

Klinische und chromosomale Diagnostik bei Fanconi Anämie: „pitfalls“ und Probleme. Ein Rückblick.

Traute Schroeder-Kurth, Tianhui Zhu

Zusammenfassung

Rückblickend auf 35 Jahre persönliches Engagement in der Aufklärung des Krankheitsbildes Fanconi Anämie beschreibt die Erstautorin sowohl Erfolge als auch Sackgassen ihrer Forschungsansätze. Unklare klinische und zytogenetische Befunde sind bis heute noch nicht vollständig interpretierbar. Die Antwort auf die zentrale Frage: Was ist Fanconi Anämie? kann daher auch heute noch nicht abschließend beantwortet werden. Einige Probleme, wie die Identifizierung von Mosaik-Fällen, die Interpretation der zytogenetischen Befunde, die Schwierigkeiten der Differentialdiagnostik und die Phänotyp-Genotyp-Korrelation werden auf dem Hintergrund der langjährigen persönlichen Erfahrung dargestellt und kommentiert. Aus den Erfahrungen mit dem Internationalen FA-Register leiten die Autoren die Forderung nach exakter und kontinuierlicher Dokumentation sämtlicher Befunde ab.

Schlüsselwörter

Fanconi Anämie, Fanconi Anämie Forschung, Chromosomenbruch-Analyse, Mosaik-Fälle, Labordiagnostik bei Fanconi Anämie, internationale Fanconi Anämie Register

Summary

Looking back on 35 years of Fanconi anemia research the senior author describes her longstanding involvement with and personal contributions to the many challenging questions surrounding Fanconi anemia. Extensive clinical, cytogenetic and molecular heterogeneity obviously render FA a challenging disease. Some of the early cytogenetic data can be explained by mosaicism, but others remain unclarified. Even to date, the central question whether a patient has or does not have Fanconi anemia cannot be reliably answered in a number of cases who fail to display mutations in any of the known FA genes. This commentary deals with personal observations concerning cases of mosaicism, the interpretation of chromosome breakage studies, problems of differential diagnosis, and aspects of genotype-phenotype correlations. In the interest of a correct diagnosis, prognosis and optimal patient care, and based on longterm personal experience and on contributions to the international FA registry, the authors stress that every attempt should be made to assure a continuous and comprehensive documentation of clinical, cytogenetic and molecular findings.

Keywords

Fanconi anemia, laboratory diagnosis of chromosome breakage syndromes, chromosome breakage studies, mosaicism, genotype-phenotype correlations, international Fanconi anemia registry

1. Beobachtungen, Interpretationsversuche und „pitfalls“

Rückschauend auf die ersten Jahre der Fanconi Anämie (FA)-Forschung stand Bestätigung oder Ausschluss einer FA bei Patienten mit verdächtigen Symptomen mit Hilfe der 1964 entdeckten Chromosomeninstabilität im Vordergrund aller Bemühungen. Dieses neue Phänomen verlangte nach Interpretation. Die Tatsache, dass Chromosomenbrüche und Reunionsfiguren nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* nachgewiesen werden konnten, deuteten auf schwere zelluläre Insuffizienzen hin, für die sich nach den Konzepten der 60iger Jahre am ehesten Stoffwechselfekte mit ihren messbaren Enzym- oder Vitaminmängeln anboten. So lauteten die ersten Interpretationsversuche zur Ursache der Chromosomenbrüchigkeit gemäß der Analysen von Löhr et al. (1965), dass ein Hexokinasedefekt in den Zellen vorliegt, bis widersprüchliche Befunde diese Hypothese unwahrscheinlich machten (Schroeder et al. 1964, Schroeder 1966a). Da sich der erste Patient ohne Hexokinase-Defekt auch phänotypisch und in seinem Chromosomenbefund von den vorherigen Beobachtungen deutlich unterschied, wurde der Schluss gezogen, dass verschiedene Genmutationen für das Krankheitsbild der FA verantwortlich sein könnten (Schroeder, 1966b).

