

Fanconi-Anämie: Paradigma der genetischen Heterogenität

Ilija Demuth, Marcin Wlodarski, Martin Digweed

Zusammenfassung

Die Fanconi Anämie ist eine klinisch und genetisch heterogene Erkrankung, welche durch Mutationen in einer Reihe von Genen bedingt wird, die maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Stabilität unseres Genoms beteiligt sind. Die klinische Heterogenität der Erkrankung lässt sich zumindest teilweise durch ihre genetische Heterogenität begründen. Dabei werden Schweregrad und klinischer Verlauf der Erkrankung eher von der Art und Position der jeweiligen Mutation als von der Art des betroffenen Gens bestimmt. Die Autoren geben einen Überblick über die historische Entwicklung der FA-Forschung, von der Entdeckung der erhöhten Chromosomenbrüchigkeit durch Traute Schroeder im Jahre 1964, der Entdeckung der ersten Komplementationsgruppen im Jahre 1980, bis zur Kartierung und Klonierung der verschiedenen FA-Gene ab dem Jahre 1992. Die Identifizierung des FANCG-Gens im Jahre 1998 als menschliches Äquivalent des in Hamsterzellen entdeckten XRCC9-Reparaturgens hat eine der ersten konkreten Hinweise für die Beteiligung der FA-Gene an DNA-Reparaturvorgängen in der Säugerzelle erbracht, wobei dem evolutionär konservierten FANCD2 Gen offenbar eine Schlüsselrolle zukommt. Inzwischen wurde auch gezeigt, dass die bekannten Krebsgene BRCA1 und BRCA2 sehr eng mit den FA-Genen kooperieren, im Falle von BRCA2 sogar identisch mit einem der FA-Gene sind. Daher kann nicht mehr daran gezweifelt werden, dass die FA-Gene eine wichtige Rolle in der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden spielen. Wie diese Gene und ihre Produkte im einzelnen bei Schaden-erkennung und DNA-Reparatur zusammenwirken, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Schlüsselwörter

Fanconi Anämie, genetische Heterogenität, Komplementationsgruppen, FANC-Gene, DNA-Reparatur

Summary

Fanconi anemia is a clinically and genetically heterogenous disease caused by mutations in a number of genes which are responsible for the stability of our genome. Clinical heterogeneity reflects in part the underlying genetic heterogeneity, even though type and position of the respective mutations appears to have a greater influence on the clinical phenotype than the type of gene that is affected.

The authors briefly review the milestones of modern day FA-research, beginning with the discovery, by Traute Schroeder in 1964, of chromosomal instability. Further milestones were the discovery of complementation groups in 1980 and the mapping and cloning of the respective FA genes, beginning in 1992. Identification in 1998 of the FANCG-gene as the human equivalent of the Chinese hamster XRCC9 DNA-repair gene provided the first definite link between FA-genes and the maintenance of genetic stability in mammalian somatic cells. The highly conserved FANCD2 gene, discovered in the year 2000, appears to play a key role in the cellular response to certain types of DNA-damage, notably double strand breaks and interstrand crosslinks. Most recently, it was discovered that the known cancer genes BRCA1 and BRCA2 cooperate very closely with the FA gene products in the response to DNA damage, with BRCA2 being a bona fide FA-gene if both alleles are affected by mutations. On the basis of these recent findings there is no doubt that the FA family of genes plays an important role in the somatic maintenance of our genome. How these genes function in damage recognition and/or DNA repair is currently under active investigation.

Keywords

Fanconi anemia, genetic heterogeneity, complementation groups, FANC-genes, DNA-repair

Meilensteine der FA-Forschung

Guido Fanconi beschrieb 1927 eine Panmyelophthase bei drei Brüdern und grenzte diese Erscheinungsform der Anämie als eine konstitutive (genetische) Krankheit ab. Neben der Panmyelophthase präsentierten die von Fanconi beschriebenen Brüder auch eine Hyperpigmentierung der Haut, Mikrozephalie, Hypogenitalismus, Strabismus und Hyperreflexie (1). Hypo- oder Aplasie von Daumen und Radius sind gleichfalls als Hauptmerkmale des Syndroms früh beschrieben worden. Tatsächlich ist das klinische Bild der Krankheit höchst variabel, und die schwerwiegenden Fälle haben zunächst die Beschreibung bestimmt (2).

Angesichts dieser Variabilität wäre die Differentialdiagnose der Fanconi-Anämie äußerst problematisch geblieben, wenn nicht Schroeder 1964 eine wesentliche Entdeckung gemacht hätte: Lymphozyten von FA-Patienten zeigen spontane Chromosomenaberrationen (3). Diese Aberrationen betreffen etwa 25 % der untersuchten Zellen und sind vor allem Chromatidbrüche, triradiale und quadriradiale Translokationsfiguren, in die nicht-homologe Chromosomen involviert sind. Eine Beteiligung des FA-Gens an „metabolism and mechanics of the chromosome“ wurde bereits 1974 von Schroeder postuliert (4). Der Befund der Chromosomenbrüchigkeit hat dazu Anlass gegeben, Zellen von FA-Patienten auf die Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Substanzen zu untersuchen. Schuler bemerkte bereits 1969, dass sich die Häufigkeit von Zellen mit Chromosomenbrüchen nach einer Behandlung der Zellen mit einem Alkylans mehr als verdoppelt (5). In einer ausführlichen Untersuchung behandelten Sasaki und Tonomura Lymphozyten von FA-Patienten und Kontrollen mit einer Reihe verschiedener Chemikalien und berechneten so die relative Empfindlichkeit der FA-Zellen (6). Es wurde sofort ersichtlich, dass die FA-Zellen besonders empfindlich gegenüber bi- oder polyfunktionellen Alkylantien (HN₂, Mitomycin C und Psoralen/UVA) sind. Die Zellen zeigten keine besondere Empfindlichkeit gegenüber basen-modifizierenden

Chemikalien wie MMS, MNNG und 4NQO und nur mäßige Empfindlichkeit gegenüber DMMC, einem monofunktionellen Derivat von MMC. Bi- und polyfunktionelle Alkylantien sind in der Lage, DNA-Interstrangvernetzungen (sog. „Crosslinks“) zu produzieren.

