

Aus dem Zentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. R. Schneppenheim

**„Molekulargenetische Untersuchungen des Fanconi Anämie C
Gens bei Kindern mit malignen Erkrankungen“**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

HENNING CLAUSEN

aus Kiel

Hamburg, 2008

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 27.11.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Kerstin Kutsche

Für

Sascha und Daniel

Inhaltsverzeichnis

1. Glossarium	S. 6
2. Einleitung	S. 8
2.1) Die Fanconi Anämie und ihre molekulargenetischen Grundlagen	S. 8
2.2) Das Malignomrisiko bei der Fanconi Anämie	S. 13
2.3) Die Stellung des heterozygoten Erbanlageträgers	S. 15
2.4) Fanconi Anämie C Gen Veränderungen bei Malignompatienten	S. 16
2.5) Arbeitshypothese und Fragestellung	S. 18
3. Material und Methoden	S. 19
3.1) Vorgehensweise	S. 19
3.2) Patienten	S. 20
3.3) DNA Isolierung	S. 21
3.4) Polymerasekettenreaktion (PCR)	S. 22
3.5) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	S. 22
3.6) Silberfärbung	S. 23
3.7) DNA Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSC)	S. 23
3.8) Aufreinigung der PCR Produkte	S. 23
3.9) Sequenzierung	S. 24
3.10) Klonierung	S. 25
3.11) Denaturierende hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (dHPLC)	S. 26
3.12) Restriktionsfragment Längenpolymorphismus Analyse	S. 27
3.13) Statistische Auswertung	S. 28
4. Ergebnisse	S. 31
4.1) Vorstellung der Ergebnisse	S. 31
4.2) Bekannte heterozygote Fanconi Anämie C Gen Polymorphismen	S. 32
4.3) Bekannte Fanconi Anämie C Gen Mutationen	S. 34
4.4) Neue heterozygote Fanconi Anämie C Gen Mutationen	S. 38
4.5) Neue homozygote Fanconi Anämie C Gen Mutationen	S. 44
4.6) RFLP Analyse des Intron 11 Polymorphismus	S. 47
4.7) Ergebnisse der statistischen Auswertung	S. 48

5. Diskussion	S. 51
6. Zusammenfassung	S. 58
7. Literaturverzeichnis	S. 59
8. Anhang	S. 74
8.1) Abbildungsverzeichnis	S. 74
8.2) Tabellenverzeichnis	S. 74
8.3) Material- und Geräteliste	S. 75
8.4) Rezepte	S. 77
8.5) Oligonukleotide (Primer)	S. 82
8.6) Daten des Patienten- und Normalkollektivs	S. 84
8.7) Protein kodierende cDNA- und Aminosäuresequenz des Fanconi Anämie C Gens	S. 85
9. Danksagung	S. 86
10. Eidesstattliche Erklärung	S. 87

1.) Glossarium

A	Adenin
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BPL	base pair ladder (Basenpaarskalierung)
BRCA1	Brustkrebs assoziiertes Protein 1
BRCA2	Brustkrebs assoziiertes Protein 2
C	Cytosin
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
dHPLC	denaturing high performance liquid chromatography (denaturierende hochauflösende Flüssigkeitschromatographie)
DEB	Diepoxybutan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dITP	Desoxyinosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
FA	Fanconi Anämie
<i>FANCA</i>	Fanconi Anämie A Gen
<i>FANCB</i>	Fanconi Anämie B Gen
<i>FANCC</i>	Fanconi Anämie C Gen
<i>FANCD1</i>	Fanconi Anämie D1 Gen
<i>FANCD2</i>	Fanconi Anämie D2 Gen
<i>FANCE</i>	Fanconi Anämie E Gen
<i>FANCF</i>	Fanconi Anämie F Gen
<i>FANCG</i>	Fanconi Anämie G Gen
<i>FANCI</i>	Fanconi Anämie I Gen
<i>FANCL</i>	Fanconi Anämie L Gen

Fam.	Familie
G	Guanin
GEFA	Deutsches Fanconi Anämie Register
HbF	Fetales Hämoglobin
IFAR	Internationales Fanconi Anämie Register
JMML	Juvenile Myelomonozytäre Leukämie
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMC	Mitomycin C
NADPH	Nicotinamid Adenine Dinucleotid Phosphat
NHL	Non Hodgkin Lymphom
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
RCLB	Red cell lysis buffer (Erythrozytenlysepuffer)
RFLP	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SAA	Schwere Aplastische Anämie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SSC	single strand conformation analysis (Einzelstrangkonnformationsanalyse)
T	Thymin
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie vom T-Zelltyp
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TTE	Tris-Taurin-EDTA
UV	Ultraviolett
VACTERL	Dysplasiesyndrom mit Vertebraldefekt (V), Analtresie (A), Cardialdefekt (C), Tracheoösophagealer Fistel (T), Ösophagusatresie (E), Renale Dysplasie (R), Extremitätendysplasie (L)
WT	Wildtyp

2.) Einleitung

2.1) Die Fanconi Anämie und ihre molekulargenetischen Grundlagen

Im Jahre 1927 veröffentlichte der Kinderarzt Guido Fanconi, dessen Lebenswerk von Stevens und Meyer später gewürdigt wurde [114], eine Arbeit mit dem Titel „Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution)“ [40].

Damit wurde erstmals eine solche Erkrankung mit schwerer aplastischer Anämie im Kindesalter von anderen Panzytopenien differenziert. 1933 wurde das Krankheitsbild mit einem eigenen Namen, „*Fanconi Anämie*“, belegt [76]. Im Jahre 1966 beleuchtete Guido Fanconi die klinischen Aspekte dieses Krankheitsbildes in einer weiteren Veröffentlichung [41]. Das von Estren und Dameshek (1947) beschriebene und nach ihnen benannte Syndrom [38] entspricht bis auf das Fehlen kongenitaler Malformationen dem Vollbild der Fanconi Anämie und wurde entsprechend 1984 als Variante der Fanconi Anämie bezeichnet [89]. Die klinische Variabilität des Krankheitsbildes machte die Differentialdiagnose der Fanconi Anämie schwierig und führte zunächst zu einer Beschreibung der klinisch schweren Fälle mit Hyperpigmentierung der Haut (z.B. Café au lait Flecken), Strabismus, Hyperreflexie, Hypogenitalismus, Mikrocephalie und Hypo- oder Aplasien des Daumens bzw. des Radius [52]. Nieren- und Urogenitalfehlbildungen [65] sowie VACTERL Syndrome bei Zwillingen mit Fanconi Anämie wurden beschrieben [33]. Bei rund einem Drittel der Patienten fanden sich in einer Untersuchung von Strathdee et al. dagegen keine Malformationen [116].

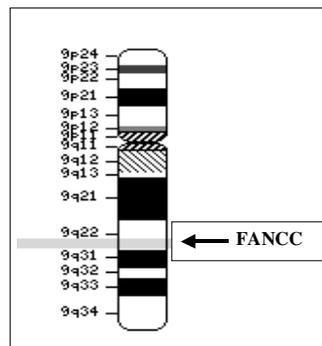
Als Schroeder et al. 1964 die Entdeckung machten, dass Lymphozyten von Fanconi Anämie Patienten spontane Chromosomenaberrationen in etwa 25 % der untersuchten Zellen trugen [106], bot dies eine wesentliche diagnostische Hilfe. Die Stabilität der genetischen Information ist essentiell für eine normale Funktion der Körperzellen.

Schroeder et al. postulierten im Verlauf, dass das Fanconi Anämie Genprodukt am Mechanismus und Metabolismus der Chromosomen mitbeteiligt sein müsse [107]. Die Forscher hatten bereits 1966 aufgrund der klinischen Variabilität der Fanconi Anämie angenommen, dass verschiedene Mutationen zum klinischen Phänotyp führen [105]. Durch eine genetische Untersuchung konnte 1976 ein autosomal rezessiver Erbgang für die Fanconi Anämie bestätigt werden [108]. Eine Pränataldiagnostik in betroffenen Familien zeigte, dass bis zu 25% der Feten betroffen waren [19, 20]. Lediglich für die seltene Komplementationsgruppe B wurde eine X-chromosomale Vererbung nachgewiesen [84].

In den sich anschließenden Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Stoffe auf die Chromosomeninstabilität bei Fanconi Anämie Patienten entdeckten Sasaki et al. [103, 104], dass die DNA dieser Patienten besonders sensibel gegenüber bi- oder polyfunktionellen Alkylanzien wie beispielsweise Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB) ist. Diese Alkylanzien führen zu einer Vernetzung der DNA Stränge, sog. „crosslinks“. Die Reparatur solcher DNA Defekte erfolgt normalerweise durch homologe Rekombination. Ein essentielles Protein hierfür stellt RAD51 dar, welches bei Fanconi Anämie Patienten verminderte Aktivität in nuklearen Foci nach Induktion von DNA Schäden zeigt [36]. Die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen kann bei einem Mangel an RAD51 auch unabhängig davon durch sog. „single strand annealing“ erfolgen. Dieses ist mit einer erhöhten Fehlerquote bzw. Mutationsrate verbunden, die möglicherweise zu den für Fanconi Anämie Patienten typischen Chromosomenaberrationen führt. Als diagnostischer Test wird die MMC bzw. DEB Empfindlichkeit bei Fanconi Anämie Patienten heute regulär im Rahmen von Zellzyklusanalysen untersucht [17, 37, 70, 109].

Zakrzewski et al. konnten 1980 mittels Zellfusionsexperimenten bei Fanconi Anämie Patienten zeigen, dass die Erkrankung genetisch heterogen ist [141]. In einem Teil der differenzierbaren Komplementationsgruppen konnte durch Kopplungsanalysen innerhalb der Familien das zugehörige Fanconi Anämie Gen lokalisiert werden [62, 63, 64, 130, 131, 132]. So wurde 1992 das Fanconi Anämie Gen der Komplementationsgruppe C (*FANCC*) auf dem langen Arm des Chromosoms 9 (9q22.3) lokalisiert [117, 49].

Abb. 1: Chromosom 9 und das Fanconi Anämie C Gen (*FANCC*)



Lokalisation des Fanconi Anämie C Gens (*FANCC*) auf dem langen Arm des Chromosoms 9 im Bereich 9q22.3 (siehe Pfeil).

Die Analyse der zugrunde liegenden DNA Reparaturdefekte bei Fanconi Anämie Patienten ist in der Folge schwierig geblieben und bis heute nicht abschließend beurteilbar. Auf molekularer Ebene haben Untersuchungen der klonierten Fanconi Anämie Gene gezeigt, dass die Proteine FANCA, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG und FANCL sich zu einem Komplex im Bereich des Zellkerns zusammenlagern [27, 34, 53]. Diesem Proteinkomplex gehören höchstwahrscheinlich noch andere Moleküle an, wie beispielsweise FANCI und FANCI [78]. Innerhalb dieses Proteinkomplexes ist FANCL für die Monoubiquitinierung des FANCD2 Proteins verantwortlich [46, 56, 72, 85, 111, 135]. Dabei ändert das FANCD2 Protein in einer Art Schlüsselposition unter Einwirkung dieses Proteinkomplexes seinen Aktivierungsgrad und wird zu Arealen im Zellkern verlagert, die - neben den Brustkrebs assoziierten Proteinen BRCA1 und BRCA2 - auch FANCB und andere wichtige DNA Reparaturproteine enthalten [111, 61, 42]. Nach Abschluß der DNA Reparatur wird FANCD2 durch „ubiquitin specific protease 1“ (USP1) deubiquitiniert und damit in seinen Ausgangszustand versetzt [87]. Howlett et al. entdeckten in diesem Zusammenhang, dass biallelische Mutationen von Fanconi Anämie Patienten der seltenen Gruppe *D1* im Bereich des Brustkrebs assoziierten Gens 2 (*BRCA2*) liegen, dass heißt *FANCD1* ist mit *BRCA2* identisch. Daraus folgerten Howlett et al., dass Keimbahnmutationen der betroffenen Fanconi Anämie Patienten zu einem ähnlich erhöhten Risiko für die Entstehung maligner Erkrankungen führen müssten, wie dies für betroffene Familien mit Mutationen der Gene *BRCA1* und *BRCA2* gilt [58]. Yang et al. fanden im Jahre 2002 [139], dass das *BRCA2* Protein neben einer Bindungsstelle für das Protein RAD51 [126, 68] auch eine Bindungsstelle für das Protein „deleted in split hand / split foot 1 region“ (*DSS1*) besitzt. Es ist so in der Lage, einzelsträngige DNA zu binden. Die Fähigkeit der *BRCA1* und *BRCA2* Proteine, durch oxidativen Stress induzierte Schäden der DNA zu reparieren [92], verdeutlicht ihre unmittelbare Beziehung zu den gegenüber solchen Einflüssen besonders sensiblen Zellen der Fanconi Anämie Patienten [27, 60].

Bei Fanconi Anämie Patienten sind diese Funktionsabläufe in der Zelle nachhaltig gestört. Es kommt zu einem funktionsunfähigen Proteinkomplex mit der Folge einer fehlenden Monoubiquitinierung des FANCD2 Proteins und einer verminderten Aktivität von FANCD2 in Zellkernbereichen, welche *BRCA1* und *BRCA2* enthalten.

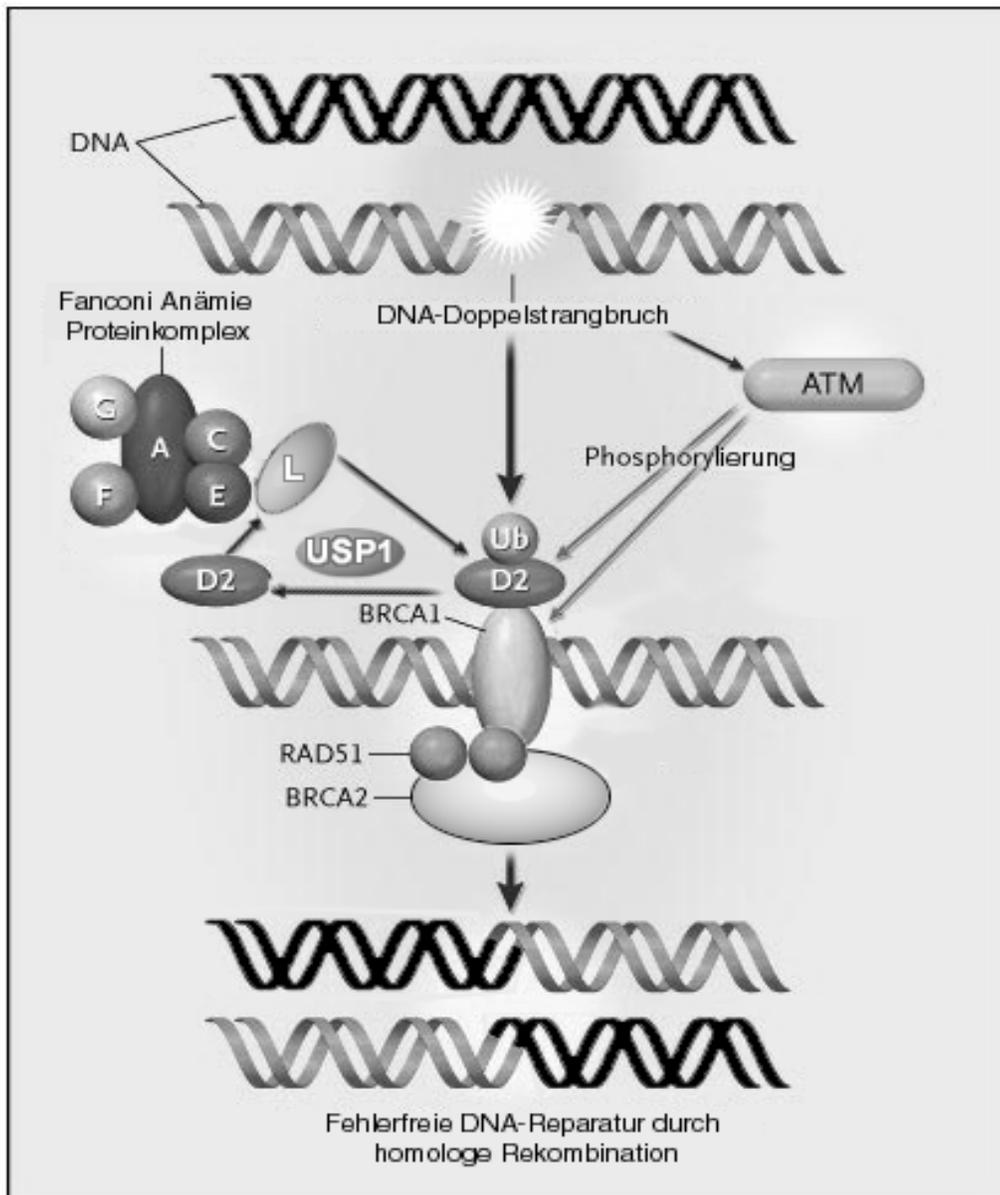
Weitere zelluläre Interaktionen der Fanconi Anämie Proteine sind für FANCB und FANCL nachgewiesen [83]. Für das FANCA Protein bestehen Wechselwirkungen mit den Proteinen „human alpha spektrin II“ und „sorting nexin-5“ (*SNX5*) [82, 91]. Für das FANCC Protein sind unter anderem Wechselwirkungen mit den Proteinen „humanes alpha spektrin II“,

„signal transducer and activator of transcription 1“ (STAT1), „cyclin-dependent kinase“ (cdc2) und NADPH Cytochrom P450 Reduktase beschrieben [69, 73, 82, 93]. Auch das Tumorsuppressor Gen *p53* scheint hier eine Rolle zu spielen. Bei der Kreuzung von knock-out Mäusen, die für *FANCC* und *p53* defizient waren, konnten im Tiermodell maligne Tumoren beobachtet werden, wie sie typisch für Fanconi Anämie Patienten sind [44]. *FANCC* defiziente Stammzellen können unter experimentellem Selektionsdruck zu akuten myeloischen Leukämien in transfizierten Mäusen führen [57, 79]. Das Ataxia telangiectasia mutierte Protein (ATM) kann nach ionisierender Strahlenschädigung der DNA das FANCD2 Protein durch Phosphorylierung in einen anderen Aktivierungszustand bringen [123] und spielt bei der Funktion der Fanconi Anämie Proteine möglicherweise eine entscheidende Kompensationsrolle [100, 67].

Das Protein „meiotic recombination homolog A“ (MRE11A), das bei Defekten zu Ataxia telangiectasia ähnlichen Erkrankungen führt, scheint mit dem FANCD2 Protein ebenfalls zu interagieren und wird in immortalisierten FANCD2 Zellen herunterreguliert [115]. Da MRE11A in der Zelle mit dem Nijmegen Breakage Syndrom Protein „Nibrin“ und RAD51 interagiert und an der Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase beteiligt ist [124, 125], könnte das FANCD2 Protein so einen Einfluß auf den Zellzyklus haben. Das *FANCC* Protein scheint für die G2-Checkpunktfunktion innerhalb des Zellzyklus essentiell zu sein [43]. Eine Störung dieser Prozesse könnte die Entartung der Zelle zur Folge haben und zur Entstehung von Malignomen führen.

Eine potentielle Wirkungsweise dieser komplexen DNA Reparaturvorgänge im Zellkern ist in der folgenden graphischen Darstellung für die Fanconi Anämie Proteine und die begleitenden Proteine ATM, RAD51, Ubiquitin (Ub), USP1 sowie BRCA1 und BRCA2 dargestellt (Abb. 2). Die Zeichnung erhebt dabei keinen Anspruch auf Vollständigkeit des gesamten homologen Rekombinationsprozesses, sondern dient lediglich der zusätzlichen Übersicht.

Abb. 2: Schematische Darstellung möglicher DNA Reparaturvorgänge



Die Proteinkinase ATM signalisiert BRCA1 einen vorliegenden DNA Doppelstrangbruch durch Phosphorylierung. BRCA1 wandert mit RAD51 zur DNA Reparaturstelle. Die Fanconi Anämie (FA) Proteine werden in diesen Prozess eingebunden. Der FA Proteinkomplex aus A, C, E, F, G, L und D2 löst eine Ubiquitinierung des FA Proteins D2 durch Ubiquitin (Ub) aus und lenkt dieses in Richtung BRCA1. Das Protein FANCD2 wird durch USP1 nach der Reparatur wieder in seinen Ausgangszustand gebracht. Im Ergebnis kommt es zur homologen Rekombination der DNA.

2.2) Das Malignomrisiko bei der Fanconi Anämie

Auf der zellulären Ebene kann eine maligne Erkrankung aufgrund einer Serie von Mutationen verschiedener Gene entstehen. Zu diesen gehören u.a. Onkogene, die die Zellteilung beschleunigen, Tumorsuppressorgene, die eine beschleunigte Zellteilung bremsen können, Telomerasegene, welche Zellen immortalisieren können oder DNA Reparaturgene wie bei der Fanconi Anämie, welche normalerweise Fehler bei der DNA Replikation reparieren. Die Malignomentstehung reflektiert eine Akkumulation verschiedener solcher Mutationen, die letztendlich Veränderungen des Zellwachstums und die maligne Transformation initiieren. Die Entwicklung setzt sich in Form von Tumorzellbildung fort, die zu einem bösartigen Tumor führt mit Invasions- und Metastasierungstendenz.

Das erhöhte Malignomrisiko für Fanconi Anämie Patienten [5, 7, 8, 12, 16, 29, 71, 80, 112] hat die molekularen Forschungsarbeiten nachhaltig beeinflusst, obwohl die Inzidenz der Fanconi Anämie selten ist. Sie wird in einer von Smith et al. durchgeführten Untersuchung für eine Region in Südafrika mit etwa 1 / 22.000 bei Kindern unter 15 Jahren angegeben [11]. Andere Autoren geben Schätzungen von 1 / 300.000 bis 1 / 360.000 Geburten an [120, 71]. Für die betroffenen Patienten bedeutet die Diagnose, dass ihr Risiko für die Inzidenz einer akuten myeloischen Leukämie (AML) etwa 15.000fach über dem Risiko für Kinder der Normalbevölkerung liegt [16, 18]. Das kumulative Risiko steigt bis auf etwa 52 % in einem Alter von 40 Jahren [102]. Eine 500fach erhöhte Inzidenz von Plattenepithelcarcinomen des Kopf- und Halsbereichs ist von Kutler et al. bei Fanconi Anämie Patienten beschrieben worden [74]. Das mittlere Überleben für Fanconi Anämie Patienten liegt bei etwa 16 Jahren [34], wobei die heute möglichen Stammzelltransplantationen die Prognose entscheidend verbessert haben.