Die Suche nach einer Korrelation zwischen Chromosomenbefund und zwischen Phänotyp/Genotyp wurde auch in den späteren Jahren der FA-Forschung weiter verfolgt, unterstützt von exakten Analysen der unterschiedlichen Muster von Chromosomenbruch-Lokalisationen und signifikanten Unterschieden in den Typen der Reunionsfiguren bei FA und Bloom Syndrom (BS) (Schroeder und German, 1974).

Die Konfiguration von Reunionsfiguren unter Beteiligung bestimmter Chromosomen bei FA und BS erlaubte Rückschlüsse auf die Positionen von Chromosomen und Chromosomenabschnitten im Interphasekern (Vogel und Schroeder, 1974, Hager et al. 1982). Diese aufwändigen Untersuchungen mit ihren schwierigen sta-

tistischen Interpretationen wurden durch die Chromosomenmarkierungen im Interphasekern von Cremer und seinen Mitarbeitern abgelöst. Im Wesentlichen wurden chromosomale Areale bestätigt, aber die einzelnen Chromosomen schienen keine festen Positionen einzunehmen (Cremer et al. 1982).

In einer ausführlichen, 6-jährigen Verlaufsbeobachtung eines unbehandelten erwachsenen Patienten mit FA wurden klinische, hämatologische und zytogenetische Daten dokumentiert. Es zeigten sich erhebliche Schwankungen in den zytogenetischen Werten, die unabhängig von den klinischen oder hämatologischen Befunden waren. Klone mit chromosomalen Umbauten wurden in Lymphozyten-Kulturen über mehrere Jahre beobachtet, bevor sie nicht mehr entdeckbar waren. Aus den zytogenetischen Analysen ließen sich keine prognostischen Voraussagen ableiten. Der beobachtete Patient verstarb 1979 an einem Bronchialkarzinom (Schroeder et al. 1976). Heute suchen verschiedene Autoren (z.B. Toennies, 2000) mit Hilfe der Multicolor-FISH-Technik im Knochenmark von FA-Patienten nach Zell-Klonen mit veränderten Chromosomensätzen, in der Hoffnung, rechtzeitig die Entwicklung von Neoplasien zu erfassen. Derartige Langzeitbeobachtungen sollten dann auch prognostisch wertvoll sein.

Umfangreiche Untersuchungen über bruchauslösende *in vitro*-Bedingungen mit unterschiedlichen Klastogenen folgten. Ziel dieser Untersuchungen war eine sichere und spezifische Steigerung der Chromosomenbrüchigkeit in Lymphozytenkulturen. Die Ergebnisse nach Behandlung der Kulturen mit INH wurden als Einfluss auf den Reparaturmechanismus bzw. auf die Ligase interpretiert, die in Zellen einiger FA-Fälle vermindert vorgefunden wurde (Schroeder und Stahl-Maugé, 1979). Der Durchbruch zur eindeutigen Identifizierung der FA aber wurde von Auerbach 1981 durch die bei FA-Zellen mit DEB induzierbare Chromosomen-Brüchigkeit erreicht. Eine erfolgversprechende neue Methode – ein Survival Test für Lymphozytenklone – geriet leider in Ver-

gessenheit, obwohl sich damit Differenzierungsmöglichkeiten für FA und Non-FA Fälle ergaben (Wunder und Fleischer, 1983) und eine neue rezessive Non-FA Erkrankung mit isoliertem Radiusdefekt bei zwei Kindern und ihren im Test heterozygoten Eltern entdeckt wurde (Kantner et al. 1986).