Die Empfindlichkeit von FA-Zellen gegenüber DNA-Crosslink-produzierenden Alkylantien, wurde rasch bestätigt, und die Hypothese wurde aufgestellt, dass FA-Zellen in der Reparatur solcher Läsionen defizient sind (7). Neben Xeroderma pigmentosum, bei dem ein Defekt in der Reparatur von UV-induzierten DNA-Läsionen eindeutig gezeigt werden konnte, sollte FA demnach ein weiteres Syndrom mit fehlender DNA-Reparatur darstellen. Die Beweisführung ist jedoch bei FA sehr schwierig gewesen und immer noch nicht abgeschlossen. Ein großes Problem ist, dass die Variabilität, die auf klinischem Niveau beobachtet wird, sich auf dem zellulären Niveau fortsetzt. Während manche Labore eine zwei- bis achtfache Reduktion in der Rate der Crosslink-Entfernung in ihren FA-Zellen messen konnten, fanden andere keine Unterschiede in der Crosslink-Reparatur zwischen Kontrollzellen und ihren FA-Zellen. Ein Grund für diese unterschiedlichen Befunde liegt möglicherweise in der Verwendung verschiedener Methoden zum Nachweis der DNA-Reparatur. Angesichts der klinischen Variabilität entstand aber der Verdacht, dass die FA keine einheitliche genetische Entität darstellt, sondern Mutationen in verschiedenen Genen zu diesem Phänotyp führen können. Die Möglichkeit der genetischen Heterogenität bei der FA wurde bereits 1966 von Schroeder postuliert: „Aus diesem Grund nehmen wir an, dass verschiedene Genmutationen zum klinischen Bild der Fanconi-Anämie führen.“ (8).

1980 konnten Zakrzewski und Sperling anhand von Zellfusions-Experimenten mit FA-Patientenzellen zeigen, dass die autosomal-rezessiv vererbte Fanconi Anämie tatsächlich genetisch heterogen ist (9). Weitere Untersuchungen haben dies bestätigt – die Anzahl der Komplementations-

gruppen unter FA-Patienten liegt gegenwärtig bei 8 (10, 11, 12). In 4 von den 8 Komplementationsgruppen konnte das zugrundeliegende Gen durch Kopplungsanalysen in Familien chromosomal lokalisiert werden: *FANCA*, *FANCD2*, *FANCE*, und *FANCG*.

Zur Lokalisierung des *FANCE* Gens haben wir drei Familien ausgesucht, die zuvor in das EUFAR-Register (European Concerted Action on Fanconi Anemia Research) aufgenommen worden waren. Zwei von den drei Familien sind türkischen Ursprungs und die beiden konsanguinen Elternpaare haben jeweils ein betroffenes und ein gesundes Kind. Die dritte Familie mit drei betroffenen Nachkommen kommt aus Bangladesch. Die lymphoblastoide Zelllinie eines betroffenen Kindes einer dieser Familien stellt die Referenzlinie für FA-E dar (13, 14). Die anderen zwei Familien konnten mittels Zellfusions- und Mitomycin-C-Überlebens-Experimenten der Gruppe FA-E zugeordnet werden. Durch eine Homozygotie-Kartierung mit 274 ausgesuchten Mikrosatelliten, die sich in einem durchschnittlichen Abstand von 11cM über die 22 Autosomen erstrecken, konnten bereits 82% des Genoms für eine Lokalisierung von *FANCE* ausgeschlossen werden. Kandidaten-Regionen verblieben auf den Chromosomen 6p (44cM) und 19q (23cM). Eine Kopplungsanalyse unter Einbeziehung der restlichen Familienangehörigen schloss 19q aus und eine Feinkartierung mit weiteren Markern grenzte die kritische Region auf einen 18,2 cM-Bereich auf Chromosom 6 zwischen den Markern D6S422 und D6S1610 in der Bande 6p21-22 ein (15).

Die Lokalisierung des *FANCE*-Gens in einer chromosomalen Region, die bisher nicht mit der FA assoziiert war, entsprach der Erwartung bei genetischer Heterogenität und bildete eine Grundlage für dessen Klonierung. Für FA-E Patienten hat die Lokalisierung des *FANCE*-Gens in dieser Region signifikante therapeutische Konsequenzen: Die lebensbedrohliche Erkrankung des Knochenmarks wird, wenn möglich, durch Knochenmark-Transplantation von einem nicht betroffenen, HLA-identischen Geschwi-

ster behandelt. Auf Chromosom 6p21-22 sind auch die HLA Klasse I Gene lokalisiert. Die nicht betroffenen Geschwister von FA-E Patienten sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht HLA-identisch.