In einer Untersuchung europäischer Patienten fanden Faivre et al. bei etwa 20 % der Fanconi Anämie Patienten ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) oder eine AML [39]. Eine 2003 veröffentlichte retrospektive Analyse der gesammelten Daten aus den letzten 20 Jahren des Internationalen Fanconi Anämie Registers (IFAR) unterstreicht das erhöhte Risiko für die Entwicklung einer malignen Erkrankung bei Fanconi Anämie Patienten. In ihrem Umfang ist diese Analyse einzigartig und bei der Auswertung der Daten zeigten insgesamt 199 der 754 Patienten (23 %) eine maligne Erkrankung. In 60 % der Fälle waren dies maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems. Bei den übrigen 40 % wurden solide Tumoren wie Plattenepithelcarcinome mit bevorzugter Lokalisation des oberen Gastrointestinaltraktes und der Anorektalregion, Lebertumoren, Hirntumoren, Nierentumoren und andere in absteigender Häufigkeit diagnostiziert. Bei den Lebertumoren waren über die Hälfte Adenome, welche

auch im Zusammenhang mit der bei Fanconi Patienten häufig anzutreffenden Androgentherapie im Rahmen einer schweren aplastischen Anämie Behandlung auftreten. Bei lediglich 16 % der Patienten mit einem Plattenepithelcarcinom konnten ein Tabak- oder Alkoholabusus als begleitende Risikofaktoren in der Anamnese eruiert werden. Dabei war das Risiko der weiblichen Patienten für die Entstehung eines Plattenepithelcarcinoms gegenüber den männlichen Patienten nur bei Berücksichtigung der gynäkologischen Cervix-, Vaginal- und Vulvacarcinome erhöht. In 54 % dieser Fälle war ein humaner Papillomavirusbefall der Anal- bzw. Vaginalregion vorausgegangen. Bei 21 Patienten fanden sich sogar mehr als eine Neoplasie in der Krankengeschichte. Diese Zweitmalignome waren in über 80 % der Fälle Plattenepithelcarcinome. Desweiteren wurde über ein zunehmendes Auftreten von Tumoren mit der Zeit nach Knochenmarkstransplantation (KMT) berichtet. Die Datenlage lässt zum jetzigen Zeitpunkt jedoch keinen eindeutigen Schluß zu, ob dieses Auftreten von Carcinomen mit der KMT und der begleitenden immunsuppressiven Therapie in Zusammenhang steht oder ein unabhängiges Risiko darstellt. Von den 754 untersuchten Patienten entwickelten 113 Patienten ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) oder eine AML (15 %), 601 Patienten (80 %) zeigten hämatologische Zeichen eines fortschreitenden Knochenmarksversagens. Dabei ergab sich bei einem Patientenalter von 40 Jahren ein kumulatives Risiko für die Inzidenz eines progredienten Knochenmarksversagens ohne Zeichen eines MDS oder einer AML von 90 %. Für eine maligne Knochenmarkserkrankung lag die Inzidenz im Alter von 40 Jahren bei 33 % und für die eines soliden Tumors bei 28 %. [75]

Für Patienten der Fanconi Anämie C Gruppe ergab sich eine erniedrigte Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu den übrigen Fanconi Anämie Gruppen insgesamt. *FANCC* Mutationen des Exons 14 in dieser Gruppe und im Intron 4 bei Ashkenazi-jüdischen Patienten verschlechterten die Prognose zusätzlich im Vergleich zu Patienten mit Mutationen im Exon 1 des *FANCC* [75].

Die Validität dieser Untersuchung von insgesamt 754 Patienten war jedoch eingeschränkt. Die Kohorte stammte überwiegend aus dem nordamerikanischen Raum und die Meldung der Patientendaten war abhängig vom betreuenden Arzt und dessen freiwilligen, klinischen Angaben. Eine standardisierte Überprüfung der erhobenen Daten erfolgte nicht. Die 2008 veröffentlichte deutsche Fanconi Anämie Registeranalyse (GEFA) bestätigt diese Aussagen im wesentlichen [98]. Eine Einschätzung des vollständigen Spektrums der malignen Erkrankungen und des Malignomrisikos für Fanconi Anämie Patienten ist in Anbetracht der genannten Daten nur bedingt möglich. Unbestritten scheint jedoch zu sein, dass das Risiko für Malignome bei Patienten mit Fanconi Anämie mit dem Alter wächst.

2.3) Die Stellung des heterozygoten Erbanlageträgers

Heterozygote Anlageträger für die Fanconi Anämie sollten in der Normalbevölkerung mit einer Prävalenz von 1/200 bis 1/300 zu finden sein [6, 71, 94, 108]. In bestimmten ethnischen Gruppen, wie bei den Ashkenazi Juden, wird eine Frequenz von 1/50 bis 1/100 für Heterozygote des *FANCC* angenommen [127, 128, 134]. Kongenitale Fehlbildungen des Urogenitaltraktes sowie Hand- und Fußdeformitäten wurden bei Familienangehörigen von Fanconi Anämie Patienten gehäuft beobachtet [13, 133]. Dagegen gibt es, sich zum Teil widersprechende Angaben, über das mögliche Risiko für die Entstehung einer malignen Erkrankung bei heterozygoten Anlageträgern. So revidierten Swift et al. ihre 1971 veröffentlichten Ergebnisse [120], die zunächst für ein erhöhtes Risiko gesprochen hatten, in einer Arbeit von 1980 und stellten fest, dass sich kein klinischer Hinweis für eine Häufung von Malignomen in den von ihnen untersuchten 25 Familien von Fanconi Anämie Patienten finden ließ [121]. In anderen entsprechenden Familienanalysen fanden Potter et al. ebenfalls keine erhöhte Inzidenz von Malignomen unter den Angehörigen von Fanconi Anämie Patienten [95], während eine Untersuchung von Garriga et al. 1959 noch eine erhöhte Anzahl von Leukämien in den Familien festgestellt hatte [47]. Heterozygote *FANCD1* Träger zeigten in einer nordamerikanischen Analyse ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs, ovarielle Tumoren, Prostatacarcinome und gastrointestinale Tumoren [24, 110, 124]. Sporadische Fälle von Pankreascarcinomen mit nachweislich heterozygoten *FANCC* Mutationen der Betroffenen sind ebenfalls beschrieben [32].

Weitere Untersuchungen bei Fanconi Anämie Patienten erstreckten sich aufgrund der inkonstanten phänotypischen Charakteristika bei Heterozygotie auf die Differenzierung im zellulären Bereich.

Petridou et al. entdeckten 1990, dass heterozygote Anlageträger der Fanconi Anämie laborchemische Besonderheiten aufwiesen. So stellten sie einen erhöhten fetalen Hämoglobingehalt (HbF) sowie eine erniedrigte Zellzahl von natürlichen Killerzellen (NK-cells) im Immunsystem fest [94]. Eine Verlängerung der Zellzyklusphasen wurde bereits zuvor von Kubbis et al. bei heterozygoten Anlageträgern beobachtet [70]. Die Chromosomenbrüchigkeit bei Familienangehörigen von Fanconi Anämie Patienten wurde in mehreren Studien getestet. So fanden Novotna et al. eine durch DEB induzierbare erhöhte Chromosomenbrüchigkeit bei Heterozygoten [88]. Marx et al., deren Ergebnisse in der Folge nicht bestätigt wurden, konnten 1989 heterozygote von homozygoten Anlageträgern unterscheiden [9]. Andere Arbeitsgruppen differenzierten Patienten und heterozygote

Anlageträger pränatal bei Schwangeren [19, 20, 86]. Auf der anderen Seite kamen Dallapiccola et al. und Schroeder-Kurth et al. in ihren Veröffentlichungen aus demselben Jahr zu dem Ergebnis, dass eine Testung der Chromosomenbrüchigkeit bei heterozygoten Anlagetägern für die Fanconi Anämie mittels DEB - insbesondere wegen der großen Streubreite der Ergebnisse - nicht allein für eine individuelle Differenzierung, wohl aber für eine Gruppenunterscheidung ausreichend sei [6, 10]. Wunder et al. setzten in ihrer Familienanalyse 1983 ultraviolette Strahlung zur Ermittlung der Chromosomenbrüchigkeit bei Lymphozyten ein. Unter Psoralen und UVA Einfluss stellten sie eine inkonstante Anzahl von Chromosomenaberrationen bei den untersuchten Familienangehörigen fest und postulierten, dass eine erhöhte Fragilität der Chromosomen bei einzelnen Individuen mit einem erhöhten Risiko für die Malignomentstehung vergesellschaftet sein könnte [136]. Bei einer retrospektiven Analyse des nordamerikanischen Internationalen Fanconi Anämie Registers (IFAR) ergab sich für insgesamt 944 untersuchte Verwandte von Fanconi Anämie Patienten wiederum kein generell erhöhtes Krebsrisiko [24]. Eine molekularbiologische Untersuchung, wie sie zunehmend bei Fanconi Anaemie Patienten gebräuchlich ist [31, 14], fand zur Verifizierung des heterozygoten Genstatus in den Familien dieser genannten Arbeiten nicht statt. Damit bleibt zweifelhaft, ob die untersuchten Probanden tatsächlich Mutationen für die Fanconi Anämie trugen.

2.4) Fanconi Anämie C Gen Veränderungen bei Malignompatienten

Die Hypothese, dass Fanconi Anämie Gene eine kausale Rolle bei der Entstehung von akuten myeloischen Leukämien haben, veranlasste Xie et al. AML Zelllinien von insgesamt 15 Patienten zu untersuchen. Dabei stellten die Forscher fest, dass über 50 % der Zelllinien keine normale Synthese der Fanconi Anämie Proteine zeigten. Sie folgerten, dass die Fanconi Anämie Gene an der Leukämieentwicklung grundsätzlich beteiligt sein müssten [138].

Im Knochenmark könnte das Fanconi Anämie C Gen (*FANCC*) beispielsweise in einer klonalen, myeloischen Progenitorzelle inaktiviert werden und so an der Entstehung einer Leukämie mitbeteiligt sein. Ein solcher Vorgang scheint durch die Arbeit von Sweetser et al. untermauert zu werden, die bei klonalem Wachstum den Verlust eines langen Armes von Chromosom 9 beschreibt [119]. In diesem Bereich liegt das *FANCC*, dessen Funktion so bei heterozygotem Anlagetägerstatus in der betroffenen Zelle verloren gehen kann („loss of heterozygosity“). Damit läge funktionell ein homozygoter Status des mutierten Allels vor und es könnte kein normales *FANCC* Protein mehr produziert werden, wie dies bei Fanconi Anämie Patienten der Fall ist.

Von Waisfisz et al. wurden bei drei Fanconi Anämie Patienten eine spontane Korrektur des homozygoten Allelstatus beschrieben [130]. Dies entspricht dem umgekehrten Vorgang, bei dem spontan eine Revision des Krankheitsbildes durch Neumutation des Gens im Körper erfolgt. Ein Nebeneinander von homozygoten Keimbahnveränderungen und heterozygoten oder normalen Zellpopulationen im menschlichen Körper wird als Mosaik bezeichnet. Die neuen somatischen Mutationen entsprechen quasi einer natürlichen Gentherapie.

Barber et al. publizierten 2003 eine in Großbritannien durchgeführte Analyse des Fanconi Anämie C Gens (*FANCC*) bei 97 Patienten mit AML und 91 Patienten mit ALL [22]. Bekannte Mutationen des *FANCC* ließen sich bei den untersuchten Patienten mittels SSC Analyse nicht finden. In dem begleitenden Kontrollkollektiv von 104 gesunden Kindern fand sich ebenfalls kein heterozygoter Anlageträger. Die Forscher fanden eine erhöhte p.S26F Allelfrequenz für den von Verlander et al. 1994 beschriebenen Polymorphismus im Exon 1 des *FANCC* unter den von ihnen untersuchten AML Patienten und stellten die Hypothese auf, dass das Allel p.S26F kennzeichnend für ihre Patientengruppe sei und als Risikofaktor für die Malignomentstehung gelten könne [22].

Da die Analyse innerhalb der Familien von Fanconi Anämie C Patienten aufgrund der kleinen Fallzahlen schwierig bleibt und zu unklaren Aussagen hinsichtlich des Malignomrisikos für heterozygote Anlageträger führt, stellt sich im Umkehrschluss die Frage, ob unter Patienten mit Malignomen heterozygote Fanconi Anämie C Genträger zu finden sind. Kinder mit insbesondere hämatologischen Malignomen scheinen wegen der Seltenheit dieser Erkrankung im Kindesalter als Kollektiv für derartige Fragestellungen besonders geeignet zu sein.

Wären heterozygote Anlageträger für die Fanconi Anämie C unter Kindern mit malignen Erkrankungen des hämatologischen Systems signifikant häufiger anzutreffen, so wäre ein kausaler Zusammenhang für die Malignomentstehung wahrscheinlich.

2.5) Arbeitshypothese und Fragestellung

Diese Untersuchung ist Teil einer umfangreicheren Studie mit derselben Fragestellung unter Einschluß weiterer Fanconi Anämie Gene, die von meinen Kodoktoranden bearbeitet wurden.

Das deutlich erhöhte Malignomrisiko der Fanconi Anämie Patienten - eines überwiegend autosomal rezessiv vererbten Chromosomenbrüchigkeitssyndroms - hat zu der Frage geführt, ob heterozygote Anlageträger für die Fanconi Anämie ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Entstehung maligner Erkrankungen haben. Heterozygote Individuen tragen nur auf einem des väterlichen bzw. mütterlichen homologen Chromosoms eine Genveränderung im Gegensatz zu den erkrankten Patienten, die auf beiden Chromosomen Mutationen tragen.

Ist eine heterozygote Veränderung des Fanconi Anämie C Gens (*FANCC*) ein Risikofaktor für die Entstehung maligner Erkrankungen bei Kindern bzw. gibt es bei Kindern mit gesicherten malignen Erkrankungen eine Häufung von heterozygoten *FANCC* Mutationen?

Ein kausaler Zusammenhang eines solchen *FANCC* Defektes mit der Malignomentstehung wäre dann wahrscheinlich, wenn sich in einem pädiatrischen Kollektiv mit überwiegend für Fanconi Anämie Patienten typischen Malignomen vermehrt heterozygote Anlageträger für *FANCC* Mutationen finden ließen.

Zur Klärung dieser Frage wurden 186 pädiatrische Patienten mit überwiegend hämatologischen Malignomen auf Mutationen des *FANCC* Gens untersucht.

3.) Material und Methoden

3.1) Vorgehensweise

Zur molekulargenetischen Analyse des Fanconi Anämie C Gens (*FANCC*) wurden die Materialproben der anonymisierten Patienten aufgearbeitet. Dazu wurde die DNA der Patienten entweder aus peripheren Leukozyten, aus Zellen des Knochenmarks, der Milz nach vorausgegangener Splenektomie oder aus asserviertem Tumorgewebe isoliert. Die Exons 1 bis 14 des *FANCC* Gens wurden mittels PCR amplifiziert. Alle PCR Produkte wurden anschließend mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSC) untersucht. Bei Auffälligkeiten erfolgte eine Sequenzierung. Im Falle kleiner Deletionen wurde das zu untersuchende PCR Produkt zur allelspezifischen Analyse kloniert. Eine Bestätigung der Ergebnisse erfolgte mittels denaturierender hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (dHPLC) oder Restriktionsfragment Längenpolymorphismus Analyse (RFLP) in ausgewählten Fällen. Für alle Patienten erfolgte im Vergleich zu einem Normalkollektiv die Analyse eines Einzelneukleotidpolymorphismus im Intron 11 des *FANCC*. Eine statistische Auswertung dieser Polymorphismusanalyse erfolgte im Anschluss.

Die Bezeichnung der einzelnen Genveränderungen folgt der gebräuchlichen internationalen Nomenklatur und ist mit Stand zum 15. Juni 2008 in diese Arbeit übernommen worden [15, 118]. Die verwendete Nomenklatur ist im Internet über die Webseite der „Human Genome Variation Society“ (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) bzw. für den Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) im Intron 11 beim „National Center for Biotechnology Information“ der „National Library of Medicine“ in Bethesda, USA in der Datenbank für „Single Nukleotide Polymorphisms (dbSNP)“ unter der Referenznummer rs4647534 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) in ihrer jeweilig aktuellen Version abrufbar. Die „Fanconi Anemia Mutation Database“ bei der Rockefeller Universität in New York, USA ist ebenfalls im Internet einsehbar (<http://www.rockefeller.edu/fanconi/mutate/>). Die cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz des Fanconi Anämie C Gens sind dem Anhang zu entnehmen und bei der „GenBank“ unter der Nummer NM_000136.2 im Internet verzeichnet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.2) Patienten

In dieser Arbeit wurden insgesamt 186 pädiatrische Patienten anonymisiert untersucht. 102 dieser Patienten hatten eine akute myeloische Leukämie (AML), 3 Patienten eine AML bei Trisomie 21 und 4 Patienten eine akute lymphatische Leukämie (ALL). Bei 2 Patienten wurden sowohl eine AML und eine ALL vom T-Zelltyp (T-ALL) diagnostiziert. Eine chronisch myeloische Leukämie (CML) wurde bei 5 der Patienten diagnostiziert. Eine chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML) wiesen 4 der untersuchten Kinder auf, eine juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) hatten 11 der Patienten. Unter den 3 Patienten mit erhöhter Chromosomenbrüchigkeit befand sich ein Patient mit Nijmegen Breakage Syndrom. Bei 3 Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) befand sich ein Patient mit T-Zell NHL und ein Patient mit Entwicklung eines Sekundärmalignoms. Bei weiteren 3 der zu untersuchenden Patienten lag ein VACTERL Syndrom vor. 5 andere Patienten hatten eine schwere aplastische Anämie (SAA) mit Progredienz des Knochenmarksversagens. Bei einem dieser SAA Patienten entwickelte sich eine Panmyelopathie. Unter 27 Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) waren insgesamt 3 Patienten mit einem Übergang in eine ALL, ein Patient mit Übergang in eine CMML sowie 2 Patienten mit Übergang in eine AML, von denen wiederum ein Patient ein Ewing Sarkom entwickelte.

14 Patienten mit gesicherter Fanconi Anämie (FA) wurden in die Untersuchung mit eingeschlossen, davon hatten 2 eine AML. Die Komplementationsgruppen der Fanconi Anämie Patienten waren dem Untersucher zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht bekannt.

Bei zwei Patienten wurden außerdem die Geschwister und Eltern untersucht. Dabei waren unter den Geschwistern der einen Familie ein Kind mit einer T-ALL und in der anderen Familie ein Geschwisterkind mit einem Neuroblastom.

Von diesem Patientenkollektiv ausgehend wurde bei zusätzlich 36 Patienten mit T-Zell ALL und 55 Patienten mit Neuroblastom das Exon 4 des *FANCC* untersucht. Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des Patientenkollektivs (Tab. 1).

Ebenfalls eingeschlossen in die Untersuchung wurden 6 Tumorzelllinien, darunter 4 AML und 2 CML Zelllinien.

Das Normalkollektiv bestand aus insgesamt 96 anonymisierten pädiatrischen Patienten.

Das Einverständnis zu dieser Untersuchung wurde zuvor von den Patienten bzw. deren Eltern nach entsprechender Aufklärung durch die betreuenden Ärzte eingeholt.

Es erfolgte eine retrospektive Analyse der Daten. Nach DNA Isolierung wurde bei allen Patienten das Fanconi Anämie C Gen molekulargenetisch auf Veränderungen hin untersucht. Der Übersichtlichkeit halber sind die Rezepturen für die im folgenden genannten Puffer und

Lösungen im Anhang dieser Arbeit aufgelistet. Weitere Hilfsmittel sowie die Oligonukleotidsequenzen (Primer) sind ebenfalls dort aufgeführt.

Tabl. 1: Patientenkollektiv

Anzahl der Patienten	Diagnose	ggf. zusätzliche Diagnosen
4	ALL	
107	AML	3 x Trisomie 21, 2 x T-ALL
3	Chromosomenbrüchigkeit	1 x Nijmegen Breakage Syndrom
5	CML	
4	CMML	
14	Fanconi Anämie	2 x AML
11	JMML	
27	MDS	2 x AML, 1 x Ewing Sarkom
3	NHL	1 x Sekundärmalignom
5	SAA	1 x Panmyelopathie
3	VACTERL	
56	Neuroblastom*	
38	T-ALL*	

*) 56 Neuroblastom bzw. 38 T-ALL Patienten wurden nur im Exon 4 des *FANCC* analysiert.

3.3) DNA Isolierung

Aus 5-10 ml EDTA-Blut, tiefgefrorenen Knochenmarksproben, Milz- oder Tumorgewebe der Patienten und des Normalkollektivs wurden die Leukozyten bzw. Gewebezellen, nach Lyse der Erythrozyten mittels Lysepuffer (RCLB), durch Zentrifugation isoliert. Anschließend wurden die Proben in Proteinkinase K und SDS-haltigem TNE-Puffer für 2 Stunden bei 65° C inkubiert und verdaut. Die Proteinfraction wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt und die sich in der wässrigen Phase befindliche DNA durch Zusatz von 4M LiCl und eisgekühltem Ethanol gefällt. Die an einem Glashaken hängen bleibende, präzipitierte DNA wurde in TE-Puffer gelöst. Bei der Probenaufbereitung wurde mit geringen Abweichungen nach Standardprotokollen vorgegangen [3]. Alternativ wurden die Proben mittels eines Kits (QIAamp Blood & Body Fluid) nach Angaben des Herstellers (QIAGEN) aufbereitet. Die so gewonnenen DNA-Proben wurden vor der weiteren Verwendung bei 4° C gelagert.

3.4) Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von Saiki et al. entwickelte Polymerasekettenreaktion ermöglicht auf relativ einfache Weise eine hohe Kopiezahl einer spezifischen DNA Sequenz zu synthetisieren und somit die Untersuchungsbedingungen für eine solche Sequenz bei hoher Amplifikation der ursprünglichen Sequenz zu verbessern [99].

In den meisten Fällen wurden für die PCR spezifische Oligonukleotidsequenzen - sogenannte Primer - gewählt, die neben den zu untersuchenden Exons auch die Mitamplifikation flankierender Intronsequenzen ermöglichten, um mögliche Splice-site Mutationen mitzuerfassen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen sind der Literatur entnommen [48]. Die Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen sind im Anhang dieser Arbeit aufgelistet.

Der PCR Ansatz wurde mit einigen Tropfen Mineralöl bedeckt, um eine Kondensation am Deckel des Eppendorfgefäßes während des laufenden Versuchs zu vermeiden. Alternativ erfolgte die Amplifikation ohne Mineralöl bei beheiztem Deckel des Thermocyclers als Kondensationsschutz. Die Reaktion erfolgte in programmierbaren Thermocyclern.

3.5) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Nach der PCR wurden die Produkte auf ein selbstgegossenes 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen [28]. Hierzu wurde eine Trägerfolie (Pagebond) an drei Seiten randständig mit einem 6 mm breiten und 0,4 mm hohen Spacer belegt und zwischen zwei Glasplatten mit entsprechender Größe eingespannt. Das Gel wurde nach der im Anhang angegebenen Rezeptur vorbereitet und zur Polymerisation in den Spaltraum zwischen den Glasplatten gegossen. Nach Aushärtung wurde das Gel auf der Trägerfolie haftend als Einheit entnommen.

Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese bei 4° bis 8° Celsius. Zur Kontaktherstellung mit den Elektroden der Elektrophoresekammer wurden in Tris-Borat-Puffer getränkte Filterpapierstreifen (25 x 1,5 cm) zwischen Elektroden und Gel platziert. Zwei Mikroliter des PCR Produkts wurden jeweils in 1 x 3 x 0,2 mm große Geltaschen (slots) kathodennah appliziert. Zur Kontrolle lief ein 50 bzw. 100 bp Standard DNA Molekulargewichtsmarker mit. Die angelegte Spannung betrug 400 Volt, die Wattleistung 40 W und die Laufzeit je nach PCR Produktgröße zwischen 30 und 60 Minuten.

3.6) Silberfärbung

Die Darstellung der PCR Produkte erfolgte mit einer Silberfärbung [28]. Dabei wurde die DNA durch Ethanol im Gel fixiert und anschließend durch Salpetersäure oxidiert. Im Anschluß wurde das Gel in einer Silbernitratlösung inkubiert und danach so lange durch Natriumbikarbonat- / Formalinlösung reduziert, bis sich die DNA gut sichtbar auf dem Gel angefärbt hatte. Die Reaktion wurde schließlich mit Essigsäure gestoppt und das Gel getrocknet.

3.7) DNA Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSC)

Bei dieser Methode [90] wurde das doppelsträngige PCR Produkt für zehn Minuten in Formamidpuffer auf 94° Celsius erhitzt.

