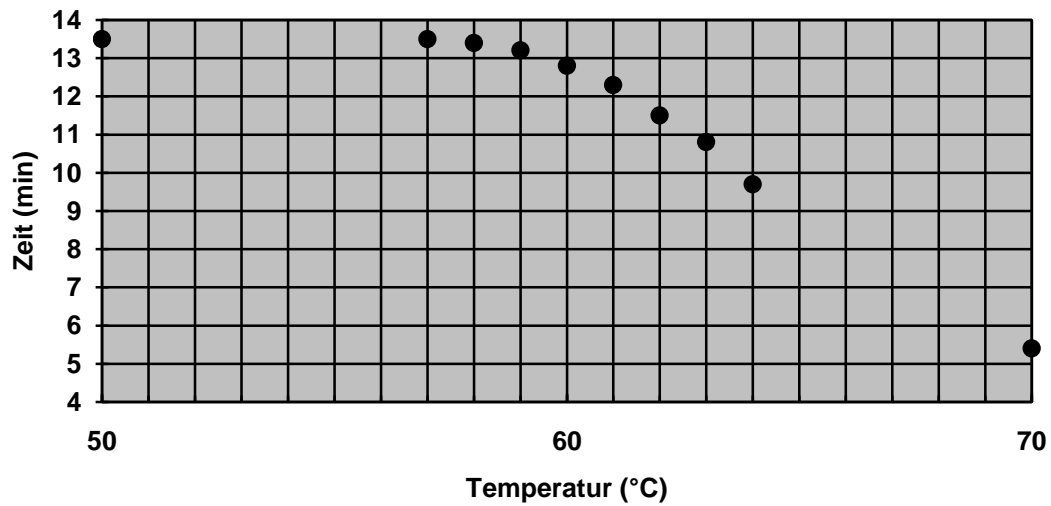
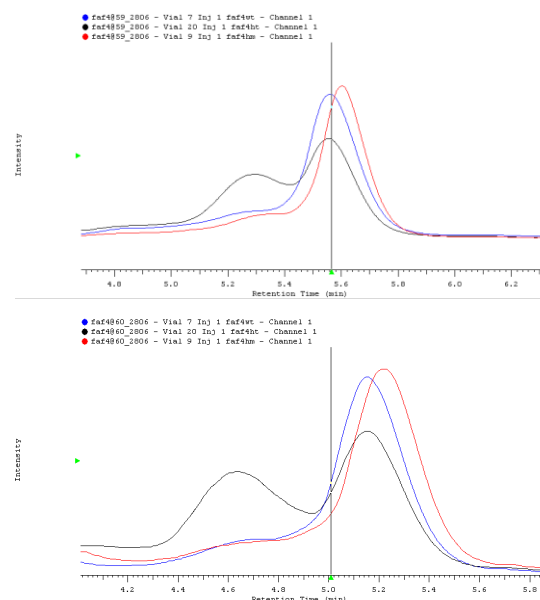


Abbildung 7: Schmelzkurve Abschnitt 4 des Fanconi-F-Gens

Die folgende Abbildung zeigt die Kontroll-Injektion von einer bekannt heterozygoten Probe, einer bekannt homozygoten Probe und einer Wildtypprobe bei drei aufeinanderfolgenden Temperaturen.



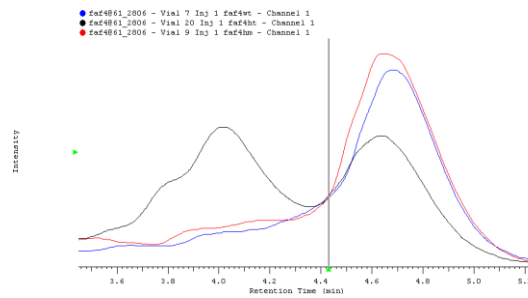


Abbildung 8: DHPLC bei bekannter Wildtypprobe (blau) und hetero- (schwarz) und homozygot (rot) veränderter Probe bei 59°C, 60°C und 61°C zur Optimierung der Analysetemperatur

Die folgende Tabelle enthält die DHPLC-Bedingungen der verschiedenen Fanconi-Gene.

Gen / Exon	Länge (Basenpaare)	Temperaturvorhersage (°C)	optimierte Temperatur (°C)	Startgradient Puffer A (%)	Stopgradient Puffer A (%)
FANCA					
1	320	69	69	5	39
2	356	63	63	51	38
3	266	57	57	48	39
4	253	60	62	59	42
5	232	57	57	57	42
6	380	58	58	53	44
7	291	61	61	48	36
8	278	58	58	49	39
9	210	58	58	45	42
10	263	63	59	45	36
11	273	63	62	46	36
12	221	62	62	46	38
13	390	63	63	44	38
14	338	62	62	44	35
15	341	64	63	47	41
16	249	64	66	53	45
17	203	61	61	51	42
18	429	61	61	43	34
19/20	351	61	62	46	36
21	333	55	55/64	44/51	37/42
22	332	61	61	48	39
23	327	62	62	46	36
24	238	65	64	51	42
25	318	63	63/66	48/52	39/43
26	444	60	60	46	37
27	284	57	59	50	39
28	354	62	62	41	37

Gen / Exon	Länge (Basenpaare)	Temperaturvorhersage (°C)	optimierte Temperatur (°C)	Startgradient Puffer A (%)	Stopgradient Puffer A (%)
FANCA					
29	214	60	60	52	43
30	381	61	61	47	38
31	256	59	59	50	41
32	389	64	64	47	38
33	391	64	64	47	38
34	285	62	62	49	40
35	313	63	63	50	39
36	225	65	65	52	43
37	347	59	59	48	39
38	240	57	57	51	42
39	286	62	61	47	38
40	314	65	65	46	37
41	332	62	62	47	38
42	269	62	64	49	59
43	220	65	65	52	43
FANCC					
1	263	59,5	59	50	36
2	232	56,9	56	49	38
3	254	54	53	51	38
4	234	55,6	56	52	38
5	184	58,3	57	51	40
6	289	59,4	61	49	38
7	265	58,6	59	49	38
8	228	58,4	57	51	38
9	253	58,7	60	49	38
10	192	60,3	62	50	40
11	254	61,7	62	48	38
12	297	63,3	63	53	39
13	303	62,9	60	50	38
14	325	60,9	61	49	36
FANCF					
1	313	64,7	65	49	35
2	351	64,9	63	48	35
3	361	64,1	63 und 65	47	35
4	351	61	60	45	37
5	308	60,1	58	48	37
FANCG					
1	253	63,4	62 und 64	53	41
2	248	62,5	62	50	41
3	358	61,5	61	51	36
4	388	62,7	63	50	36
5	307	61,9	60	52	35
6	310	61,2	61	51	38
7	281	62,5	62	51	40
8	315	59,1	62	49	38

Gen / Exon	Länge (Basenpaare)	Temperaturvorhersage (°C)	optimierte Temperatur (°C)	Startgradient Puffer A (%)	Stopgradient Puffer A (%)
FANCG					
9	240	62,1	62	49	40
10	434	62,3	60	49	33
11	242	61	58	53	40
12	335	62	62	50	37
13	298	62,3	62	49	38
14	240	62	61 und 63	49	38

Tabelle 7: optimierte DHPLC-Bedingungen der Fanconi-Gene A, C, F und G

3.5 Evaluation der softwaregestützten Analysetemperaturvorhersage

Mithilfe der Software WAVEMAKER (Transgenomic) konnten Vorhersagen für die optimale Analysetemperatur der DNA-Fragmente errechnet werden. In 15 Fällen bei insgesamt 33 optimierten Abschnitten waren die Vorhersagen der Software und die oben beschriebene Bestimmung der optimalen Analysetemperatur mit einer Abweichung $< 0,5$ °C identisch. Bei drei Abschnitten wurden die Analysen aufgrund des Schmelzprofils mit mehreren Schmelzdomänen bei zwei Temperaturen gemessen. Die softwareermittelte Temperatur lag in diesen Fällen zwischen den beiden Messtemperaturen. Bei sieben Abschnitten betrug die Differenz zwischen Softwarevorhersage und ermittelter Analysetemperatur mehr als $0,5$ °C, bei fünf Abschnitten mehr als $1,7$ °C und bei drei Abschnitten mehr als $2,5$ °C.

3.6 Sequenzabweichungen bei T-ALL-Patienten

Bei dem Screening der DNA von zehn T-ALL-Patienten zur Etablierung des DHPLC-Screenings nach gemeinsamer Amplifikation auf einer Mikrotiterplatte der Fanconi-Gene A,C,F und G konnten 27 Sequenzvarianten detektiert und in der Sequenzierung bestätigt werden. Die folgende Tabelle zeigt die bei den Patienten gefundenen Veränderungen.

Amplikon	Veränderung	Patienten									
		113	120	122	35	147	254	107	114	226	131
FANCA 5	IVS 4 -59 A>G					X				X	
FANCA 8	IVS 7 -12 A>G	X	X	X		X	X	X	X	X	X
FANCA 9	796 A>G Thr-Ala					X		X			X
FANCA 11	IVS 10 -8 A>G					X				X	
FANCA 14	IVS 13 -20 A>G	X	X					X	X		X
FANCA 19/20	IVS 20 +15 T>C	X	X					X	X		X
	IVS 20 +30 insGT					X				X	
FANCA 22	1927 C>G Pro-Ala					X				X	
FANCA 23	IVS 23 +8 T>C	X	X								
FANCA 24	IVS 24 +73 A>G	X		X			X				
FANCA 25	IVS 25 +67 A>G	XX	XX	XX		XX	XX	XX	XX	XX	XX
FANCA 28	IVS 27 -36 G>T						X				
FANCA 29	IVS 28 -7 T>C					X				X	
FANCA 32	IVS 31 -4 T>C									X	
FANCA 33	IVS 33 +18 A>G					X				X	
FANCA 34	IVS 34 +45 G>A					X				X	
FANCA 35	IVS 35 +62 C>T			X			X				
FANCA 37	3654 A>G p.=					X				X	
FANCA 39	IVS 39 +58 T>A	X	X	X		X			X	X	X
	IVS 39 +62 G>T					X				X	
FANCA 40	3982 A>G	X				X			X	X	
FANCA 41	IVS 40 -97 T>C					X				X	
FANCA 42	IVS 42 +29 T>C							XX			
FANCF 4	959 C>T Pro-Leu				X						
FANCG 1	IVS 1 +77 A>C			X	X	XX					
FANCG 5	IVS 5 +58 C>T	XX						XX	XX		
FANCG 12	IVS 12 +7 G>A	X		X	X	X	X	X	X	X	X

Tabelle 8: Veränderungen bei T-ALL-Patienten in den Fanconi-Genen A, C, F und G
x heterozygote Veränderung, xx homozygote Veränderung

Von den gefundenen Sequenzabweichungen war die folgende zuvor nicht beschrieben.

FANCA IVS 25 +67 A>G: Diese Veränderung wurde bei neun der zehn T-ALL-Patienten homozygot nachgewiesen. Auch in der Kontrollgruppe (n=96) überwog das G-Allel mit 88 Homozygoten und sieben Heterozygoten deutlich.

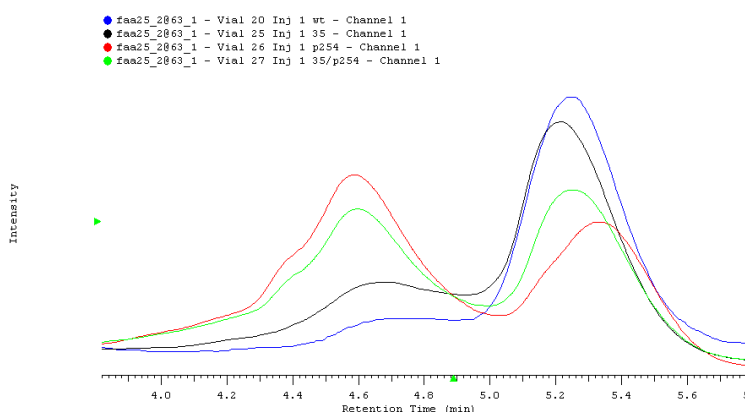


Abbildung 9: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 25+67 A>G in der DHPLC (rote und grüne Kurve), blaue und schwarze Kurve entsprechen der Wildtypsequenz

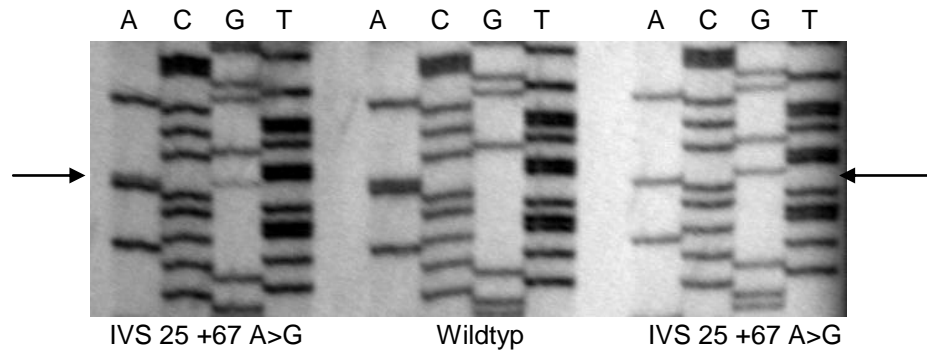


Abbildung 10: Darstellung der Veränderung FANCA IVS 25+67 A>G homozygot und heterozygot im Sequenziergel gegenüber dem Wildtyp

Die folgenden Veränderungen wurden bereits beschrieben.

FANCA IVS 4-59 A>G: Diese Veränderung trat heterozygot bei zwei der zehn T-ALL-Patienten auf. Es ist ein bekannter Polymorphismus, 1997 von Mathew beschrieben.

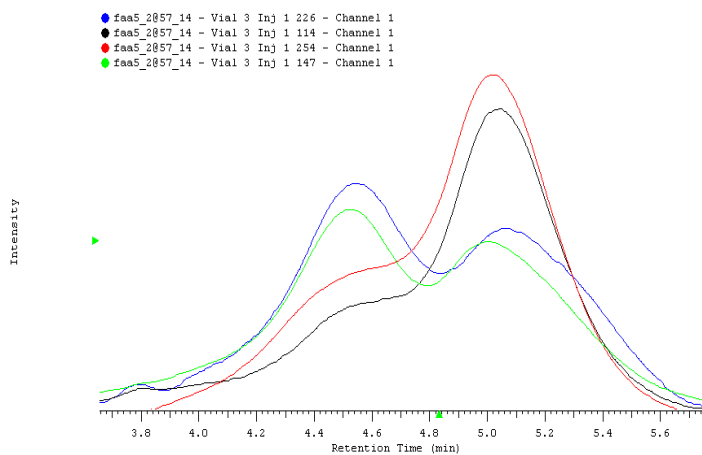


Abbildung 11: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 4-59 A>G in der DHPLC (blaue und grüne Kurve)

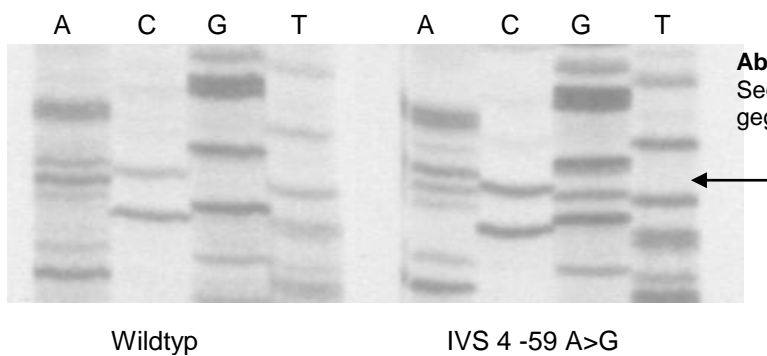


Abbildung 12: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 4-59 A>G gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCA IVS 7-12 A>G: Dieser Polymorphismus wurde 1997 von Levran et al. beschrieben; die Allelfrequenz betrug für G 55,4% und für A 44,6%. Die Veränderung lag bei neun der zehn Patienten heterozygot vor.