Das *FANCE*-Gen wurde durch Kopplungsanalysen in nur drei Familien kartiert, was die Potenz der Homozygotie-Kartierung verdeutlicht. Tatsächlich konnten wir bereits 1998 mit dieser Technik in einer konsanguinen Familie mit zwei betroffenen und sieben nicht betroffenen Kindern ein weiteres FA-Gen chromosomal lokalisieren. Das Gen, das auf Chromosom 9p12-13.3 kartierte, konnte anschließend durch Markeranalyse in eingeteilten Familien als das in FA-G Patienten mutierte Gen, *FANCG*, bestimmt werden (16).

Die chromosomale Lokalisierung der FA-Gene bietet einen Zugang zur Gen-Identifikation, wichtig ist hier allerdings der Hinweis, dass parallel zu diesen Arbeiten der Grundlagenforschung die Ergebnisse Eingang in die genetische Beratung und Diagnostik der betroffenen Familien finden.

Klonierung von FA-Genen

Sieben der verschiedenen FA-Gene konnten inzwischen kloniert werden. Methodisch spielte dabei die Expressionsklonierung eine herausragende Rolle. Hierbei werden menschliche cDNA-Klone in kultivierte Patientenzellen eingebracht, die anschließend hinsichtlich einer Korrektur von FA-typischen Eigenschaften, z.B. MMC-Hypersensitivität, getestet werden. Die cDNAs der genetisch komplementierten Zellen können dann sequenziert werden. Unter Umständen findet sich in Sequenzdatenbanken die zur isolierten cDNA korrespondierende genomische Sequenz mit Angabe der chromosomalen Lokalisation. Ist das gesuchte Gen im Vorfeld bereits kartiert worden und stimmt diese Kartierung mit der Lokalisation der komplementierenden cDNA überein, so hat man einen ersten guten Hinweis darauf, das Krankheitsgen identifiziert zu haben. Das es sich bei den so isolierten cDNAs tatsächlich um Transkripte des gesuchten Gens handelt, wird anschließend durch die

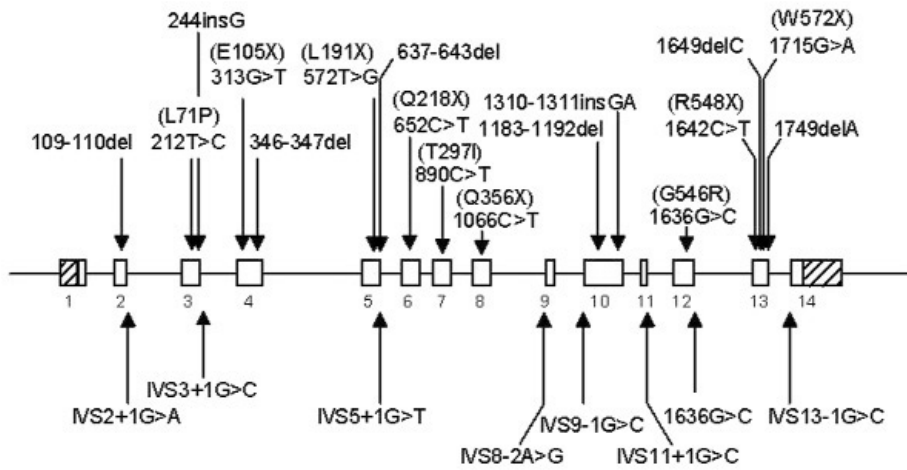


Abb 1 Mutationen im Fanconi Anämie-Gen FANCG

Die offenen Kästchen stellen die Exons des Gens dar, schraffierte Kästchen sind die 3' und 5' nicht-translatierten Abschnitte, die Abstände zwischen den Exons geben die Längen der Introns wieder. Alle bekannten Mutationen in FANCG sind angezeigt (29, 51, 52).

Identifikation von Genmutationen bei Patienten nachgewiesen.

Auf diese Weise wurden die Gene *FANCC*, *FANCA*, *FANCG*, *FANCF* und *FANCE* identifiziert (17-21). Zeitgleich mit der Expressionsklonierung des *FANCA*-Gens wurde die Positionsklonierung dieses Gens publiziert (22). Eine Kombination beider Strategien führte kürzlich zur Identifizierung des *FANCD2*-Gens: Nach der Fusion von kultivierten FA-D2-Zellen mit einzelne Chromosomen enthaltenden Mikrozellen, wurde die Komplementation der MMC-Hypersensitivität durch Chromosom 3 gezeigt. Die weitere Eingrenzung der kritischen Region erfolgte durch die Analyse von Zellklonen, die trotz des transferierten menschlichen Chromosoms 3, MMC-Empfindlichkeit zeigten. Es stellte sich heraus, dass der zelluläre FA-Phänotyp in diesen Zellen aufgrund von Mikrodeletionen im fremden Chromosom 3 erhalten blieb. Überlappende Deletionen in verschiedenen Zellklonen machten eine Lokalisation des *FANCD2*-Gens innerhalb eines 200Kb-Intervalls auf Chromosom 3p25.3 möglich (23). Die Mutationsanalyse von Kandidatengen dieser Region führte schließlich zur Identifikation des *FANCD2*-Gens (24).