Dabei trennen sich die Doppelstränge in einzelne DNA Stränge durch Denaturierung auf. Während dieser Auftrennungsphase nehmen die Einzelstränge eine von ihrer Basenfolge abhängige Sekundärstruktur an, die nach sofortiger Kühlung auf Eis beibehalten wird und die Mobilität während einer Elektrophorese beeinflusst. Die in ihrer Sequenz vom Normalfall (Wildtyp) abweichenden Einzelstränge zeigen aberrante Laufeigenschaften. Dieses Wanderungsverhalten während der Elektrophorese ist neben der Basenfolge der DNA abhängig von der anliegenden Spannung, der Polyacrylamidkonzentration des Gels, der Temperatur und dem Glyceringehalt [55]. Elektrophoretische Artefakte sind bei der Analyse der einzelnen Exons des Fanconi Anämie C Gens (*FANCC*) möglich und zu berücksichtigen [21, 22]. Die nach Silberfärbung als aberrant identifizierten PCR Produkte wurden anschließend sequenziert.

3.8) Aufreinigung der PCR Produkte

Für die Sequenzierung der PCR Produkte war eine Aufreinigung notwendig. Dazu wurden 30 µl des PCR Produktes entweder mit einem sogenannten internen Primer erneut in einem PCR Ansatz amplifiziert und die so erhaltenen neuen PCR Produkte direkt sequenziert oder es wurden 30 µl des PCR Produktes mit 7 µl Gel Loading Buffer III vermischt und auf einem 1%igen Agarosegel bei 80 Volt anliegender Spannung innerhalb von 90 bis 120 Minuten aufgetrennt. In einem zweiten Schritt wurde unter UV-Lichtkontrolle das gewünschte PCR

Produkt in einem Agaroseblöckchen aus dem Gel gestant und mit einem Kit (Easy Pure bzw. Ultrafree-DA) nach Angaben des Herstellers (Biozym bzw. Millipore) aufbereitet. Die so aufgereinigten PCR Produkte wurden resuspendiert und zur Sequenzierung amplifiziert.

3.9) Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der genauen Nukleotidsequenz innerhalb der DNA und macht den Nachweis von DNA Veränderungen möglich.

In dieser Arbeit wurde ein zyklisches Sequenzierverfahren nach Herstellerangaben (Amersham) angewendet, das gegenüber dem ursprünglichen Verfahren [101] doppelsträngige DNA zur Analyse einsetzt und gleichzeitig mit geringeren DNA Ausgangsmengen arbeitet [122]. Diese Vorteile ermöglichen es, doppelsträngige DNA in Form eines einfachen PCR Produktes wahlweise in Richtung des 3' Endes (Sense-Primer) oder in Richtung des 5' Endes (Antisense-Primer) der DNA zu sequenzieren.

Aufgereinigte PCR Produkte wurden direkt sequenziert. Dabei wurden im wesentlichen selbstkonstruierte Sequenzierprimer verwendet. Diese, anhand der bekannten Gensequenzen des *FANCC* ermittelten internen Primer, ermöglichten die Amplifikation des PCR Produkts in hoher Qualität. Zum Einsatz kam hierbei ein Kit (ThermoSequenase) mit radioaktiv markierten Terminatoren (³³P-substituierte ddNTP's), wobei nach Angaben des Herstellers (Amersham) gearbeitet wurde. Zur Verminderung von Kompressionen wurde dGTP durch dITP im Sequenzieransatz ersetzt und die Proben wurden nach Denaturierung auf einem speziellen Sequenziergel mittels PAGE aufgetrennt. Dabei erfolgte die Elektrophorese mit 1 x TTE Pufferlösung und 50 Watt Leistung bei 20° Celsius über eine Zeitspanne von 90 bis 220 Minuten. Mit zunehmender Größe des zu trennenden Produktes verlängerte sich die Laufzeit entsprechend. Im Anschluss daran wurde das Gel auf einem Blatt Filterpapier als Trägerfläche in einem Vakuumtrockenofen für 120 Minuten getrocknet. Ein hochempfindlicher Röntgenfilm wurde zusammen mit dem auf dem Filterpapier fixierten Gel für mindestens 24 Stunden in einer Kassette belichtet und anschließend in einem konventionellen Röntgenfilmautomaten entwickelt. Die Auswertung der belichteten Röntgenfilme erfolgte am Leuchttisch.

3.10) Klonierung

Die beschriebene PCR Methode ist zwar sequenzspezifisch jedoch nicht allelspezifisch, da bei einer genomischen DNA Analyse stets die Allele beider Chromosomen amplifiziert werden. Eine direkte Sequenzierung eines solchen PCR Produktes führt somit immer zur parallelen Abbildung beider Allele. Dies ermöglicht leicht die Identifizierung homozygoter DNA Veränderungen jedoch nicht immer eine sichere Aussage über Art und Umfang heterozygoter Genveränderungen. DNA Sequenzabweichungen in Form von Insertionen oder Deletionen sind so beispielsweise bei der direkten Sequenzierung nicht eindeutig einem Allel zuzuordnen. Treten Veränderungen innerhalb eines amplifizierten DNA Abschnitts darüber hinaus kombiniert auf, ist die Zuordnung zu einem Allel nur möglich, wenn die Allele getrennt voneinander sequenziert werden. Eine solche allelspezifische Sequenzierung erfolgt nach Klonierung. Dazu wird der zu untersuchende DNA Abschnitt des Patienten in ein Plasmid integriert, in Bakterien übertragen und mit diesen vermehrt. Unter den Ligations- und Transformationsbedingungen wird in der Regel nur ein Allel in jedes Plasmid eingebaut und nur ein Plasmid pro Bakterium aufgenommen. Das in die Bakterien integrierte Allel entspricht somit idealerweise entweder dem mütterlichen oder väterlichen Allel und macht dadurch die selektive Vermehrung getrennter Allele in der jeweiligen Bakterienkolonie möglich.

In dieser Arbeit wurde dabei nach Angaben des Herstellers (Stratagene) vorgegangen und ein pCR-Script Amp SK(+) Cloning Kit verwendet. Das PCR Produkt wurde durch selektive Präzipitation gereinigt und seine überhängenden Enden mittels Pfu DNA Polymerase aufgefüllt. Die Ligation mit dem Vektor pCR-Script Amp SK(+) erfolgte mit Hilfe der Enzyme Srf I und T4 DNA Ligase. Danach wurde der Vektor durch Transformation in E. coli Bakterien (Epikurian coli XL-1 Blue MRF⁺ Kann supercompetent cells) eingebracht und diese auf LB-Agarnährböden aufgebracht. Die Nährböden enthielten X-gal und IPTG und waren Ampicillin beschichtet. Nach Inkubation bei 37° Celsius über 24 Stunden wurden geeignete Bakterienkolonien anhand ihrer Färbung selektioniert.

Das sich auf dem Plasmid befindliche lacZ-Gen ermöglicht transformierten Bakterien die Spaltung von X-gal, wodurch sich ein blauer Farbstoff bildet. Jene Bakterienkolonien, die ein unverändertes Plasmid tragen, färben sich somit blau. Wird jedoch der zu untersuchende Genabschnitt in das Plasmid ligiert, so kommt es durch die Insertion in das Plasmid zur Spaltung des lacZ-Gens auf dem pCR-Script Amp SK(+) Plasmid und die Fähigkeit zur Galaktosespaltung geht dem Bakterium damit verloren. Durch die fehlende Spaltung von X-gal bleibt die entstehende Bakterienkolonie farblos.

Zur weiteren Analyse wurden demnach nur farblose Bakterienkolonien selektioniert. Aus 10 verschiedenen Kolonien wurde mit plasmidspezifischen Primern ein PCR Produkt amplifiziert, welches die ligierten DNA Abschnitte beinhaltet. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte nach einer modifizierten Alkali-Lysemethode (Mini Präparation) nach Birnboim und Doly [25]. Nach Größenkontrolle der PCR Produkte mittels PAGE wurden die so gewonnenen allelspezifischen DNA Abschnitte nach Aufreinigung sequenziert und analysiert.

3.11) Denaturierende hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (dHPLC)

Für das Exon 4 des *FANCC* wurden die in der SSC Analyse als aberrant verlaufenden und in der Sequenzierung bzw. nach Klonierung als heterozygot erkannten PCR Produkte mittels dHPLC (WAVE 3500 dHPLC Nucleic Acid Fragment Analysis System) nach Herstellerangaben (Transgenomic) zur Bestätigung analysiert.

Die Etablierung von Versuchsbedingungen für die PCR Produkte des *FANCC* erfolgte durch Schmelzkurvenanalyse, Softwarevorhersagen des Herstellers und durch Testläufe mit aberranten PCR Produkten. Die dHPLC des *FANCC* Exon 4 erfolgte bei 56° Celsius. Die PCR Produkte wurden sowohl nativ als auch nach Zusatz eines bekannten Wildtyp PCR Produkts analysiert. Die Retentionsparameter wurden mit zuvor identifizierten polymorphen oder mutierten PCR Produkten verglichen.

Das zu untersuchende PCR Produkt wurde hierzu nach fünfminütiger Denaturierung und Heteroduplexinduzierung bei 95° Celsius langsam auf 10° Celsius abgekühlt (Gradient: 1° Celsius/Minute) und anschließend bei 4° Celsius gelagert. Proben von 5-10 µl wurden in eine vorgeheizte C₁₈ Reverse-Phasen-Säule mit nonporösen Poly-(Styren-Divenybenzen) Partikeln (DNASep Matrix von Transgenomic) injiziert. Die Elution der Proben erfolgte bei linearem Acetonitrilgradient aus Puffer A (0.1 mol/l TEAA) und Puffer B (0.1 mol/l TEAA, 250 ml/l Acetonitril) mit einer Konzentrationszunahme von Puffer B um 2 % / Minute. Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.9 ml / Minute. Die Retentionszeit wurde online über UV-Absorption bei 254 nm gemessen. Ergebnisdiagramme zeigten die Absorptionsintensität nach Probeninjektion in die Säule in Millivolt pro Minute (mV/min) an [4, 14, 31, 59, 66, 81, 97, 137].

3.12) Restriktionsfragment Längenpolymorphismus Analyse

Mittels der von Gibson et al. beschriebenen Polymorphismusanalyse für ein 587 bp großes PCR Produkt aus dem Bereich des Intron 11 im *FANCC* erfolgte mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoR1* eine Restriktionsfragment Längenpolymorphismus Analyse (RFLP) für die 186 Patienten und 96 Personen des Normalkollektivs [51].

Das Restriktionsenzym *EcoR1* erkennt die DNA Sequenz GAATTC und schneidet bei Erkennen dieser Sequenz die DNA nach der ersten Base Guanin (G!AATTC). Da die spezifische Nukleotidsequenz nicht von Gibson et al. veröffentlicht wurde, wird in dieser Arbeit die von Gibson et al. gewählte Bezeichnung „Allel A1“ und „Allel A2“ beibehalten. Die Internetreferenz für diesen Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) Cluster Report ist unter der Nummer rs4647534 bei www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/ (Stand: 15. Juni 2008) einsehbar. Es entstehen bei Vorliegen des Allels A2 im Intron 11 des *FANCC* zwei unterschiedlich große Fragmente von 240 bp bzw. 347 bp Länge. Anschließend können in einer PAGE Analyse die PCR Produkte anhand der unterschiedlich geschnittenen Fragmente differenziert werden. Dabei sprechen eine Bande für das homozygote Vorliegen von Allel A1, zwei Banden für das Vorliegen des Allels A2 in homozygoter Form und drei Banden für Heterozygotie (Allel A1 und A2).

3.13) Statistische Auswertung

Für die Ergebnisse des *FANCC* Polymorphismus aus Intron 11 wurden die Auftretenswahrscheinlichkeiten der hypothesenrelevanten genetischen Merkmale untersucht. Dabei galt es zu untersuchen, ob sich die 186 in dieser Arbeit untersuchten Patienten hinsichtlich der Allelfrequenz der Polymorphismen von den 96 Personen des Normalkollektivs unterscheiden.

Intron 11 Polymorphismus:

Für die Auftretenswahrscheinlichkeit des Allels A2 im Intron 11 des *FANCC* wurde angenommen, dass sich das Normal- und Patientenkollektiv nicht signifikant unterscheiden und beide Stichproben aus einer Grundgesamtheit mit einem Anteil von π positiven Merkmalen stammen. Ein beobachteter Unterschied zwischen Malignomfällen im Patientenkollektiv und Frequenz des Allels A2 im Intron 11 des *FANCC* wäre damit nur zufällig (1. Nullhypothese: $H_0 : \pi_1 = \pi_2$).

Wenn das Vorliegen oder Fehlen des *FANCC* Intron 11 Allels A2 als ein möglicher Risikofaktor für die Malignomentstehung bei Kindern zu werten wäre, müsste dieses Allel unterschiedlich verteilt sein zwischen Kindern mit malignen Erkrankungen und gesunden Kindern. Es sollte sich somit ein nicht nur zufälliger Unterschied zwischen den untersuchten Stichproben in dieser Arbeit für dieses Merkmals zeigen. Die Ausprägung oder das Fehlen des Allels A2 im Intron 11 des *FANCC* wäre in diesem Falle mit einem möglichen Malignomentstehungsrisiko für die betroffenen Personen verknüpft (1. Alternativhypothese: $H_1 : \pi_1 \neq \pi_2$).

Für Allel A2 im Intron 11 des *FANCC* wurde neben der absoluten Häufigkeitsverteilung innerhalb der Stichproben auch das gemeinsame Auftreten von Allel A1 und A2 als heterozygoter Phänotyp analysiert. Dabei wurde die Hypothese überprüft, ob sich Patienten- und Normalkollektiv in dieser Studie hinsichtlich der Auftretenswahrscheinlichkeit für Heterozygotie unterscheiden.

Die Analyse von Probanden des Patienten- und Normalkollektivs innerhalb dieser Arbeit würde entsprechend einen nicht nur zufälligen Unterschied für Heterozygotie ergeben. Beide Stichproben würden nicht aus einer gemeinsamen Grundgesamtheit mit einem Anteil von π positiven Merkmalen stammen und die Auftretenswahrscheinlichkeiten im Patienten- und Normalkollektiv wären für Heterozygotie im Intron 11 des *FANCC* signifikant verschieden. Ein Zusammenhang zwischen den beobachteten Malignomfällen und assoziierter

Heterozygotie wäre in diesem Fall nicht nur zufällig (2. Nullhypothese $H_0 : \pi_1 = \pi_2$; 2. Alternativhypothese $H_1 : \pi_1 \neq \pi_2$).

Für den Fall, dass in der veröffentlichten Stichprobe von Gibson et al. [51] ebenfalls ausschließlich onkologische Probanden eingeschlossen wurden, sollte der Vergleich mit dem Normalkollektiv in dieser Abhandlung hinsichtlich der Auftretenshäufigkeit des heterozygoten Allels A2 einen signifikanten Unterschied ergeben. Entsprechend wurde die Hypothese überprüft, ob sich die Wahrscheinlichkeiten für das Vorliegen von Heterozygotie in der Stichprobe von Gibson et al. [51] und in der Stichprobe gesunder Probanden dieser Studie unterscheiden (3. Nullhypothese $H_0 : \pi_1 = \pi_3$; 3. Alternativhypothese $H_1 : \pi_1 \neq \pi_3$).

Für den Fall, dass die Ausprägung des Allels A2 im Intron 11 des *FANCC* nicht als möglicher Risikofaktor für maligne Erkrankungen zu werten wäre, sollten die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten dieses Merkmals in allen drei Gruppen vergleichbar sein. Überprüft wurde deshalb, ob sich die Wahrscheinlichkeiten zwischen der Patientengruppe in dieser Studie, der Gruppe gesunder Probanden in dieser Studie und der Stichprobe von Gibson et al. [51] unterscheiden (4. Nullhypothese $H_0 : \pi_1 = \pi_2 = \pi_3$; 4. Alternativhypothese $H_1 : \neg H_0$).

Dazu wurde analysiert, ob sich die 186 in dieser Studie untersuchten Patienten für Heterozygotie des Allels A2 im Intron 11 des *FANCC* von der aus 58 Individuen bestehenden veröffentlichten Stichprobe [51] nur zufällig unterscheiden und damit aus einer Grundgesamtheit mit einem Anteil von π positiven Merkmalsausprägungen stammen (5. Nullhypothese $H_0 : \pi_2 = \pi_3$). Wenn die heterozygote Ausprägung des Allels A2 im Intron 11 des *FANCC* als Risikofaktor für maligne Erkrankungen im Kindesalter zu werten wäre, sollte sich das veröffentlichte Kollektiv [51] vom Patientenkollektiv in dieser Arbeit nicht signifikant unterscheiden - vorausgesetzt die Probanden in der Studie von Gibson et al. [51] waren pädiatrische Patienten mit Malignomerkrankungen.

Stammten die genannten Stichproben aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten, so wäre alternativ ein nicht nur zufälliger Unterschied zwischen der Patientenstichprobe in dieser Arbeit und in der von Gibson et al. [51] Stichprobe zu erwarten (5. Alternativhypothese $H_1 : \pi_2 \neq \pi_3$).

Statistische Berechnungen:

Zur statistischen Hypothesenprüfung wurden für die Hypothesen 1, 2, 3 und 5 jeweils ein 4-Felder-Chi-Quadrat-Test berechnet. Zur Überprüfung der 4. Hypothese wurde ein 2 * 3-Felder-Chi-Quadrat-Test für den Vergleich der drei Stichproben berechnet.

Bei den genannten Stichprobengrößen wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $\alpha = 5 \%$ als hinreichend akzeptabel festgelegt. Sie entspricht dem kritischen Wert für die Übertretungswahrscheinlichkeit beim einseitigen exakten Fisher-Test.

Die Berechnung des empirischen Wert χ^2_{emp} bei einem 4-Felder-Chi-Quadrat-Test wurde von Bortz und Lienert 1998 beschrieben [1]. Der kritische Wert für zweiseitige 4-Felder-Chi-Quadrat-Tests ist ebenfalls dort vertafelt ($df = 1$ für Vierfelder-Test) und beträgt $\chi^2_{\text{krit}; \alpha=0.05; df=1} = 3,84$. Die Berechnung des empirischen Wert χ^2_{emp} bei einem $k * m$ -Felder-Chi-Quadrat-Test wird ebenfalls von Bortz und Lienert erläutert [1]. Der kritische Wert für zweiseitige $k * m$ -Felder-Chi-Quadrat Tests ist dort vertafelt ($df = 2$ für 2 * 3-Felder-Test) und beträgt $\chi^2_{\text{krit}; \alpha=0.05; df=2} = 5,99$. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Häufigkeitstabellen.

Aus den Allelfrequenzen der in dieser Arbeit analysierten Patienten- und Normalkollektive für den Polymorphismus in Intron 11 des *FANCC* erfolgte unter der Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts ein statistischer Vergleich der berechneten und beobachteten Genotypen durch entsprechende Chi-Quadrat-Teste.

Auf eine Darstellung der statistischen Auswertungen für die Ergebnisse der *FANCC* Polymorphismen aus Exon 1 und Exon 6 wurde aufgrund der niedrigen Fallzahlen im untersuchten Kollektiv verzichtet (Exon 1: 3 Patienten und 3 Normalpersonen; Exon 6: 1 Patient).

4.) Ergebnisse

4.1) Vorstellung der Ergebnisse

Bei den untersuchten 186 pädiatrischen Patienten konnten neben bereits in der Literatur veröffentlichten Polymorphismen und bekannten Mutationen des Fanconi Anämie C Gens (*FANCC*) auch neue Mutationen im Bereich der Exons 1, 4 und 5 nachgewiesen werden. Bei 2 der 6 untersuchten Zelllinien fanden sich ebenfalls zuvor noch nicht beschriebene Mutationen des *FANCC*.

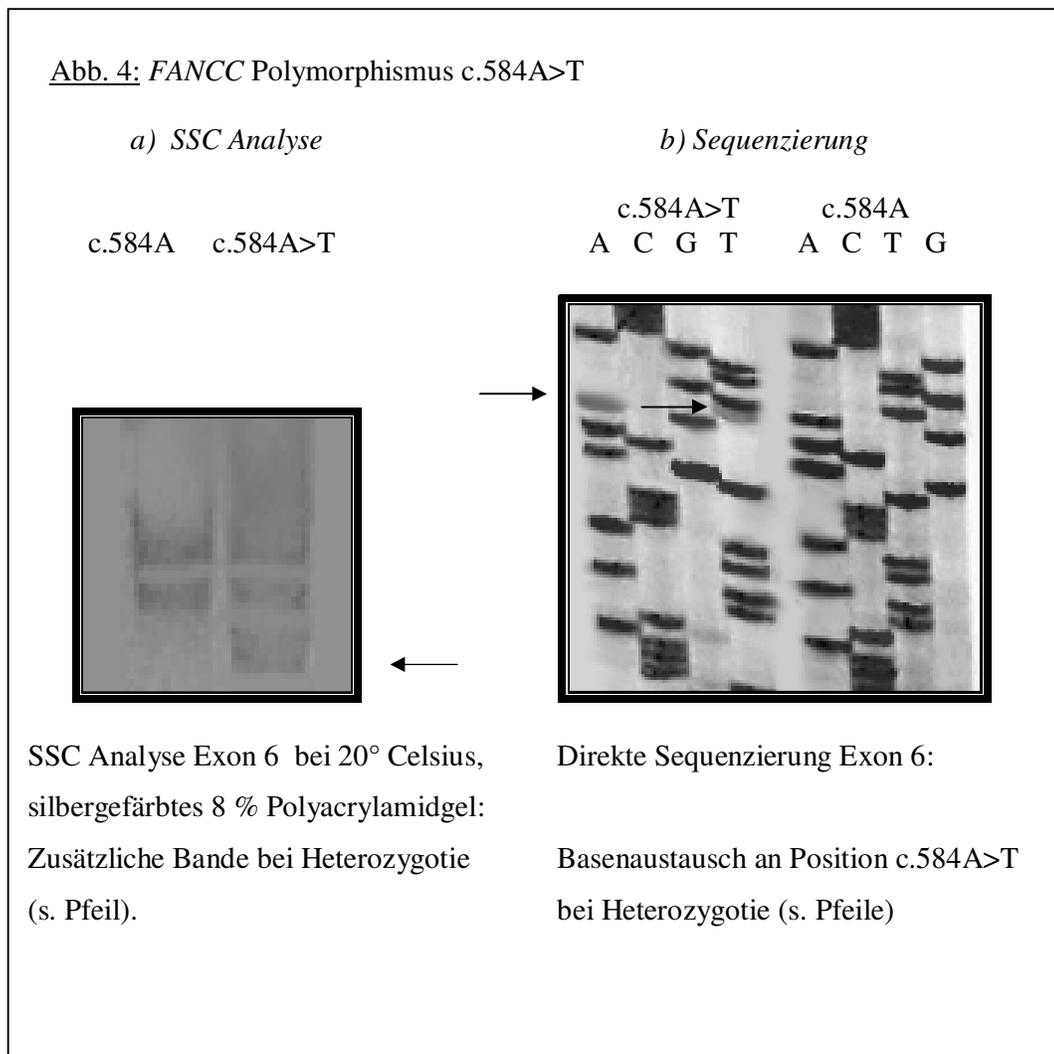
Im folgenden werden zunächst die bereits bekannten Veränderungen des *FANCC* erläutert und im Anschluß daran die neuen Ergebnisse ausführlich vorgestellt. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse findet sich in Tabelle 2.

Es folgt die Analyse des *FANCC* Intron 11 Polymorphismus bei 186 Patienten und 96 Personen des Normalkollektivs mittels RFLP Analyse mit ihrer statistischen Auswertung. Die von Gibson et al. gewählte Bezeichnung für Allel A1 und A2 in diese Arbeit übernommen worden [51]. Die Bezeichnung aller anderen Mutationen, Polymorphismen und Aminosäuresequenzen erfolgt gemäß der international gebräuchlichen Nomenklatur mit Stand zum 15. Juni 2008 [15].