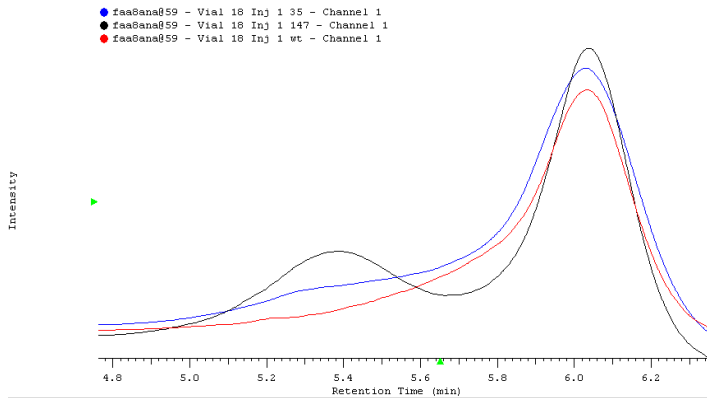


Abbildung 13: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 7-12 A>G in der DHPLC (schwarze Kurve)

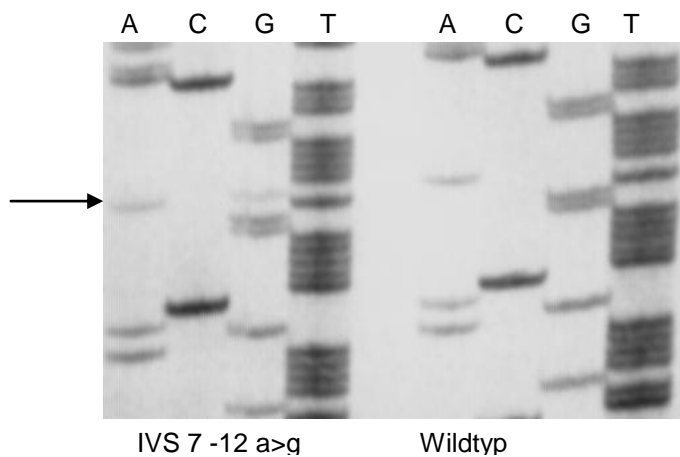


Abbildung 14: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 7-12 A>G in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA Exon 9 796 A>G: Dieser Polymorphismus im Exon 9 wurde 1997 von Savino et al. publiziert. An Position 266 folgt ein Aminosäureaustausch von Threonin nach Alanin. Bei drei Patienten lag diese Veränderung heterozygot vor.

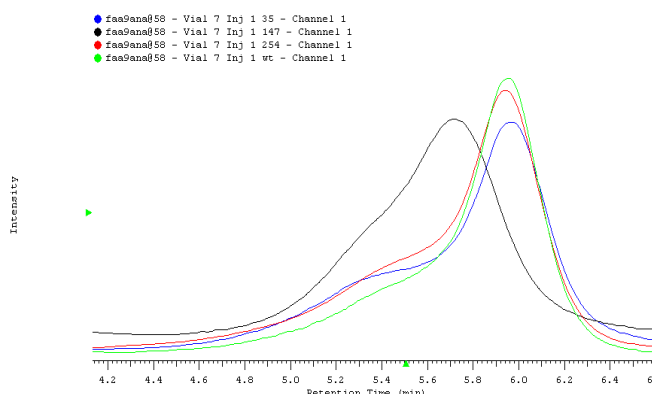


Abbildung 15: Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 9 796 A>G in der DHPLC (schwarze Kurve)

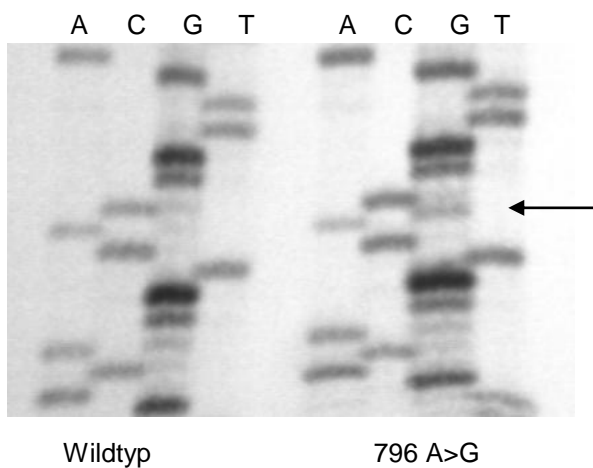


Abbildung 16: Darstellung der Sequenzvariation Exon 9 FANCA 796 A>G in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA IVS 10 -8 A>G: Diese Sequenzvariation wurde bei einem der zehn T-ALL-Patienten heterozygot nachgewiesen. In der Kontrollgruppe zeigten sich auf 96 gesunde Probanden dreizehn heterozygote.

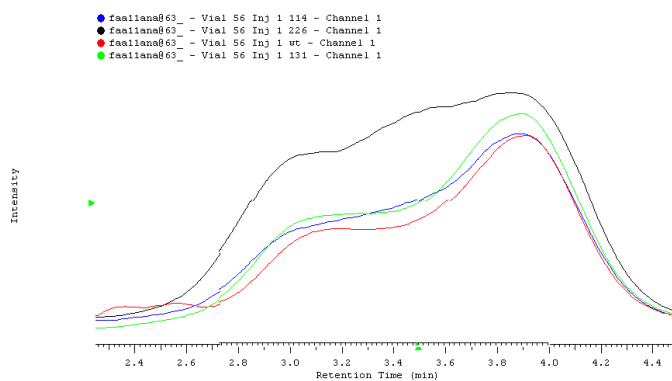


Abbildung 17: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 10-8 A>G in der DHPLC (schwarze Kurve), die blaue, rote und grüne Kurve entsprechen der Wildtypsequenz

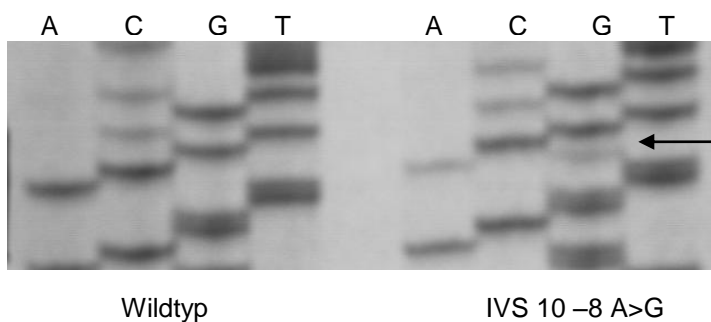


Abbildung 18: Darstellung der Veränderung FANCA IVS 10-8 A>G im Sequenziergel gegenüber dem Wildtyp

FANCA IVS 13-20 A>G: Der von Levran et al. 2004 veröffentlichte Polymorphismus konnte bei fünf der zehn Patienten heterozygot nachgewiesen werden.

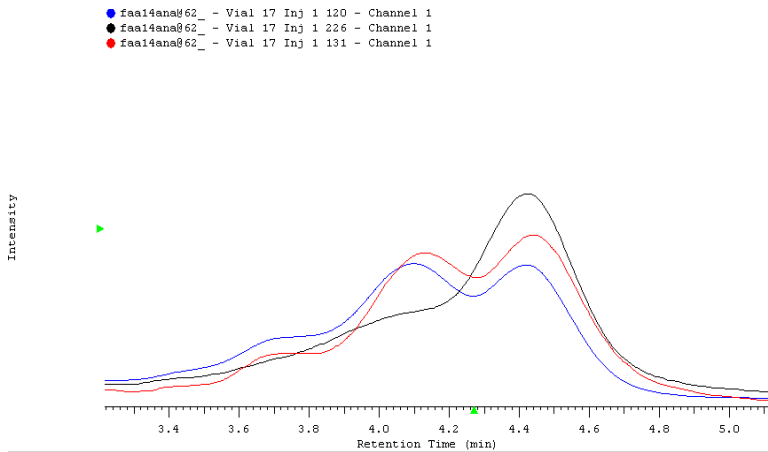


Abbildung 19: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 13-20 A>G in der DHPLC (rote und blaue Kurve)

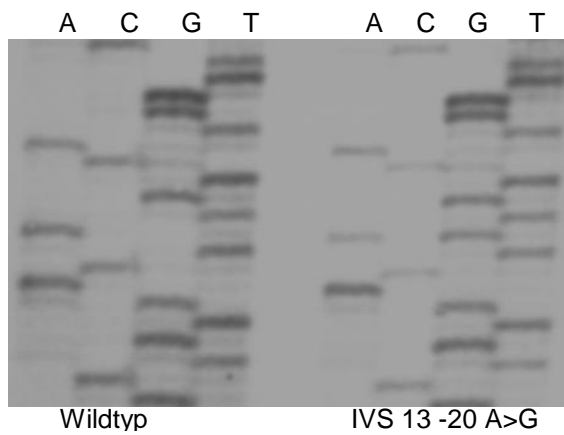


Abbildung 20: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 13-20 A>G in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA IVS 20+15 T>C: Bei fünf der zehn T-ALL-Patienten fand sich diese Sequenzvariation im Screening mit der DHPLC und konnte in der Sequenzierung bestätigt werden.

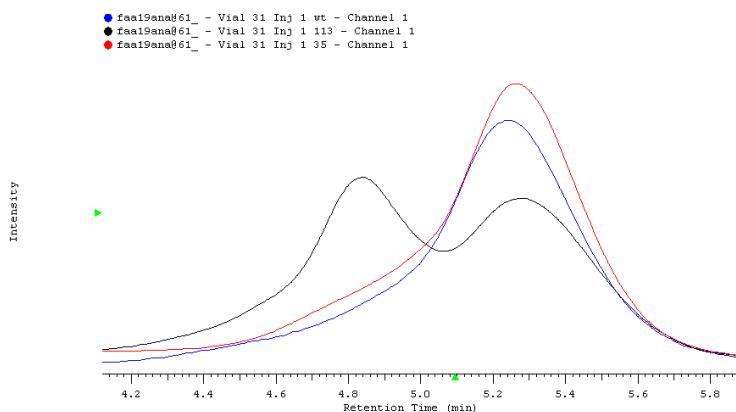


Abbildung 21: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 20+15 T>C in der DHPLC (schwarze Kurve)

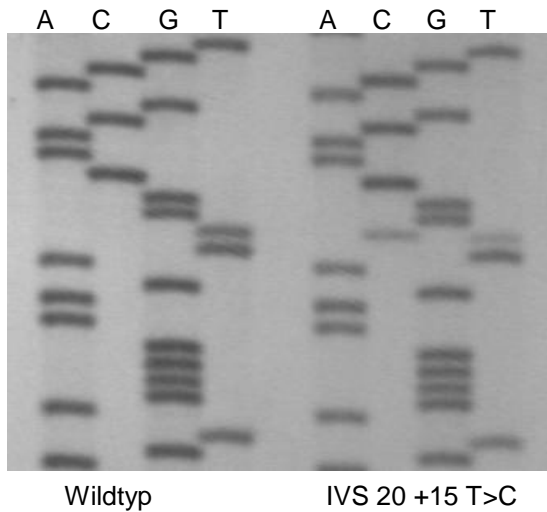


Abbildung 22: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 20+15 T>C in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA IVS 20+30 insGT: Dieser Polymorphismus wurde 2004 von Levran et al. publiziert.

Er lag bei zwei der zehn Patienten heterozygot vor.

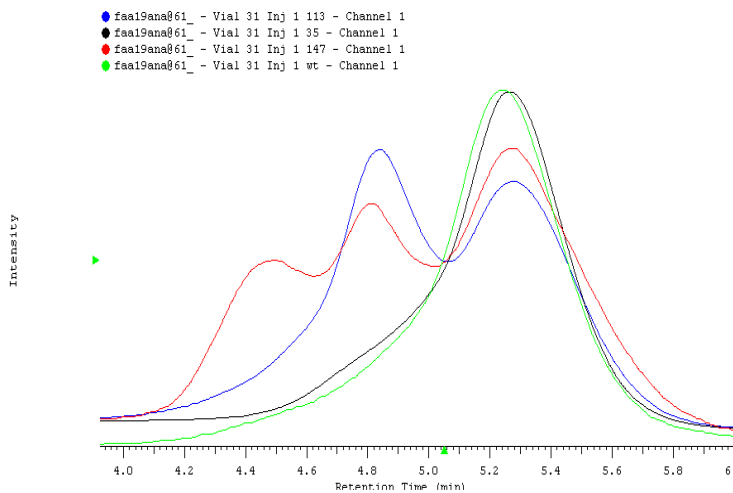


Abbildung 23: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 20+15 t>c (blaue und rote Kurve) und IVS 20+30 insGT in der DHPLC (rote Kurve)

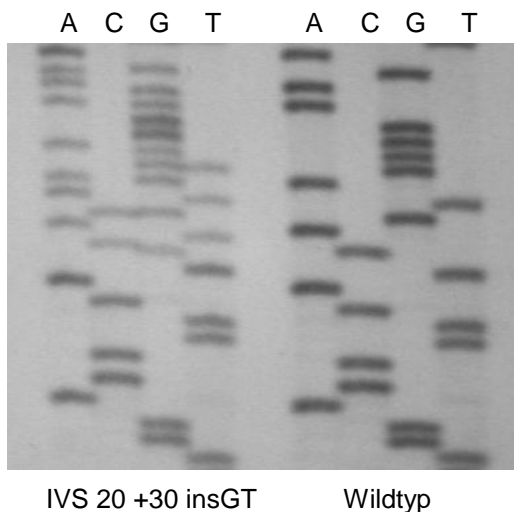


Abbildung 24: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 20+30 insGT in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA Exon 22 1927 C>G: Dieser Polymorphismus wurde 1997 von Levran et al. veröffentlicht. Hierdurch wird an Position 643 Prolin durch Alanin ersetzt. Er wurde bei zwei der zehn Patienten heterozygot nachgewiesen.

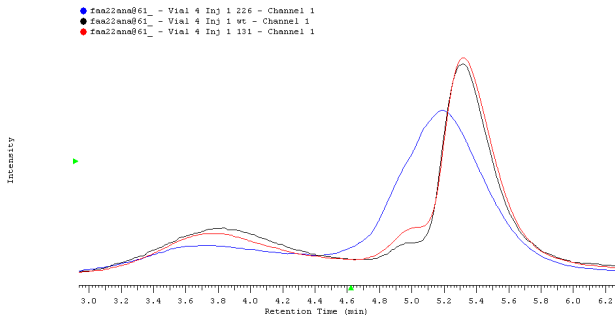


Abbildung 25: Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 22 1927 C>G in der DHPLC

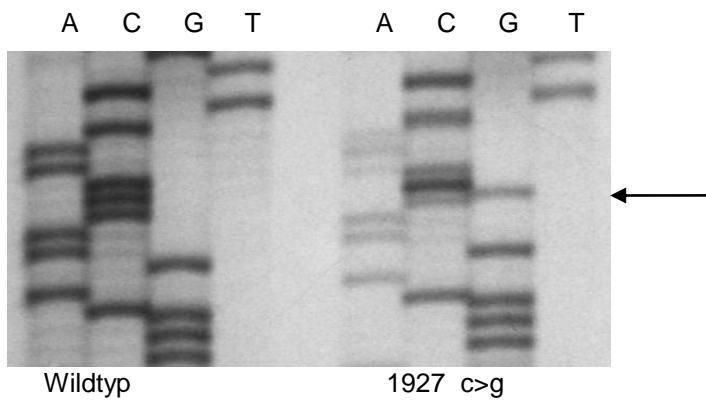


Abbildung 26: Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 22 1927 C>G in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA IVS 23+8 T>C: Dieser im Intron 23 gelegene Polymorphismus wurde ebenfalls 1997 von Levran et al. publiziert. Bei zwei der zehn T-ALL-Patienten lag er heterozygot vor.

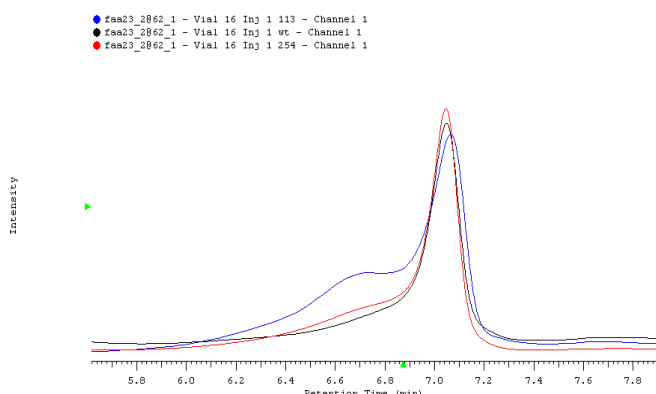


Abbildung 27: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 23+8 T>C in der DHPLC (blaue Kurve)

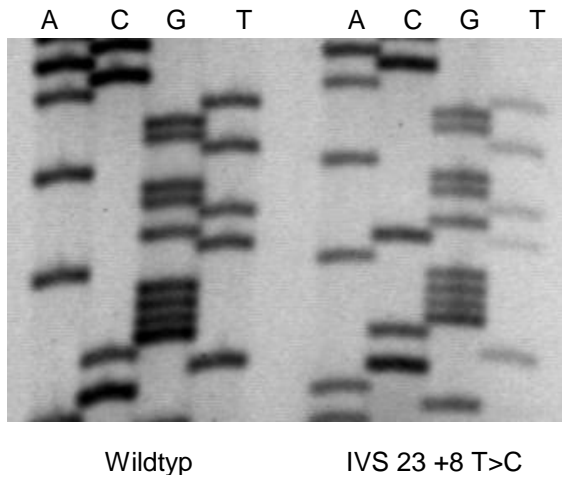


Abbildung 28: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 23+8 T>C in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA IVS 24+73 A>G: Dieser Polymorphismus lag bei drei der zehn Patienten heterozygot vor; 1996 wurde er von Auerbach et al. publiziert.