Mutationsanalyse

Die ausführliche Analyse von Genmutationen der bekannten FA-Gene ergab, dass die meisten Patienten private Mutationen in compound-heterozygotem Status tragen. Im *FANCA*-Gen fand sich eine auffällige Häufung von großen intragenischen Dele-

tionen – etwa ein Drittel der Patienten zeigen diesen Mutationstyp. Aufgrund der zahlreich in diesem Gen vorhandenen intronischen Alu-Repeats postulierten Morgan et al. Alu-Repeat-vermittelte Rekombination als Entstehungsmechanismus (25). Wenige, gehäuft auftretende FA-Mutationen gehen auf eine Gründer-Mutation zurück. Dies trifft z.B. auf die Mutation IVS4+4A>T des *FANCC*-Gens zu, die bei einem Großteil der Ashkenazijüdischen Patienten homozygot vorliegt (26, 27). Im *FANCA*-Gen fanden sich bestimmte Deletionen, die in der afrikanischen Population Südafrikas häufiger zu finden sind (28). Die Mutation E105X fanden wir bei 44% der Allele in deutschen Patienten der Gruppe G (s.u.).

Mutationsanalyse im FANCG-Gen

In unserem Labor führten wir ein Mutationsscreening bei Patienten der Komplementationsgruppe G durch (29). Hierfür wurden alle 14 Exons des *FANCG*-Gens von genomischer DNA amplifiziert und in SSCP-Gelen unter vier verschiedenen Bedingungen analysiert. PCR-Produkte mit auffälliger Mobilität wurden dann sequenziert. Für die meisten Patienten fanden sich in einem oder mehreren PCR-Produkten SSCP-Mobilitätsvarianten. Fehlten solche Hinweise auf Mutationen, wurden die PCR-Produkte direkt sequenziert. In insgesamt 20 untersuchten Patienten fanden sich 18 verschiedene Mutationen. Für 13 Patienten wurden Mutationen im homozygoten Status nachgewiesen, was für sieben Patienten aufgrund von Konsanguinität erwartet wurde. Bei den

compound-heterozygoten Patienten konnte nur eine Mutation nicht bestimmt werden. Eine Übersicht der bislang bekannten *FANCG*-Mutationen findet sich in Abbildung 1.

Unter den insgesamt 18 verschiedenen Mutationen fand sich nur eine missense Mutation. Dabei handelt es sich um die Transition 212T>C, die bei dem türkischen Patienten homozygot vorliegt und zu einem konservativen Austausch von Leucin zu Prolin an der Position 71 des Proteins führt (L71P). Dieser Austausch findet sich nicht bei 50 daraufhin untersuchten Kontrollpersonen (100 Chromosomen) der gleichen ethnischen Gruppe. Hinzu kommt, dass die Aminosäure Leucin an dieser Position in der Mausequenz konserviert und Teil eines putativen Leucinzippers ist. Diese Indizien stützen die Annahme, dass es sich beim Austausch L71P tatsächlich um die krankheitsauslösende Veränderung handelt.

Alle der entdeckten Mutationen führen als nonsense Mutationen zum vorzeitigen Abbruch der Translation, abgesehen von der missense Mutation L71P. Wie bei anderen FA-Genen treten die meisten Mutationen jeweils nur einmal auf. Eine Ausnahme bildet die Stop-Codon-Mutation 313G>T (E105X), die in 44% aller untersuchten Allele von deutschen FA-G Patienten gefunden wurde. Es lag der Verdacht nahe, dass es sich um eine Gründer-Mutation handelt. Dieses wurde mit Hilfe von fünf Mikrosatelliten um den *FANCG*-Locus analysiert: D9S2176, D9S1853, D9S 1874, D9S1817 und D9S165. Der

Allel	1	2	3	4	5	6	7	cM
	251	251	251	251	253	263	259	53,6
	212	212	212	212	212	212	216	58,3
	337	337	337	337	337	337	337	
	261	261	261	261	261	261	261	59,3
	195	195	195	197	197	197	195	61,4

Abb 2 Nachweis einer Founder-Mutation in FANCG

Die Haplotypen für einen Abschnitt auf Chromosom 9p sind für sieben FANCG-Allele gezeigt, die alle die Mutation 313G>T (E105X) tragen. Die Angaben entsprechen den PCR-Produkt-Längen in Basenpaaren der Mikrosatelliten-Marker. Der Abstand zur pter ist in cM angegeben.

Marker D9S2176, eine hochpolymorphe (CA) Dinucleotid-Sequenz wurde in einem genomischen FANCG-Klon entdeckt (Heterozyosität 0.81).

Die Analyse der Allele bei deutschen Patienten mit der Mutation 313G>T zeigte einen gemeinsamen Haplotypen. Die dem FANCG-Gen am nächsten liegenden Mikrosatelliten D9S1817 und D9S2176 (ca. 50kb von FANCG entfernt) zeigten die gleichen Längen, wobei das D9S2176 Allel mit 335bp sonst eine Häufigkeit von 0.038 in der Bevölkerung zeigt. Die Mikrosatelliten D9S1853 und D9S165 haben in den meisten Patienten die gleichen Allele (Abb. 2). Die abweichenden Allele sind Anzeichen einer Haplotyp-Erosion aufgrund von Rekombinationen oder Mutationen.

Die *in vitro* Analyse von Mutationen die bei Patienten gefunden wurden und von artifiziellen Mutationen des FANCG-Gens nach Übertragung in Patientenzellen zeigte, dass die Aminosäuren 583-622 in der carboxyterminalen Hälfte des Proteins für die volle funktionelle Aktivität notwendig sind, auch wenn die aminoterminal Region (Position 1-428) für die spezifische nukleare Komplexierung mit dem Protein FANCA ausreichend ist (30).