Schließlich konnte die formale Genetik der FA bearbeitet werden. Hierbei zeigte sich, dass die FA einem rezessiven Erbgang folgt. Anzeichen für einen X-chromosomalen Erbgang ergaben sich nicht. Die Frage nach einer genetischen Heterogenie musste zu diesem frühen Zeitpunkt unbeantwortet bleiben, aber die unterschiedlichen Phänotypen und Verlaufsformen der FA forderten zur fortgesetzten Beobachtung und Dokumentation der Befunde heraus. 1976 fehlten noch die Möglichkeiten zur direkten Darstellung von zellulären Unterschieden oder von Gendefekten; es gab keine Hinweise auf das konstante Fehlen eines Enzyms oder eines genetisch determinierten Proteins (Schroeder et al. 1976). Erst 1980 gelangen Zakrezevski und Sperling Komplementierungsexperimente, die den ersten unserer adulten FA Patienten eindeutig als genetisch different von einem „infantilen“ Typus der FA klassifizierten.

Zusammenhänge zwischen Chromosomenbrüchigkeit und Leukämie bei FA und anderen Erbkrankheiten faszinierten in den folgenden Jahren, in denen der Blick bereits auf einen abnormen Repairmechanismus als Ursache für Chromosomenaberrationen und DNA-Schäden gelenkt wurde (Schroeder und Kurth, 1971, Schroeder 1974). Aus Beobachtungen der spontan auftretenden Chromosomenmutationen bei FA, Bloom-Syndrom und Ataxia teleangiectasia sowie den UV-induzierten DNA-Schäden bei Xeroderma Pigmentosum leitete sich eine Modellvorstellung über eine unbekannt Anzahl von weiteren Mutationsschritten bis zur Entstehung von Leukämien und anderen Neoplasien ab. Zunächst werden dabei klonale, primäre Krebszellen gebildet, deren Schicksal unter dem *in vivo* stattfindenden Selektionsdruck bis zur klinischen Manifestation der Krebserkrankung verläuft (Schroeder, 1972). Unter welchen Voraussetzungen sich die primäre Krebszelle bildet, welche Veränderungen sie haben muss, um sich als Klon zu etablieren, ist nach wie vor unbekannt. Lensch et al. (1999) kommen in ihrer Arbeit über den Selektionsdruck, der bei der molekularen Evolution von myeloisch-leukämischen Klonen auf molekularer Ebene analysierbar wird, zu vergleichbaren theoretischen Überlegungen.

Aufgrund der damaligen Kenntnisse konnte die Frage: „Was ist Fanconi Anämie?“ 1983 anlässlich eines Symposiums wie folgt zusammengefasst werden (Schroeder-Kurth, 1984):

1. Trotz intensiver klinischer, zytogenetischer, biochemischer und genetischer Forschung unter Einbeziehung der Krebsforschung war eine einheitliche Definition für FA nicht erkenntlich.

2. Die klinischen Bilder variieren von unauffälligen Phänotypen bis hin zu Patienten mit schweren Missbildungen.

3. Die Anämie ist keineswegs immer präsent, präanämische Phasen der FA sind durch Familienbeobachtungen erkannt worden.

4. Die Krankheitsverläufe sind z.T. schwer vorhersagbar. Einige Patienten benötigen Therapie, andere leben lange ohne Medikamente.

5. Es gibt frühe und späte Knochenmarksinsuffizienzen. Kinder und Erwachsene sterben an Panzytopenien, viele an Blutungen und einige an Leukämie oder anderen Krebserkrankungen.

6. Die Chromosomenbrüchigkeit schien auf den ersten Blick ein ausgezeichnetes Diskriminierungsmerkmal zu sein: FA-Patienten, auch im präanämischen Stadium, weisen eine erhöhte spontane und induzierte Chromosomeninstabilität auf, Patienten oder Probanden ohne erhöhte Chromosomeninstabilität haben keine FA. Es gibt jedoch einige interessante Ausnahmen.

7. Die Chromosomeninstabilität wird als genetische Disposition für die Entstehung von Leukämien und anderen Neoplasien interpretiert.

Tab 1 Statistik der cytogenetischen Befunde (Zhu 1986)

Zytogenetische Diagnose durch Chromosomenbruchanalyse in 72 Std.-Kulturen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes nach Klastogen-Exposition. Als Klastogene werden Mitomycin (MMC) und Diepoxybutan (DEB) eingesetzt. In der Tabelle werden die beobachteten Schwankungsbreiten der einzelnen Parameter angegeben.