Polymorphismus c. 584A>T im Exon 6 bei einem Patienten mit AML

Der bekannte Polymorphismus c.584A>T, der entweder mit Aspartat oder Valin an Position 195 des FANCC Proteins (p.D195V) korreliert, konnte heterozygot bei einem Patienten mit AML (FF 34) nachgewiesen werden.

Heterozygotie für diesen Polymorphismus führt in der SSC Analyse zu einer zusätzlichen Bande im Polyacrylamidgel (Abb. 4a). Das PCR Produkt scheint in der PAGE Analyse unauffällig (nicht abgebildet). In der direkten Sequenzierung sieht man an Basenposition 584 im Exon 6 zwei Banden auf gleicher Höhe, die jeweils dem Allel Adenin bzw. Thymin entsprechen (Abb. 4b).



4.3) Bekannte Fanconi Anämie C Gen Mutationen

Compound heterozygote Fanconi Anämie C Patientin

Die bekannte Deletion c.67delG führt zu einer Leserasterverschiebung und damit zu einem vorzeitigen Stopcodon (p.W22X) im Bereich des Exon 1 des *FANCC*. Bei einer hier untersuchten Fanconi Anämie Patientin (K 633) konnte sie heterozygot nachgewiesen werden. Diese Patientin ist compound heterozygot für die bekannte Splice-site Mutation c.456+4A>T. Die Kombination beider Mutationen führt im Ergebnis zu einem nicht funktionsfähigen Genprodukt. Die Mutationen sind damit kausal für die Entstehung einer Fanconi Anämie bei der Patientin.

Als heterozygote Anlageträger wurden für die Mutation c.67delG im Exon 1 die Mutter der Patientin und für die Splice-site Mutation c.456+4A>T im Intron 4 der Vater der Patientin identifiziert. Die letztere Mutation ist ein typischerweise bei Ashkenazi Juden gefundener Defekt. Eine familiäre Beziehung des aus dem ehemaligen Ostpreußen stammenden Vaters zu entsprechenden Vorfahren ist nicht bekannt. Die Patientin ist damit die erste Fanconi Anämie Patientin der Komplementationsgruppe C mit compound Heterozygotie für diese Mutation in Deutschland.

Liegt die Deletion c.67delG im Exon 1 des *FANCC* heterozygot vor, so führt dies in der SSC Analyse zum Ausfall einer Bande im Polyacrylamidgel (Abb. 5a). Das PCR Produkt scheint in der PAGE Analyse unauffällig (nicht abgebildet). In der direkten Sequenzierung sieht man eine Überlappung der Sequenzen bedingt durch die Basenpaardeletion (Abb. 5b). In der Klonierung lassen sich beide Allele getrennt voneinander darstellen (Abb. 5c).

Die heterozygote Splice-site Mutation c.456+4A>T führt in der SSC Analyse zu einer zusätzlichen Bande im Polyacrylamidgel (Abb. 6a) und ist in der dHPLC Analyse anhand des charakteristischen Elutionsprofils gegenüber dem Wildtyp identifizierbar. Das PCR Produkt ist in der PAGE Analyse unauffällig (nicht dargestellt).

Heterozygote Splice-site Mutation im Intron 4 bei Patient mit Neuroblastom

Der Bruder (K 712) der genannten Fanconi Anämie Patientin (K633) ist heterozygoter Anlageträger der Splice-site Mutation c.456+4A>T. Bei ihm wurde ein Neuroblastom diagnostiziert. In einer zusätzlichen Untersuchung von weiteren 55 Patienten mit Neuroblastomen fanden sich keine weitere heterozygote Splice-site Mutationen c.456+4A>T in der dHPLC Analyse.

Bei Vorliegen der heterozygoten Mutation c.456+4A>T zeigt sich in der dHPLC ein überhöhter erster Peak gegenüber dem Wildtyp im Elutionsdiagramm (Abb. 6c). In der direkten Sequenzierung zeigen sich bei Heterozygotie für die Mutation zwei Banden auf gleicher Höhe, die jeweils dem Wildtyp Allel (Adenin) bzw. dem mutierten Allel (Thymin) entsprechen (Abb. 6b). Ein zusammenfassender Stammbaum der Familie ist im Anschluß an die Ergebnisse dargestellt (Abb. 7).

Abb. 5: FANCC Deletion c.67delG

a) SSC Analyse c.67delG

Deletion Wildtyp

VL

ML

K 633

K 712

WT

c.67delG

c.67delG

c.67delG

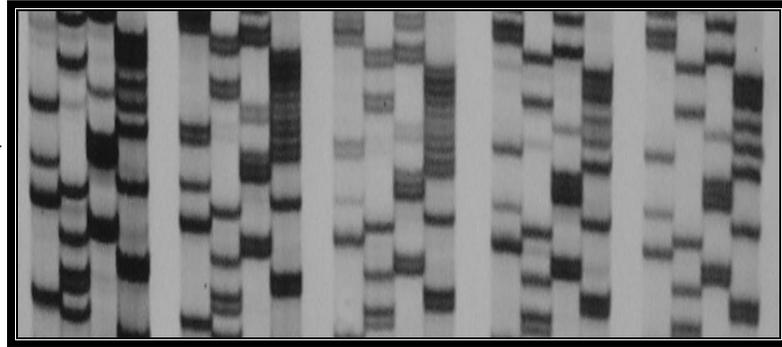
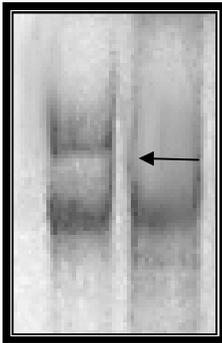
A C G T

A C G T

A C G T

A C G T

A C G T



SSC Analyse Exon 1 bei 4° Celsius, silbergefärbtes 8 % Polyacrylamidgel: Doppelbande bei heterozygoter Deletion gegenüber dem Wildtyp (s.Pfeil).

Direkte Sequenzierung c.67delG: Leserasterverschiebung bei Vorliegen der Deletion gegenüber dem Wildtyp (auf Pfeilhöhe). Es sind die Fanconi Anämie Patientin (K633), ihr Bruder (K712), die Eltern (VL, ML) und eine gesunde Normalperson (WT) dargestellt.

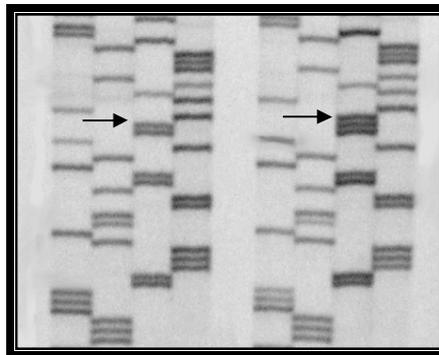
c) Klonierung c.67delG

Deletion

Wildtyp

A C G T

A C G T

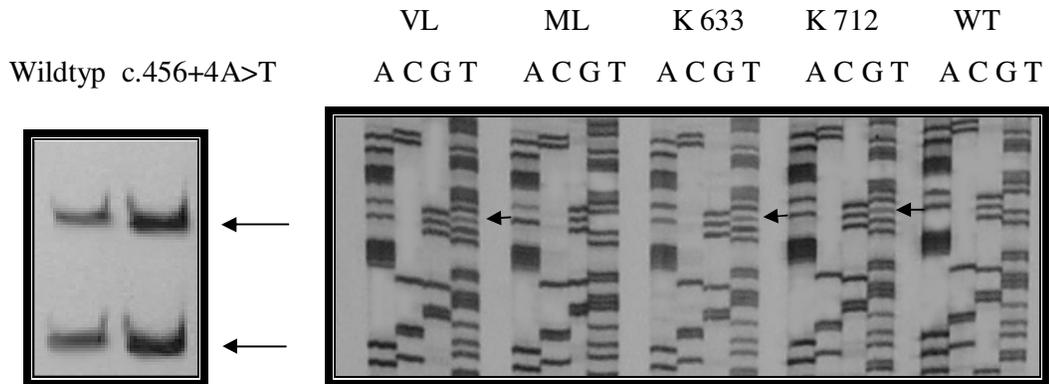


Klonierung c.67delG: Deletion (Guanin) gegenüber dem Wildtyp an Basenposition 67 des Exon 1 (Pfeile).

Abb. 6: *FANCC* Splice-site Mutation c.456+4A>T

a) *SSC Analyse c.456+4A>T*

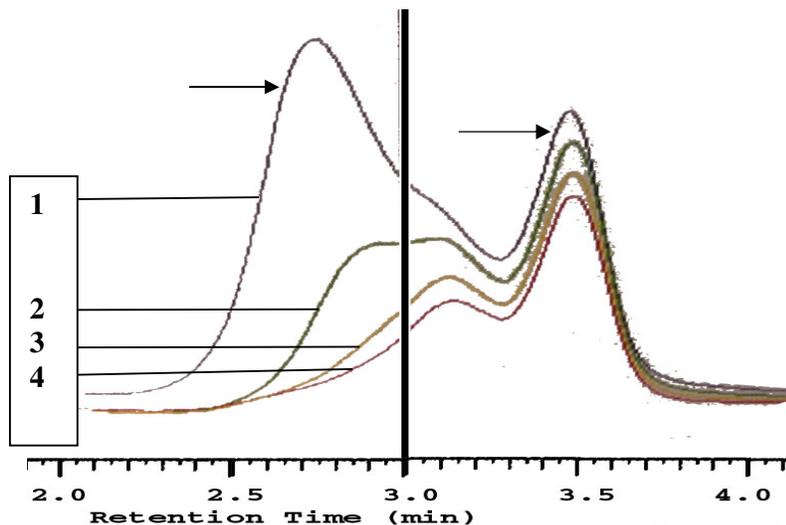
b) *Sequenzierung c.456+4A>T*



SSC Analyse Exon 4 bei 4° Celsius, silbergefärbtes 8 % Polyacrylamidgel: Zusätzliche Banden bei Heterozygotie der Splice-site Mutation gegenüber dem Wildtyp (s. Pfeile).

Direkte Sequenzierung c.456+4A>T: Zwei Banden auf gleicher Höhe bei heterozygoten Mutationsträgern (Pfeile) gegenüber dem Wildtyp. Es sind die Fanconi Anämie Patientin (K633), ihr Bruder (K712), die Eltern (VL, ML) und eine gesunde Kontrollperson (WT) dargestellt.

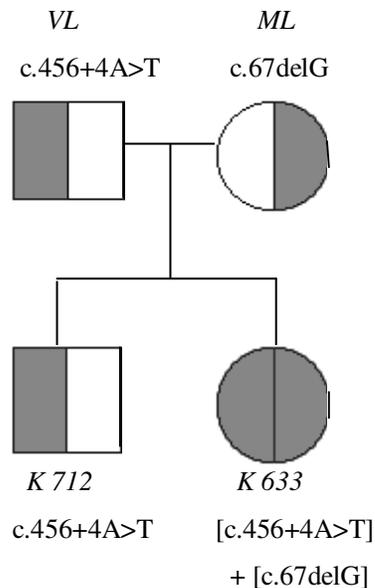
c) *dHPLC Analyse c.456+4A>T*



dHPLC Analyse der heterozygoten Mutation c.456+4A>T bei Neuroblastompatienten: Oberster Kurvenverlauf (1) mit hohem ersten Peak (linker Pfeil) und relativ dazu niedrigem zweiten Peak (rechter Pfeil) bei Heterozygotie im Vergleich zu drei Wildtypen (2,3,4), dargestellt durch darunter liegende Elutionsdiagramme.

Abb. 7:

Stammbaum der Familie von K 633 und K 712



4.4) Neue heterozygote Fanconi Anämie C Gen Mutationen

Basenaustausch vor Exon 1 (5' Region) bei AML-Zelllinie

Der heterozygote Basenaustausch c.1-12G>A vor dem Exon 1 des *FANCC* bei der AML-Zelllinie MKB 1 (HA 481) sollte zu einer Substitution von Guanin durch Adenin führen.

Weder bei den untersuchten Patienten noch im Normalkollektiv fand sich diese Veränderung. Das heterozygote Vorliegen dieses Basenaustausches führt in der SSC Analyse zu einer zusätzlichen Bande im Polyacrylamidgel (Abb. 8a). Das PCR Produkt scheint in der PAGE Analyse unauffällig (nicht abgebildet). In der direkten Sequenzierung sieht man an Basenposition -12 vor dem Exon 1 (5' Region) zwei sich überlappende Banden, die jeweils dem Allel Guanin bzw. dem Allel Adenin entsprechen (Abb. 8b).

Abb. 8: Basenaustausch c.1-12G>A

a) *SSC Analyse*

c.1-12G>A Wildtyp



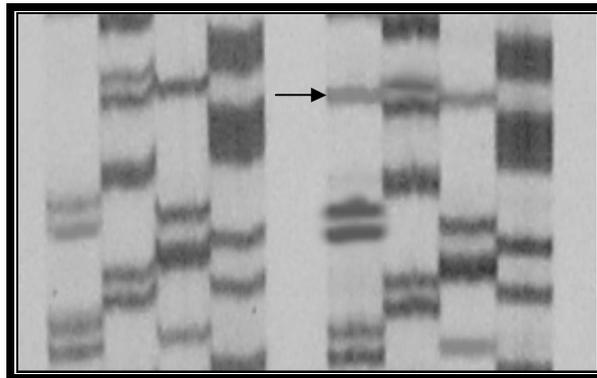
SSC Analyse Exon 1 mit angrenzenden Intronabschnitten bei 4° Celsius, silbergefärbtes 8 % Polyacrylamidgel: Doppelbande bei Heterozygotie gegenüber dem Wildtyp.

b) *Sequenzierung*

Wildtyp

c.1-12G>A

A C G T A C G T



Direkte Sequenzierung des heterozygoten Basenaustausches: Zwei Banden auf gleicher Höhe bei heterozygotem Basenaustausch (Pfeil) gegenüber dem Wildtyp. Dargestellt sind die AML-Zelllinie sowie ein Wildtyp.

Missense Mutation im Exon 1 bei einem Patient mit AML

Der heterozygote Basenaustausch an Position c.7C>G im Exon 1 des *FANCC* bei einem Patienten mit AML (HA 456) sollte zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Glutamat (p.Q3E) führen. Diese Veränderung ließ sich weder bei den anderen untersuchten Patienten noch im Normalkollektiv finden.

Das heterozygote Vorliegen dieses Basenaustausches führt in der SSC Analyse zu einem charakteristischen Doppelbandenmuster im Polyacrylamidgel (Abb. 9a). Das PCR Produkt scheint in der PAGE Analyse unauffällig (nicht abgebildet). In der direkten Sequenzierung sieht man an Basenposition 7 im Exon 1 zwei Banden auf gleicher Höhe, die jeweils dem Wildtyp Allel (Cytosin) bzw. dem veränderten Allel (Guanin) entsprechen (Abb. 9b).

Abb. 9: Missense Mutation c.7C>G

a) *SSC Analyse*

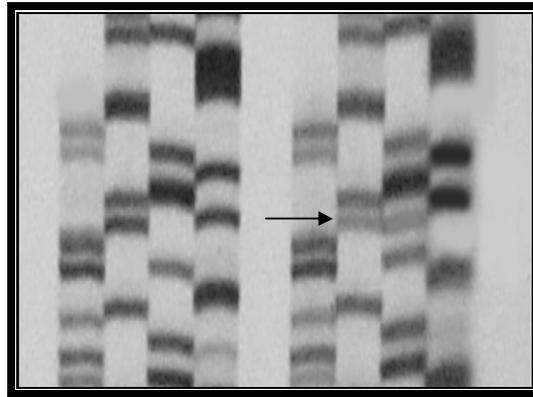
Wildtyp c.7C>G



SSC Analyse bei 4° Celsius, silbergefärbtes 8 % Polyacrylamidgel: Doppelbanden bei Heterozygotie im Exon 1 (s. Pfeile) gegenüber dem Wildtyp.

b) *Sequenzierung*

Wildtyp c.7C>G
A C G T A C G T



Direkte Sequenzierung des heterozygoten Basenaustausches im Exon 1 des *FANCC*: Zwei Banden auf gleicher Höhe bei heterozygotem Basenaustausch (s. Pfeil) gegenüber dem Wildtyp. Darstellt sind der Patient mit AML sowie eine Normalperson.

Leserasterverschiebung im Exon 4 bei zwei Geschwistern mit T-ALL

Eine neue heterozygote Nonsense Mutation c.377_378delGA im Exon 4 des *FANCC* wurde bei zwei Geschwistern mit ALL vom T-Zelltyp (FF16 und B1) entdeckt. Die Deletion der zwei Basen Guanin und Adenin führt zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einem vorzeitigen Stopcodon. Im Fanconi Anämie C Protein sollte zunächst Arginin durch Isoleucin an Aminosäureposition 126 und anschließend Phenylalanin durch das vorzeitige Stopcodon Opal an Aminosäureposition 127 ersetzt werden (p.R126IfsX127). Diese Veränderung ließ sich bei den untersuchten zwei Patienten als auch bei einem nicht erkrankten Geschwisterkind und den konsanguinen, ebenfalls nicht erkrankten Eltern nachweisen. Die aus der Türkei stammenden Eltern sind Cousin und Cousine ersten Grades.

Trotz Konsanguinität waren die Patienten jedoch nicht homozygot für die Mutation. Weitere *FANCC* Mutationen konnten bei keinem Familienmitglied identifiziert werden. Bei 60 weiteren pädiatrischen Patienten mit T-ALL, den übrigen 185 Patienten in dieser Untersuchung sowie im Normalkollektiv von 96 Kindern ließ sich diese heterozygote Deletion nicht nachweisen.

Das PCR Produkt fällt bei Vorliegen der heterozygoten Deletion bereits durch ein charakteristisches Bandenmuster in der PAGE Analyse (6%iges Gel) auf (Abb. 10a).

In der SSC Analyse bei 4° Celsius lässt sich im 10%igen Polyacrylamidgel eine Doppelbandenkonfiguration nachweisen (Abb. 10b). Bei der direkten Sequenzierung kommt es durch die Deletion der zwei Basen Guanin und Adenin auf dem veränderten Allel zu einer entsprechenden Bandenverschiebung (Abb. 10c). Nach Klonierung lassen sich die beiden Allele getrennt voneinander sequenzieren und darstellen (Abb. 10d). Ein zusammenfassender Stammbaum der Familie folgt im Anschluß an die Ergebnisdarstellung (Abb. 11).

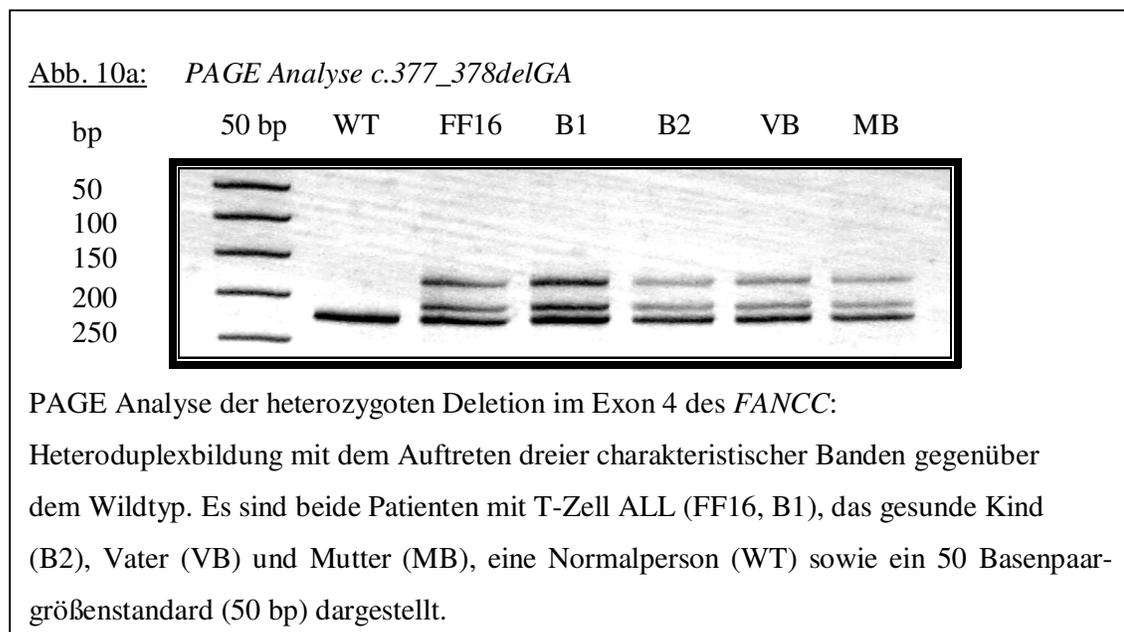
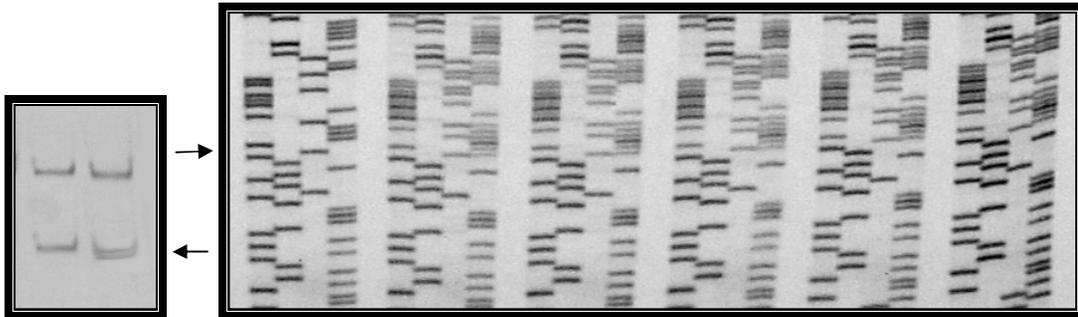


Abb. 10b-d: Basendelektion c.377_378delGA

b) SSC Analyse

c) Sequenzierung

	WT	FF16	B1	B2	VB	MB
Wildtyp Deletion	A C G T	A C G T	A C G T	A C G T	A C G T	A C G T



SSC Analyse bei 4°

Celsius, silbergefärbtes

10 % Polyacrylamidgel:

Doppelbande bei Vorliegen

der heterozygoten Deletion

(s. Pfeil).

Direkte Sequenzierung der heterozygoten Basendelektion

im Exon 4:

Zwei Banden auf gleicher Höhe bei heterozygoter

Basendelektion (auf Pfeilhöhe) gegenüber dem Wildtyp. Es

sind Sequenzen beider Patienten mit T-ALL (FF16, B1),

sowie der gesunden Familienmitglieder (B2, VB, MB) und

einer Normalperson (WT) dargestellt.