Genotyp-Phänotyp Korrelationen

Eine kürzlich veröffentlichte, groß angelegte Studie ergab, dass die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Komplementationsgruppe keinen starken Einfluss auf den klinischen Verlauf der FA hat (31). Für FA-G-Pa-

tienten wurde ein, im Vergleich zu Patienten der Gruppen A und C, relativ frühes Auftreten von akuten myeloidischen Leukämien beobachtet. Bei Patienten der Gruppe C finden sich weniger somatische Auffälligkeiten als in den Gruppen A und G. Ein Vergleich mit Patienten der Gruppen B, D1, D2, E und F ist aufgrund der geringen Patientenzahl wenig aussagekräftig.

Auch die Korrelation bestimmter Mutationen mit klinischen Phänotypen erwies sich, aufgrund des großen Mutationsspektrums und der Tatsache, dass die meisten Mutationen compound-heterozygot vorliegen, als schwierig. FA-C-Patienten der Ashkenazi-jüdischen Population mit der Mutation IVS4+4A>T zeigen einen deutlich schwereren Verlauf als Patienten mit der Mutation 322delG im gleichen Gen und Patienten der anderen Komplementationsgruppen (32). Auch die Mutation delE12-31 im FANCA-Gen scheint mit einem schwereren Verlauf verknüpft zu sein. Generelle Aussagen lassen sich allerdings nicht treffen. So fanden Futaki et al. bei japanischen Patienten mit der schon erwähnten Mutation IVS4+4A>T, im Vergleich zu anderen FA-Patienten, keinen signifikanten Unterschied im Schweregrad des klinischen Phänotyps (33). Unterschiedliche genetische Hintergründe könnten die verschiedenen Verläufe, bei gleicher Mutation, erklären.

Genfunktion

FANCG ist mit dem vorher bekannten XRCC9 identisch, einem Gen, das

durch funktionelle Komplementation von UV-empfindlichen Hamsterzell-Mutanten UV-40 isoliert wurde (34). UV-40-Zellen zeigen in der S-Phase eine permanente Hemmung der DNA-Synthese nach einer mutagenen Behandlung. Dieses Phänomen haben wir ebenfalls in einer FA-Fibroblastenlinie, FA1BER, beobachtet (35, 36), bei der FANCG mutiert ist (29). Dieses Verhalten könnte durch einen Ausfall der Reparatur von DNA-Crosslinks erklärt werden. Tatsächlich ist FA1BER eine der wenigen FA-Zelllinien, für die eine fehlende DNA-Crosslink-Entfernung biochemisch nachgewiesen werden konnte (37). In Kontrollzellen werden Crosslinks mit einer Halbwertszeit von 10 Stunden repariert. Dagegen werden weder in FA1BER, noch in XP-Fibroblasten die Crosslinks entfernt. Die Messung der DNA-Reparatursynthese nach Psoralen/UVA- oder Angelicin-Behandlung, einem monofunktionellen Psoralen, zeigte, dass Kontrollzellen und FA1BER-Zellen, aber nicht XP-Zellen, Psoralenmonoaddukte reparieren können. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass UV-induzierte Thymin-dimere in FA1BER Zellen korrekt repariert werden (38), was die Tatsache unterstreicht, dass Läsionen, die nur einen Strang der DNA betreffen, von anderen Mechanismen repariert werden als solche, die wie Crosslinks, beide Stränge involvieren.

Die Klonierung des FANCG-Gens hat eine der ersten deutlichen Verbindungen zu DNA-Reparaturvorgängen in der Säugerzelle erbracht. Weitere und noch kräftigere Hinweise auf eine di-

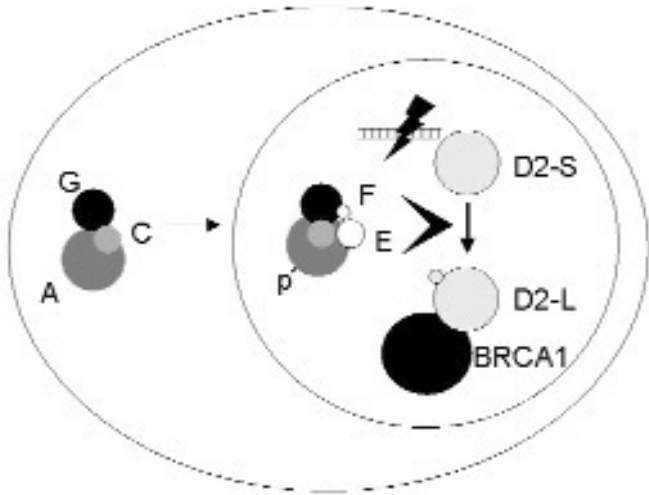


Abb 3 Modell des Fanconi Anämie-Pathways zur Reparatur von DNA-Läsionen

In der Graphik ist die Verteilung der FANC-Proteine und der Komplexe zwischen Zytoplasma und Zellkern, sowie ihre Wechselwirkung mit BRCA1 dargestellt. Die Buchstaben der Proteine geben die Komplementationgruppe wieder, FANCB und FANCD1 sind nicht dargestellt, da diese Proteine noch nicht identifiziert wurden. Die Graphik basiert auf den Befunden mehrerer Arbeitsgruppen (u.a. 39, 40, 41). Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen.

rekte Beteiligung der FA-Gene an der DNA Reparatur wurden durch die Klonierung des *FANCD2*-Gens gewonnen (24). Das *FANCD2*-Protein wird als Folge einer mutagenen Belastung modifiziert, und zwar durch Monoubiquitinierung. Die modifizierte Isoform, sog. *FANCD2-L*, kann nach Immunfärbung in diskreten nuklearen Foci lokalisiert werden: In diesen Foci assoziiert *FANCD2-L* mit dem Produkt des bekannten Brustkrebsgens *BRCA1* (39). Solche Foci, die für eine Reihe von DNA-Reparatur-Proteinen beschrieben wurden, enthalten beschädigte DNA und werden als Orte angesehen, in denen DNA-Läsionen aktiv repariert werden.