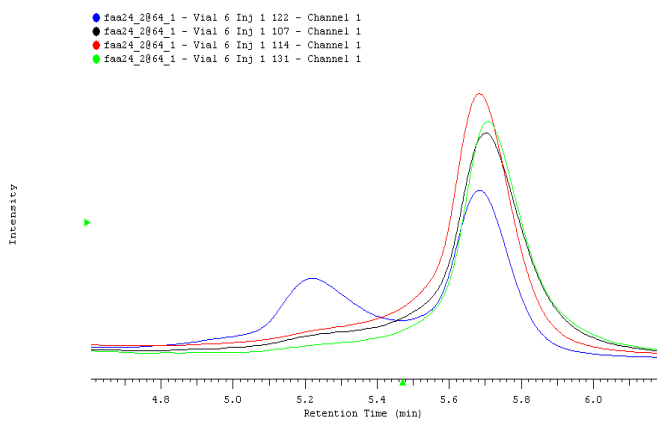


Abbildung 29: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 24+73 A>G in der DHPLC (blaue Kurve)

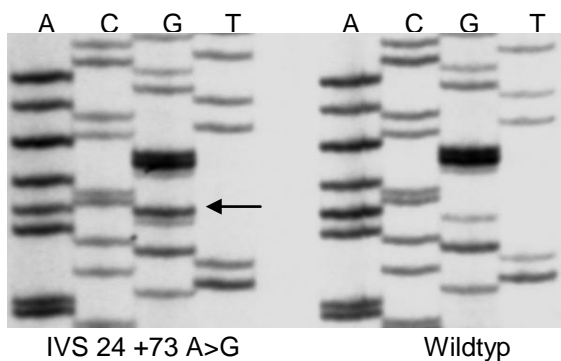


Abbildung 30: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 24+73 A>G gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCA IVS 27-36 G>T: Dieser im Intron 27 liegende Polymorphismus wurde 1998 von Tipping et al. veröffentlicht. Im Patientenkollektiv lag er bei einem Patienten heterozygot vor.

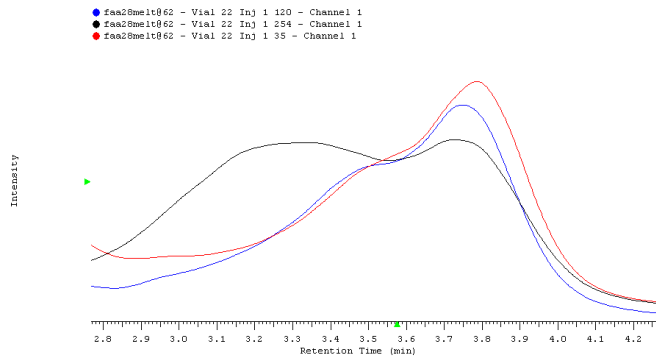


Abbildung 31: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 27-36 G>T in der DHPLC (schwarze Kurve)

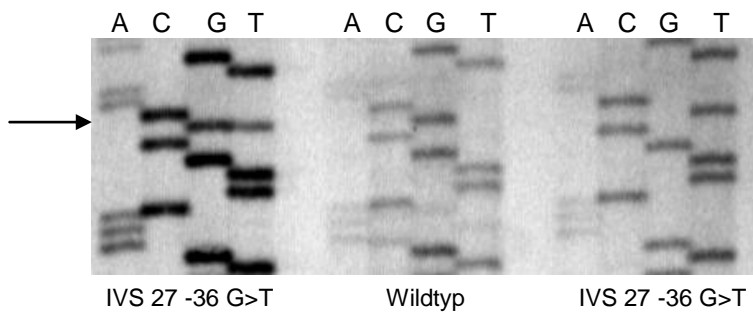


Abbildung 32: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 27-36 G>T homo- und heterozygot in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA IVS 28-7 T>C: Diese Veränderung wurde bei zwei der zehn Patienten heterozygot gefunden und konnte in der Sequenzierung bestätigt werden. Levran et al. veröffentlichten den Polymorphismus 2004.

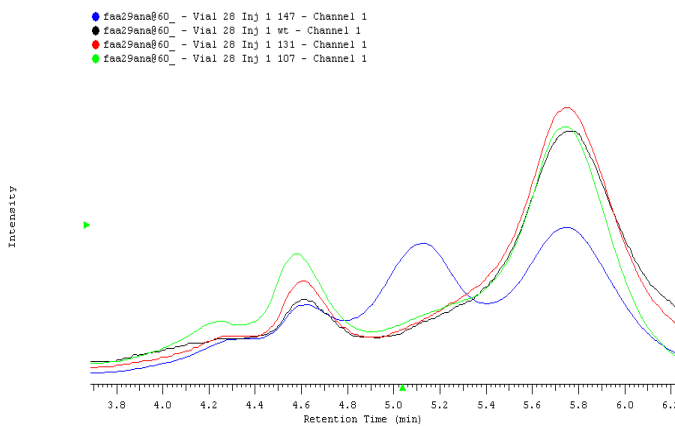


Abbildung 33: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 28-37 T>C in der DHPLC (blaue Kurve)

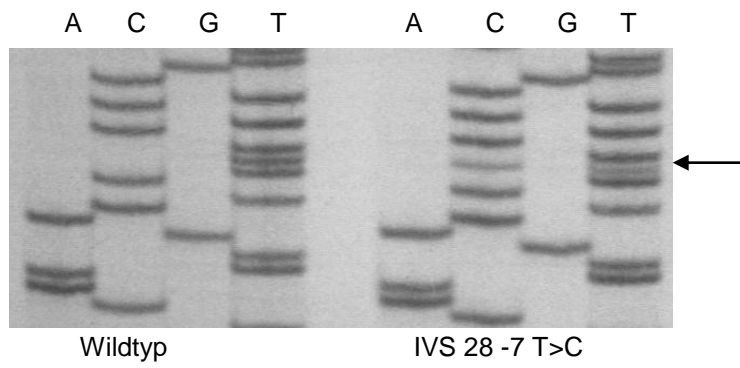


Abbildung 34: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 28-7 T>C in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA IVS 31-4 T>C: Dieser Polymorphismus wurde 2001 von Tipping et al. publiziert und trat bei einem der zehn T-ALL-Patienten heterozygot auf.

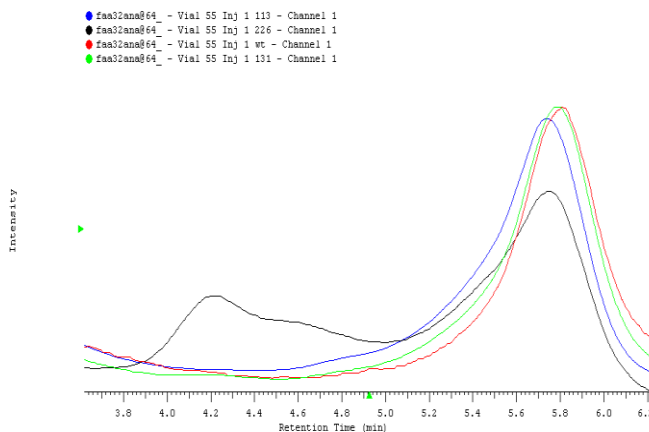


Abbildung 35: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 31-4 T>C in der DHPLC (schwarze Kurve)

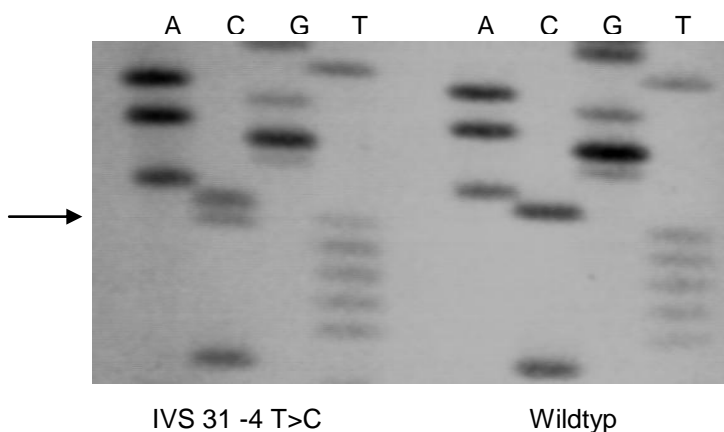


Abbildung 36: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 31-4 T>C in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

FANCA IVS 33+18 A>G: Bei zwei der zehn Patienten konnte dieser im Intron 33 gelegene und von Levran et al. veröffentlichte Polymorphismus nachgewiesen werden.

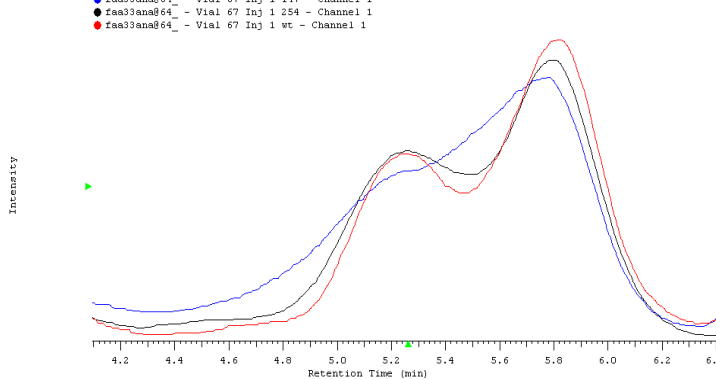


Abbildung 37: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 33+18 A>G in der DHPLC (blaue Kurve)

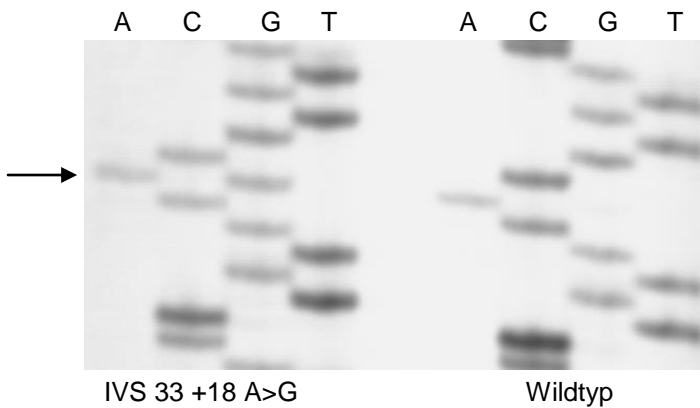


Abbildung 38: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 33+18 A>G gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCA IVS 34+45 G>A: Dieser ebenfalls von Levran et al. 2004 publizierte Polymorphismus lag bei zwei der zehn T-ALL-Patienten heterozygot vor.

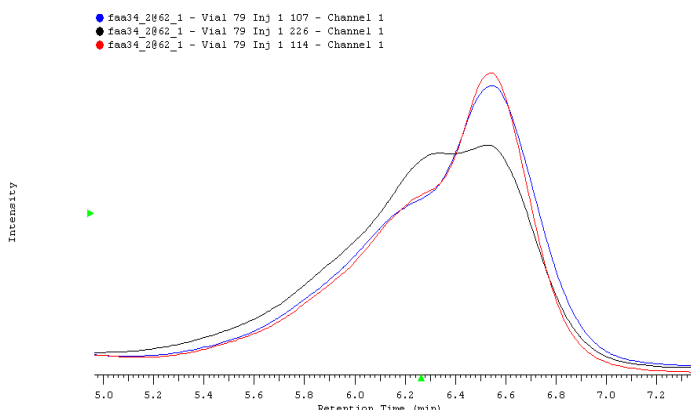


Abbildung 39: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 34+45 G>A in der DHPLC (schwarze Kurve)

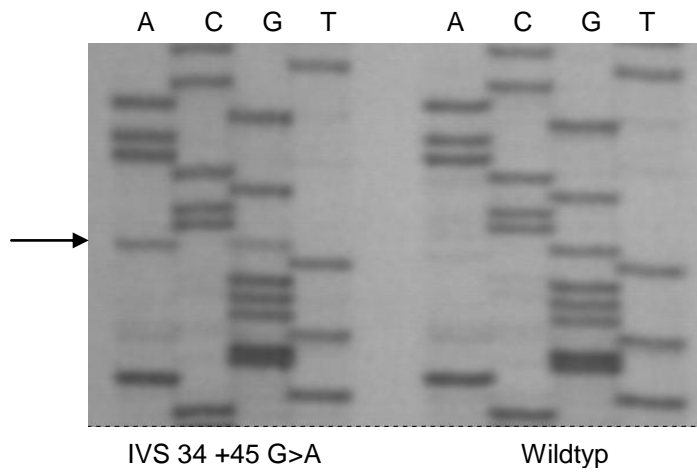


Abbildung 40: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 34+45 G>A gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCA IVS 35+62 C>T: Dieser von Levrán et al. publizierte Polymorphismus lag bei zwei der zehn Patienten heterozygot vor.

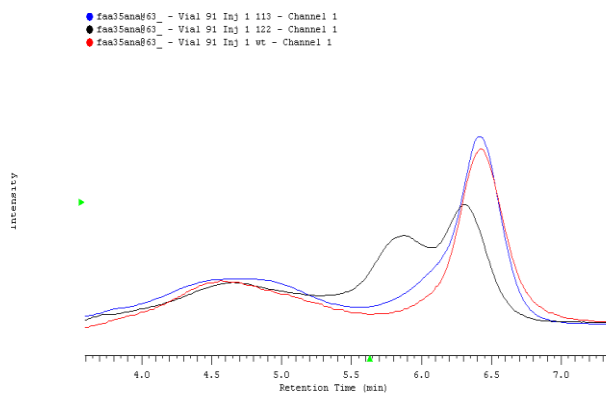


Abbildung 41: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 35+62 C>T in der DHPLC (schwarze Kurve)

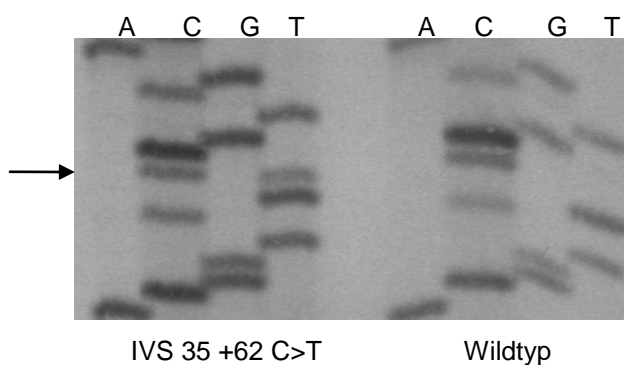


Abbildung 42: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 35+62 C>T gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCA Exon 37 3654 A>G: Dieser von Auerbach et al. beschriebene Polymorphismus codiert an Position 1218 auch nach Basenaustausch für Prolin. Im Patientenkollektiv trat er zweimal heterozygot auf.

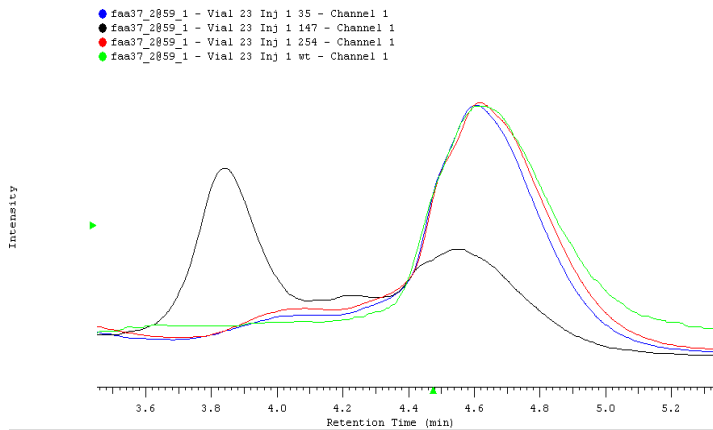


Abbildung 43: Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 37 3654 A>G in der DHPLC (schwarze Kurve)

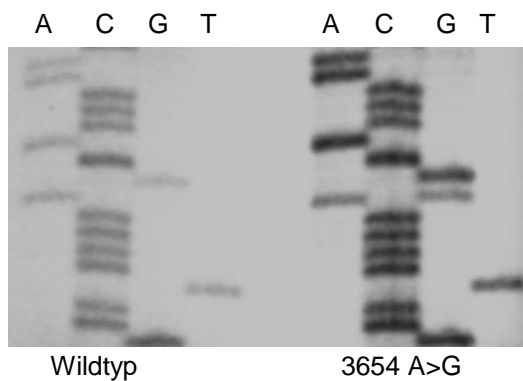


Abbildung 44: Darstellung der Sequenzvariation FANCA 3654 A>G gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCA IVS 39 +58 T>A: Bei sieben der zehn T-ALL-Patienten konnte diese Veränderung heterozygot nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe waren es neun Homozygote und 43 Heterozygote.