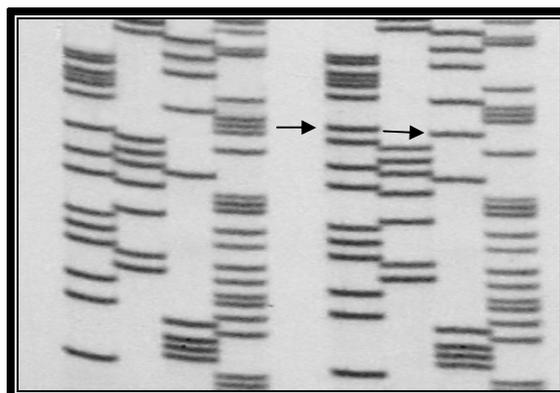
d) Klonierung

c.377_378delGA

Wildtyp

A C G T

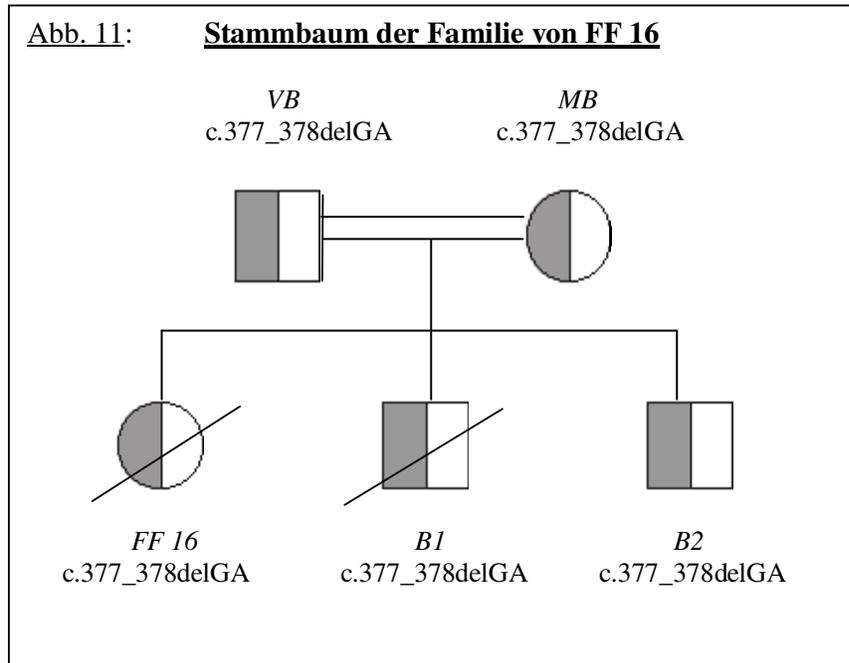
A C G T



Klonierung bei heterozygoter Deletion c.377_378delGA im Exon 4 des *FANCC*.

Deletion an Basenposition 377 und 378 (Guanin und Adenin) gegenüber dem Wildtyp

(s. Pfeile).



Missense Mutation im Exon 5 bei AML

Der heterozygote Basenaustausch an Position c.510A>G im Exon 5 des *FANCC* bei einem Patienten mit AML (HA 5123) sollte zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin durch Serin an Aminosäureposition 170 des *FANCC* Proteins führen (p.N170S). Diese Veränderung ließ sich bei keinem weiteren der untersuchten Patienten bzw. im Normalkollektiv nachweisen.

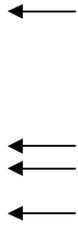
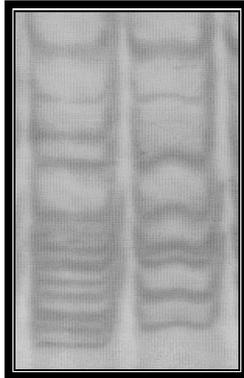
Das heterozygote Vorliegen dieses Basenaustausches führt in der SSC Analyse des Exon 5 zu einem charakteristischen Muster mehrerer Banden im Polyacrylamidgel (Abb. 12a). Das PCR Produkt scheint in der PAGE Analyse unauffällig (nicht abgebildet).

In der direkten Sequenzierung erkennt man an Basenposition 510 im Exon 5 zwei Banden auf gleicher Höhe, die jeweils dem Wildtyp Allel (Adenin) bzw. dem veränderten Allel (Guanin) entsprechen (Abb. 12b).

Abb. 12: Missense Mutation c.510A>G

a) *SSC Analyse*

c.510A>G Wildtyp



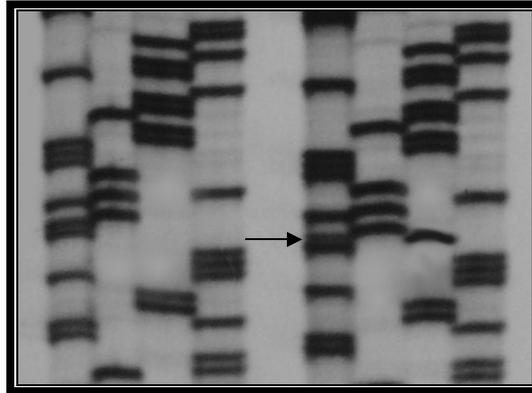
SSC Analyse Exon 5 bei 4° Celsius, silbergefärbtes 10 % Polyacrylamidgel:
Charakteristisches Bandenmuster bei heterozygotem Basenaustausch gegenüber dem Wildtyp (s. Pfeile).

b) *Sequenzierung*

Wildtyp

c.510A>G

A C G T A C G T



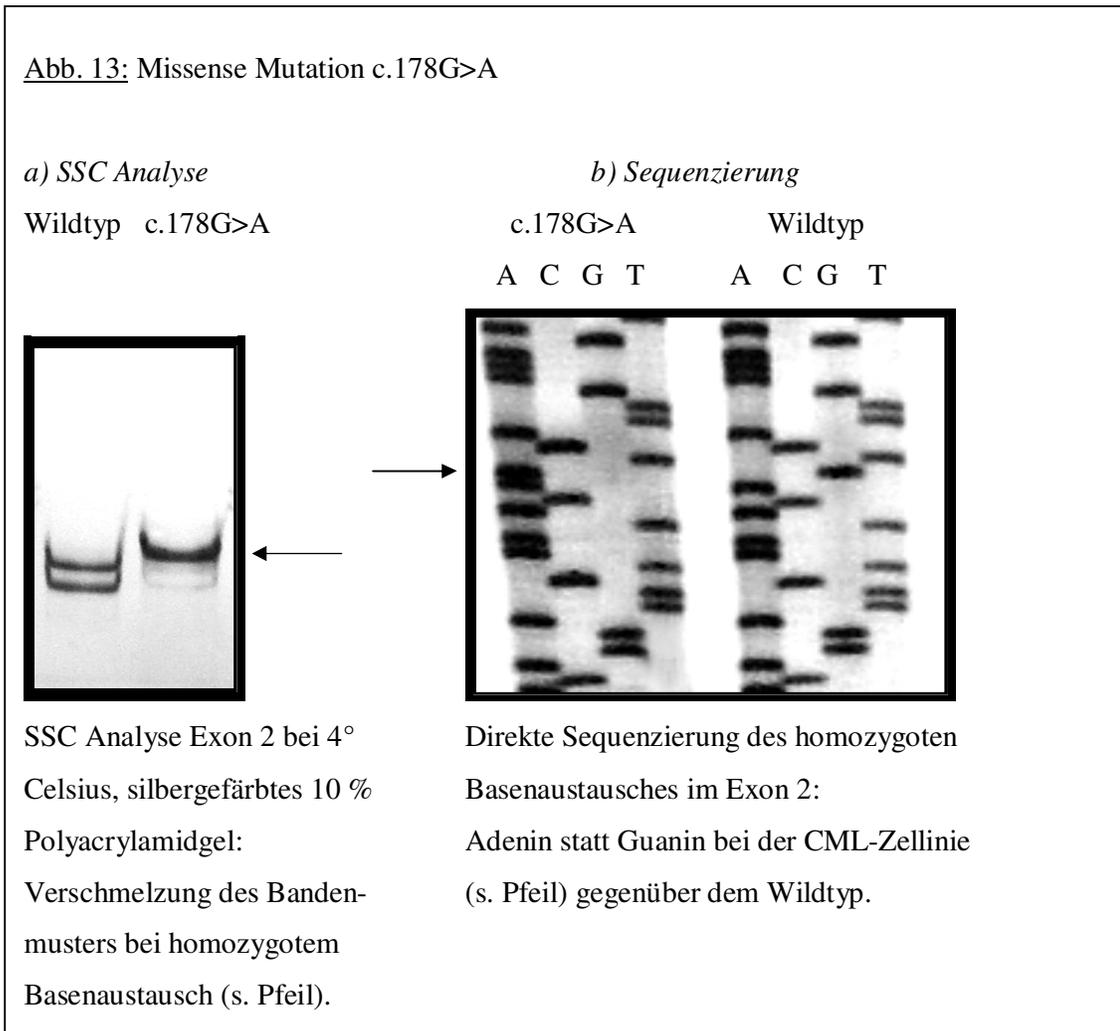
Direkte Sequenzierung des heterozygoten Basenaustausches im Exon 5 des *FANCC*:
Zwei Banden auf gleicher Höhe bei heterozygotem Basenaustausch (s. Pfeil) gegenüber dem Wildtyp.
Es sind Sequenzen des Patienten mit AML und einer Normalperson dargestellt.

4.5) Neue homozygote Fanconi Anämie C Gen Mutationen

Missense Mutation im Exon 2 bei CML-Zelllinie

Bei der Analyse der CML-Zelllinie K 562 (HA 476) konnte der homozygote Basenaustausch an Position c.178G>A im Exon 2 des *FANCC* nachgewiesen werden. Dieser sollte zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an Aminosäureposition 60 des *FANCC* Proteins führen (p.V60I). Diese Veränderung ließ sich bei keinem weiteren der untersuchten Patienten bzw. im Normalkollektiv nachweisen.

Das homozygote Vorliegen dieses Basenaustausches führt in der SSC Analyse des Exon 2 zu einer Bandenverschmelzung im Polyacrylamidgel (Abb. 13a). Das PCR Produkt ist in der PAGE Analyse unauffällig (nicht abgebildet). In der direkten Sequenzierung erkennt man an Basenposition 178 im Exon 2 den homozygoten Austausch der Wildtypbande (Guanin) gegenüber der veränderten Sequenz bei der CML-Zelllinie (Adenin) (Abb. 13b).



Die nachstehende Tabelle (Tab. 2) fasst die zuvor erläuterten Ergebnisse zusammen .

Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse für 186 Patienten und 6 Zelllinien:

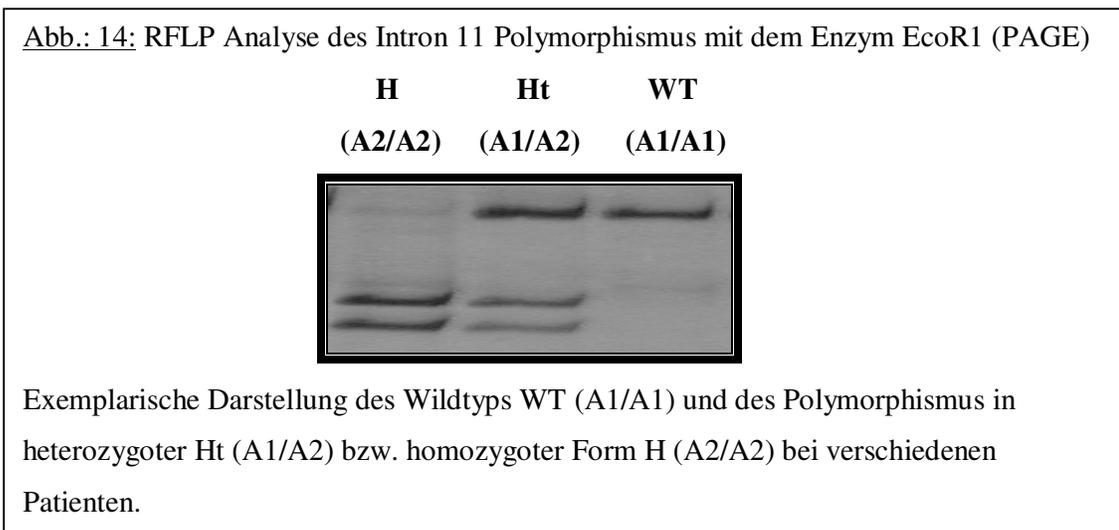
Erstbeschreiber der Polymorphismen bzw. Mutationen sind in Klammern genannt.

Patient	Diagnose	Ergebnisse	(Erstbeschreiber)
HA 119 K 742 FF 31 M 38 K 739 K 861	AML AML JMML Gesund Gesund Gesund	c.77C>T	Polymorphismus p.S26F (Verlander 1994)
FF 34	AML	c.584A>T	Polymorphismus p.D195V (Verlander 1994)
K 633	Fanconi Anämie	c.456+4A>T c.67delG	Splice-site Mutation Leserasterverschiebung (Prämaures Stopcodon) (Whitney 1993) (Strathdee 1992)
K 712	Neuroblastom, Bruder zu K633	c.456+4A>T	Splice-site Mutation (Whitney 1993)
HA 456	AML	c.7C>G	Missense Mutation p.Q3E (diese Arbeit)
FF 16 B 1 B 2 VB MB	T-ALL T-ALL, Bruder zu FF16 Gesund, Bruder zu FF16 Gesund, Vater zu FF16 Gesund, Mutter zu FF16	c.377_378delGA	Nonsense Mutation (Prämaures Stopcodon) p.R126IfsX127 (diese Arbeit)
HA 5123	AML	c.510A>G	Missense Mutation p.N170S (diese Arbeit)
HA 481	AML-Zelllinie (MKB 1)	c.1-12G>A	Basenaustausch (5' Region vor Exon 1) (diese Arbeit)
HA 476	CML-Zelllinie (K 562)	c.178G>A	Missense Mutation p.V60I (diese Arbeit)

4.6) RFLP Analyse des Intron 11 Polymorphismus

In der RFLP Analyse des Intron 11 Polymorphismus (Abb.: 14) von 186 Patienten lag bei 28 dieser Patienten eine Homozygotie für Allel A2 vor. 99 Patienten waren heterozygot für den Polymorphismus und bei 59 Patienten ließ sich mittels RFLP Allel A1 in homozygoter Form nachweisen (Tab. 3).

Bei den 96 untersuchten Personen des Normalkollektivs ergab sich folgende Verteilung bei der RFLP Analyse. 10 Personen waren homozygote Anlageträger für Allel A2, bei insgesamt 63 Personen lag eine Heterozygotie vor und bei 23 Personen fand sich Allel A1 in homozygoter Form (Tab. 3).



Tab. 3: RFLP Analyse des FANCC Intron 11 mittels EcoR1 bei 186 Patienten und 96 Personen des Normalkollektivs.

FANCC Intron 11 (RFLP Analyse)	Patientenkollektiv n = 186 (%)	Normalkollektiv n = 96 (%)
Homozygoter Polymorphismus (A2/A2)	28 (15)	10 (10)
Heterozygoter Polymorphismus (A1/A2)	99 (53)	63 (66)
Homozygoter Wildtyp (A1/A1)	59 (32)	23 (24)

Aus dieser Analyse von insgesamt 372 Allelen innerhalb des Patientenkollektivs ergab sich eine absolute Verteilung von 217 für Allel A1 und 155 für Allel A2. Die prozentuale Auswertung ergab eine Allelfrequenz von 0,583 für A1 und von 0,417 für A2 innerhalb des Patientenkollektivs. Unter den 186 Patienten in dieser Arbeit wurde eine Häufigkeit von 0,532 für Heterozygotie (Allel A1/A2) beobachtet.

Unter den insgesamt 192 Allelen der 96 Kontrollpersonen fand sich 109 mal das Allel A1. Dies entspricht einer Allelfrequenz von 0,568. Entsprechend fand sich 83 mal das Allel A2 innerhalb dieser Stichprobe, was einer Frequenz von 0,432 entspricht. Das Ergebnis der Analyse für die 96 Kontrollen ergab eine Allelfrequenz für Heterozygotie (Allel A1/A2) von 0,656.

4.7) Ergebnisse der statistischen Auswertung

Intron 11 Polymorphismus:

Für die 1. Hypothese, ob sich auf Allelebene ein signifikanter Unterschied zwischen dem in dieser Arbeit untersuchten Patienten- und Normalkollektiv hinsichtlich der Auftretenswahrscheinlichkeit des Allels A2 im Intron 11 des *FANCC* finden ließe, berechnet sich ein $\chi^2_{\text{emp}} \approx 0,127$. Da $\chi^2_{\text{emp}} < \chi^2_{\text{krit}}$ wird die Nullhypothese (H_0) beibehalten. Es findet sich somit kein signifikanter Unterschied.

Bei der Überprüfung der 2. Hypothese, bei der sich auf Personenebene ein signifikanter Unterschied zwischen dem in dieser Arbeit untersuchten Patienten- und Normalkollektiv hinsichtlich der Auftretenswahrscheinlichkeit des Phänotyps A1/A2 im Intron 11 des *FANCC* finden lassen sollte, berechnet sich ein $\chi^2_{\text{emp}} \approx 3,98$. Daher muss die Nullhypothese (H_0) verworfen werden. Es findet sich somit ein signifikanter Unterschied (vergl. Tab. 4c und Tab. 5).

Bei der 3. Hypothese errechnet sich ein $\chi^2_{\text{emp}} \approx 2,254$. Daher wird die Nullhypothese (H_0) beibehalten. Das heißt, dass sich das Patientenkollektiv von Gibson et al. [51] und das in dieser Arbeit untersuchte Normalkollektiv nur zufällig voneinander unterscheiden. Für die 4. Hypothese, ob sich für das Allel A2 ein Unterschied zwischen den drei Vergleichsgruppen ergäbe, ergibt sich ein $\chi^2_{\text{emp}} \approx 0,158$. Daher wird die Nullhypothese (H_0) beibehalten. Das heißt, die drei Vergleichsgruppen unterscheiden sich nur zufällig und sind damit nicht signifikant verschieden.

Bei Auswertung der 5. Hypothese, ob sich die Patientengruppe in dieser Arbeit signifikant von der von Gibson et al. gewählten Gruppe unterscheidet, ergibt sich ein Wert $\chi^2_{\text{emp}} \approx 0,0008$.

Die Nullhypothese (H_0) wird beibehalten und es kann unter einer 5%igen Fehlerwahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass sich die Stichproben der beiden Patientenkollektive hinsichtlich der Auftretenswahrscheinlichkeit für Heterozygotie (A1/A2) im Intron 11 des *FANCC* nur zufällig unterscheiden. Vergleiche hierzu auch Tab. 4a und 5.

Für die Analyse der aus den Allelfrequenzen berechneten Genotypfrequenzen in den berechneten und beobachteten Zahlen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Patientenkollektiv ($\chi^2 = 1,795$; d.f. 2; $p = 0,408$). Bei der Analyse des Normalkollektivs wurde unter der Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts ein signifikanter Unterschied zwischen erwarteten und beobachteten Werten festgestellt ($\chi^2 = 11,067$; d.f. 2, $p = 0,004$). Es kann unter einer 5%igen Fehlerwahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass sich das Normalkollektiv für die Analyse des Intron 11 Polymorphismus nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet. Vergleiche hierzu auch die Darstellung in Tab. 4a – 4c.

Tab. 4a: Verteilung der Allele im Intron 11 des FANCC

Stichprobe	Patientenkollektiv (n = 372)	Normalkollektiv (n = 192)	Studie von Gibson (n = 116)
Allel A1	58 % (n = 217)	57 % (n = 109)	57 % (n = 66)
Allel A2	42 % (n = 155)	43 % (n = 83)	43 % (n = 50)

n = Anzahl der Allele

Tab. 4b: Allelfrequenzen des FANCC Intron 11 EcoRI RFLP

bei 186 Patienten und 96 Personen des Normalkollektivs

Allelkollektiv	A1-Allel	A1 (%)	A2-Allel	A2 (%)	2 n
Patienten	217	58	155	42	372
Normal	109	57	83	43	192
Gesamt	326	58	238	42	564

2 n = Anzahl der Allele

Tab. 4c: Genotypfrequenzen des FANCC Intron 11 EcoRI RFLP

bei 186 Patienten und 96 Personen des Normalkollektivs

Genotyp- kollektiv	A1/A1 (o)	A1/A1 (e)	A1/A2 (o)	A1/A2 (e)	A2/A2 (o)	A2/A2 (e)	n	Het	χ^2	d f	P
Patienten	59	63	99	91	28	33	186	0,49	1,795	2	0,408
Normal	23	31	63	47	10	18	96	0,49	11,067	2	0,004
Gesamt	82	94	162	138	38	51	282	0,49			

n = Anzahl der Personen; (o) = observed; (e) = expected; Het = Heterozygotie-Rate

Tab. 5: Phänotypverteilung für Heterozygotie A1/A2 im Intron 11 des FANCC

Stichprobe	Patientenkollektiv (n = 186)	Normalkollektiv (n = 96)	Studie von Gibson (n = 58)
Heterozygotie (A1/A2)	53 % (n = 99)	66 % (n = 63)	53 % (n = 31)

n = Anzahl der Personen

5.) Diskussion

Die von Patienten mit Fanconi Anämie bzw. deren Angehörigen sowie den beteiligten Behandlern gestellte Frage nach einem erhöhten Malignomrisiko bei nicht erkrankten Anlageträgern konnte bisher nicht abschliessend beantwortet werden. In diesem Teil der Arbeit soll die Frage diskutiert werden, ob das Vorliegen von heterozygoten Mutationen des Fanconi Anämie C Gens (*FANCC*) mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Malignoms unter den 186 in dieser Arbeit untersuchten pädiatrischen Patienten verbunden ist. Sind, mit anderen Worten, bei den untersuchten Patienten *FANCC* Mutationen gehäuft angetroffen worden?

Für die genannte Fragestellung ist diese Arbeit mit einem Anteil von insgesamt 158 Leukämien und myelodysplastischen Syndromen (85 %) geeignet, da solche hämatologischen Erkrankungen auch typischerweise bei der Fanconi Anämie auftreten [75]. Die Einbeziehung pädiatrischer Patienten mit schweren aplastischen Anämien, Non-Hodgkin Lymphomen, Chromosomenbrüchigkeitssyndromen und VACTERL Fehlbildungen erweitert das Spektrum vor dem Hintergrund, dass diese Krankheitsbilder ebenfalls bei Fanconi Anämie Patienten beobachtet worden sind [75, 33]. Nach Möglichkeit wurden zur Aufklärung der genetischen Hintergründe bei betroffenen Patienten begleitende Familienanalysen im *FANCC* durchgeführt.

Es fanden sich drei heterozygote Patienten für den von Verlander et al. [129] beschriebenen Polymorphismus p.S26F im Exon 1 des *FANCC*. Homozygote Anlageträger fanden sich nicht. Diese drei Kinder hatten eine Leukämie der myeloischen Reihe, wie dies auch bei allen Patienten in der von Barber et al. veröffentlichten Studie der Fall war [22]. Bei den 188 von Barber et al. untersuchten Kindern fand sich diese p.S26F Genvariante insgesamt bei vier AML Patienten des M4 Subtyps und bei einem Probanden des von Barber et al. gewählten Normalkollektivs. Dies entspricht einer viermal häufigeren Verteilung dieser Genvariante unter den 97 Patienten mit akuten myeloischen Leukämien (AML) im Vergleich zu dem Normalkollektiv von 481 Kindern bei Barber et al.. Die Autoren interpretierten diesen Zusammenhang zwischen Polymorphismus und AML als möglichen Risikofaktor für zumindest einen kleinen Teil ihrer pädiatrischen Patienten, betonten jedoch die Möglichkeit des Zufalls bei der kleinen Stichprobe innerhalb ihrer Arbeit.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Barber et al. [22] fanden sich in dieser Untersuchung bei 186 Patienten wie im gesunden Vergleichskollektiv von 96 Kindern jeweils drei heterozygote Anlageträger für den p.S26F Polymorphismus. Eine Häufung des p.S26F

Polymorphismus im Patientenkollektiv lag somit nicht vor. Die Hypothese von Barber et al. [22] lässt sich durch diese Untersuchung damit nicht bestätigen. Die nur kleinen Zahlen lassen dies auch kaum zu und können die zufälligen Häufungen wie auch die zufällige Gleichheit eines bestimmten Merkmals innerhalb der Kohorte bedingen. Eine denkbare Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse wären auch die möglicherweise genetisch unterschiedlichen Hintergründe der eingeschlossenen Patienten. Während die Studie von Barber et al. [22] Patienten aus Großbritannien untersuchte, schließt diese Arbeit überwiegend Patienten und Kontrollpersonen aus dem kontinentaleuropäischen Raum ein. Unklar ist, ob die britische Population hinsichtlich ihrer Verteilung für genetische Veränderungen des *FANCC* vergleichbar ist mit den angegebenen europäischen Zahlen in der Literatur. Danach machen Fanconi Anämie Patienten der Gruppe C in Europa etwa 10 % aller Fanconi Anämie Patienten aus [39, 63, 64]. In anderen Subpopulationen wie den Ashkenazi Juden sind heterozygote Genveränderungen des *FANCC* häufiger anzutreffen [128, 134].