Die weiteren FA-Proteine sind in diesen Vorgang dadurch eingebunden, dass sie eben für die Monoubiquitinierung von *FANCD2* notwendig sind (39). Dass sie als multimerer Komplex in der Zelle vorzufinden sind, war bereits bekannt (40, 41). In Abbildung 3 werden diese molekularen Wechselwirkungen schematisch dargestellt. Es ist möglich, sogar wahrscheinlich, dass die FA-Proteine in andere Wechselwirkungen involviert sind, so interagiert zum Beispiel *FANCA* mit *SNX5* (42) und Human alpha spectrin II (43), *FANCC* mit *Hsp70* (44), *cdc2* (45) und *P-450* (46). Möglicherweise beeinflussen solche Interaktionen die Aktivität der FA-Protein-Komplexe in der Monoubiquitinierung von *FANCD2*, quasi als Sensoren der zellulären Physiologie. Somit können die verschiedenen, an FA-Zellen erhobenen Befunde zur Regulation des Zellzyklus (47, 48, 49) und zur Empfindlichkeit ge-

genüber reaktiven toxischen Sauerstoff-Spezies (50) in einen gemeinsamen Pathway, oder besser, in ein Netzwerk, eingebunden werden.

Die Einbindung der FA-Gene in zelluläre Netzwerke zur Schadenserkennerung und Schadensabwehr hat sich in jüngster Zeit durch zwei wichtige Entdeckungen bestätigt. Zum einen wurde gezeigt, dass Patienten der sehr seltenen Komplementationgruppen FA-D1 und FA-B biallelische Mutationen in einem Gen tragen, welches mit dem bekannten Brustkrebsgen *BRCA2* identisch ist (53). Die Identifizierung von *BRCA2* als ein bona fide Fanconi Gen liefert den letztendlichen Beweis für die unmittelbare Beteiligung der Fanconi Gene an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, wahrscheinlich auf dem Wege der homologen Rekombinationsreparatur. In Zellen von Patienten der Komplementationgruppen FA-D1 und FA-B, die jetzt als Zellen mit biallelischen Mutationen im *BRCA2*-Gen identifiziert wurden, war bereits 1997 eine fehlerhafte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen aufgefallen (54), deren Ursache nun durch die mutationsbedingte Einschränkung der Funktion des *BRCA2*-Genproduktes verständlich wird.

Die Wechselwirkung von DNA-Reparaturproteinen und beschädigter DNA kann, wie bereits erwähnt, durch Immunfluoreszenz mikroskopisch als nukleäre Foci sichtbar gemacht werden. Tatsächlich werden viele DNA-Reparaturproteine auf diese Weise in Foci gefunden (55). Die Entdeckung,

dass mono-ubiquitiniertes *FANCD2* auch in Foci gefunden wird und dort mit *BRCA1* und *BRCA2* interagiert, impliziert, dass die Zusammensetzung der DNA-Reparatur-Foci in FA-Zellen gestört sein könnte: In FA-B- und FA-D1-Zellen, durch den Verlust von *BRCA2*, in FA-D2-Zellen, weil *FANCD2* fehlt und in allen anderen FA-Zellen, weil *FANCD2* nicht mono-ubiquitiniert werden kann.

Dies konnte tatsächlich nachgewiesen werden. So sind Foci, die *RAD51* enthalten, in sämtlichen FA-Gruppen stark reduziert (56). *RAD51* stellt einen essentiellen „effector“ der homologen Rekombination dar. Es bildet mit einzelsträngiger DNA eine filamentöse Struktur, um einen Strangtausch mit einem homologen DNA-Doppelstrang zu ermöglichen. Die Bildung dieser *RAD51*-Foci ist offensichtlich sowohl *BRCA2*- als auch *FANCD2*-abhängig. Die hierdurch beeinträchtigte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen über homologe Rekombination in FA-Zellen könnte dazu führen, dass andere Mechanismen verwendet werden, z. B. das *RAD51*-unabhängige, sog. „single strand annealing“. Möglicherweise sind die charakteristischen Chromosomenaberrationen in FA-Zellen und deren erhöhte Mutationsrate auf die Verwendung dieser alternativen und fehlerhaften Reparaturprozesse zurückzuführen.

Auch die besondere Beziehung der FA-Gene zu sauerstoffinduzierten Schäden wird durch die unmittelbare Beteiligung der Brustkrebsgene an

dem FA-Gennetzwerk deutlich, da sowohl BRCA1 als auch BRCA2 eine wichtige Rolle bei der Reparatur von oxidativen DNA-Modifikationen (z.B. 8-Oxoguanin) im Sinne einer Transkriptions-gekoppelten Reparatur spielen (57). Die zweite wichtige Entdeckung betrifft das Produkt des *FANCD2* Gens, welches offenbar zu den zahlreichen Proteinen gehört, die nach DNA-Schädigung (insbesondere durch ionisierende Strahlung) durch die Kinase-Funktion des ATM Protein phosphoryliert werden (58). Je nach Art der Schädigung kann eine Aktivierung des *FANCD2*-Proteins als Schlüsselprotein des FA-Proteinnetzwerkes also durch Ubiquinierung oder durch Phosphorylierung erfolgen.