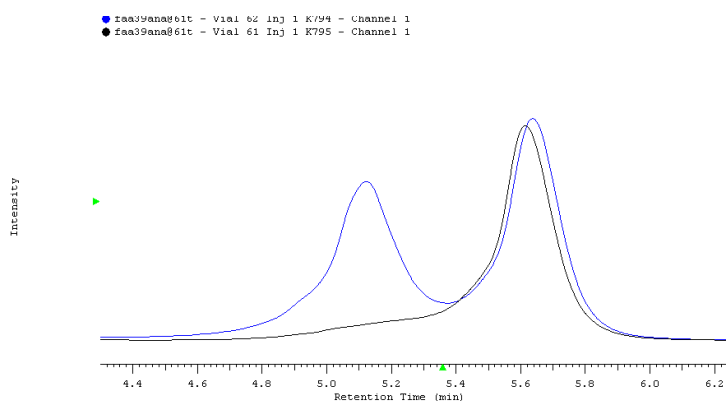


Abbildung 45: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 39+58 T>A in der DHPLC

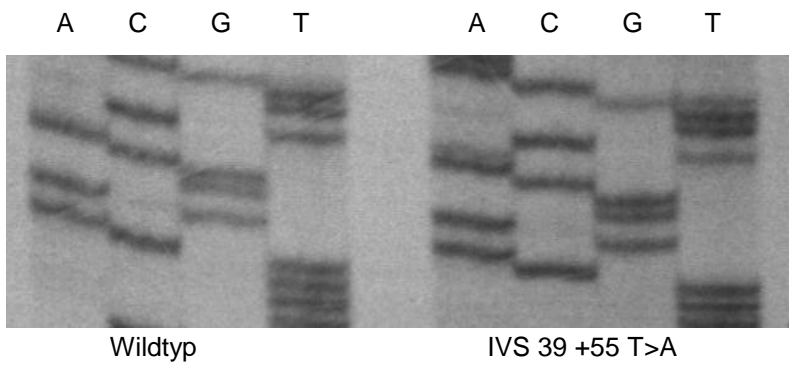


Abbildung 46: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 39+58 T>A gegen den Wildtyp

FANCA IVS 39 +62 G>T: Diese Sequenzvariante konnte bei zwei der zehn Patienten heterozygot nachgewiesen werden, im Kontrollkollektiv waren auf 96 gesunde Probanden 17 heterozygote vorhanden. Homozygote Träger fanden sich in beiden Kollektiven nicht.

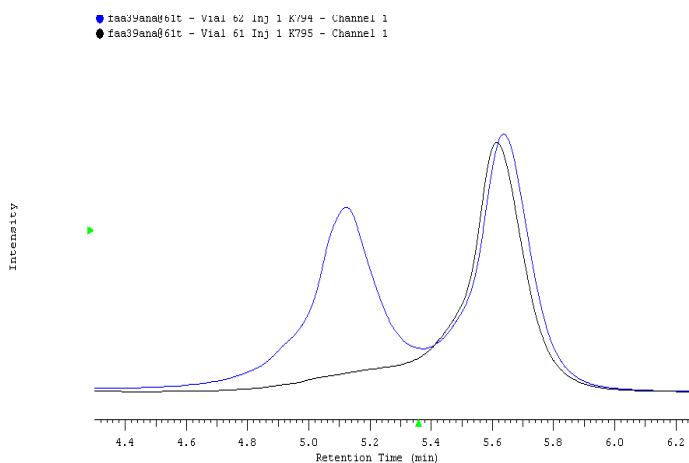


Abbildung 47: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 39+62 G>T in der DHPLC

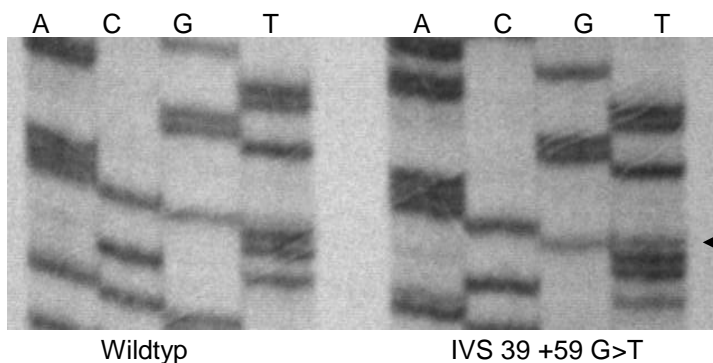


Abbildung 48: Darstellung der Sequenzvariation FAA IVS 39+62 G>T gegen den Wildtyp in der Sequenzierung

FANCA Exon 40 3982 A>G: Im Exon 40 konnte dieser von Pronk et al. 1997 veröffentlichte Polymorphismus bei vier der T-ALL-Patienten heterozygot nachgewiesen werden. Er codiert für einen Aminosäureaustausch von Threonin nach Alanin an Position 1328.

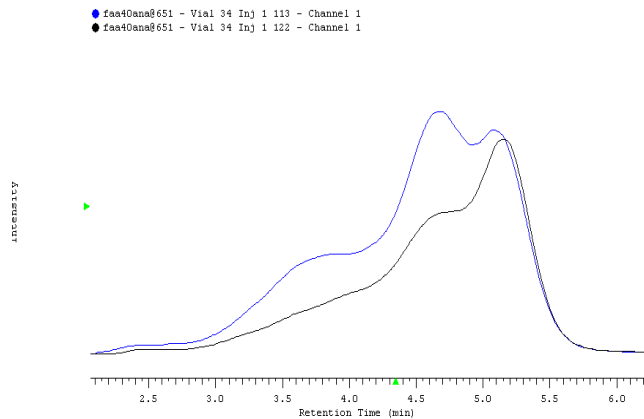


Abbildung 49: Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 40 3982 A>G in der DHPLC (blaue Kurve)

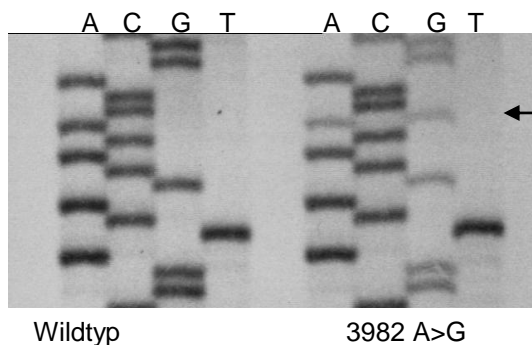


Abbildung 50: Darstellung der Sequenzvariation FANCA 3982 A>G gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCA IVS 40-97 T>C: Bei zwei Proben aus dem Patientenkollektiv lag dieser von Levran et al. beschriebene Polymorphismus vor.

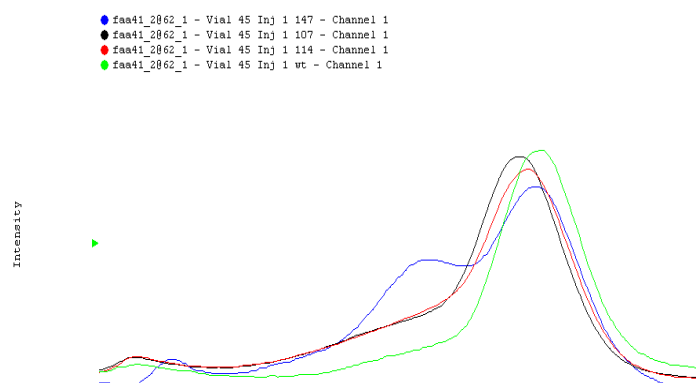


Abbildung 51: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 40-97 T>C in der DHPLC (blaue Kurve)

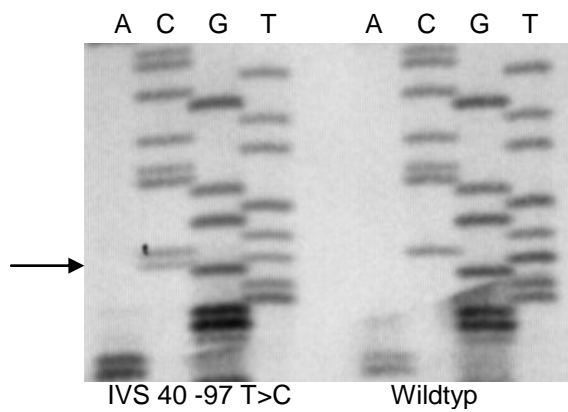


Abbildung 52: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 40-97 T>C gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCA IVS 42+29 T>C: Dieser Polymorphismus im Intron 42 wurde 1997 von Levran et al. veröffentlicht. Hier lag er bei einem Patienten homozygot vor.

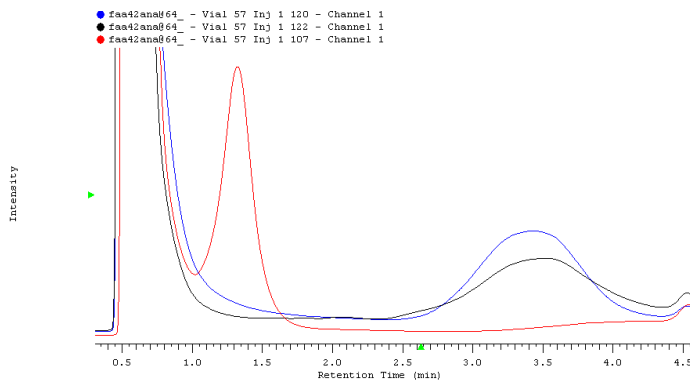


Abbildung 53: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 42+29 T>C in der DHPLC (rote Kurve)

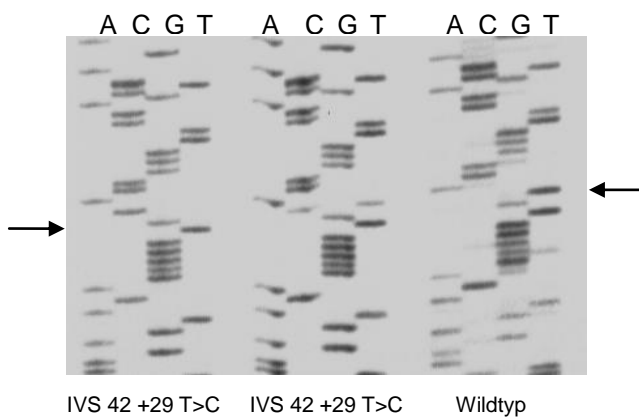


Abbildung 54: Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 42+29 T>C gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCF 959 C>T: Der oben beschriebene Polymorphismus lag bei einem der Patienten heterozygot vor.

FANCG IVS 1+77 A>C: Dieser bekannte Polymorphismus (V. Leber) im Intronbereich wurde bei einem Patienten homozygot und bei zwei Patienten heterozygot gefunden.

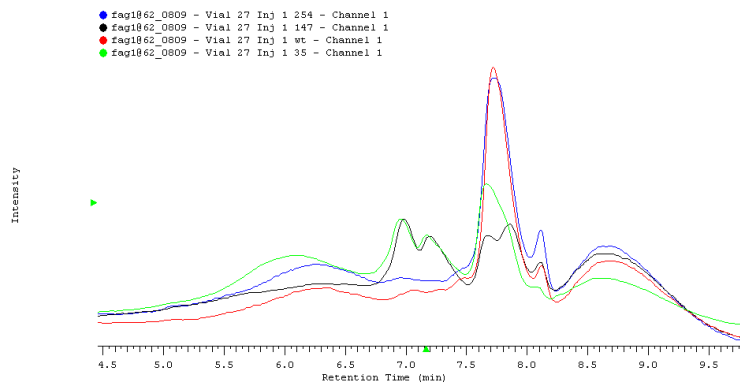


Abbildung 55: Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 1+77 A>C in der DHPLC, schwarze Kurve Homozygotie, grüne Kurve Heterozygotie

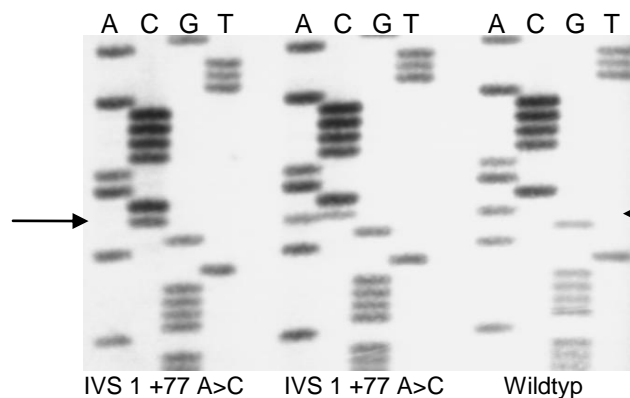


Abbildung 56: Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 1+77 A>C gegen den Wildtyp im Sequenzigel

FANCG IVS 5+58 C>G: Dieser Polymorphismus wurde ebenfalls in der Arbeit von V. Leber beschrieben. Hier lag die Veränderung bei drei der zehn Patienten homozygot vor.

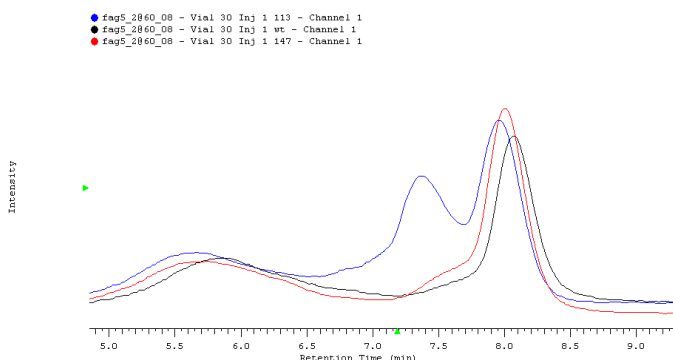


Abbildung 57: Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 5+58 C>G in der DHPLC (blaue Kurve)

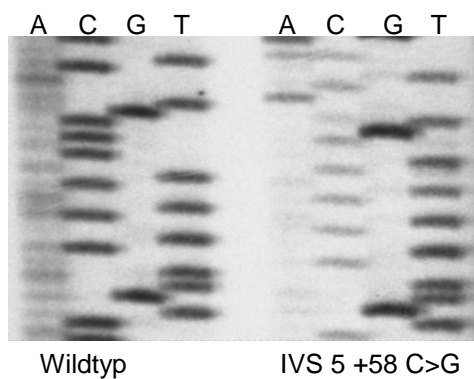


Abbildung 58: Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 5+ 58 C>G gegen den Wildtyp im Sequenziergel

FANCG IVS 12+7 G>A: Auch dieser Polymorphismus wurde in der Arbeit von V. Leber veröffentlicht. Er trat bei neun Patienten aus dem Kollektiv heterozygot auf.

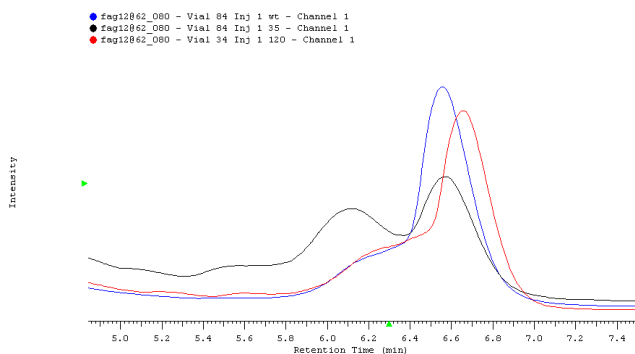


Abbildung 59: Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 12+7 G>A in der DHPLC (schwarze Kurve)

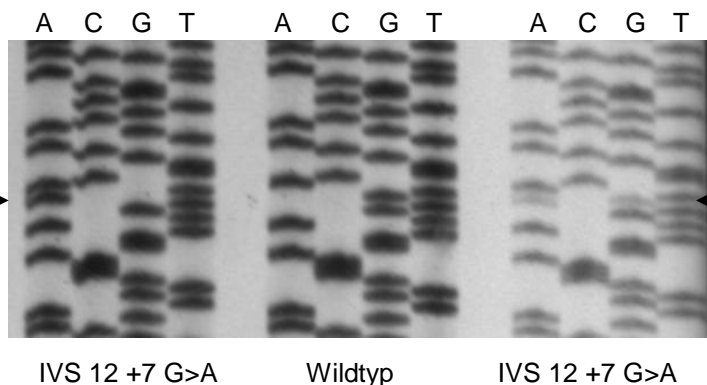


Abbildung 60: Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 12+7 G>A homo- und heterozygot in der Sequenzierung gegen den Wildtyp

4 Diskussion

Patienten mit einer homozygoten Veränderung in den Fanconi-Genen haben ein erhöhtes Risiko, an einer AML zu erkranken. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch eine Heterozygotie im Fanconi-F-Gen einen Risikofaktor für die Entstehung einer AML darstellt. Hierzu wurde ein Patientenkollektiv in dem Fanconi-F-Gen auf Veränderungen untersucht und mit einem Kontrollkollektiv verglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein vereinfachtes Verfahren zum Screening der Fanconi-Gene A, C, F und G mittels denaturierender High-Performance Liquid Chromatographie (DHPLC) etabliert.