Der p.S26F Polymorphismus wurde insgesamt in beiden Untersuchungen am häufigsten diagnostiziert. Zu einem nachweislichen Gendefekt des *FANCC* führt der beschriebene Polymorphismus nicht [50, 129] und ein kausaler Zusammenhang dieses Polymorphismus mit einer AML erscheint nach den in dieser Arbeit erhobenen Daten unwahrscheinlich.

Der von Verlander et al. [129] zuerst beschriebene Polymorphismus p.D195V im Exon 6 des *FANCC* wurde in dieser Arbeit bei lediglich einem Patienten mit AML nachgewiesen. Damit ist dieser Polymorphismus des *FANCC* seltener in dem hier untersuchten Patientengut anzutreffen als der Polymorphismus p.S26F im Exon 1. Barber et al. [22] hatten diesen Polymorphismus unter ihren 91 ALL Patienten einmal gefunden. Da sich unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten lediglich vier ALL Patienten und 2 Patienten mit ALL und AML befanden, ist ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse mit der Arbeit von Barber et al. [22] schwerlich möglich.

Der Polymorphismus p.D195V wurde in dieser Untersuchung bei lediglich einem Patienten nachgewiesen. Damit scheint auch das Auftreten dieses Polymorphismus für die Entstehung einer malignen Erkrankung nicht als Risikofaktor wesentlich zu sein.

Von den in diese Arbeit eingeschlossenen Fanconi Anämie Patienten waren dem Untersucher die Komplementationsgruppen zum Zeitpunkt der Analyse nicht bekannt. In Europa gehören etwa 10 % aller Fanconi Anämie Patienten der Gruppe C an [39]. Entsprechend fand sich unter den hier analysierten 14 Patienten nur eine Patientin mit *FANCC* Mutationen (7 %). Die Beschreibung einer Fanconi Anämie Patientin der Komplementationsgruppe C mit compound Heterozygotie für die bekannten Mutationen c.67delG und c.456+4A>T ist für eine deutsche Fanconi Anämie Patientin bisher einmalig. Dabei trägt die Mutter der Patientin auf

einem ihrer Chromosomen die Mutation c.67delG. Der aus dem ehemaligen Ostpreußen stammende Vater der Patientin ist heterozygoter Anlageträger für die besonders häufig unter Ashkenazi Juden zu findende Mutation c.456+4A>T [128, 134]. Eine familiäre Verbindung zu entsprechenden Vorfahren ist nicht bekannt. Diese Splice-site Mutation geht in homozygoter Form bei Ashkenazi Juden mit einem gravierenden Phänotyp einher. So lassen sich bei den betroffenen Patienten kongenitale Fehlbildungszeichen häufiger finden als bei anderen Mutationen des *FANCC* [128]. Dies ist bei der in dieser Arbeit untersuchten Patientin nicht der Fall. Sie fiel ursprünglich durch einen Mikrocephalus und Pigmentanomalien, später durch Knochenmarksversagen auf. In Japan ist die c.456+4A>T Splice-site Mutation nicht mit einem klinisch schwerwiegenderen Krankheitsbild verknüpft [45]. Dies zeigt die Bedeutung genetisch unterschiedlicher Hintergründe in den untersuchten Populationen, für die eine solche Aussage gemacht werden soll. Aus der retrospektiven Analyse der Daten des Internationalen Fanconi Anämie Registers (IFAR) in den USA geht hervor, dass die c.456+4A>T Mutation in homozygoter Form mit einer schlechteren Prognose für die Patienten verbunden ist. Dagegen ist die Deletion c.67delG im Exon 1 des *FANCC* in homozygoter Form mit einer besseren Überlebenschance verbunden [75]. Die prognostische Bedeutung von compound Heterozygotie für die beiden Mutationen - wie in dem hier geschilderten Fall - ist unklar. Die Patientin befindet sich nach Knochenmarkstransplantation zur Zeit in klinischer Remission.

Ein weiterer heterozygoter Anlageträger der Splice-site Mutation c.456+4A>T ist der Bruder der genannten Fanconi Anämie Patientin. Bei diesem wurde in der Kindheit ein Neuroblastom diagnostiziert. In dieser Arbeit wurden daraufhin weitere 55 Neuroblastomfälle bei Kindern untersucht, ohne die c.456+4A>T Mutation erneut zu finden. Interessanterweise ist das Auftreten eines Neuroblastoms bei Fanconi Anämie bereits beschrieben worden [26]. Auch wenn damit diese Mutation nicht als ein klarer Risikofaktor für die Entstehung eines Neuroblastoms gelten kann, so besteht doch die Möglichkeit, dass die *FANCC* Mutation c.456+4A>T eine kausale Rolle bei der Tumorbildung in diesem Einzelfall gespielt haben könnte.

Der Nachweis des heterozygoten Basenaustausches c.7C>G bei einem Patienten mit AML sollte zu einem Aminosäureaustausch (p.Q3E) im Exon 1 des *FANCC* führen. Der dadurch bedingte Austausch von Glutamin durch Glutamat würde die Polarität der Aminosäuren im Anfangsbereich des Fanconi Anämie C Proteins ändern. Dieses könnte zu einer Konformationsänderung des resultierenden Proteins führen. Eine Änderung der räumlichen Proteinstruktur wiederum könnte zu einer Veränderung von Proteinbindungsstellen führen und somit entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Funktionsweise haben. Für eine zelluläre

Resistenz gegenüber DNA schädigenden Substanzen wie Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB), welche zu sog. „cross-links“ zwischen einzelnen Chromosomen führen, sind die Aminosäurepositionen 1 bis 55 des FANCC Proteins von entscheidender Bedeutung [93]. Die hier beschriebene Veränderung liegt in diesem sensiblen Bereich. Auf der anderen Seite scheint für eine Interaktion des FANCC Proteins mit der NADPH Cytochrom P450 Reduktase die Aminosäureposition 26 am Anfang des FANCC Proteins essentiell zu sein [69]. Auch diese Position innerhalb des FANCC Proteins könnte durch den hier vorgestellten Aminosäureaustausch an Position 3 entscheidend beeinflusst werden. Sollte sich in Expressionsanalysen die Veränderung p.Q3E des FANCC Proteins beispielsweise für die DNA Reparaturmechanismen der Zelle als funktionell bedeutsam erweisen, so wäre ein kausaler Zusammenhang zur AML bei diesem Patienten möglich. Der betroffene AML Patient ist in dieser Untersuchung der einzige Kandidat mit dieser Veränderung des *FANCC*. Da es sich um eine neue Mutation handelt, ist die Durchführung von Expressionsstudien zur Abschätzung ihrer Bedeutung notwendig.

Bei einem anderen Patienten mit AML konnte der heterozygote Basenaustausch c.510A>G nachgewiesen werden. Der Austausch von Asparagin durch Serin an Aminosäureposition 170 des FANCC Proteins (p.N170S) könnte möglicherweise zu einer reversiblen Phosphorylierung des Serinrestes und damit unter Umständen zu einer veränderten Aktivität bzw. Proteinfunktion führen [2]. Da über die zelluläre Expression dieses veränderten Genprodukts keine Daten vorliegen, erscheint eine abschließende Interpretation dieser Mutation nicht möglich. Diese neu beschriebene Genveränderung des *FANCC* ließ sich weder bei den anderen Patienten noch im Normalkollektiv dieser Untersuchung nachweisen.

Bei einer Patientin mit akuter lymphatischer Leukämie vom T-Zelltyp (T-ALL) wurde die heterozygote *FANCC* Mutation c.377_378delGA erstmalig beschrieben. Da die Deletion der Basen Guanin und Adenin im Exon 4 des *FANCC* zu einer Leserasterverschiebung führt, kommt es zu einem vorzeitigen Stopcodon unmittelbar nach der Deletion. Ein vorzeitiger Abbruch der Proteinbiosynthese wäre die Folge.

Weitere Mutationen im Bereich des *FANCC* ließen sich bei dieser Patientin durch Sequenzierung aller in dieser Arbeit untersuchten Genabschnitte nicht nachweisen. In der anschließenden Familienuntersuchung zeigte sich, dass die aus der Türkei stammenden Eltern blutsverwandt sind. Als Cousin und Cousine tragen sie ebenfalls die heterozygote Mutation c.377_378delGA des *FANCC* und haben diese auf zwei weitere Söhne vererbt. Dabei ist ein Sohn zum Zeitpunkt dieser Untersuchung klinisch gesund gewesen, während der andere ebenfalls eine T-ALL entwickelte. Bei der Tochter wurden während des weiteren Krankheitsverlaufs ein MDS und eine AML diagnostiziert. Bei dem ebenfalls

leukämiekranken Bruder war die T-ALL refraktär. Beide betroffenen Kinder waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits verstorben. Eine rein zufällige familiäre Häufung von bösartigen Tumorerkrankungen bei den geschilderten Geschwistern erscheint durch den Nachweis der neuen *FANCC* Mutation unwahrscheinlich. Es drängt sich vielmehr der Verdacht auf, dass hier ein kausaler Zusammenhang zwischen der Mutation c.377_378delGA und dem Auftreten der Leukämien besteht. Bei Fanconi Anämie Patienten sind maligne Erkrankungen des hämatologischen Systems besonders häufig anzutreffen [75, 98], so dass die hier neubeschriebene *FANCC* Mutation als ein Risikofaktor für die Entwicklung einer solchen malignen Erkrankung bei den geschilderten Kindern gewertet werden kann, der allerdings im Hinblick auf die nicht erkrankten Genträger in der Familie von eingeschränkter Penetranz ist. Um zu überprüfen, ob auch andere T-ALL Patienten diese Mutation im Exon 4 des *FANCC* tragen, wurden weitere 60 Kinder mit diagnostizierter T-ALL untersucht. Bei diesen fand sich die Mutation c.377_378delGA nicht. Auch unter den 96 gesunden Probanden war die Mutation nicht zu finden. Polymorphismen des Exon 4 sind zwar für Fanconi Anämie Patienten der Gruppe C nachgewiesen worden [50, 129], interessanterweise sind jedoch bis auf die bei Ashkenazi Juden häufig anzutreffende Mutation c.456+4A>T [134] und die innerhalb eines brasilianischen Patientenkollektivs nachweisbare Mutation c.455_456dupA [140] keine weiteren Mutationen des Exon 4 aus Veröffentlichungen bekannt. Das mutierte Allel scheint damit nicht nur in dem hier untersuchten Kollektiv selten zu sein. Ein Verlust der zweiten normalen Genkopie („loss of heterozygosity“) könnte im Bereich des Knochenmarks bei den kranken Geschwistern zu einer klonalen Zellexpansion und malignen Entartung geführt haben, wie dies für kindliche AML Fälle von Sweetser et al. [119] beschrieben worden ist. Diesbezügliche Untersuchungen konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurden 6 verschiedene Leukämiezelllinien mituntersucht. Eine Veröffentlichung über die genetische Analyse des gesamten *FANCC* ist für diese Zelllinien in der Literatur bislang nicht zu finden. Xie et al. untersuchten Leukämiezelllinien und berichteten über abnormale Fanconi Anämie Proteinstrukturen in mehr als 50 % der untersuchten Fälle. Drei der von Xie et al. untersuchten Zelllinien zeigten sogar ein Fehlen der *FANCC* Proteinexpression [138]. Xie et al. veröffentlichten jedoch keine molekulargenetischen Daten des *FANCC* und ihre Rückschlüsse basierten ausschließlich auf Proteinanalysen. Bei der Zelllinie MKB 1 wurde die heterozygote Mutation c.1-12G>A im *FANCC* identifiziert, die theoretisch die Splice-site der 5' Region verändern könnte.

In der Analyse der Zelllinie K 562 zeigte sich der homozygote Basenaustausch c.178G>A im Exon 2 des *FANCC*, der zum Austausch von Valin durch Isoleucin (p.V60I) führen sollte. Ob dieser Aminosäurenaustausch pathogenetische Bedeutung hat, ist unklar.

Die genannten neuen Genveränderungen des *FANCC* wurden mittels SSC Analyse entdeckt. Barber et al. fanden in ihrer Untersuchung keine neuen oder bekannten *FANCC* Mutationen in der SSC Analyse [22]. Sie betonen jedoch, welche Auswertungsschwierigkeiten sie bei dieser Methodik hatten. So mussten sie die zuvor von Awan et al. publizierten Aussagen korrigieren [21, 22]. Da sie etwa ein Drittel aller diagnostizierten AML Fälle innerhalb Großbritanniens in einem Zeitraum von 5 Jahren in ihre Analyse einbeziehen konnten, kamen die Autoren zu dem Schluß, dass bekannte Mutationen des *FANCC* nur eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung der AML im Kindesalter spielen können. Die vorliegende Arbeit relativiert diese Aussage nur geringfügig trotz einiger Kandidatenmutationen in dem hier untersuchten Kollektiv.

Der statistisch signifikante Unterschied bei Heterozygoten im Bereich des untersuchten *FANCC* Intron 11 Polymorphismus zwischen der Patientenstichprobe und den gesunden Probanden in dieser Studie ist vor dem Hintergrund zu interpretieren, dass sich die Stichprobe der gesunden Probanden nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet. Dies macht eine abschließende Aussage über einen möglicherweise kausalen Zusammenhang zwischen Heterozygotie im Intron 11 des *FANCC* und einer Malignomentstehung bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten nicht möglich. Der Vergleich mit der von Gibson et al. veröffentlichten Intron 11 Polymorphismus Analyse [51] ist vor dem Hintergrund schwierig, dass Informationen über etwaige für die hiesige Hypothesenprüfung bedeutsame Unterschiede in der Stichprobenzusammensetzung nicht vorliegen. Zwar konnte ein deskriptiver Unterschied der Auftretenshäufigkeiten festgestellt werden, die statistische Überprüfung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied. Ein möglicher statistischer Grund für dieses Ergebnis ist unter Umständen die kleinere Fallzahl bei Gibson et al. [51]. Im Vergleich zu den 116 dort ausgewerteten Allelen fließen in dieser Abhandlung insgesamt 564 Allele in die Auswertung mit ein. Die Streuung innerhalb der Stichprobe von Gibson et al. [51] könnte so mehr ins Gewicht fallen. Die fehlende Parallelisierung der Patientengruppe mit dem Normalkollektiv beispielsweise in Bezug auf das Alter, Geschlecht oder den ethnischen Hintergrund der Probanden in dieser wissenschaftlichen Abhandlung ist ebenfalls kritisch einzustufen. Für eine wünschenswerte Randomisierung der Probanden und prospektive Analyse wäre eine enorme Vergrößerung der Stichprobe und ein jahrzehntelanger Beobachtungszeitraum notwendig, da pädiatrische Krebserkrankungen immer noch selten sind und die genetischen Prädispositionen für maligne Erkrankungen sich nicht auf einen

bestimmten Lebensabschnitt auswirken, wie die von Kutler et al. veröffentlichten Daten des Internationalen Fanconi Anämie Registers (IFAR) verdeutlichen [75]. Es ist denkbar, dass sich die Stichproben auch durch weitere Merkmale inhaltlich gravierend unterscheiden. Leider sind, wie oben erwähnt, bei Gibson et al. [51] keine genaueren Hinweise über die Zusammensetzung der gewählten Stichprobe zu finden.

Basierend auf den vollständigen Daten lässt sich die in dieser Dissertation aufgestellte Hypothese nicht bestätigen, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen Malignomentstehung und heterozygoten *FANCC* Veränderungen besteht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Auswertungen des nordamerikanischen Internationalen Fanconi Anämie Registers (IFAR) sowie neueren israelischen Daten über Verwandte von Fanconi Anämie Patienten. Für diese besteht grundsätzlich kein erhöhtes Krebsrisiko [23, 24]. Lediglich für einen kleinen Teil der untersuchten pädiatrischen Patienten mit heterozygoten *FANCC* Veränderungen besteht weiterhin die Möglichkeit eines bedeutsamen Risikos für die Entstehung einer malignen Erkrankung.

6. Zusammenfassung

Die Fanconi Anämie geht für die betroffenen Patienten mit einem deutlich erhöhten Malignomrisiko einher. Dieses Risiko ist am ehesten durch die molekularen Grundlagen der Fanconi Anämie zu erklären. Den Fanconi Anämie Proteinen wird eine essentielle Rolle bei der DNA Reparatur zugesprochen. Ein Ausfall dieses zellulären DNA Reparatursystems kann über Chromosomenaberrationen zur Entartung der Zelle führen. Davon ist insbesondere das hämatologische System betroffen, so dass bei einer Vielzahl möglicher Tumoren Leukämien bei Fanconi Anämie Patienten überwiegend auftreten. Ob dieses Malignomrisiko auch für heterozygote Anlageträger von Mutationen der Fanconi Anämie Gene gilt, ist angesichts der widersprüchlichen Forschungsergebnisse in der Literatur bisher unklar geblieben.

Diese Arbeit zeigt anhand der 186 untersuchten Patienten, von denen über 80 % maligne Erkrankungen des hämatologischen Systems hatten, dass generell kein erhöhtes Malignomrisiko für heterozygote Anlageträger im Bereich des Fanconi Anämie C Gens (*FANCC*) gilt.

Die Möglichkeit eines Malignomrisikos bleibt jedoch für einen kleinen Teil der hier untersuchten Patienten bestehen. Hierbei stehen die neu beschriebenen Mutationen des *FANCC* bei 2 Patienten mit akuten myeloischen Leukämien (AML) und 2 weiteren Patienten mit akuten lymphatischen Leukämien vom T-Zelltyp (T-ALL) sowie das Auftreten einer bereits bekannten *FANCC* Mutation bei 1 von 56 untersuchten Neuroblastompatienten im Vordergrund. Für diese Hypothese sprechen auch die neu beschriebenen Mutationen im Bereich des *FANCC* bei 2 Leukämiezelllinien.

Das Auftreten der bekannten Polymorphismen p.S26F im Exon 1 und p.D195V im Exon 6 des *FANCC* stellt kein signifikant erhöhtes Risiko für die Entstehung einer malignen Erkrankung dar.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten- und Normalkollektiv fand sich in dieser Arbeit bei der statistischen Auswertung für Heterozygotie im Intron 11 Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP rs4647534). Der Anteil Heterozygoter war unter den gesunden Probanden größer. Die Allelfrequenzen waren dagegen in beiden Gruppen nicht signifikant verschieden.

Die Aussage, dass heterozygote *FANCC* Anlageträger ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer malignen hämatologischen Erkrankung haben, wird durch die Ergebnisse in dieser Arbeit nicht wesentlich gestützt. Es bleibt abzuwarten, wie zukünftige Studien dieses Risiko einschätzen werden und ob die Aufklärung der zugrunde liegenden zellulären Funktionen des Fanconi Anämie C Genproduktes dazu beitragen kann.

7.) Literaturverzeichnis

Nr. Monographien

- 1 Bortz J, Liebert GA (1998)
Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung.
Springer: Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand
Paris Santa Clara Singapur Tokio
- 2 Budecke E (1994)
*Grundriss der Biochemie. Für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und
Naturwissenschaften.*
9. Auflage de Gruyter, Berlin New York
- 3 Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982)
Molecular Cloning. A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- 4 Skoog DA, Leary JJ (1996)
Instrumentelle Analytik. Grundlagen - Geräte - Anwendungen.
Springer, Berlin Heidelberg

Beitragswerke

- 5 Alter BP, Young NS (1998)
The bone marrow failure syndromes. Fanconi's Anemia.
In: Nathan DG, Orkin SH (eds)
Hematology of infancy and childhood.
5th edn., WB Saunders, Philadelphia
Vol. 1, Chapter 7: 237-335 und 259-273
- 6 Dallapiccola B, Porfirio B (1989)
Chromosomal Studies in Fanconi Anemia Heterozygotes.
In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G (eds)
Fanconi Anemia. Clinical, cytogenetic and experimental aspects.
Springer, Berlin Heidelberg New York
145-173
- 7 Golub TR, Arceci RJ (2002)
Acute Myelogenous Leukemia.
In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology.*
4th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
Section IV, Chapter 20: 547

- 8 Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG (2002)
Acute Lymphoblastic Leukemia.
In: Pizzo PA, Poplack DG (eds)
Principles and Practice of Pediatric Oncology.
4th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
Section IV, Chapter 19: 491
- 9 Marx MP, Smith S (1989)
Significance of Cellular Sensitivity in a Group of Parents of Fanconi Anemia Patients.
In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G (eds)
Fanconi Anemia. Clinical, cytogenetic and experimental aspects.
Springer, Berlin Heidelberg New York
137-144
- 10 Schroeder-Kurth TM, Zhu TH, Hong Y, Westphal I (1989)
Variation in Cellular Sensitivities Among Fanconi Anemia Patients, Non-Fanconi Anemia
Patients, Their Parents and Siblings, and Control Probands.
In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G (eds)
Fanconi Anemia. Clinical, cytogenetic and experimental aspects.
Springer, Berlin Heidelberg New York
105-144
- 11 Smith S, Marx MP, Jordaan CJ, van Niekerk CH (1989)
Clinical aspects of a cluster of 42 patients in South Africa with Fanconi Anemia.
In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G (eds)
Fanconi Anemia. Clinical, cytogenetic and experimental aspects.
Springer, Berlin Heidelberg New York
43
- 12 Tomlinson GE, Finegold MJ (2002)
Tumors of the Liver.
In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*.
4th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
Section IV, Chapter 29: 849

Zeitschriften

- 13 Altay C, Sevgi Y, Pirnar T (1975)
Fanconi's anemia in offspring of patient with congenital radial and carpal hypoplasia.
N Engl J Med 293: 151-152
- 14 Ameziane N, Errami A, Léveill   F, Fontaine C, de Vries Y, van Spaendonk RM, de Winter JP,
Pals G, Joenje H (2008)
Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening.
Hum Mutat 29: 159-166

- 15 Antonarakis SE, den Dunnen JT (2001)
Nomenclature for the description of human sequence variations.
Hum Genet 109: 121-124
- 16 Auerbach AD (1992)
Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes.
Leukemia 6: 1-4
- 17 Auerbach AD (1993)
Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test.
Exp Hematol 21: 731-733
- 18 Auerbach AD, Allen RG (1991)
Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry.
Cancer Genet Cytogenet 51: 1-12
- 19 Auerbach AD, Sagi M, Adler B (1985)
Fanconi anemia: prenatal diagnosis in 30 fetuses at risk.
Pediatrics 76: 794-800
- 20 Auerbach AD, Zhang M, Ghosh R, Pergament E, Verlinsky Y, Nicholas H, Boué J (1986)
Clastogen-induced chromosomal breakage as a marker for first trimester prenatal diagnosis of Fanconi Anemia.
Hum Genet 73: 86-88
- 21 Awan A, Taylor GM, Gokhale DA, Dearden SP, Will A, Stevens RF, Birch JM, Eden T (1998)
Increased frequency of Fanconi anemia group C genetic variants in children with sporadic acute myeloid leukemia.
Blood 91: 4813-4814
- 22 Barber LM, McGrath HEN, Meyer S, Will AM, Birch JM, Eden OB, Taylor GM (2003)
Constitutional sequence variation in the Fanconi anaemia group C (FANCC) gene in Childhood acute myeloid leukaemia.
Br J Haematol 121: 57-62
- 23 Baris HN, Kedar I, Halpern GJ, Shohat T, Magal N, Ludman MD, Shohat M (2007)
Prevalence of breast and colorectal cancer in Ashkenazi Jewish carriers of Fanconi anemia and Bloom syndrome.
Isr Med Assoc J 9:847-850
- 24 Berwick M, Satagopan JM, Ben-Porat L, Carlson A, Mah K, Henry R, Diotti R, Milton K, Pujara K, Landers T, Dev Batish S, Morales J, Schindler D, Hanenberg H, Hromas R, Levrán O, Auerbach AD (2007)
Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer.
Cancer Res 67: 9591-9596
- 25 Birnboim HC, Doly J (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res 7:1513-23