Die enge funktionelle Beziehung zwischen *FANCD2* und ATM spiegelt sich offenbar auch im Phänotyp der Patienten mit biallelischen Mutationen im *FANCD2* Gen, die sowohl FA-typische als auch ATM-typische klinische und zelluläre Merkmale zeigen (58). Sowohl die Erkenntnis, dass biallelische Mutationen in *BRCA2* Fanconi Anämie bedingen, als auch die Erkenntnis, dass das Produkt des *FANCD2* Gens durch ATM phosphoryliert werden kann, unterstreichen die enge Interaktion zwischen den verschiedenen Genprodukten, welche für die Aufrechterhaltung der Stabilität und Integrität unseres Genoms verantwortlich sind.

Eine mögliche Wechselwirkung zwischen *FANCD2* und MRE11 wird durch eine vollständige Herabsetzung der MRE11-Foci-Bildung in immortalisierten FA-D2-Zellen impliziert (60). In dieser Hinsicht unterscheiden sich FA-D2-Zellen von allen anderen FA-Zellen (56, 59). Mutationen in MRE11 führen zu den „Ataxia telangiectasia-like Disorder“ (60). MRE11 interagiert in der Zelle mit Nibrin dem Produkt des Gens, das für Nijmegen Breakage Syndrom verantwortlich ist (61). Da der RAD50-MRE11-Nibrin-Protein-Komplex an der S-Phase-Arretierung beteiligt ist, könnte *FANCD2* einen Effekt auf den Zellzyklus möglicherweise hierüber erzielen. Es steht zu erwarten, dass in den nächsten Jahren weitere Mitglieder dieses umfangreichen protektiven Netzwerkes

gefunden und ihre Funktionen aufgeklärt werden.

Literatur

1. Fanconi G (1927) Familiäre infantile perniziösartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrb Kinderheilkd* 117:257-280
2. Glanz A und Fraser FC (1982) Spectrum of anomalies in Fanconi anemia. *J Med Genet* 19:412-416
3. Schroeder TM, Anschütz F und Knopp A (1964) Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik* 1:194-196
4. 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
5. Schuler D, Kiss A, Fabian F (1969) Chromosomal peculiarities and „*in vitro*“ examinations in Fanconi's anaemia. *Humangenetik* 7:314-322.
6. Sasaki MS and Tonomura A (1973) A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross linking agents. *Cancer Res* 33:1829-1836
7. Sasaki MS (1975) Is Fanconi's anaemia defective in a process essential to the repair of DNA cross links? *Nature* 257:501-503
8. Schroeder TM (1966) Cytogenetischer Befund und Ätiologie bei Fanconi-Anämie. Ein Fall von Fanconi-Anämie ohne Hexokinasedefekt. *Humangenetik* 3:76-81
9. Zakrzewski S und Sperling K (1980) Genetic heterogeneity of Fanconi's anaemia demonstrated by somatic cell-hybrids. *Hum Genet* 56:81-84
10. Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M (1992) Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet* 1:196-198
11. Joenje H, Oostra AB, Wijker M, di Summa FM, van Berkel CG, Roomans 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
12. Joenje H, Levitus M, Waisfisz Q, D'Andrea A, Garcia-Higuera I, Pearson T, van Berkel CG, Roomans 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.
13. Joenje H, Lo ten Foe JR, Oostra AB, van Berkel CG, Roomans MA, Schroeder-Kurth T, Wegner RD, Gille JJ, Buchwald M, Arwert F (1995) Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype. *Blood* 86:2156-2160
14. 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

15. 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

16. Saar K, Schindler D, Wegner R-D, Reis A, Wienker T, Hoehn H, Joenje H, Sperling K, Digweed M. Localisation of a Fanconi anemia gene to chromosome 9p (1998) *Eur J Hum Genet* 6:501-508

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

18. Lo Ten Foe JR, Roomans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J et al. (1996) Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet* 14:320-323

19. de Winter JP, Waisfisz Q, Roomans MA, van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H (1998) The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet* 20:281-283

20. de Winter JP, Roomans MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, et al. (2000) The fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet* 24:15-16

21. de Winter JP, Leveille F, van Berkel CG, Roomans MA, van Der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H (2000) Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet* 67:1306-1308

22. The Fanconi anaemia/Breast cancer consortium (1996) Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nat Genet* 14:324-328

23. Hejna JA, Timmers CD, Reifsteck C, Bruun DA, Lucas LW, Jakobs PM, Toth-Fejdel S, Unsworth N, Clemens SL, Garcia DK, Naylor SL, Thayer MJ, Olson SB, Grompe M, Moses RE (2000) Localization of the Fanconi anemia complementation group D gene to a 200-kb region on chromosome 3p25.3. *Am J Hum Genet* 66:1540-1551

24. Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, Moses R, Grompe M (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 7:241-248

25. Morgan NV, Tipping AJ, Joenje H, Mathew CG (1999) High frequency of large intragenic deletions in the Fanconi anemia group A gene. *Am J Hum Genet* 65:1330-1341