4.1 Genauigkeit der Vorhersage von Sequenzvarianten durch das Screening

Es wurden in dieser Arbeit insgesamt 186 Patienten auf Sequenzvarianten im Fanconi-F-Gen durch Screening mittels denaturierender High-Performance-Liquid-Chromatography (DHPLC) nach zuvor erfolgter Polymerasekettenreaktion untersucht. In keiner der zur Kontrolle sequenzierten, im Screening unauffälligen Proben zeigten sich Sequenzvarianten. Alle Positivkontrollen (einschließlich bei nicht vorhandenen Positivkontrollen amplifiziertes Material der Affenzelllinie cos-7) waren im Screening mit der DHPLC klar auffällig. Ebenso waren alle Patientenproben, die in der Sequenzierung Veränderungen aufwiesen, im Screening aberrant. In Genen mit Nachweis von mehreren Sequenzvarianten in der Sequenzierung konnten diese verschiedenen Elutionsprofile in der DHPLC klar zugeordnet werden, die jeweiligen Elutionsprofile waren entsprechend der Sequenzabweichung gut reproduzierbar. Auch in der Literatur wird dem Screeningverfahren eine hohe Sensitivität und Spezifität bescheinigt, die amplifizierten Abschnitte sollten jedoch zwischen 180 und 700 Basenpaaren liegen, da mit weiter steigender Größe die Sensitivität abnimmt (Fackenthal et

al., 2005). Die Sensitivität im Mutationsscreening wird auf 96 bis 100% geschätzt (O'Donovan et al., 1998). Takashima et al. 2001 beschrieben bei einem Screening von Charcot-Marie-Tooth-auslösenden Genen in einem Vergleich von DHPLC und direkter Sequenzierung sogar mehrere Sequenzvariationen, die durch die DHPLC, nicht aber durch die Auswertungssoftware der direkten Sequenzierung erfasst wurden.

Trotz der beobachteten Diskriminierung mehrerer Sequenzvarianten in der DHPLC in einem amplifizierten Abschnitt sollten auffällige Retentionsmuster sequenziert werden, um möglicherweise im bekannten Retentionsmuster versteckte Auffälligkeiten und damit Sequenzaberrationen nicht zu übersehen. Dies ist vor allem in hochgradig polymorphen Genen wie FANCA denkbar. In der Evaluierung der DHPLC im Mutationsscreening des MEN1-Gens berichten Crépin et al. 2006 über versteckte zusätzliche Aberrationen im polymorphen Exon 9.

4.2 Genauigkeit der Vorhersage der Analysetemperatur

Bei fünfzehn Fragmenten wichen die optimierten Analysebedingungen von der Softwarevorhersage der optimalen Analysetemperatur durch die Software WAVEMAKER (Transgenomic) ab, bei drei Fragmenten wurde aufgrund von zwei ausgeprägten Schmelzdomänen bei zwei unterschiedlichen Temperaturen das Screening durchgeführt. Somit war bei mehr als der Hälfte der Fragmente die optimierte Analysetemperatur abweichend von der Softwarevorhersage. Hierbei fiel die größte Anzahl auf Abweichungen der Temperatur von 1-2°C, größere Abweichungen von 2-3°C bildeten mit fünf Fragmenten den kleineren Teil; größere Unterschiede als 3°C traten nicht auf. Ein Verzicht auf die Optimierung der Analysebedingungen mit Ermittlung einer Schmelzkurve und Probeinjektionen von Positivkontrollen scheint daher nicht möglich. Durch die Softwareunterstützung kann aber die Anzahl der Injektionen zur Ermittlung der Schmelzkurve reduziert werden. Falls Positivkontrollen verfügbar sind, könnte durch Injektion von Positiv- und Wildtypkontrollen benachbart der vorhergesagten Temperatur die Optimierung verkürzt werden.

4.3 Bewertung der gefundenen Aberration im Fanconi-F-Gen

Im Fanconi F-Gen wurde im Screening des Patientenkollektivs eine Genvariante gefunden. Der Basenaustausch C>T im einzigen Exon an Position 959 korreliert mit einer Kodierung für Leucin statt Prolin. Bei drei Patienten mit einer AML von 186 trat diese Veränderung heterozygot auf, im Kontrollkollektiv mit 96 gesunden Kindern sahen wir ebenfalls drei heterozygote Träger der Veränderung. Die Berechnung der Allel- und Genotypfrequenzen zeigten unter Voraussetzung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts keine signifikanten Unterschiede (siehe auch Kapitel 3.2). Eine pathogene Wirkung dieser Sequenzvariation ist daher unwahrscheinlich.

4.4 Zusammenfassung der Bewertung des Screenings mittels DHPLC

Durch die gute Reproduzierbarkeit der Retentionsmuster der unterschiedlichen Sequenzvarianten kann die Anzahl der notwendigen Sequenzierungen deutlich reduziert werden. Unbekannte Sequenzvariationen oder Mutationen werden sicher durch die DHPLC detektiert. Durch das halbautomatisierte Verfahren kann Zeit wie zum Beispiel durch Gießen von Gelen, Beladen und Färben bei der SSC-Analyse (Single-strand-confirmation-Analyse) eingespart werden. Bei einer mit Primern vorbereiteten Mikrotiterplatte kann das Screening eines Patienten in den 72 Exons nach weniger als 24 Stunden abgeschlossen werden. Die Zeit während der sequentiellen Analyse der einzelnen Exons in der DHPLC kann für andere Tätigkeiten genutzt werden, da eine Anwesenheit hierbei nicht erforderlich ist. Dies und der niedrigere Sequenzierbedarf spiegelt sich auch in der Kostenanalyse des Screenings wieder. Crépin et al. 2006 schätzten die Kosten für die Genotypdiagnose des MEN1-Gens unter Vorschalten eines Screenings mit der DHPLC als fünfmal geringer gegenüber der direkten Sequenzierung ein. Auch in einem ökonomischen Vergleich des BRCA1-Screenings von

Sevilla et al. 2002 stellte sich die DHPLC als deutlich günstiger verglichen mit direkter Sequenzierung oder SSC-Analyse heraus.

Das Kontaminationsrisiko ist bei Verwendung der DNA eines Patienten auf der vorbereiteten Mikrotiterplatte gering. Zusammenfassend ist das Screening auf Mutationen in den Fanconi-Genen A, C, F und G mittels DHPLC im beschriebenen Ablauf hoch sensitiv, spezifisch, kostengünstig, schnell und verlässlich.

4.5 Heterozygotie im Fanconi-F-Gen als Risikofaktor für die Entstehung einer AML ?

Die Heterozygotenfrequenz der Fanconi-Anämie wird in Deutschland auf 1:300 bis 1:200 geschätzt. Bei ungefähr 2,5% der Fanconi-Anämie-Patienten ist die auslösende Mutation im FANCI-F-Gen zu finden. Folglich ist in einer unselektierten Population bei 8000 bis 12000 Individuen eine Heterozygotie im Fanconi-F-Gen zu erwarten. Das Risiko einer AML dieser heterozygoten Anlageträger ist nicht hinreichend geklärt, die vorliegenden epidemiologischen Daten sind im Gegensatz zu homozygoten Anlageträgern, für die sich ein deutlich erhöhtes Risiko zeigt, unzureichend und widersprüchlich (Swift 1971, Swift et al., 1980, Potter et al. 1983).

Im Fanconi-F-Gen wurde im Screening des Patientenkollektivs eine Sequenzvariation gefunden. Eine Pathogenität der Veränderung kann durch diese Arbeit weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Auf der Basis der Arbeitshypothese ist ein signifikanter Einfluss von Heterozygotie im Fanconi-F-Gen als Risikofaktor für die Entstehung einer AML unwahrscheinlich; heterozygote Mutationen sollten häufiger im Fanconi-F-Gen des untersuchten Kollektivs zu finden sein, wenn diese ein Risikofaktor für die Entstehung einer AML wären. Die Arbeiten von Kodoktoranden, die andere Fanconi-Gene mit der gleichen Fragestellung untersuchten, zeigten diesbezüglich ähnliche Ergebnisse ohne einen Hinweis für eine Bestätigung der oben genannten These.

Neben der Bewertung, ob ein erhöhtes Risiko bezüglich der Entwicklung einer AML bei heterozygoten Mutationsträgern in den Fanconi-Genen vorliegt, ist auch die Frage nach dem allgemeinem Malignomrisiko im Hinblick einer Risikoeinschätzung einer

Malignomentwicklung bei Verwandten eines Fanconi-Patienten mit einer heterozygot vorliegenden Mutation von Bedeutung. Weder die bisherigen Studien noch diese Arbeit oder die Arbeiten von Kodoktoranden lassen eine abschließende Aussage zu. In dem untersuchten Patientenkollektiv finden sich vornehmlich mit AML- und MDS-Patienten die beiden häufigsten malignen Erkrankungen bei Fanconi-Anämie-Patienten, so dass die Hypothese eines erhöhten Malignomrisikos bei heterozygoten Anlageträgern nicht bestätigt werden kann.

5 Zusammenfassung

Die Fanconi-Anämie ist eine seltene, vornehmlich autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die durch kongenitale Fehlbildungen, progredientes Knochenmarksversagen und erhöhtes Auftreten von malignen Folgeerkrankungen auffällt. Zelluläres Kennzeichen der Erkrankung ist die erhöhte Chromosomenbrüchigkeit, die zum Teil spontan, vor allem aber durch alkylierende Substanzen wie zum Beispiel Diepoxybutan auftritt. Den Fanconi-Proteinen wird eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität sowie der DNA-Reparatur zugeschrieben.

Von den malignen Erkrankungen bei FA-Patienten tritt die AML am häufigsten auf. Unklar ist, ob auch Heterozygotie in den Fanconi-Genen ein Risikofaktor für die Entstehung einer AML ist. In dieser Arbeit wurde die Rolle des Fanconi-F-Gens untersucht, indem ein Patientenkollektiv mit Kindern, bei denen eine bösartige hämatologische Erkrankung (vor allem AML) vorliegt, auf ein erhöhtes Auftreten von Heterozygotie in den Fanconi-Genen gegenüber einem Normalkollektiv untersucht wurde. Hierbei wurde aus peripheren Leukozyten gewonnene DNA in den fünf definierten Abschnitten des Fanconi-F-Gens durch PCR vervielfältigt und anschließend das Screening mit der denaturierenden High Performance Liquid Chromatography durchgeführt. Es wurde eine Veränderung gefunden, eine Pathogenität kann durch diese Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Der Vergleich mit dem Normalkollektiv spricht aufgrund der fehlenden Signifikanz jedoch gegen eine Bedeutung als Risikofaktor.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein halbautomatisiertes Screeningverfahren für die Fanconi-Gene A, C, F und G mit den insgesamt 72 Exons etabliert. Für das Fanconi-A-Gen konnten die Daten einer zuvor durchgeführten Optimierung übernommen werden. Es wurde auf einer mit entsprechenden Primern vorbeladenen Mikrotiterplatte die DNA in einem Temperatur-gradienten-Cycler durch PCR bei unterschiedlichen Temperaturen amplifiziert.

Im nächsten Schritt folgte nach Optimierung der DHPLC-Bedingungen durch Schmelzkurven, Softwarevorhersage und Probeläufe mit bekannt aberranten Proben die Analyse der unbekannt Proben. Die Retentionsmuster wurden dann mit bekannten Retentionsmustern verglichen.

Für alle 72 Exone wurden Bedingungen für ein Mutationsscreening mittels DHPLC definiert. Durch die hohe Spezifität der Retentionsmuster kann der Sequenzierbedarf und damit auch der Kostenaufwand erheblich verringert werden. Die DHPLC ist geeignet für die Erkennung und Reproduzierbarkeit bekannter Veränderungen sowie für das Screening noch unbekannter Veränderungen in den Fanconi-Genen A, C, F und G.

6 Literaturverzeichnis

Ahmad, S.I., Hanaoka, F., Kirk, S.H.: Molecular biology of Fanconi anemia – an old problem, a new insight
BioEssays 2002, 24: 439-448

Ahmad, S., Kirk, S.: Molecular Mechanisms of Fanconi Anemia
Springer, New York (2006)

Aker, M., Varadi, G., Slavin, S. et al.: Fludarabine-based protocol for human umbilical cord blood transplantation in children with Fanconi anemia
J Pediatr Hematol Oncol. 1999 May-Jun;21(3):237-9

Alter, B.P.: Fanconi's anemia and its variability
Br J Haematol 1993; 85:9

Alter, B.P.: Fanconi's anemia and malignancies
Am J Hematol 1996; 53:99-110

Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D., Taniguchi, T.: ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response
Genes Dev. 2004 Aug 15;18(16):1958-63

Alter, B.P., Greene, M.H., Velazquez, I. et al.: Cancer in Fanconi anemia
Blood. 2003;101(5):2072

Alter, B.P.: Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001.
Cancer. 2003; 97(2):425-40

Auerbach, A.D., Wolman, S.R.: Susceptibility of Fanconi anemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens
Naturer 1976; 261:494-496

Auerbach, A.D.: Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test
Exp Hematol 1993; 21:731-733

Blom, E., van de Vrugt, H.J., de Vries, Y. et al. : Multiple TPR motifs characterize the Fanconi anemia FANCG protein

DNA Repair (Amst). 2004 Jan 5;3(1):77-84

Boulad, F., Gillio, A., Small, T.N. et al.: Stem cell transplantation for the treatment of Fanconi anaemia using a fludarabine-based cytoreductive regimen and T-cell-depleted related HLA-mismatched peripheral blood stem cell grafts

Br J Haematol. 2000 Dec;111(4):1153-7

Butturini, A., Gale, R.P., Verlander, P.C. et al.: Hematologic Abnormalities in Fanconi Anemia: An International Fanconi Anemia Registry Study

Blood 1994; 84:1650-1655

Cantor, S., Drapkin, R., Zhang, F. et al.: The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 24;101(8):2357-62. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 27;101(17):6834

Check, E.: Second cancer case halts gene-therapy trials

Nature. 2003 Jan 23;421(6921):305

Crepin, M., Pigny, P., Escande, F. et al.: Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography for the mutational analysis of the MEN1 gene

J Mol Endocrinol. 2006 Apr;36(2):369-76

Cumming, R.C., Lightfoot, J., Beard, K. et al.: Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1

Nat Med. 2001 Jul;7(7):814-20

Dallapiccola, B., Porfirio, B., Mokini, V. et al.: Effect of oxidants and antioxidants on chromosomal breakage in Fanconi anemia lymphocytes

Hum Genet. 1985;69(1):62-5

Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J. et al.: Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein

Mol Cell. 2001 Feb;7(2):273-82

Degan, P., Bonassi, S., de Caterina, M. et al.: In vivo accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families

Carcinogenesis 1995; 16:735-742

Dokal, I., Chase, A., Morgan, N.V. et al.: Positive diepoxybutane test in only one of two brothers found to be compound heterozygotes for Fanconi's anaemia complementation group C mutations

Br J Haematol 1996; 93:813-816

Emerit, I., Levy, A., Pagano, G. et al.: Transferable clastogenic activity in plasma from patients with Fanconi anemia

Hum Genet. 1995 Jul;96(1):14-20

Fackenthal, D.L., Chen, P.X., Das, S.: Denaturing high-performance liquid chromatography for mutation detection and genotyping

Methods Mol Biol. 2005;311:73-96

Faivre, L., Guardiola, P. et al.: Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia

Blood 2000; 96:4064-4070

Fanconi, G.: Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (pernizioses Blutbild und Konstitution)

Jahrb Kinderh 1927; 117:257

Folias, A., Matkovic, M., Bruun, D. et al.: BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA

Human Molecular Genetics 2002 ; 11 :2591-2597

Futaki, M., Yamashita, T. et al.: The IVS4+4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients

Blood 2000; 95:1493-1498

Futaki, M., Igarashi, T., Watanabe, S. et al.: The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage
Carcinogenesis. 2002 Jan;23(1):67-72

Gennery, A.R., Slatter, M.A., Bhattacharya, A. et al.: The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia
Clin Immunol. 2004 Nov;113(2):214-9

Giampetro, P.F., Verlander, P.C., Davis, J.G. et al.: Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an International Fanconi Anemia Registry study
Am J Med Genet 1997; 68:58-61

Gillio, A.P., Verlander, P.C., Batish, S.D. et al.: Phenotypic consequences of mutations in the Fanconi anemia FAC gene: an International Fanconi Anemia Registry study
Blood. 1997 Jul 1;90(1):105-10

Gluckman, E., Devergie, A., Dutreix, J.: Radiosensitivity in Fanconi anaemia: application to the conditioning regimen for bone marrow transplantation
Br J Haematol. 1983 Jul;54(3):431-40.