- 26 Bissig H, Staehelin F, Tolnay M, Avoledo P, Richter J, Betts D, Bruder E, Kuhne T (2002)
Co-occurrence of neuroblastoma and nephroblastoma in an infant with Fanconi's anemia.
Hum Pathol 33: 1047-1051
- 27 Bogliolo M, Cabré O, Callén E, Castillo V, Creus A, Marcos R, Surrallés J (2002)
The Fanconi anaemia genome stability and tumor suppressor network.
Mutagenesis 17: 529-538
- 28 Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991)
Analysis of the VNTR-locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE.
Am J Hum Genet 48: 137-144
- 29 Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD (1994)
Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: An International Fanconi Anemia
Registry study.
Blood 84:1650-1655
- 30 Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP,
Kalyanarama N, Nemes J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R,
Daley GQ, Lander ES (1999)
Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes.
Nat Genet 22: 231-238
(Erratum: *Nat Genet* 23: 373)
- 31 Casado JA, Callen E, Jacome A, Rio P, Castella M, Lobitz S, Ferro T, Munoz A, Sevilla J,
Cantalejo A, Cela E, Cervera J, Sanchez-Calero J, Badell I, Estella J, Dasi A, Olive T,
Ortega JJ, Rodriguez-Villa A, Tapia M, Molines A, Madero L, Segovia JC, Nevelling K,
Kalb R, Schindler D, Hanenberg H, Surralles J, Bueren JA (2007)
A comprehensive strategy for the subtyping of Fanconi Anemia patients: conclusions from
the Spanish Fanconi Anemia research network.
J Med Genet 51:241-249
- 32 Couch FJ, Johnson MR, Rabe K, Boardman L, McWilliams R, de Andrade M,
Petersen G (2005)
Germ line Fanconi anemia complementation group C mutations and pancreatic cancer.
Cancer Res 65: 383-386
- 33 Cox PM, Gibson RA, Morgan N, Brueton LA (1997)
VACTERL with hydrocephalus in twins due to Fanconi anemia (FA): mutation in the
FAC gene.
Am J Med Genet 68: 86-90
- 34 D'Andrea AD (1996)
Fanconi anemia forges a new pathway.
Nature Genet 14: 240-242
- 35 Demuth I, Wlodarski M, Digweed M (2002)
Fanconi-Anämie: Paradigma der genetischen Heterogenität.
Medgenetik 2:17-23

- 36 Digweed M, Rothe S, Demuth I, Scholz R, Schindler D, Stumm M, Grompe M, Jordan A, Sperkling K (2002)
Attenuation of the formation of DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi anaemia.
Carcinogenesis 23: 1121-1126
- 37 Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, Buriot D, Prieur M (1982)
The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia.
Hum Genet 62 : 327
- 38 Estren, S.; Dameshek, W. (1947)
Familial hypoplastic anemia of childhood: report of eight cases in two families with beneficial effect of splenectomy in one case.
Am J Dis Child 73: 671-687
- 39 Faivre S, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee ML, van Weel-Sipman M, Havenga C, Morgan N, de Winter J, Digweed M, Savoia A, Pronk J, de Ravel T, Jansen S, Joenje H, Gluckmann E, Mathew CG (2000)
Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia.
Blood 96: 4064-4070
- 40 Fanconi, G. (1927)
Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution).
Jahr Kinderheilk 117: 257-280
- 41 Fanconi, G. (1966)
Familial constitutional panmyelocytopathy, Fanconi's anemia (F.A.). Clinical aspects.
Seminars Hemat 4: 233-240
- 42 Fei P, Yin J, Wang W (2005)
New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein.
Cell Cycle 4:80-86
- 43 Freie B, Ciccone SL, Li X, Plett PA, Orschell CM, Srour EF, Hanenberg H, Schindler D, Lee SH, Clapp DW (2004)
A role for the Fanconi anemia C protein in maintaining the DNA damage-induced G2 checkpoint.
J Biol Chem 279: 50985-50993
- 44 Freie B, Xiabin L, Ciccone SLM, Nawa K, Cooper S, Vogelweid C, Schantz L, Haneline LS, Orazi A, Broxmeyer HE, Lee SH, Clapp DW (2003)
Fanconi Anemia Type C and p53 Cooperate in Apoptosis and Tumorigenesis.
Blood 102: 4146-1452
- 45 Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, Asano S, Nakahata T (2000)
The IVS4 + 4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients.
Blood 95: 1493- 1498

- 46 Garcia-Higuera I, Kuang Y, Denham J, D'Andrea AD (2000)
The Fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex.
Blood 96: 3224-3230
- 47 Garriga S, Crosby WH (1959)
The incidence of leukemia in families of patients with hypoplasia of the marrow.
Blood 14: 1008-1012
- 48 Gibson RA, Buchwald M, Roberts RG, Mathew CG (1992)
Characterisation of the exon structure of the Fanconi anaemia group C gene by vectorette PCR.
Hum Mol Genet 2: 35-38
- 49 Gibson RA, Ford D, Jansen S, Savoia A, Havenga C, Milner RD, de Ravel TJ, Cohn RJ, Ball SE, Roberts I, et al. (1994)
Genetic mapping of the FACC gene and linkage in Fanconi anaemia families.
J Med Genet 31: 868-871
- 50 Gibson RA, Morgan NV, Goldstein LH, Pearson IC, Kesterton IP, Foot NJ, Jansen S, Havenga C, Pearson T, de Ravel TJ, Cohn RJ, Marques IM, Dokal I, Roberts I, Marsh J, Ball S, Milner RD, Llerena JC, Samochatova E, Mohan SP, Vasudevan P, Birjandi F, Hajianpour A, Murer-Orlando M, Mathew CG (1996)
Novel mutation and polymorphisms in the Fanconi anemia group C gene.
Hum Mutat 8: 140-148
- 51 Gibson RA, Savoia A, Buchwald M, Mathew CG (1993)
EcoR1 RFLP in the Fanconi anaemia complementation group C gene (FACC).
Hum Mol Genet 2: 1509
- 52 Glanz A, Fraser FC (1982)
Spectrum of anomalies in Fanconi anemia.
J Med Genet 19: 412-416
- 53 Gordon SM, Alon N, Buchwald M (2005)
FANCC, FANCE, and FANCD2 form a ternary complex essential to the integrity of the Fanconi anemia DNA damage response pathway.
J Biol Chem 280: 36118-36125
- 54 Gordon S, Buchwald M (2003)
Fanconi anemia protein complex: mapping protein interactions in the yeast 2- and 3-hybrid systems
Blood 102: 136-141
- 55 Grade K, Grunewald I, Graupner I, Behrens F, Coutelle C (1994)
Identification of three novel mutations in the CFTR gene using temperature-optimized non-radioactive conditions for SSCP analysis.
Hum Genet 94: 154-8

- 56 Grompe, M (2003)
FANCL, as in ligase.
Nat Genet 35: 113–114
- 57 Habi O, Delisle MC, Messier N, Carreau M (2005)
Lack of self-renewal capacity in Fancc^{-/-} stem cells after ex vivo expansion.
Stem Cells 23: 1135-1141
- 58 Howlett N, Toshiyasu T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, de Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD (2002)
Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia.
Science 297: 606-609
- 59 Huber CG (1998)
Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA.
J Chromatogr A 806: 3-30
- 60 Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB (1981)
Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia.
Nature 290: 142-143
- 61 Joenje H, Arwert F (2001)
Connecting Fanconi anaemia to BRCA1.
Nature Med 7:406-407
- 62 Joenje H, Levitus M, Waisfisz Q, D'Andrea A, Garcia-Higuera I, Pearson T, van Berkel CG, Rooimans MA, Morgan N, Mathew CG, Arwert F (2000)
Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A.
Am J Hum Genet 67: 759-762
- 63 Joenje H, Lo ten Foe JR, Oostra AB, van Berkel, Rooimans MA, Schroeder-Kurth T, Wegner RD, Gille JJ, Buchwald M, Arwert F (1995)
Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence of a fifth genetic subtype.
Blood 86: 2156-2160
- 64 Joenje H, Oostra AB, Wijker M, di Summa FM, van Berkel CG, Rooimans MA, Ebell W, van Weel M, Pronk JC, Buchwald M, Arwert F (1997)
Evidence for at least eight Fanconi anemia genes.
Am J Hum Genet 61: 940-944
- 65 Joenje H, Patel KJ (2001)
The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia.
Nature Rev Genet 2: 446-457

- 66 Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC (1999)
Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis.
Clin Chem 45: 1133-1140
- 67 Kennedy RD, Chen CC, Stuckert P, Archila EM, De la Vega MA, Moreau LA, Shimamura A, D'Andrea AD (2007)
Fanconi anemia pathway-deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated.
J Clin Invest 117:1440-1449
- 68 Kitao H, Yamamoto K, Matsushita N, Ohzeki M, Ishiai M, Takata M (2006)
Functional interplay between BRCA2/FancD1 and FancC in DNA repair.
Biol Chem 281: 21312-21320
- 69 Kruyt FA, Hoshino T, Liu JM, Joseph P, Jaiswal AK, Youssoufian H (1998)
Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase.
Blood 92: 3050-3056
- 70 Kubbis M, Schindler D, Hoehn H, Schnitzel A, Rabinovitch PS (1985)
Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent endomitosis in Fanconi anemia cells.
Am J Hum Genet 37: 1022
- 71 Kupfer GM, Näf D, D'Andrea AD (1997)
Molecular biology of Fanconi Anemia.
Hematol Oncol Clin North Am 11(6): 1045-1060
- 72 Kupfer GM, Näf D, Suliman A, Pulsiper M, D'Andrea AD (1997)
The Fanconi anemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex.
Nat Genet 17: 487-490
- 73 Kupfer GM, Yamashita T, Näf D, Suliman A, Asano S, D'Andrea AD (1997)
The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinase, cdc2.
Blood 90: 1047-1054
- 74 Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, Goberdhan A, Shah JP, Singh B (2003)
High incidence of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in patients with Fanconi anemia (FA).
Arch Otolaryngol 129: 106-112
- 75 Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD (2003)
A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR).
Blood 101: 1249-1256

- 76 van Leeuwen HC (1933)
Ein Fall von „konstitutioneller infantiler pernizosaähnlicher Anämie“ (Fanconi).
Folia Haematol (Leipz) 49: 434-443
- 77 Léveillé F, Ferrer M, Medhurst AL, Laghmani el H, Rooimans MA, Bier P, Steltenpool J, Titus TA, Postlethwait JH, Hoatlin ME, Joenje H, de Winter JP (2006)
The nuclear accumulation of the Fanconi anemia protein FANCE depends on FANCC.
DNA Repair (Amst.) 5:556-565
- 65 van Leeuwen HC (1933)
Ein Fall von „konstitutioneller infantiler pernizosaähnlicher Anämie“ (Fanconi).
Folia Haematol (Leipz) 49: 434-443
- 78 Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, de Winter JP, Joenje H (2003)
Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes.
Blood 103:2498-2503
- 79 Li J, Sejas DP, Zhang X, Qiu Y, Nattamai KJ, Rani R, Rathbun KR, Geiger H, Williams DA, Bagby GC, Pang Q (2007)
TNF-alpha induces leukemic clonal evolution ex vivo in Fanconi anemia group C murine stem cells.
J Clin Invest 117:3283-3295
- 80 Liu J, Buchwald M, Walsh CE, Young NS (1994)
Fanconi anemia and novel strategies for therapy.
Blood 84: 3995-4007
- 81 Liu W, Smith DI, Rechtzigel KJ, Thibodeau SN, James CD (1998)
Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations.
Nucleic Acids Res 26: 1396-1400
- 82 McMahon LW, Walsh CE, Lambert MW (1999)
Human alpha spektrin II and the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCC interact to form a nuclear complex.
J Biol Chem 274: 32904-32908
- 83 Medhurst AL, Laghmani el H, Steltenpool J, Ferrer M, Fontaine C, de Groot J, Rooimans MA, Scheper RJ, Meetei AR, Wang W, Joenje H, de Winter JP (2006)
Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway.
Blood 108: 2072-2080
- 84 Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H (2004)
X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B.
Nat Genet 36:1219-24

- 85 Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W. (2003)
A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia.
Nat Genet 35: 165 – 170
- 86 Murer-Orlando M, Llerrena JC, Birjandi F, Gibson RA, Mathew CG (1993)
FACC gene mutations and early prenatal diagnosis of Fanconi's anaemia.
Lancet 342: 686
- 87 Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, Bernardis R (2005)
The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway.
Mol Cell 17: 331-339
- 88 Novotná B, Goetz P, Surkova WI (1979)
Effects of alkylating agents on lymphocytes from controls and from patients with Fanconi's anemia.
Hum Genet 49: 41-50
- 89 Nowell, P.; Bergman, G.; Besa, E.; Wilmoth, D.; Emanuel, B. (1984)
Progressive preleukemia with a chromosomally abnormal clone in a kindred with the Estren-Dameshek variant of Fanconi's anemia.
Blood 64: 1135-1138
- 90 Orita M, Iwahama H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1970)
Detection of polymorphism of human.
Proc Natl Acad Sci USA 86: 2766-2770
- 91 Otsuki T, Kajigaja S, Ozawa K, Liu JM (1999)
SNX5, a new member of the sorting nexin family, binds to the Fanconi anemia complementation group A protein.
Biochem Biophys Res Commun 265: 630-635
- 92 le Page F, Randrianarison V, Marot D, Cabannes J, Perricaudet M, Feunteun J, Sarasain A (2000)
BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells.
Cancer Res 60: 5548-5552
- 93 Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Diaz J, Faulkner GR, Reifsteck C, Olson S, Bagby GC (2001)
The Fanconi anemia complementation group C gene product: structural evidence of multifunctionality.
Blood 98:1392-1401
- 94 Petridou M, Barrett AJ (1990)
Physical and Laboratory Characteristics of Heterozygote Carriers of the Fanconi Aplasia Gene.
Acta Paediatr Scand 79: 1069-1074

- 95 Potter NU, Sarmonsakis C, Li FP (1983)
Cancer in relatives of patients with aplastic anemia.
Cancer Genet Cytogenet 9: 61-66
- 96 Rischewski J, Clausen H, Leber V, Niemeyer C, Ritter J, Schindler D, Schneppenheim R (2000)
A heterozygous frameshift mutation in the Fanconi Anemia C gene in a familialy T-ALL and secondary malignancy.
Klin Pädiatr 212: 174-176
- 97 Rischewski J, Schneppenheim R. (2001)
Screening strategies for a highly polymorphic gene: DHPLC analysis of the Fanconi anemia group A gene.
J Biochem Biophys Methods 47: 53-64
- 98 Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W (2008)
Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry.
Haematologica 93:511-517
- 99 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239: 487-491
- 100 Salles D, Cabral RE, Paixão JC, de Almeida CE, Seuánez HN, Cabral-Neto JB (2007)
Changes in protein expression due to deleterious mutations in the FA/BRCA pathway.
Biochem Biophys Res Commun 364:755-760
- 101 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463 – 5467
- 102 dos Santos CC, Gavish H, Buchwald M (1994)
Fanconi anemia revisited: old ideas and new advances.
Stem Cells 12: 142-153
- 103 Sasaki MS (1975)
Is Fanconi's anemia defective in a process essential to the repair of DNA crosslinks?
Nature 257: 501-503
- 104 Sasaki MS, Tonomura A (1973)
A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents.
Cancer Res 33: 1829-1836
- 105 Schroeder TM (1966)
Cytogenetischer Befund und Ätiologie bei Fanconi-Anämie. Ein Fall von Hexokinasedefekt.
Humangenetik 3: 76-81

- 106 Schroeder TM, Anshütz F, Knopp A (1964)
Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie.
Humangenetik 1: 194-196
- 107 Schroeder TM, German J (1974)
Bloom's syndrome and Fanconi's anemia: demonstration of two distinctive patterns
of chromosome disruption and rearrangement.
Humangenetik 25: 299-306
- 108 Schroeder TM, Tilgen D, Krüger J, Vogel F (1976)
Formal genetics of Fanconi's anemia.
Hum Genet 32: 257-288
- 109 Seyschab H, Sun Y, Friedl R, Schindler D, Hoehn H (1993)
G2 phase cell cycle disturbance as a manifestation of a genetic cell damage.
Hum Genet 92: 61-68
- 110 Shimamura A, D'Andrea AD (2003)
Subtyping of Fanconi anemia patients: implications for clinical management.
Blood 102: 3459-3460
- 111 Siddique MA, Nakanishi K, Taniguchi T, Grompe M, D'Andrea AD (2001)
Function of the Fanconi anemia pathway in Fanconi anemia complementation group
F and D1 cells.
Exp Hematol 29: 1448-1455
- 112 Skikne BS, Lynch SR, Bezwoda WR, Bothwell TH, Bernstein R, Katz J, Kramer S,
Zucker M (1978)
Fanconi's Anaemia, with Special Reference to Erythrokinetic Features.
S Afr Med J 53: 43-50
- 113 Sparkes RS (1996)
Molecular insights into Fanconi Anemia.
J Clin Invest 97: 897-898
- 114 Stevens, R. F.; Meyer, S. (2002)
Fanconi and Glanzmann: the men and their works.
Brit. J. Haemat. 119: 901-904
- 115 Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A,
Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM (1999)
The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with ataxia-
-telangiectasia-like disorder.
Cell 99: 577-587
- 116 Strathdee CA, Buchwald M (1992)
Molecular and cellular biology of Fanconi anemia.
Am J Pediat Hematol Oncol 14: 177-185

- 117 Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M (1992)
Evidence of at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9.
Nat Genet 1: 196-108
- 118 Strahdee CA, Gavish H, Shannon WA, Buchwald M (1992)
Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation
Nature 356: 763-767, errata in 358: 434
- 119 Sweetser DA, Chen C-S, Blomberg AA, Flowers DA, Gallipeau PC, Barrett MT, Heerema MT, Buckley J, Woods WG, Bernstein ID, Reid BJ (2001)
Loss of heterozygosity in childhood de novo acute myelogenous leukemia.
Blood 98: 1188-1194
- 120 Swift M (1971)
Fanconi's anemia in the genetics of neoplasia.
Nature 230: 370-373
- 121 Swift M, Caldwell RJ, Chase C (1980)
Reassessment of cancer predisposition of Fanconi anemia heterozygotes.
JNCT 65: 863-867
- 122 Tabor S, Richardson CC (1995)
A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- or dideoxyribonucleotides.
Proc Natl Acad Sci USA 92: 6339-6343
- 123 Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, Lane WS, Kastan MB, D'Andrea AD (2002)
Convergence of the Fanconi anemia and Ataxia telangiectasia pathways.
Cell 109: 459-472
- 124 The Breast Cancer Linkage Consortium (1999)
Cancer Risks in BRCA2 Mutation Carriers
J Natl Cancer Inst 91: 1310-1316
- 125 Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A (1998)
Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome.
Cell 93: 467-476
- 126 Venkitaraman AR (2002)
Cancer susceptibility and the function of BRCA1 and BRCA2.
Cell 108: 171-182
- 127 Venkitaraman AR (2003)
A growing network of cancer-susceptibility genes
N Engl J Med 348: 1917-1919

- 128 Verlander PC, Kaporis A, Liu Q, Zhang Q, Seligsohn U, Auerbach AD (1995)
Carrier frequency of the IVS4+4A → T mutation of the Fanconi anemia gene FAC
in the Ashkenazi Jewish population.
Blood 86: 4034-4038
- 129 Verlander PC, Lin JD, Udono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG,
Auerbach AD (1994)
Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC.
Am J Hum Genet 54: 595-601
- 130 Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CGM, Hoatlin ME,
Ianzano L, Gibson RA, Arwert F, Savoia A, Mathew CG, Pronk JC, Joenje H (1999)
Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi anaemia alleles reveals novel
mechanistic basis for reverse mosaicism.
Nat Genet 22: 379-383
- 131 Waisfisz Q, Saar K, Morgan NV, Altay C, Leegwater PA, de Winter JP, Komatsu K,
Evans GR, Wegner RD, Reis A, Joenje H, Arwert F, Mathew CG, Pronk JC,
Digweed M (1999)
The Fanconi anemia group E gene, FANCE, maps to chromosome 6p.
Am J Hum Genet 64: 1400-1405
- 132 Wegner RD, Henrichs I, Joenje H, Schroeder-Kurth TM (1996)
Fanconi anemia complementation group E: clinical and cytogenetic data of the first patient.
Clin Genet 30: 479-482
- 133 Welshimer K, Swift M (1982)
Congenital Malformations and Developmental Disabilities in Ataxia-Telangiectasia,
Fanconi Anemia, and Xeroderma Pigmentosum Families.
Am J Hum Genet 34:781
- 134 Whitney MA, Jakobs P, Kaback M, Moses RE, Grompe M (1994)
The Ashkenazi Jewish Fanconi anemia mutation: incidence among patients and carrier
frequency in the at-risk population.
Hum Mutat 3: 339-341
- 135 de Winter JP, van der Weel L, de Groot J, Stone S, Waisfisz Q, Arwert F, Scheper RJ,
Kruyt FA, Hoatlin ME, Joenje H (2000)
The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC
and FANCG.
Hum Mol Genet 9: 2665-2674
- 136 Wunder E, Fleischer-Reischmann B (1983)
Response of Lymphocytes from Fanconi's Anemia Patients and Their Heterozygous
Relatives to 8-Methoxy-Psoralene in a Cloning Survival Test System.
Hum Genet 64: 167-172
- 137 Xiao W, Oefner PJ (2001)
Denaturing high-performance liquid chromatography: a review.
Hum Mutat 17: 439-474

- 138 Xie Y, de Winter JP, Waisfisz Q, Nieuwint AWM, Scheper RJ, Arwert F, Hoatlin ME, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis G-J, Joenje H (2000)
Aberrant Fanconi anaemia protein profiles in acute myeloid leukaemia cells.
Br J Haematol 111: 1057-1064
- 139 Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP (2002)
BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA-DSS1-ssDNA structure.
Science 297: 1837-1848
- 140 Yates J, Keeble W, Pals G, Ameziane N, van Spaendonk R, Olson S, Akkari Y, Pasquin R, Bagby G (2006)
Novel inactivating mutations of FANCC in Brazilian patients with Fanconi anemia.
Hum Mutat 27: 214
- 141 Zakrzewski S, Sperling K (1980)
Genetic heterogeneity of Fanconi's anaemia demonstrated by somatic cell-hybrids.
Hum Genet 56: 81-84

8.) Anhang

8.1) **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Chromosom 9 und das Fanconi Anämie C Gen (<i>FANCC</i>)	S. 9
Abb. 2: Schematische Darstellung möglicher DNA Reparaturprozesse	S. 12
Abb. 3: <i>FANCC</i> Polymorphismus c.77C>T	S. 32
Abb. 4: <i>FANCC</i> Polymorphismus c.584A>T	S. 33
Abb. 5: <i>FANCC</i> Deletion c.67delG	S. 36
Abb. 6: <i>FANCC</i> Splice-site Mutation c.456+4A>T	S. 37
Abb. 7: Stammbaum der Familie von K 633 und K 712	S. 38
Abb. 8: Basenaustausch c.-12G>A	S. 39
Abb. 9: Missense Mutation c.7C>G	S. 40
Abb. 10a: PAGE Analyse c.377_378delGA	S. 41
Abb. 10b-d: Basendeletion c.377_378delGA	S. 42
Abb. 11: Stammbaum der Familie von FF 16	S. 43
Abb. 12: Missense Mutation c.763A>G	S. 44
Abb. 13: Missense Mutation c.178G>A	S. 45
Abb. 14: RFLP Analyse des Intron 11 Polymorphismus mit dem Enzym EcoR1	S. 47