26. 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

27. Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M (1993) A common

mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nat Genet* 4:202-205

28. Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV, Gibson RA, Kuyt LP, Havenga C, Gluckman E, Joenje H, de Ravel T, Jansen S, Mathew CG (2001) Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5734-5739

29. Demuth I, Wlodarski M, Tipping AJ, Morgan NV, de Winter JP, Thiel M, Grasl S, Schindler D, D'Andrea AD, Altay C, Kayserili H, Zatterale A, Kunze J, Ebell W, Mathew CG, Joenje H, Sperling K, Digweed M (2000) Spectrum of mutations in the Fanconi anemia group G gene, FANCG/XRCC9. *Eur J Hum Genet* 8:861-868

30. Kuang Y, Garcia-Higuera I, Moran A, Mondoux M, Digweed M, D'Andrea AD (2000) Carboxy terminal region of the Fanconi anemia protein, FANCG/XRCC9, is required for functional activity. *Blood* 96:1625-1632

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

32. Gillio AP, Verlander PC, Batish SD, Giampietro PF, Auerbach AD (1997) Phenotypic consequences of mutations in the Fanconi anemia FAC gene: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 90:105-110

33. 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

34. Busch DB, Zdzienicka MZ, Natarajan AT, Jones NJ, Overkamp WJ, Collins A, Mitchell DL, Stefanini M, Botta E, Albert RB, Liu N, White DA, van Gool AJ, Thompson LH (1996) A CHO mutant, UV40, that is sensitive to diverse mutagens and represents a new complementation group of mitomycin C sensitivity. *Mutat Res* 363:209-221

35. Digweed M, Zakrzewski-Lüdcke S, und Sperling K (1988) Fanconi's anaemia : correlation of genetic complementation group with psoralen/UVA response. *Hum Genet* 78:51-54

36. Digweed M und Sperling K (1989) Identification of a HeLa mRNA fraction which can correct the DNA-repair defect in Fanconi anaemia fibroblasts. *Mutat Res* 218:171-177

37. Gruenert DC und Cleaver JE (1985) Repair of psoralen-induced cross-links and monoadducts in normal and repair-deficient human fibroblasts. *Cancer Res* 45:5399-5404.

38. Klocker H, Burtscher HJ, Auer B, Hirsch-Kaufmann M, Schweiger M (1985) Fibroblasts from patients with Fanconi's anemia are not deficient in excision of thymine dimer. *Eur J Cell Biol* 37:240-242

39. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M,

D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7:249-262

40. Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Pulsipher M, D'Andrea AD (1997) The Fanconi anaemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex. *Nat Genet* 17:487-490

41. 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

42. Otsuki T, Kajigaya 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

43. McMahon LW, Waish CE, Lambert MW (1999) Human alpha spectrin II and the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCC interact to form a nuclear complex. *J Biol Chem* 274:32904-32908

44. Pang Q, Keeble W, Christianson TA, Faulkner GR, Bagby GC (2001) FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *EMBO J* 20:4478-4489

45. Kupfer GM, Yamashita T, Naf 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

46. 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

47. Segal GM, Magenis RE, Brown M, Keeble W, Smith TD, Heinrich MC, Bagby GC Jr (1994) Repression of Fanconi anemia gene (FACC) expression inhibits growth of hematopoietic progenitor cells. *J Clin Invest* 94:846-852.

48. Digweed M, Gunthert U, Schneider R, Seyschab H, Friedl R, Sperling K (1995) Irreversible repression of DNA synthesis in Fanconi anemia cells is alleviated by the product of a novel cyclin-related gene. *Mol Cell Biol* 15:305-314

49. Digweed M und Sperling K (1996) Molecular analysis of Fanconi anaemia. *Bioessays* 18:579-585

50. Schindler D und Hoehn H (1988) Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am J Hum Genet* 43:429-435

51. Nakanishi K, Moran A, Hays T, Kuang Y, Fox E, Garneau D, de Oca RM, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Functional analysis of patient-derived mutations in the Fanconi anemia gene, FANCG/XRCC9. *Exp Hematol* 29:842-849

52. Yamada T, Tachibana A, Shimizu T, Mugishima H, Okubo M, Sasaki MS (2000) Novel mutations of the FANCG gene causing alternative splicing in Japanese Fanconi anemia. *J Hum Genet* 45:159-166

53. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, de Die-Smulders C, Persky N, Grom-

pe M, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297: 606-609

54. Escarcellar M, Rousset S, Papadopoulou D (1997) The fidelity of double strand break processing is impaired in complementation groups B and D of Fanconi anemia. *Somat Cell Molec Genet* 23:401-7

55. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14:927-939.

56. Digweed M, Rothe S, Demuth I, Scholz R, Schindler D, Stumm M, Grompe M, Jordan A, Sperling K (2002) Attenuation of the formation of DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi anaemia. *Carcinogenesis* 23:1121-1126

57. 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* 60:5548-52

58. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andraessen PR, Gregroy RC, Kim ST, Lane WS, Kasten MB, D'Andrea AD (2002) Convergence of the Fanconi anemia and Ataxia telangiectasia pathways. *Cell* 109:459-72

59. Digweed M, Demuth I, Rothe S, Scholz R, Jordan A, Grotzinger C, Schindler D, Grompe M, Sperling K (2002) SV40 large T-antigen disturbs the formation of nuclear DNA-repair foci containing MRE11. *Oncogene* 21:4873-4878.

60. 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 an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99:577-587.

61. Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanoska 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.