Gluckman, E., Berger, R., Dutreix, J.: Bone marrow transplantation for Fanconi anemia
Semin Hematol. 1984 Jan;21(1):20-6. Review.

Gluckman, E., Auerbach, A.D., Horowitz, M.M. et al.: Bone marrow transplantation for Fanconi anemia
Blood. 1995 Oct 1;86(7):2856-62

Garcia-Higuera, I., Kuang, Y. et al. : Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC and FANCG/XRCC9 interact in a Functional nuclear complex
Mol Cell Biol 1999; 19:4866-4873

Garcia-Higuera, I., Kuang, Y. et al. : The Fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex
Blood 2000; 96:3224-3230

Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S. et al.: Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway
Molecular Cell 2001; 7:249-262

Gordon, S.M., Buchwald, M.: Fanconi anemia protein complex: mapping protein interactions in the yeast 2- and 3-hybrid systems
Blood. 2003 Jul 1;102(1):136-41. Epub 2003 Mar 20

Guardiola, P., Pasquini, R., Dokal, I. et al.: Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation
Blood. 2000 Jan 15;95(2):422-9

Hirsch, B., Shimamura, A., Moreau, L. et al.: Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood
Blood. 2004 Apr 1;103(7):2554-9. Epub 2003 Dec 11

Hoatlin, M.E., Christianson, T.A. et al. : The Fanconi anemia group C gene product is located in both the nucleus and cytoplasm of human cells
Blood 1998; 91:1418-1425

Holmes, R.K., Harutyunyan, K., Shah, M. et al.: Correction of cross-linker sensitivity of Fanconi anemia group F cells by CD33-mediated protein transfer
Blood. 2001 Dec 15;98(13):3817-22

Huber, P.A., Medhurst, A.L., Youssoufian, H. et al.: Investigation of Fanconi anemia protein interactions by yeast two-hybrid analysis
Biochem Biophys Res Commun. 2000 Feb 5;268(1):73-7

Hussain, S., Witt, E., Huber, P.A.J. et al.: Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1
Human Molecular Genetics 2003; 12:2503-2510

Hussain, S., Wilson, J.B., Medhurst, A.L. et al.: Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways.
Hum Mol Genet. 2004 Jun 15;13(12):1241-8. Epub 2004 Apr 28

- Ishida, R., Buchwald, M.:** Susceptibility of Faconie anemia lymphoblasts to DNA cross-linking and alkylating agents
Cancer Res 1982; 42:4000-4006
- Koc A, Pronk JC, Alikasifoglu M, et al.:** Variable pathogenicity of exon 43del (FAA) in four Fanconi anaemia patients within a consanguineous family.
Br J Haematol. 1999 Jan;104(1):127-30.
- Korkina, L.G., Samochatova, E.V., Maschan, A.A. et al.:** Release of active oxygen radicals by leukocytes of Fanconi anemia patients
J Leukoc Biol. 1992;52(3):357-62
- Korkina, L.G. et al.:** Redox dependent toxicity of diepoxybutane and Mitomycin C in sea urchin embryogenesis
Carcinogenesis 2000; 21:213-220
- Kruyt, F.A.E., Hoshino, T. et al.:** Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase
Blood 1998; 92:3050-3056
- Kruyt, F.A.E., Abou-Zahr, F. et al.:** Resistance to Mitomycin C Requires Direct Interaction between the Fanconi Anemia Proteins FANCA and FANCG in the Nucleus through an Arginine-rich Domain
J Biol Chem 1999; 274:34212-34218
- Kuang, Y., Garcia-Higuera, I., Digweed, M. et al. :** Carboxy terminal region of the Fanconi anemia protein, FANCG/XRCC9, is required for functional activity
Blood 2000; 96:1625-1632
- Kupfer, G.M., Naf, D., Suliman, A. et al.:** The Fanconi anaemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex
Nat Genet. 1997 Dec;17(4):487-90
- Kutler, D.I., Singh, B., Satagopan, J. et al.:** A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)
Blood 2003; 101: 1249-1256

Leber, V.: Zur Bedeutung des Fanconi-Anämie G-Gens für die Entstehung hämatologischer Malignome im Kindesalter

Hamburg, Univ. FB Medizin, Diss., 2006

Leveille, F., Blom, E., Medhurst, A.L. et al.: The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein

J Biol Chem. 2004 Sep 17;279(38):39421-30. Epub 2004 Jul 15

Levitus, M., Roimans, M.A., Steltenpool, J. et al.: Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes

Blood. 2004 Apr 1;103(7):2498-503. Epub 2003 Nov 20

Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C. et al.: The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J

Nat Genet. 2005 Sep;37(9):934-5. Epub 2005 Aug 21

Levitus, M., Joenje, H., de Winter, J.P.: The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance

Cell Oncol. 2006;28(1-2):3-29. Review

Medhurst, A.L., Huber, P. et al.: Direct interactions of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway

Human Molecular Genetics 2001: 10:423-429

Medhurst, A.L., Laghmani el H., Steltenpool, J. et al.: Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway

Blood. 2006 Sep 15;108(6):2072-80. Epub 2006 May 23

Meetei, A.R., Sechi, S., Wallisch, M. et al.: A Multiprotein Nuclear Complex Connects Fanconi Anemia and Bloom Syndrome

Molecular and Cellular Biology 2003; 23:3417-3426

Meetei, A.R., de Winter, J.P., Medhurst, A.L. et al.: A Novel Ubiquitin Ligase is Deficient in Fanconi Anemia

Abstract: Fifteenth Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium 2003

- Meetei, A.R., Yan, Z., Wang, W.:** FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination
Cell Cycle. 2004 Feb;3(2):179-81
- Meetei, A.R., Medhurst, A.L., Ling, C. et al.:** A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M
Nat Genet. 2005 Sep;37(9):958-63. Epub 2005 Aug 21
- Memoli, S., Napolitano, A., d'Ischia, M. et al.:** Diffusible melanin-related metabolites are potent inhibitors of lipid peroxidation
Biochim Biophys Acta. 1997 May 17;1346(1):61-8
- Migliarina, R., Le Coniat, M., Berger, R.:** A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow cytometry
Anal Cell Pathol. 1991;3(2):111-8
- Mosedale, G., Niedzwiedz, W., Alpi, A. et al.:** The vertebrate Hef ortholog is a component of the Fanconi anemia tumor-suppressor pathway
Nat Struct Mol Biol. 2005 Sep;12(9):763-71. Epub 2005 Aug 21
- Moustacchi, E., Diattloff-Zito, C.:** DNA semiconservative synthesis in normal and Fanconi anemia fibroblasts following treatment with 8-methoxypsoralen and near ultraviolet light or with x-rays
Hum Genet 1985; 61:228-230
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S. et al.:** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73
- Nakanishi, K., Taniguchi, T., Ranganathan, V. et al.:** Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response
Nat Cell Biol. 2002 Dec;4(12):913-20
- Nakanishi, K., Yang, Y.G., Pierce, A.J. et al.:** Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 25;102(4):1110-5. Epub 2005 Jan 13

New, H.V., Cale, C.M., Tischkowitz, M. et al.: Nijmegen breakage syndrome diagnosed as Fanconi anaemia

Pediatr Blood Cancer. 2005;44(5):494-9

Niedzwiedz, W., Mosedale, G., Johnson, M. et al.: The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair

Mol Cell. 2004 Aug 27;15(4):607-20

Nordenson, I.: Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia

Hereditas 1977; 86:147-150

Nagasawa, H., Little, J.B.: Suppression of cytotoxic effect of mitomycin-C by superoxide dismutase in Fanconi's anemia and dyskeratosis congenita fibroblasts

Carcinogenesis. 1983;4(7):795-9

O'Donovan, M.C., Oefner, P.J., Roberts, S.C. et al.: Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection

Genomics. 1998 Aug 15;52(1):44-9

Oefner, P.J., Underhill, P.A.: DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)

Curr Protocols Hum Genet (Suppl), (1998) 19: 7.10.1-7.10.12

Offit, K., Levrn, O., Mullaney, B. et al.: Shared genetic susceptibility to breast cancer, brain tumors, and Fanconi anemia

J Natl Cancer Inst. 2003 Oct 15;95(20):1548-51

Pace, P., Johnson, M., Tan, W.M. et al.: FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity

EMBO J. 2002 Jul 1;21(13):3414-23

Pagano, G., Youssoufian, H.: Fanconi's anemia proteins: Concurrent roles in cell protection against oxidative damage

BioEssays 2003 ; 25 :589-595

- Pagano, G., Ahmad, S.:** Fanconi Anemia and Oxidative Stress. In: Ahmad, S., Kirk, S. (Hrsg) Molecular Mechanisms of Fanconi Anemia
Springer, New York (2006)
- Pagano, G., Degan, P., d'Ischia, M. et al.:** Gender- and age-related distinctions for the in vivo prooxidant state in Fanconi anaemia patients
Carcinogenesis. 2004;25(10):1899-909
- Pagano, G., Degan, P., d'Ischia, M. et al.:** Oxidative Stress as a multiple effector in Fanconi anemia clinical phenotype
Eur J Haematol 2005; 75:93-100
- Pearl-Yafe, M., Halperin, D., Halevy, A. et al.:** An oxidative mechanism of interferon induced priming of the Fas pathway in Fanconi anemia cells
Biochem Pharmacol. 2003 Mar 1;65(5):833-42
- Pichierri, P., Averbeck, D., Rosselli, F.:** DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein
Hum Mol Genet. 2002 Oct 1;11(21):2531-46. Erratum in: Hum Mol Genet. 2004 Jun 15;13(12):1289
- Poot, M., Gross, O., Epe, B. et al.:** Cell cycle defect in connection with oxygen and iron sensitivity in Fanconi anemia lymphoblastoid cells
Exp Cell Res. 1996 Feb 1;222(2):262-8
- Potter, N.U., Sarmousakis, C., Li, F.P.:** Cancer in relatives of patients with aplastic anemia
Cancer Genet Cytogenet. 1983 May;9(1):61-5
- Reid S, Schindler D, et al.:** Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer.
Nat Genet. 2007 Feb;39(2):162-4. Epub 2006 Dec 31.
- Reuter, T., Herterich, S. et al.:** Strong FANCA/FANCG but weak FANCA/FANCC interaction in the yeast 2-hybrid system
Blood 2000; 95:719-720

Risinger, M.A., Groden, J.: Crosslinks and crosstalk: human cancer syndromes and DNA repair defects

Cancer Cell. 2004 Dec;6(6):539-45. Review

Rosenberg, P.S., Greene, M.H., Alter, B.P.: Cancer incidence in persons with Fanconi anemia

Blood. 2003;101(3):822-6. Erratum in: Blood. 2003;101(6):2136

Rossi, G., Giorgiani, G., Comoli, P. et al.: Successful T-cell-depleted, related haploidentical peripheral blood stem cell transplantation in a patient with Fanconi anaemia using a fludarabine-based preparative regimen without radiation

Bone Marrow Transplant. 2003 Mar;31(6):437-40

Saadatzadeh, M.R., Bijangi-Vishehsaraei, K., Hong, P. et al.: Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway

J Biol Chem. 2004; 279(16):16805-12

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S. et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

Science 1988; 239:487-491

Sala-Trepat, M., Rouillard, D., Escarceller, M. et al.:

Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells

Exp Cell Res. 2000;260(2):208-15

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K. et al.:

Molecular mechanism of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints

Annual Review of Biochemistry. Volume 73, Page 39-85, Jul 2004

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; 74:5463-5467

Schindler, D., Hoehn, H.: Fanconi Anemia Mutation Causes Cellular Susceptibility to Ambient Oxygen

Eur J. Hum. Genet. 1988; 43:429-435

Sevilla, C., Moatti, J.P., Julian-Reynier, C. et al.: Testing for BRCA1 mutations: a cost-effectiveness analysis

Eur J Hum Genet. 2002 Oct;10(10):599-606

Shimamura, A., Montes de Oca, R. et al.: A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway

Blood. 2002 Dec 15;100(13):4649-54

Siddique, M.A., Nakanishi, K., Taniguchi, T. et al.: Function of the Fanconi anemia pathway in Fanconi anemia complementation group F and D1 cells

Exp Hematol. 2001 Dec;29(12):1448-55

Soulier, J., Leblanc, T., Larghero, J. et al.: Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway

Blood. 2005 Feb 1;105(3):1329-36

Swift, M.: Fanconi's Anaemia in the Genetics of Neoplasia

Nature 1971; 230:370-374

Swift, M., Caldwell, R.J. et al.: Reassessment of cancer predisposition of Fanconi anemia heterozygotes

J Natl Cancer Ins 1980; 65:863-867

Takashima, H., Boerkoel, C.F., Lupski, J.R.: Screening for mutations in a genetically heterogeneous disorder: DHPLC versus DNA sequence for mutation detection in multiple genes causing Charcot-Marie-Tooth neuropathy

Genet Med. 2001 Sep-Oct;3(5):335-42

Takeuchi, T., Morimoto, K.: Increased formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, an oxidative DNA damage, in lymphoblasts from Fanconi's anemia patients due to possible catalase deficiency

Carcinogenesis 1993; 14:1115-1120

Taniguchi, T., D'Andrea, A.D.: Molecular pathogenesis of Fanconi anemia

Int J Haematol 2002; 75:123-128

Taniguchi, T., D'Andrea, A.D.: The Fanconi anemia protein, FANCE, promotes the nuclear accumulation of FANCC

Blood. 2002 Oct 1;100(7):2457-62

Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R. et al.:

S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51

Blood. 2002 Oct 1;100(7):2414-20

Tischkowitz, M., Dokal, I.: Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects

Br J Haematol. 2004;126(2):176-91

Venkitaraman, A.R.: Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2

Cell. 2002 Jan 25;108(2):171-82

Vilcheck, S.K., O'Brien, T.J., Pritchard, D.E.: Fanconi anemia complementation group A cells are hyper-sensitive to chromium (IV) induce toxicity

Environ Health Perspect 2002; 110:773-777

Wagner, J.E., Tolar, J., Levrn, O. et al.: Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia

Blood. 2004;103(8):3226-9

Waisfisz, Q., de Winter, J.P. et al.: A physical complex of the Fanconi anemia proteins FANCG/XRCC9 and FANCA

Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 10320-10325

Wang W.: Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins.

Nat Rev Genet. 2007 Oct;8(10):735-48.