Diagnose	N	Test	% aberrante Zellen	Brüche/Zelle	Aberrationen/ aberrante Zelle
FA	17	endogen	5 – 40	0.05 – 0.85	1.0 – 1.8
	13	MMC	56 – 100	1.60 – 6.00	1.2 – 6.2
	17	DEB	54 – 100	1.90 – 8.55	1.2 – 8.15
Non-FA	42	endogen	0 – 11	0.00 – 0.10	1.0 – 1.7
	28	MMC	4 – 42	0.04 – 1.28	1.0 – 2.5
	38	DEB	1 – 20	0.03 – 0.28	1.0 – 1.7

Klonale Zellen ohne Anzeichen von Malignität sind über Jahre beobachtbar.

8. Diese Chromosomeninstabilität kann sich im Laufe der Erkrankung verändern, sogar „normalisieren“.
9. Das Ausmaß der spontanen Chromosomeninstabilität unterscheidet sich von Patient zu Patient, auch von Familie zu Familie; ebenso zeigen sich individuell unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Agentien, die zur Induktion von Chromosomenbrüchen verwendet wurden.
10. Die cytogenetischen Untersuchungsergebnisse sind von zahlreichen Faktoren abhängig. Sie unterscheiden sich von Labor zu Labor und sind deshalb schwer miteinander vergleichbar.
11. Heterozygote Eltern und „gesunde“ Geschwister können ebenfalls eine erhöhte Chromosomeninstabilität aufweisen.
12. Die ersten Komplementierungsexperimente erbrachten eindeutig den Hinweis auf zwei genetische Formen der FA: einen „adulten“ und einen „infantilen“ Typ (Zakrezewski und Sperling, 1980, Zakrezewski et al. 1983).
13. Voller Spannung wurden die Ergebnisse der nächsten Komplementierungsexperimente erwartet, in der Hoffnung, die FA-Varianten mit ihren unterschiedlichen Phänotypen, die Phänomene auf zellulärer Ebene und die Zusammenhänge zwischen FA und Krebs besser verstehen zu lernen.

Andere Wissenschaftler trugen anlässlich desselben Workshops in Amsterdam ihre Erfahrungen über die Variabilität der klinischen Bilder und mit den ersten Knochenmark-Transplantationen vor. Sie berichteten über beobachtete Zell-Klone in einem Fall von FA mit atypischer myelomonozytärer Leukämie sowie die zytogenetische Differentialdiagnose von FA und non-FA mit Hilfe unterschiedlicher Clastogene. Hypothesen über die zugrundeliegenden Defekte im Reparaturmechanismus der Zellen und über die Rolle von Sauerstoffradikalen bei der Entstehung von Chromosomenbrüchen bei FA wurden diskutiert (Clinical Genetics, 25:207ff).

2. Zum Problem der Identifizierung von FA-Mosaiken

Kwee und Joenje (1984) gaben ihre Beobachtung von Klastogen-resistenten Zellen bei einem FA-Fall bekannt und verglichen ihren Befund mit dem von Auerbach et al. (1981) mitgeteilten Verdacht auf Mosaikbildung aufgrund von Rückmutationen. Bei einem von vier Patienten fanden die Autoren einen signifikanten Anstieg der Chromosomeninstabilität nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von MMC, DEB und Cis-Platin, aber nur 40% der Metaphasen zeigten Bruchereignisse, nicht wie in den anderen Fällen fast 100% der ausgewerteten Metaphasen.