8.2) **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Patientenkollektiv	S. 21
Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse für 186 Patienten und 6 Zelllinien	S. 46
Tab. 3: RFLP Analyse des <i>FANCC</i> Intron 11 Polymorphismus mittels EcoR1 bei 186 Patienten und 96 Personen des Normalkollektivs	S. 47
Tab. 4a: Verteilung der Allele im Intron 11 des <i>FANCC</i>	S. 50
Tab. 4b: Allelfrequenzen des <i>FANCC</i> Intron 11 EcoR1 RFLP bei 186 Patienten und 96 Personen des Normalkollektivs	S. 50
Tab. 4c: Genotypfrequenzen des <i>FANCC</i> Intron 11 EcoR1 RFLP bei 186 Patienten und 96 Personen des Normalkollektivs	S. 50
Tab. 5: Phänotypverteilung für Heterozygotie A1/A2 im Intron 11 des <i>FANCC</i>	S. 50

8.3) Material- und Geräteliste

<i>Gerät / Material</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
³³ P-markierte ddNTPs	Redivue 33P-dideoxy nucleotides	Amersham Pharmacia biotech Europe GmbH	Braunschweig
Agarose	Agarose Typ 1	Sigma	Steinheim
Bind	-	Pharmacia	Freiburg
BlueSlick	-	Serva / Boehringer	Heidelberg
BPL	50 & 100 bp DNA Ladders	GIBCO BRL, Life Technologies	Eggenstein
Brutschrank	NUAIRE U AUTOFLOW	Zapf	Sarstedt
Brutschrank	Function Line	Heraeus	Hamburg / Osterode
Cloning Kit	pCR Script Amp SK(+)	Stratagene	Heidelberg
Digitalbildschirm	The Imager	Appligene	Illkirch
DNA Aufreinigungskit	Easy Pure	Biozym Diagnostik GmbH	Hess.Oldendorf
DNA Aufreinigungskit	Ultrafree-DA	Millipore GmbH	Schwalbach
DNA Kit	QIAamp DNA Blood / Tissue Midi Kit	QIAGEN GmbH	Hilden
Elektrophoresekammer	Typ S2	Gibco BRL	Eggenstein
Elektrophoresekammer	Multiphor II	Pharmacia Biotech	Freiburg
Elektrophoresekammer	Multigel Long	Biometra	Göttingen
Elektrophoresekammer	DNA Sub Cell	Bio Rad	Hercules, USA
Ethanol	Absolut p.a.	Merck	Darmstedt
Filterpapier	3 mm Chr 58 x 68 cm	Whatman	Maidstone, England
Glashaken	Pasteurpipetten	Assistant	Deutschland
Glasplatten PAGE	26 x 12 x 0,5 cm	Hampe	Kiel
Glassplatten SSCP	15 x 15 x 0,3 cm	Biometra	Göttingen
Glasplatten Sequenzierung	45 x 34,5 x 0,5 cm	Hampe	Kiel
HPLC-System	WAVE 3500 dHPLC System	Transgenomic	Omaha, USA
Kämme	0,4 mm Sharktooth	Gibco-BRL	Eggenstein

Kühlgerät	Kryo Thermostat WK 5	COLORA Messtechnik	Lorch / Württ.
Kühlflussgerät	Multi Temp III	Pharmacia Biotech	München
Kühlflussgerät	Jalabo F 10	Jalabo GmbH	Seelbach
Laminarflussbank	Holten Lamin Air	Heto-Holten A/S	Allerød, Dänemark
PCR Enzymlösung	Taq DNA Polymerase	Gibco BRL.	Eggenstein
PCR Enzymlösung	Platinum PCR SuperMix	Gibco BRL	Eggenstein
Pipetten	Pipetman	Gilson	Paris, Frankreich
Pipettenaufsatz	Biosphere Filter Tips	Sarstedt	Nümbrecht
Powersupply	PS 9009	Gibco BRL	Eggenstein
Primer	FANCC 1 –14 sn / asn	Gibco BRL	Eggenstein
Proteinase K		Sigma	Steinheim
Röntgenfilme	X-Omat AR	Kodak	New York, USA
Schüttler	KL 2 und WS 5	Bühler	Tübingen
Schüttler	Mini Shaker	Adolf Kühner AG	Basel, Schweiz
SDS	20%	BioRad	Hercules, USA
Sequenzierungsenzym	ThermoSequenase	USB Corporation	Cleveland, USA
Spacer für PAGE	0,4 mm	Gibco-BRL, Life Technologies Inc.	Eggenstein
Spacer für SSC	0,4 mm	Biometra	Göttingen
Spannungswandler	EPS 3500	Pharmacia / LKB	Freiburg
Spannungswandler	Power Pack P 25	Biometra	Göttingen
Spannungswandler	Desatronic 3000/200	Desaga	Heidelberg
Sterilfilter	0,22 µm	Millipore	Eschborn
Thermocycler	Trio	Biometra	Göttingen
Thermocycler	T-Gradient	Biometra	Göttingen
ThermoSequenase	Kit	Amersham	Braunschweig

Trägerfolie	Gelbond PAG	FMC	Rockland, USA
UV-Lichtschirm	Transluminator TR302	Spectroline	New York, USA
Vakuumaufgabe	Slab Dryer 483	Bio Rad	New York, USA
Vakuumtrockner	LO 3	Wkf	Modautal
Wasserbad	Lauda CS 20	Mgw	Lauda-Königshofen
Wasserbad	H2 Plus	Köttermann	Hänigsen
Zentrifuge	Rotanda / K	Hettich	Tuttlingen
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus	Osterode
Zentrifuge	EBA 12 R	Hettich	Tuttlingen
Zentrifuge	5415 C	Eppendorf	Hamburg

8.4) Rezepte

DNA Isolierung

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 % (w/v)	BioRad

TNE 10x *pH 7,6*

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

TE *pH 7,6*

Tris	10 mM	Sigma
EDTA	1 mM	Merck

Lithiumchlorid

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

PCR

10 x Cetus

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

PCR Ansatz

10 x Cetus Puffer	10 % (v/v)	s.o.
MgCl ₂	1,0 mM	Gibco
dNTPs	0,2 mM	Pharmacia
Primer Sn	2 ng/µl	Eurogentec
Primer Asn	2 ng/µl	Eurogentec
Taq-Polymerase	2 units	Gibco
Mineralöl	3 Tropfen	Sigma

PCR Ansatz Super-Mix

Super-Mix Lsg.	45 µl	Gibco
Primer Sn	2 ng/µl	Eurogentec
Primer Asn	2 ng/µl	Eurogentec
Mineralöl	3 Tropfen	Sigma

PAGE

APS 10 %

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

PAA Gel 6 %

Acrylamid / Bis-Acrylamid Lsg. 30 %	20,03 % (v/v)	Roth
Glycerin 100 %	7,01 % (v/v)	Sigma
Tris Sulfat Puffer 1 M pH 9,0	0,0331 mM	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	2,00 % (v/v)	Sigma
TEMED	0,05 % (v/v)	Sigma

PAGE Elektrophorese

TrisBorat Puffer pH 9,0

Tris	0,14 M	Merck
Borsäure	0,07 M	Merck

Silberfärbung

Ethanol

Ethanol absolut p.a.	10 % (v/v)	Merck
----------------------	------------	-------

HNO₃

HNO ₃ 65 %	1 % (v/v)	Merck
-----------------------	-----------	-------

Silbernitrat

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

Reduktionslösung

Na ₂ CO ₃ wasserfrei	280 mM	Merck
Formalin 37 %	0,02 % (v/v)	Merck

Essigsäure

Essigsäure 100% p.a.	10% (v/v)	Merck
----------------------	-----------	-------

Agarosegel Elektrophorese

TAE Puffer pH 8,3

Tris	40 mM	Merck
NaAcetat	12 mM	Sigma
EDTA	2 mM	Sigma
Essigsäure 100 % p.a.	zur pH 8,3 Einstellung	Merck

Agarosegel 1 %

Super Fine Resolution Agarose	2 % (w/v)	Amresco
Ethidiumbromid	0,01 % (w/v)	Sigma

SSC Elektrophorese

SSC Gel 8 %

Acrylamid / Bis-Acrylamid Lsg. 40 %	20,03 % (v/v)	Amresco
Glycerin 100 %	7,01 % (v/v)	Sigma
Tris Sulfat Puffer 1 M pH 9,0	0,0331 mM	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	2,00 % (v/v)	Sigma
TEMED	0,05 % (v/v)	Sigma

SSC Gel 10 %

Acrylamid / Bis-Acrylamid Lsg. 40 %	25,04 % (v/v)	Amresco
Glycerin 100 %	7,01 % (v/v)	Sigma
Tris Sulfat Puffer 1 M pH 9,0	0,0331 mM	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	2,00 % (v/v)	Sigma
TEMED	0,05 % (v/v)	Sigma

Sequenzierung Elektrophorese

TTE Puffer 20 x

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

Sequenziergel (75 ml)

Harnstoff pur	7,0 M	FMC
LongRanger 50 % Stock Lsg.	6,0 % (v/v)	FMC
20 x TTE	1,2 % (v/v)	s.o.
DMSO	1,0 % (v/v)	Merck
TEMED	0,07 % (v/v)	Sigma
APS 10 %	0,07 % (v/v)	Sigma

Methanol-Eisessig

Methanol 100 % p.a.	5 % (v/v)	Merck
Eisessig 100 % p.a.	10 % (v/v)	Merck

Klonierung

LB Lsg.

Bactotrypone	1 % (w/v)	Merck
Hefe	0,5 % (w/v)	Merck
NaCl	0,17 M	Sigma

STE Puffer

NaCl	100 mM	Sigma
Tris	10 mM	Sigma
EDTA	1 mM	Merck

TE Puffer *pH 8,0*

Tris	10 mM	Sigma
EDTA	1 mM	Merck

Restriktionsfragment Längenpolymorphismus Analyse (RFLP)

Enzym: EcoR1	37° C Verdau	New England Biolabs
NEB 2 Puffer	über 60 min.	New England Biolabs

8.5) Oligonukleotide (Primer)

<i>FANCC</i>	Typ	Sequenz (5' -> → 3')	AT (° Celsius)	Länge (bp)
Exon 1	Sn	ACC ATT TCC TTC AGT GCT GG	60	326
Exon 1	Asn	ACC ACA AGT CCC GAT TCT GGG		
Exon 1	Int	GCT GCT GTG AAG GGA CAT CAC CT	58	
Exon 2	Sn	CCC TCA ATC TAT AAT GTC AG	56	232
Exon 2	Asn	GTA AGC CTC TGT GAA ACA ATG		
Exon 2	Int	TTG CAT AAT GCC TTT ACT GAC C	56	
Exon 3	Sn	TAG TAG TTT GAG ATT TTC C	50	254
Exon 3	Asn	GCA GCA CTT TTA AAT AAT C		
Exon 3	Int	ATG ATT TTT TCT GCT TGA	49	
Exon 4	Sn	GTA GGC ATT GTA CAT AAA AG	54	234
Exon 4	Asn	TGG CAC ATT CAG CAT TAA AC		
Exon 4	Int	GGC ACT TGC ATT TAC TTT TA	53,5	
Exon 5	Sn	CTG ATG TAA TCC TGT TTG CAG	60	184
Exon 5	Asn	CCT CTC ATA ACC AAA CTG ATA C		
Exon 5	Int	GCG TGA GTT AAC CTG CAA CTG	59,5	
Exon 6	Sn	GTC CTTAAT TAT GCA TGG CTC	60	289
Exon 6	Asn	CAA CAC ACCACA GCC TTC TAA G		
Exon 6	Int	GGC TCT TAG ATT TGA GTG	61	
Exon 7	Sn	TTT TCA GTG AGC CAT TTC TG	59,5	265
Exon 7	Asn	AAA TGA GTC CAA GCA TGT CC		
Exon 7	Int	GAG CCA TTT CTG TTT AAA AT	53,5	
Exon 8	Sn	CTC CTT TGG CTG ATA ATA GC	58	232
Exon 8	Asn	CCC ATG ATA CAG CCA GAG AC		
Exon 8	Int	GTG ATA TTT CAC ATT CTC ATG G	59,5	
Exon 9	Sn	TTT CCC TTA TAC AGT GCA GG	59	253
Exon 9	Asn	GTG CTC TTG TCC AAA ATA CTC		
Exon 9	Int	GTT AAA CGT GTT CTG ATC TG	56	
Exon 10	Sn	TTC CTG ACC CCG TTT CAA TC	60	193
Exon 10	Asn	TTG ACA ATG CTC TTC CCA GG		
Exon 10	Int	TCA TGC TCT TTG GAT TTT CC	57,5	
Exon 11	Sn	GTG AAC CAG AAG TAA AGG GC	56	255
Exon 11	Asn	AGG ATC TAG GGA AAC CAT G		
Exon 11	Int	CTC AGT TGC CCT CTG ACG TAT C	54,5	
Exon 12	Sn	CCC AAA GGA AGA AGA ATT TAG	58,5	297
Exon 12	Asn	CCT CTC CTT GCT CCT CTC AG		
Exon 12	Int	GTC AAC TGC CAT GTG TTC TG	59	
Exon 13	Sn	CCT AGA AGT ATG TCT GTC CTG	62,5	303
Exon 13	Asn	CTC TCC TTG ACT AGG ATG CTG		
Exon 13	Int	TCT CCT AAC CTC TCC CCT GTG	60,5	
Exon 14	Sn	GGA TAG GGC TTC TTT CAG GG	60	392
Exon 14	Asn	TCC CAA GAT GTG TAC AGC TC		
Exon 14	Int	GTC TGG AAA GTG TTT TAA TTT GC	57,5	
Intron 11	Sn	AGT CTT CCT TCT TCA GTG GG	59	587
Intron 11	Asn	AGG TTG CCA TGA CAT ATG CC		

Erläuterung zu den Oligonukleotiden (Primer):

FANCC Nr. bezeichnet das Exon bzw. Intron im Bereich des Fanconi Anämie C Gens, welches durch den angegebenen Primer amplifiziert wird. Dabei entspricht Sn dem Sense-Primer, Asn dem Antisense-Primer und Int dem zur Sequenzierung benutzten Internen Primer. Die jeweilige Primersequenz ist vom 5` Ende in Richtung 3` Ende angegeben. Mit AT ist die sog. annealing temperature angegeben, mit der die Anbindung des Oligonukleotids bei der PCR bzw. Sequenzierung erfolgt. Die Länge gibt die Basenpaarlänge des entstehenden PCR Produktes an.

8.6) Daten des Patienten- und Normalkollektivs

Diagnose/n	Material	Patientenzahl
Akute Lymphatische Leukämie	Blut	3
Akute Lymphatische Leukämie	Knochenmark	1
Akute Myeloische Leukämie	Blut	38
Akute Myeloische Leukämie	Knochenmark	64
Akute Myeloische Leukämie, Trisomie 21	Knochenmark	2
Akute Myeloische Leukämie, Trisomie 21	Blut	1
Akute Myeloische Leukämie, T-Zell Akute Lymphatische Leukämie	Knochenmark	2
<i>Akute Myeloische Leukämie Zelllinien: HL60, MKB1, CTV1, MUTZ1</i>	<i>Zelllinie</i>	4
Chromosomenbrüchigkeitssyndrom	Blut	2
Chromosomenbrüchigkeitssyndrom, Nijmegen Breakage Syndrome	Blut	1
Chronisch Myeloische Leukämie	Blut	4
Chronisch Myeloische Leukämie	Knochenmark	1
<i>Chronisch Myeloische Leukämie Zelllinien: T1, K-562</i>	<i>Zelllinie</i>	2
Chronisch Myelomonozytäre Leukämie	Blut	1
Chronisch Myelomonozytäre Leukämie	Knochenmark	3
Fanconi Anämie	Blut	8
Fanconi Anämie	Knochenmark	4
Fanconi Anämie, Akute Myeloische Leukämie	Knochenmark	2
Juvenile Myelomonozytäre Leukämie	Blut	1
Juvenile Myelomonozytäre Leukämie	Knochenmark	2
Juvenile Myelomonozytäre Leukämie	Milz	8
Myelodysplastisches Syndrom	Blut	1
Myelodysplastisches Syndrom	Knochenmark	23
Myelodysplastisches Syndrom, Akute Myeloische Leukämie	Blut	2
Myelodysplastisches Syndrom, Ewing Sarkom	Knochenmark	1
Neuroblastom	Blut	56
Non-Hodgkin Lymphom	Blut	1
Non-Hodgkin Lymphom (T-Zell)	Blut	1
Non-Hodgkin Lymphom, Sekundär malignom	Blut	1
Normalkollektiv	Blut	96
Schwere Aplastische Anämie	Blut	4
Schwere Aplastische Anämie, Panmyelopathie	Blut	1
T-Zell Akute Lymphatische Leukämie	Blut	37
T-Zell Akute Lymphatische Leukämie	Knochenmark	1
VACTERL Syndrom	Blut	3

8.7) Protein kodierende cDNA Sequenz des Fanconi Anämie C Gens (GenBank accession number : NM_000136.2)

ACCTTTTCCCTTTTCCAAG
1 ATGGCTCAAGATTCAGTAGATCTTTCTGTGATTATCAGTTTTGGATGCA
51 GAAGCTTCTGTATGGGATCAGGCTTCCACTTTGGAAACCCAGCAAGACA
101 CCTGTCTTACGTGGCTCAGTTCAGGAGTTCCTAAGGAAGATGTATGAA
151 GCCTTAAAAGAGATGGATTCTAATACAGTCATTGAAAGATTCCCACAAT
201 TGGTCAACTGTTGGCAAAAGCTTGTGGAAATCCTTTTATTTTAGCATATG
251 ATGAAAGCCAAAAAATTCTAATATGGTGCTTATGTTGTCTAATTAACAAA
301 GAACCACAGAATCTGGACAATCAAACCTAACTCCTGGATACAGGGTGT
351 ATTATCTCATATACTTTCAGCACTCAGATTTGATAAAGAAGTTGCTCTTT
401 TCACTCAAGGCTTGGGTATGCACCTATAGATTACTATCCTGGTTGCTT
451 AAAAAATATGGTTTTATCATTAGCGTCTGAACTCAGAGAGAATCATCTTAA
501 TGGATTTAACTCAAAGGCGAATGGCTCCCAGAGAGTGGCGTCCCTGT
551 CACGAGTTTGTGTCCTTATTACCTGACAGATGTTGACCCCTGGTG
601 GAGGCTCCTCATCTGTGATGGACGTGAACCTCAGGAAATCCTCCAGCC
651 AGAGTTCTTTGAGGCTGTAAACGAGGCCATTTGCTGAAGAAGATTTCTC
701 TCCCCATGTCAGCTGTAGTCTGCCTCTGGCTTCGGCACCTCCCAGCCTT
751 GAAAAAGCAATGCTGCATCTTTTTGAAAAGCTAATCTCCAGTGAGAGAAA
801 TTGTCTGAGAAGGATCGAATGCTTTATAAAAAGATTCATCGCTGCCTCAAG
851 CAGCCTGCCACCTGCCATATTCGGGTTGTTGATGAGATGTTCAAGGTGT
901 GCACTCCTGGAAACCGATGGGGCCCTGGAAATCATAGCCACTATCAGGT
951 GTTTACGCAGTGCTTTGTAGAAGCTCTGGAGAAAAGCAAGCAAGCAGCTGC
1001 GGTTTGCACTCAAGACCTACTTTCCTTACTTCTCCATCTCTTGCCATG
1051 GTGCTGTGCAAGACCCTCAAGATATCCCTCGGGGACACTGGCTCCAGAC
1101 ACTGAAGCATATTTCTGAACTGCTCAGAGAAGCAGTTGAAGACCAGACTC
1151 ATGGGTCTGCGGAGGTCCCTTTGAGAGCTGGTTCCTGTTCACTTCTC
1201 GGAGGATGGGCTGAGATGGTGGCAGAGCAATTACTGATGTCGGCAGCCGA
1251 ACCCCCCACGGCCCTGCTGTGGCTCTTGGCCTTCTACTACGGCCCCGTG
1301 ATGGGAGGCAGAGACACAGACTATGGTCCAGGTGAAGGCCGTGCTGGGC
1351 CACCTCCTGGCAATGTCCAGAAGCAGCAGCCTCTCAGCCCAGGACCTGCA
1401 GACGGTAGCAGGACAGGGCACAGACACAGACCTCAGAGCTCCTGCACAAC
1451 GCTGATCAGGCACCTTCTCCTCAACTTCTGCTCTGGGCTCCTGGAGGC
1501 CACAGATCGCTGGGATGTCATCACCTGATGGCTCACACTGCTGAGAT
1551 AACTCACGAGATCATTGGCTTTCTTGACCAGACCTTGTACAGATGGAATC
1601 GTCTTGGCATTGAAAGCCCTAGATCAGAAAAACTGGCCCGAGAGCTCCTT
1651 AAAGAGCTGCGAACTCAAGTCTAG

Aminosäuresequenz des Fanconi Anämie C Proteins

1 MAQDSVDLSCDYQFWMQKLSVWDQASTLETQQDTC LHVAQFQEF LRKMYE
51 ALKEMDSNTVIERFPTIGQLLAKACWNPFILAYDESQKILIWCLCCLINK
101 EPQNSGQSKLNSWIQGVLSHILSALRFDKEVALFTQGLGYAPIDYYPGLL
151 KNMVLSSLASELRENHLNGFNTQRRMAPERVASLSRVCVPLITLTDVDPV
201 EALLICHGREPQEILQPEFFEAVNEAILLKKISLPMSAVVCLWLRHLPSL
251 EKAMLHLFEKLISSERNCLRRIEFCIKDSSLPQAACHPAIFRVVDEMFR
301 ALLETDGALEIIATIQVFTQCFVEALEKASKQLRFALKTYFPYTSPLAM
351 VLLQDPQDIPRGHWLQTLKHISELLREAVEDQTHGSCGGPFESWFLFIHF
401 GGWAEMVAEQLLMSAAEPPTALLWLLAFYYGPRDGRQRAQTMVQVKAVLG
451 HLLAMSRSSSLSAQDLQTVAGQGTDTDLRAPAQQLIRHLLLNFLLWAPGG
501 HTIAWDVITLMAHTAEITHEIIGFLDQTLYRWNRLGIESPRSEKLARELL
551 KELRTQV.

9.) Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1998 bis Mai 2000 im Labor der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bin ich dem Direktor der Abteilung, Herrn Prof. Dr. ret. nat. Reinhard Schneppenheim, zu Dank verpflichtet. Vor allem danke ich ihm für den Rat und die Unterstützung, die er mir als mein Doktorvater hat zukommen lassen.

Ein großer Teil der Proben wurde im Rahmen der Pädiatrischen AML-Behandlungstudien AML-BFM gesammelt und von Prof. Ludwig, Berlin bzw. Frau Prof. Creutzig, Hannover zur Verfügung gestellt. Der größte Teil der Proben von Kindern mit MDS stammte aus der MDS-Behandlungsstudie EWOG-MDS (Studienleiterin: Frau Prof. Niemeyer, Freiburg). Diesen sowie den Hamburger Kollegen, Herrn Prof. Kabisch und Herrn Dr. Rischewski, danke ich für die Bereitstellung der Patientenproben und korrespondierenden Patientendaten. Für Ihr besonderes Engagement danke ich insbesondere Herrn Dr. Rischewski und Herrn Oberstellvertretend für alle Mitarbeiter des Forschungslabors.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Zuwendung und Unterstützung außerhalb der Laborräume ganz herzlich bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

10.) Eidesstattliche Versicherung

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



Melbourne, den 15. Juni 2008

Henning Clausen