Wang, X., D'Andrea, A.D.: The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response

DNA Repair 2004; 3:1063-1069

Wang, X., Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D.: Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin

Mol Cell Biol. 2004 Jul;24(13):5850-62

Wong, A.K., Pero, R., Ormonde, P.A. et al.: RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BCR motifs in the human breast cancer susceptibility gene BRCA2

J Biol Chem 1997; 272; 31941-31944

de Winter, J.P., Waisfisz, Q. et al.: The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9

Nature Genetics 1998; 20:281-283

de Winter, J.P., van der Weel, L. et al.: The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG

Human Molecular Genetics 2000; 9:2665-2674

Wu, L., Hickson, I.D.: The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination

Nature. 2003 Dec 18;426(6968):870-4

Yamamoto, K., Ishiai, M., Matsushita, N. et al.: Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation- and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cells

Mol Cell Biol. 2003 Aug;23(15):5421-30

Yamashita, T., Kupfer, G.M. et al.: The Fanconi anemia pathway requires FAA phosphorylation and FAA/FAC accumulation

Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:13085-13090

Young, N.S., Alter, B.P.: Aplastic Anemia, Acquired and Inherited

Philadelphia, Saunders 1994

Youssoufian, H., Kruyt, F.A., Li, X.: Protein replacement by receptor-mediated endocytosis corrects the sensitivity of Fanconi anemia group C cells to mitomycin C

Blood. 1999 Jan 1;93(1):363-9

7 Anhang

7.1 Verzeichnisse von Tabellen und Abbildungen

7.1.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tab.1	Typische Anomalien bei FA-Patienten und ihre Häufigkeit	4
Tab.2	Maligne Erkrankungen bei Fanconi-Anämie-Patienten	5
Tab.3	FANC-Gene mit ihren Lokalisationen, Exons, AS sowie Molekulargewichten	12
Tab.4	FAF 959, c>t-Allelfrequenzen im Patienten- und Kontrollkollektiv	41
Tab.5	Genotypfrequenzen 959 c>t im Fanconi-F-Gen im Patienten- und Kontrollkollektiv	42
Tab.6	Mikrotiterplatte mit Position der Primer im Temperaturgradienten	42
Tab.7	Optimierte DHPLC-Bedingungen der Fanconi-Gene A, C, F und G	46-48
Tab.8	Veränderungen bei T-ALL-Patienten in den Fanconi-Genen A, C, F und G	49

7.1.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb.1	FA-Core-Komplex nach Medhurst et al., 2006	28
Abb.2	Veränderung im Fanconi-F-Gen, dargestellt in der PAGE	40
Abb.3	Darstellung des Basentausches 959 C>T im Fanconi-F-Gen in der DHPLC	41
Abb.4	Sequenziergel mit Darstellung des Basentausches 959 C>T im Fanconi-F-Gen	41
Abb.5	amplifizierte Exons der Fanconi-Platte nach Auftrennung in der PAGE, Silberfärbung	43
Abb.6	Retentionskurven bei verschiedenen Säulentemperaturen in der DHPLC am Beispiel von Abschnitt 4 des Fanconi-F-Gens	44
Abb.7	Schmelzkurve Abschnitt 4 des Fanconi-F-Gens	45
Abb.8	DHPLC bei bekannter Wildtypprobe und hetero- und homozygot veränderter Probe bei 59°C, 60°C und 61°C zur Optimierung der Analysetemperatur	45-46
Abb.9	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 25+67 a>g in der DHPLC	49
Abb.10	Darstellung der Veränderung FANCA IVS 25+67 a>g homozygot und heterozygot im Sequenziergel gegenüber dem Wildtyp	50
Abb.11	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 4-59 a>g in der DHPLC	50
Abb.12	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 4-59 a>g gegen den Wildtyp im Sequenziergel	50
Abb.13	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 7-12 a>g in der DHPLC	51
Abb.14	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 7-12 a>g in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	51
Abb.15	Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 9 796 A>G in der DHPLC	51
Abb.16	Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 9 796 A>G in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	52
Abb.17	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 10-8 a>g in der DHPLC	52
Abb.18	Darstellung der Veränderung FANCA IVS 10-8 a>g im Sequenziergel gegenüber dem Wildtyp	52
Abb.19	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 13-20 a>g in der DHPLC	53
Abb.20	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 13-20 a>g in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	53

Abb.21	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 20+15 t>c in der DHPLC	53
Abb.22	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 20+5 t>c in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	54
Abb.23	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 20+15 t>c und IVS 20+30 insGT in der DHPLC	54
Abb.24	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 20+30 insGT in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	54
Abb.25	Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 22 1927 C>G in der DHPLC	55
Abb.26	Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 22 1927 C>G in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	55
Abb.27	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 23+8 t>c in der DHPLC	55
Abb.28	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 23+8 t>c in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	56
Abb.29	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 24+73 a>g in der DHPLC	56
Abb.30	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 24+73 a>g gegen den Wildtyp im Sequenziergel	56
Abb.31	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 27-36 g>t in der DHPLC	57
Abb.32	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 27-36 g>t homo- und heterozygot in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	57
Abb.33	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 28-37 t>c in der DHPLC	57
Abb.34	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 28-7 t>c in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	58
Abb.35	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 31-4 t>c in der DHPLC	58
Abb.36	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 31-4 t>c in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	58
Abb.37	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 33+18 a>g in der DHPLC	59
Abb.38	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 33+18 a>g gegen den Wildtyp im Sequenziergel	59
Abb.39	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 33+18 a>g in der DHPLC	59
Abb.40	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 34+45 g>a gegen den Wildtyp im Sequenziergel	60
Abb.41	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 35+62 c>t in der DHPLC	60
Abb.42	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 35+62 c>t gegen den Wildtyp im Sequenziergel	60

Abb.43	Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 37 3654 A>G in der DHPLC	61
Abb.44	Darstellung der Sequenzvariation FANCA 3654 A>G gegen den Wildtyp im Sequenziergel	61
Abb.45	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 39+58 t>a in der DHPLC	61
Abb.46	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 39+58 t>a gegen den Wildtyp	62
Abb.47	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 39+62 g>t in der DHPLC	62
Abb.48	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 39+62 g>t gegen den Wildtyp in der Sequenzierung	62
Abb.49	Darstellung der Sequenzvariation FANCA Exon 40 3982 A>G in der DHPLC	63
Abb.50	Darstellung der Sequenzvariation FANCA 3982 A>G gegen den Wildtyp im Sequenziergel	63
Abb.51	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 40-97 t>c in der DHPLC	63
Abb.52	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 40-97 t>c gegen den Wildtyp im Sequenziergel	64
Abb.53	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 42+29 t>c in der DHPLC	64
Abb.54	Darstellung der Sequenzvariation FANCA IVS 42+29 t>c gegen den Wildtyp im Sequenziergel	64
Abb.55	Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 1+77 a>c in der DHPLC	65
Abb.56	Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 1+77 a>c gegen den Wildtyp im Sequenziergel	65
Abb.57	Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 5+58 c>g in der DHPLC	65
Abb.58	Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 5+58 c>g gegen den Wildtyp im Sequenziergel	66
Abb.59	Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 12+7 g>a in der DHPLC	66
Abb.60	Darstellung der Sequenzvariation FANCG IVS 12+7 g>a homo- und heterozygot in der Sequenzierung gegen den Wildtyp	66

7.2 Material- und Geräteliste

Gerät/Material	Typ	Hersteller
Agarose	NuSieve	FMC; Rockland, USA
Agarose-Kammer	GNA-200	Pharmacia; Schweden
Ammoniumpersulfat	UltraPure	GibcoBRL; Eggenstein
BlueSlick		Serva/Boehringer; Heidelberg
BPL	100 bp DNA Ladder	GibcoBRL; Eggenstein
Elektrophoresekammer	Multiphor II	Pharmacia Biotech; Freiburg
Entwicklungsmaschine	RP X-OMAT Processor	Kodak; New York
Glashaken	Pasteur-Pipetten	Selbst
Glasplatten für PAGE	26 x 12 x 0,5 cm	Hampe; Kiel
Kämme	0,4 mm Sharktooth	GibcoBRL; Eggenstein
Kühlgerät	MultiTemp III	Pharmacia Biotech
Kühlgerät	F10-C/2	Julabo; Seelbach
Millipore-Säulen	Ultrafree-DA	Millipore; Eschborn
Pipetten	Verschiedene	Gilson; Frankreich
Pipettenspitzen	Biohit/Labsystems	
Eppendorf/Gilson	Sarstedt; Nümbrecht	
PowerSupply	PS 9009	Gibco BRL; Eggenstein
Primer		Metabion, Martinsried
Proteinase K		Sigma; Steinheim
Röntgenfilme	X-Omat AR	Kodak; New York
Schüttler	MSR	Adolf Kühner AG; Basel
Schüttler	Certomat MV	BiotechInternational
SDS 20%		BioRad; CA, USA
Spacer	0,4 mm	GibcoBRL; Eggenstein
Spannungswandler	Desatronic 3000/200	Desaga; Heidelberg
Sterifilter	0,22 µm	Millipore; Eschborn
Thermocycler	Trio	Biometra; Göttingen

Trägerfolie	Gelbond PAG	BMA; Rockland, USA
Urea		Sigma; Steinheim
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge	Model10	Costar; USA

7.3 Rezepte / Ansätze / Protokolle

7.3.1 DNA-Isolierung

7.3.1.1 Hochmolekulare Phenol-/Chloroform-Extraktion

RCLB

Tris	2 M pH 7,5	10,00 mM	Merck
NaCl	3 M	12,45 mM	Merck
MgCl	1 M	0,50 mM	Merck
SDS	20%	0,01%	BioRad

TE pH 7,6

Tris		10 mM	Sigma
EDTA		1 mM	Merck

TNE 10x pH 7,6

Tris		0,10 M	Merck
NaCl		0,15 M	Merck
EDTA		0,01 M	Merck

LithiumChlorid

LiCl		4 M	Merck
------	--	-----	-------

7.3.1.2 Hochmolekulare Aufarbeitung mittels QIAamp Spinsäulen

QIAGEN Blood DNA Kit

Promega; USA

7.3.2 PCR

10xCetus-Puffer

Tris	1M	100 mM	Sigma
MgCl	100 mM	15 mM	Merck
KCl	1 M	500mM	Merck
Gelatine	2%	0,01% (v/v)	BioRad
PH 8,3 mit 1n HCl		ad 100 ml	Merck
Sterifiltration durch 0,2 µm			Milipore

Formamidpuffer

Formamid		95%	Sigma
EDTA (pH 7,5)		20mM	Merck
Bromphenolblau		0,05%	Merck
Xylen Cyanol		0,05%	Sigma

PCR-Ansatz

10xCetus		10%	s.o.
MgCl		1,0 mM	Gibco
dNTPs		0,2 mM	Pharmacia
Primer sn		2 ng/µl	metabion
Primer asn		2 ng/µl	metabion
Taq-Polymerase		2 units	Gibco

7.3.3 PAGE**APS 10%**

Ammoniumpersulfat	0,44 M	Sigma
-------------------	--------	-------

PA Gel 6%

Acrylamid / Bisacrylamid-Lsg. 30%	6,00%	Roth
-----------------------------------	-------	------

Glycerin	7,00%	Sigma
----------	-------	-------

Tris/Sulfat-Puffer 1 M pH 9,0	0,033 mM	Sigma
-------------------------------	----------	-------

APS	2,00%	Sigma
-----	-------	-------

TEMED	0,05%	Sigma
-------	-------	-------

Gel Loading Buffer 3

Bromphenolblau	0,25%	Merck
----------------	-------	-------

Xylen Cyanol	0,25%	Sigma
--------------	-------	-------

Glycerin	30%	Sigma
----------	-----	-------

TrisBorat pH 9,0

Tris	0,14 M	Merck
------	--------	-------

Borsäure	0,07 M	Merck
----------	--------	-------

7.3.4 Silberfärbung

Ethanol

Ethanol absolut p.a.	10%	Merck
----------------------	-----	-------

HNO₃

HNO ₃ 65%	1%	Merck
----------------------	----	-------

Silbernitrat

AgNO ₃	10 mM	Merck
-------------------	-------	-------

Reduktionslösung

Na ₂ CO ₃ wasserfrei	280 mM	Merck
--	--------	-------

Formalin 37%	0,02%	Merck
--------------	-------	-------

Essigsäure

Essigsäure 100% p.a.	10%	Merck
----------------------	-----	-------

7.3.5 DHPLC

Puffer A

Triethylammoniumacetat	0,1 M
Aqua	100 %

Puffer B

Triethylammoniumacetat	0,1 M
Acetonitril	25 %
Aqua	75 %

Syringe Wash Solution

Acetonitril	4-5%
Aqua	100 %

Puffer D

Acetonitril	75 %
Aqua	

7.3.6 Sequenziergel

TTE 20x (Laufpuffer)

Tris	1,78 M	Sigma
Taurin	0,58 M	Merck
EDTA	0,01 M	Merck

Gel 6%ig für ³³P

Harnstoff pur	7,0 M	Sigma
LongRanger 50% Stock-Lsg	6,0%	
20xTTE	1,2%	
DMSO	1,0%	
TEMED	0,07%	Sigma
APS 10%	0,07%	Sigma

7.3.7 Sequenzierung

Sequenzieransatz (ThermoSequenase-Kit)		Amersham
DMSO (verdünnt)	0,25µl	
Reaction Buffer	0,5µl	
Primer-Lösung	0,25µl	
Add steril	2,875µl	
Gereinigtes PCR-Produkt	0,625µl	
ThermoSequenase	0,5µl	
DGTP-Mix	0,5µl	
radioaktive Terminatoren	0,125µl	

7.4 PCR-Bedingungen der verschiedenen Exons

Gen	Exon	Denaturierung	Annealing (°C)	Zyklen	Synthese	DMSO	Ansatz (µl)
FANCA	1	95°C / 30"	62,4	40	72°C / 1'	ja	50
	2	95°C / 30"	63,2	40	72°C / 1'	nein	50
	3	95°C / 30"	61,1	40	72°C / 1'	nein	50
	4	95°C / 30"	52,6	40	72°C / 1'	nein	50
	5	95°C / 30"	52,6	40	72°C / 1'	nein	50
	6	95°C / 30"	58,2	40	72°C / 1'	nein	50
	7	95°C / 30"	63,2	40	72°C / 1'	nein	50
	8	95°C / 30"	56,8	40	72°C / 1'	nein	50
	9	95°C / 30"	58,2	40	72°C / 1'	nein	50
	10	95°C / 30"	59,6	40	72°C / 1'	nein	50
	11	95°C / 30"	59,6	40	72°C / 1'	nein	50
	12	95°C / 30"	55,3	40	72°C / 1'	nein	50
	13	95°C / 30"	63,5	40	72°C / 1'	ja	50
	14	95°C / 30"	55,3	40	72°C / 1'	nein	50
	15	95°C / 30"	63,2	40	72°C / 1'	nein	50
	16	95°C / 30"	63,2	40	72°C / 1'	nein	50
	17	95°C / 30"	55,3	40	72°C / 1'	nein	50
	18	95°C / 30"	61,1	40	72°C / 1'	nein	50
	19	95°C / 30"	58,2	40	72°C / 1'	nein	50
	20						
	21	95°C / 30"	58,2	40	72°C / 1'	nein	50
	22	95°C / 30"	53,4	40	72°C / 1'	nein	50
	23	95°C / 30"	53,4	40	72°C / 1'	nein	50
	24	95°C / 30"	56,8	40	72°C / 1'	nein	50
	25	95°C / 30"	59,6	40	72°C / 1'	nein	50
	26	95°C / 30"	61,1	40	72°C / 1'	nein	50
	27	95°C / 30"	59,6	40	72°C / 1'	nein	50
	28	95°C / 30"	62,4	40	72°C / 1'	nein	50
	29	95°C / 30"	53,4	40	72°C / 1'	nein	50
	30	95°C / 30"	55,3	40	72°C / 1'	nein	50
	31	95°C / 30"	59,6	40	72°C / 1'	nein	50
	32	95°C / 30"	58,2	40	72°C / 1'	nein	50
	33	95°C / 30"	58,2	40	72°C / 1'	nein	50
	34	95°C / 30"	58,2	40	72°C / 1'	nein	50
	35	95°C / 30"	58,2	40	72°C / 1'	nein	50
	36	95°C / 30"	59,6	40	72°C / 1'	nein	50
	37	95°C / 30"	63,2	40	72°C / 1'	nein	50
	38	95°C / 30"	59,6	40	72°C / 1'	nein	50
	39	95°C / 30"	51,8	40	72°C / 1'	nein	50
	40	95°C / 30"	62,4	40	72°C / 1'	nein	50
	41	95°C / 30"	61,1	40	72°C / 1'	nein	50
	42	95°C / 30"	61,1	40	72°C / 1'	nein	100
	43	95°C / 30"	63,5	40		nein	50

Gen	Exon	Denaturierung	Annealing (°C)	Zyklen	Synthese	DMSO	Ansatz (µl)
FANCC	1	95°C / 30"	51,8	40	72°C / 1'	nein	50
	2	95°C / 30"	55,3	40	72°C / 1'	nein	50
	3	95°C / 30"	53,4	40	72°C / 1'	nein	50
	4	95°C / 30"	56,8	40	72°C / 1'	nein	50
	5	95°C / 30"	62,4	40	72°C / 1'	nein	50
	6	95°C / 30"	63,5	40	72°C / 1'	nein	50
	7	95°C / 30"	56,8	40	72°C / 1'	nein	50
	8	95°C / 30"	53,4	40	72°C / 1'	nein	50
	9	95°C / 30"	63,5	40	72°C / 1'	nein	50
	10	95°C / 30"	61,1	40	72°C / 1'	nein	50
	11	95°C / 30"	51,8	40	72°C / 1'	nein	50
	12	95°C / 30"	51,8	40	72°C / 1'	nein	50
	13	95°C / 30"	53,4	40	72°C / 1'	nein	50
	14	95°C / 30"	61,1	40	72°C / 1'	nein	50
FANCF	1	95°C / 30"	63,2	40	72°C / 1'	nein	50
	2	95°C / 30"	62,4	40	72°C / 1'	nein	50
	3	95°C / 30"	62,4	40	72°C / 1'	nein	50
	4	95°C / 30"	55,3	40	72°C / 1'	nein	50
	5	95°C / 30"	56,8	40	72°C / 1'	nein	50
FANCG	1	95°C / 30"	52,5	40	72°C / 1'	nein	50
	2	95°C / 30"	63,5	40	72°C / 1'	nein	50
	3	95°C / 30"	63,5	40	72°C / 1'	nein	50
	4	95°C / 30"	62,4	40	72°C / 1'	nein	50
	5	95°C / 30"	56,8	40	72°C / 1'	nein	50
	6	95°C / 30"	55,3	40	72°C / 1'	nein	50
	7	95°C / 30"	53,4	40	72°C / 1'	nein	50
	8	95°C / 30"	62,4	40	72°C / 1'	nein	50
	9	95°C / 30"	52,6	40	72°C / 1'	nein	50
	10	95°C / 30"	55,3	40	72°C / 1'	nein	50
	11	95°C / 30"	61,1	40	72°C / 1'	nein	50
	12	95°C / 30"	63,5	40	72°C / 1'	nein	50
	13	95°C / 30"	63,5	40	72°C / 1'	nein	50
	14	95°C / 30"	59,6	40	72°C / 1'	ja	50