Bei Auerbach et al. (1981) war der Befund deutlicher: ein 9-jähriges Mädchen aus einer FA-Familie mit aplastischer Anämie und Fehlbildungen hatte nur 19% DEB-sensible Me-

taphasen bei der Erstuntersuchung. 1986 fanden sich bei dem Kind noch 3 von 100 untersuchten Zellen nach DEB Behandlung, die jedoch mehr als 10 Aberrationen aufwiesen (Auerbach, pers. Mitteilung). Die Interpretationen dieser auffälligen Befunde wurde klar formuliert: Die genetische Instabilität erhöht die Wahrscheinlichkeit signifikant, dass eine Korrektur des FA-Defektes – nach heutigen Kenntnissen z.B. bei Compound-Heterozygoten durch ungleiches crossing over – stattfindet, und dass ein Klon mit „normalen“ KM-Stamm-Zellen entsteht, der langsam die homozygot geschädigten FA-Zellen ersetzt.

In Mosaik-Fällen ist die Diagnosestellung mit Hilfe der Chromosomenanalyse in Zellen des peripheren Blutes nach wie vor erheblich erschwert. Gefordert wird eine ausgedehnte Chromosomenanalyse mit DEB oder MMC mit Registrierung aller Aberrationen und aberranter Zellen in einer großen Anzahl ausgewerteter Metaphasen. Insbesondere interessiert der Wert: Aberrationen/aberrante Zelle. Dieser Wert muss dem Befund bei typischer FA entsprechen, z.B. nach DEB-Induktion >10, wenn der Durchschnittswert bei dieser Behandlung in FA Zellen im Labor so hoch liegt wie bei Auerbach. Beim Vorliegen eines kompletten Mosaikstatus in Zellen des peripheren Blutes ist eine sichere Diagnosestellung letztlich nur durch die Untersuchung der Klastogen-Sensitivität von Hautfibroblasten möglich.

Tab 2 Phänotyp-Genotyp-Korrelationen bei unterschiedlichen Mutationen (Verlander et al. 1994)
Genotyp-Phänotyp-Korrelation als Funktion der jeweiligen Mutation im FANCC-Gen

	322delG ^(a,b)	Q13X ^(a)	IVS4	R185X	D195V	L554P
Zahl der Familien	9	3	16	2	1	1
Zahl der Betroffenen	12	3	19	4	1	2
Angeborene Fehlbildungen						
Hautveränderungen	6	3	16	1	1	2
Daumen und Radius	1	0	18	0	0	2
Andere Skelettdefekte						
Niere	1	0	10	0	0	0
Genitalorgane (m)	3	0	15	1	0	1
Herz	0 (6)	-	7 (11)	-	-	1 (2)
Ohr	0	0	6	0	0	1
Auge	2	0	8	0	0	0
Mikrozephalie	1	0	14	1	1	2
Magen-Darm-Trakt	1	0	17	0	0	0
	0	0	5	0	0	0
Schweregrad ^(c)	2.3	2	4.7	2	3	4.5

(a) Patient ist compound heterozygot für 322delG und Q13X;

(b) Patienten aus 2 Familien sind compound heterozygot für 322delG und R185X;

(c) Gewichtung der einzelnen Parameter: 2 = leicht betroffen, 5 = schwer betroffen;

3. Zum Problem der Interpretation von Chromosomenbefunden

Die Probleme der Identifizierung und Zuordnung eines Krankheitsbildes mit oder ohne Anämie, mit oder ohne Fehlbildungen liegen auf der Hand – und das hat sich bis heute nicht geändert. In vielen Laboratorien würde ein Patient mit wenigen MMC oder DEB empfindlichen Zellen nicht auffallen und somit nicht als FA diagnostiziert werden. Die statistischen Beurteilungen entsprechen den laboreigenen standardisierten Sensitivitätstests und verwischen subtile Einzelbefunde, was am Beispiel des Heidelberger Labors demonstriert werden kann (siehe Tab. 1).

Eine Bruchrate nach DEB von 0,30 (3 Zellen von 100 mit je 10 Aberrationen wie im Fall Auerbach) läge im Kontroll-Bereich, es sei denn, man beachtet speziell den Wert: Aberrationen/aberrante Zelle, der in einem Mosaik-Fall keineswegs immer bei 10,0 liegen muss. Die Tabelle zeigt unsere Erfahrungen, welche die Beurteilungen erschweren, weil der Wert: Aberrationen/aberrante Zelle auch wesentlich niedriger ausfallen kann. Wir haben – angeregt durch die Hinweise auf Mosaik-Fälle – unsere FA-Diagnostik über Jahre sorgfältig dokumentiert und die Ergebnisse ausführlich dargestellt (Zhu 1986, Schroeder-Kurth et al. 1989).