7.5 Oligonukleotide (Primer)

Gen	Exon	sn-Primer	asn-Primer
FANCA	1	ggc cgc agc caa tag gaa gg	gat cgg gga acc ggc gaa ac
	2	gat ggt ggg ttt ctc cgc gg	gaa ctc ccg ggc tca ggc gac
	3	gga gtt tgt tgt gtt ttg g	aca tcc cat aga att tgc g
	4	gtg tca tgt gtt aag aga aag c	atg tcc tat ttc cca acc agc
	5	agc tgg ttg gga aaa tag g	gat caa cag aac att gcc tgg
	6	gcc caa agg cca ggg agt tt	agc cag aaa tca aac ccg tct ga
	7	ggg aca tat ggc tca act caa tc	gag aca ggc tgt tct gcc tgg c
	8	ctg aag tgg atg gtc tgt gcc	ccc gta aat agg tac aaa cag c
	9	gca ggt atc aca caa att aca g	gca cag tga aac ata cag agg
	10	gta gaa gtc ttg atg gat gtg	ctg ctg aag ctc tgg aag tc
	11	gat tgg tgg gtt gcg tgc aag gc	aga att cc tgg cat ctc cag tc
	12	ccc aca act ttt tga tct ctg	cg t cca cgg cag gca gct g
	13	gag ctg tca cag ctc cat gtg	gtg gga agg gct tca ctg ag
	14	gga ata ctt gat cac cca gc	gct gac agc aag gtt gct cac
	15	agg agg ccg act aca gc	ctt ggg gag gcc aag gca gtc
	16	cag cac tgt gga tgt tgg aag	gaa aac aaa gca gtt tct gct gg
	17	cca tgc cca gtc ctc aca cc	aaa aga aac tgg acc ttt gca t
	18	cgc aca gca tgt ggg cct tta cc	gaa tag aca gtg gcc aac ctg
	19	gaa aca ccg gtc acc gtc tgt g	
	20		aga tcc acg att ctc gca ttg tc
	21	cag gct cat act gta cac ag	cac cgg ctt gag ctg gca cag
	22	gtt cac agc tct gta ttt gac	cta ctg gac tac tag gaa gac
	23	agc agg atc cgt gga atc gta c	gag aag gct cca tgc gtc taa tg
	24	gct ggc cgg gct tcc ttc	cg g aga cga gct cat gag tc
	25	ttc ttc ggc cgc tgg tgg ttg	cga caa tga ggg tgg cag agc aga
	26	gag ggc cag gct gct act t	gac acg ata aaa ttc tgg aag g
	27	cag gcc atc cag ttc gga atg	cct tcc ggt ccg aaa gct gc
	28	gtg tgg gct gtt gat ggt ctg tt	ctg ttc ttg ccc gag gag cac a
	29	gtg tgt tct gtc ctc att g	gat tca aga gat ctc ctg cc
	30	gtc ccg agc cgc cag tc	aag gca gac cca ccc taa g
	31	gga gaa ctg gga act tca gca cta	gtt ctg gga tta cag gcg tga g
	32	ctt gcc ctg tcc act gtg gag	ctc act aca aag aac ctc tag g
	33	gac aca ggc caa ggc tct g	ggc att cca gac act gtt cc
	34	gcc aag cct tag cga gtg ttt	agc agg agg tca gcg gtt tgt
	35	gga tcc tcc tgt cag ctt cct g	ttt ccc tga gat ggt aac acc
	36	gtc atg gct ggg gca gcg gag	gca tct ggg ccg gca cac
	37	ggt gac agg tgg gaa taa gga c	ctt gct cca agc cac ata ttt g
	38	agg att tat ggc cta gat gta aaa a	ctg gtg ccc ctg cct gg
	39	gca aag tag gaa atg ccc tgt t	ggg ctc gtt ctt aac cat ttg
	40	cca gct gct gac agg tac c	gga ccc aga agt gct gag atg
	41	ccc cat ctc agc act tct ggg tcc	cca tag tct gca tgc tgt gc
	42	gca cag cat gca gac tat gg	gtc gag ttg tat tgc cag cc
	43	cct ggc tgg caa tac aac tc	ggc agg tcc cgt cag aag aga t

Gen	Exon	sn-Primer	asn-Primer
FANCC	1	acc att tcc tt cag tgc tgg	acc aca agt ccc gat tct ggg
	2	ccc tca atc tat aat gtc cag	gta agc ctc tgt gaa aca atg
	3	tag tga ttt gag att ttc c	gca gca ctt tta aat aat c
	4	gta ggc att gta cat aaa ag	tgg cac att cag cat taa ac
	5	ctg atg taa tcc tgt ttg cag	cct ctc ata acc aaa ctg ata c
	6	gtc ctt aat tat gca tgg ctc	caa cac acc aca gcc ttc taa g
	7	ttt tca gtg agc cat ttc tg	aaa tga gtc caa gca tgt cc
	8	ctc ctt tgg ctg ata ata gc	ccc atg ata cag cca gag ac
	9	ttt ccc tta tac agt gca gg	gtg ctc ttg tcc aaa ata ctc
	10	ttc ctg acc ccg ttt caa tc	ttg aca atg ctc ttc cca gg
	11	gtg aac cag aag taa agg gc	agg atc tag gga aac cat g
	12	ccc aaa gga aga aga att tag	ctc tag ccc ccc aga gcc
	13	cct aga agt atg tct gtc ctg	ctc tcc ttg act agg atg ctg
	14	gga tag ggc ttc ttt cag gg	tcc caa gat gtg tac agc tc
FANCF	1	ctt cgc gca cct cat gga atc c	gtt ctc cag cag gcg cag ag
	2	cca gtt ccg gga tta gcg aac	cag gct gct gag aaa cct gg
	3	gac tct ctg atg aag acc c	ctg tta gca gac cca gat ag
	4	gaa ttc gga agt ctt tgc tgc	cta aat gca cca cta cga aga g
	5	gga act gag tcc caa gat g	ggg gag aac att gta att ttc att ttg
FANCG	1	cag ctt cac cct tcc taa gtc c	att tct ggc tct ttg gtc aag c
	2	gga ttg atc ctc agt gac aac c	tgt gcc tta aac agg act ccc
	3	agt ggg gtg atc tct gag ttg g	acc tca acc tgg tct gaa gag c
	4	agg atg agg tgc tac ttc agc	gaa tcc agg ttt tcc gac cac ca
	5	atg gag ata gga gaa gac ggg	ggg aac aag ggt cta aga agc
	6	gct cta tag ccc tct cca agc tc	ctg caa cca agt aca aca gtg c
	7	cca caa gca tta tgt ata gc	cac ccc atc aca agc acc tca g
	8	gga ttc ctg agg tgc ttg tga tg	gga ggc atc aga agt ggg aag
	9	cca tga aca tcc atc tgt tag c	cag tct tgc tgt att tca aag g
	10	ctc atg cct ttc aag aca ctg c	caa ttt cag aaa ctc tag gg
	11	gaa att gat tcc tct tca ccc c	cag tca cca aaa ccc caa atc c
	12	gac aca aga aga aat aga gga gg	aac acc act ctt aca ctt acg cc
	13	gcc taa gac tat gtc aag ttc	aaa gat tgg cag aaa gct ggg
	14	ttg gtg tcc tag agt cct tgg	ttc aaa acg tgg cag cta cag g

7.6 EDV-Software

Programm	Typ	Hersteller
WAVEMAKER		Transgenomic, Omaha, USA
Dnasis	Ver. 2.1 for Windows	Hitachi, Japan

7.7 Patientendaten, soweit bekannt

Probe	Material	Diagnose	Gruppe	Gefundene Veränderung
FF1	NMC KM	FA,AML	FA,AML	
FF2	NMC KM	FA	FA	
FF3	NMC KM	FA	FA	
FF4	NMC KM	RA	MDS	
FF5	NMC KM	RAEB	MDS	
FF6	NMC KM	RAEB-t	MDS	
FF7	NMC KM	RA	MDS	
FF8	NMC KM	RA	MDS	
FF9	NMC KM	RAEB	MDS	
FF10	NMC KM	RAEB	MDS	
FF11	NMC KM	RA	MDS	
FF12	NMC KM	RAEB-t	MDS	
FF13	NMC KM	RA	MDS	
FF14	NMC KM	RAEB	MDS	
FF15	NMC KM	sek.RAEB,RAEB-t	MDS	
FF16	NMC KM	RAEB-t	MDS	
FF17	NMC KM	RA	MDS	
FF18	NMC KM	RA	MDS	
FF19	NMC KM	RAEB	MDS	
FF20	NMC KM		2°CMML	
FF21	NMC KM		2°CMML	
FF22	NMC pBl		2°CMML	
FF23	NMC pBl		2°CMML, MDS	
FF24	NMC KM		2°CMML	
FF25	NMC Milz		JMML	
FF26	NMC Milz		JMML	
FF27	NMC Milz		JMML	
FF28	NMC Milz		JMML	
FF29	NMC Milz		JMML	
FF30	NMC Milz		JMML	
FF31	NMC Milz		JMML	
FF32	NMC Milz		JMML	
M 318	KM (>50%Blasten)	FAB M5A/FAB M4		
P 254	KM (>80%Blasten)	M2	AML	
N 179	KM (36,5%Blasten)	FAB M7,Trisomie21	AML	
P 525	KM (75%Blasten)	FAB M7,Trisomie21	AML	
24		M1	AML	
P 279	KM (80%Blasten)	M7	AML	
G 44	KM	M4	AML	
K 276	KM (0 Blasten)		FA	
L 613	pBl		FA	

Probe	Material	Diagnose	Gruppe	Gefundene Veränderung
L 419	pBl		FA	
K 633	KM		FA	
PEK 130487			NBS	
PEKka	pBl		AML	
PEKbj	MNC KM		AML	
PEK 270482			AML	
PEKja	MNC KM		AML,T-ALL	
HA 12			FA	
HA 17	pBl		CML	
HA 366	pBl		SAA	
HA 72			FA	
HA 81			SAA	
HA 89			VACTERL-H	
HA 90		B-NHL	FA, AML	
HA 98			VACTERL-Ass	
HA 103		M 5	AML	
HA 104		M 2	AML	
HA 105		M 2	AML	
HA 106		M 3	AML	
HA 108		M 5	AML	
HA 111			VACTERL	
HA 112		M 3	AML	
HA 113		M 5	AML	
HA 114		M 5	AML	
HA 115		M 4	AML	
HA 116			AML	
HA 118		M 2	AML	
HA 119		M 5	AML	FANCF 959 C>T
HA 120		M 2	AML	
HA 121		M 4	AML	
HA 122		M 4	AML	
HA 123		M 2	AML	
HA 124			AML	FANCF 959 C>T
HA 125		M 2	AML	
HA 126		M 3	AML	
HA 127		M 2	AML	
HA 128			AML	
HA 129			AML	
HA 130		M 5	AML	
HA 131			AML	
HA 132			AML	
HA 133			AML,T-ALL	
HA 134			AML	
HA 135		M 4	AML	
HA 136			AML	
HA 137			AML	
HA 138		M 5	AML	
HA 139		M 5	AML	
HA 140		M 2	AML	

Probe	Material	Diagnose	Gruppe	Gefundene Veränderung
HA 141		M 2	AML	
HA 142	pBl		FA	
HA 143	MNC KM		MDS,C-ALL	
HA 144	pBl		AML,Tris 21	
HA 150	KM	Ewing-Sarkom	AML,MDS	
HA 165	pBl (n.getrennt)		Panmyelopathie	
HA 219	KM Buffy Coat		AML	
HA 220	KM Buffy Coat	M 0	AML	
HA 221	KM Buffy Coat		AML	
HA 222	KM Buffy Coat	M 7	AML	
HA 223	KM Buffy Coat	M 7	AML	
HA 224	KM Buffy Coat		AML	
HA 225	KM Buffy Coat	M 6	AML	
HA 226	KM Buffy Coat		AML	
HA 227	KM Buffy Coat		AML	
HA 228	KM Buffy Coat		AML	
HA 229	KM Buffy Coat		AML	
HA 230	KM Buffy Coat		AML	
HA 244			SAA	
HA 260	pBl		FA	
HA 294			FA	
HA 297			FA	
HA 305	MNC KM (initial)		JMML	
HA 307	pBl		CML	
HA 308	MNC KM		AML	
HA 309	MNC KM		CML	
HA 310	MNC KM		ALL	
HA 311	MNC KM		JMML	
HA 312			CML	
HA 295	30%Blasten,nicht getrennt	M 4 , E0	AML	
HA 514			MDS	
HA 488		Unklare Chromosomenbrüchigkeit		
HA 453			AML	
HA 454			AML	
HA 455			AML	
HA 456			AML	
HA 457			AML	
HA 458			AML	
HA 459			AML	
HA 460			AML	
HA 461			AML	
HA 462			AML	
HA 463			AML	
HA 487		Unklare Strahlensensibilität		
HA 492			T-NHL	
HA 493			c-ALL	
HA 5145	pBl(70%Blasten)			
HA 507	KM (initial)		AML	

Probe	Material	Diagnose	Gruppe	Gefundene Veränderung
HA 515	pBl		JMML	
P 052			AML	
P 890			AML	
6	KM	FAB M 2	AML	
K 368		nach Osteosarkom	NHL	
F 23			NHL	
K455			ALL	
R 336	KM	M 3	AML	
K 742	KM		AML	
D 35			AML	
B 039	KM		AML	
C 052			AML	
K 004			AML,MDS	
B 026		M 7	AML	
N 308			AML	
B 17	KM		AML	
P 368			AML	
P 999			AA	
P757			ALL	
HA 685			AML	
HA 5111	MNC KM	CMML	MDS	
HA 5112	MNC KM		V.a. AML	
HA 5113	MNC KM		AML	
HA 5114	MNC KM		V.a.sek.MDS	
HA 5115	MNC KM	M 4	AML	
HA 5116	MNC KM	RAEB	MDS	
HA 5117	MNC KM		MDS	
HA 5118	MNC KM		AML	
HA 5119	MNC KM		AML	
HA 5120	MNC KM	M 1	AML	
HA 5121	MNC KM	M 4	AML	
HA 5122	MNC KM		AML	
HA 5123	MNC KM		AML	
HA 5124	MNC KM	M 7	AML	
HA 5125	MNC KM		AML	
HA 5126	MNC KM	M 5	AML	
HA 5127	MNC KM	M 5	AML	
HA 5128	MNC KM	RAEB-T	MDS	
HA 5129	MNC KM		AML	
HA 5131	MNC KM	M 2	AML	
HA 5133	MNC KM		AML	
HA 5134	MNC KM		AML	
HA 5136	MNC KM	M 2	AML	
HA 5137	MNC KM	RAEB-T	MDS nach KMT	
HA 5146			AML	
HA 5147			CML	
HA 5148			AML	
HA 5149			AML	
HA 497			AA	

7.8 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
ATLD	Ataxia teleangiectasia like disorder
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMML	Chronisch myelomonozytäre Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
DEB	Diepoxybutan
DHPLC	Denaturierende High Performance Liquid Chromatography
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FA	Fanconi-Anämie
FAAP	Fanconi anemia associated protein
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GH	Gonadotropes Hormon
GVDH	Graft-versus-host-disease
HLA	Human Leukocyte Antigen
HR	homologer Rekombination
ICL	interstrand cross-links
IFN	Interferon
IL6	Interleukin 6
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie

KMT	Knochenmarktransplantation
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie Typ 1
MMC	Mitomycin C
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NBS	Nijmegen-Breakage-Syndrom
NLS	Nuclear Localisation Signal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PUVA	8-Methoxy-Psoralen plus UV-A
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SSC-Analyse	Single-strand-conformation-Analyse
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA
TAR	Thrombozytopenia with absence of radii
TE-Puffer	Tris-EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylendiamin
TLS	translesion synthesis
TNE-Puffer	Tris-NaCl-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
TPR	tetratricopeptide repeat motifs
TTE	Tris-Taurin-EDTA
WT	Wildtyp

7.9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Frühjahr 2000 bis Frühjahr 2001 im molekularbiologischen Labor der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schneppenheim gilt für die Vergabe des Themas der Dissertation, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die freundliche Unterstützung besonderer Dank. Weiter bedanke ich mich bei Herrn Dr. Johannes Rischewski für die intensive Betreuung des praktischen Teils und die Diskussion des wissenschaftlichen Hintergrunds der Arbeit.

Für die von allen Seiten freundliche Aufnahme im Labor sowie die mir entgegengebrachte Unterstützung in der Methodik von allen Mitarbeitern des Labors möchte ich stellvertretend Frau Belinda Weber und Herrn Tobias Obser danken.

7.10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.