Unter allen untersuchten FA-Patienten reagierten nur knapp die Hälfte mit 80->100% DEB-induzierten Bruchereignissen. Ein Drittel der Fälle wies weniger aberrante Zellen nach

DEB/MMC Behandlung auf (40-64%); auch die Werte: Aberrationen/aberrante Zelle waren niedriger als im Labor Auerbach (Auerbach et al. 1989). Bei diesen besonders schwer zu diagnostizierenden Fällen waren immer vorwiegend „DEB-resistente“ Zellen vorhanden. Allerdings haben wir keinen einzigen Fall beobachten können, der wie bei Auerbach nur noch einzelne DEB-sensible Zellen mit mehr als 10 Aberrationen aufwies und dadurch die Diagnose FA mit Verdacht auf Mosaik-Bildung sicherte.

Was bedeuten diese Befunde? Repräsentieren sie alle *in vivo* entstandene Mosaik der FA oder gibt es unter den FA-Patienten oder auch während individueller Krankheitsphasen unterschiedliche Sensitivitäten für Klastogene? Die Frage, ob unsere cytogenetischen Befunde 1989 überinterpretiert wurden, ließ sich mit den damaligen Mitteln nicht entscheiden. Awert und Kwee (1989) konnten bei einem ihrer Patienten mit Verdacht auf Mosaik-Bildung in den Lymphozyten durch Fibroblasten-Untersuchung und den Kocultivierungstest eine FA bestätigen.

Als Ursachen für uneinheitliche Sensitivitäten kommen aber auch technische Faktoren infrage. Ob das von uns verwendete DEB oder die Endkonzentrationen von MMC und DEB die variablen Befunde bewirkt haben, konnten wir nicht sicher ausschließen. Frau Auerbach, die nach DEB-Behandlung ausschließlich 85 –100% Metaphasen mit Brüchen beobachtet (Auerbach et al. 1989), vermutet als

Ursache eher derartige Zusammenhänge.

Außer den Gruppierungen, die sich aufgrund der cytogenetischen Befunde unter den eindeutigen FA Patienten anboten, gab es auch schwer interpretierbare Ergebnisse, die weder durch die Klinik noch durch die Cytogenetik überzeugend zu erklären waren. Wir haben diese besonderen Fälle beobachtet und auf die Gelegenheit gewartet, das beschriebene diagnostische Problem erneut aufgreifen zu können.

4. Zu den Problemen der molekulargenetischen Analysen

Heute konzentrieren sich die FA-Forscher auf die genetische Heterogenität und die Identifikation von FA-relevanten Genen auf verschiedenen Chromosomen und innerhalb der Gene auf die Analyse der vorkommenden Mutationen. Es hat sich bestätigt, dass die FA eines der genetisch heterogensten Krankheitsbilder ist. Mit 7 oder 8 Komplementationsgruppen (Joenje et al. 1997, Digweed, 1999, Joenje und Patel, 2001) scheinen noch nicht einmal alle genetischen Subtypen der FA beschrieben zu sein, was die FA zu einer der interessantesten genetischen Erkrankungen macht. Jeder Schritt zu einer Aufklärung von genetischen Ursachen ist auch ein Schritt in Richtung auf unser Verständnis der fehlerhaften Funktionen in den Zellen und Organen und in Richtung auf mögliche Therapieverbesserungen. Joenje und Patel (2001) bieten eine Modellvorstellung für das Zusammenspiel von Genprodukten

Tab 3 Schwer interpretierbare Fälle aus der Studie von Seyschab et al. 1995

Atypische FA-Verdachtsfälle: Klinische, zytogenetische und durchflusszytometrische Daten.

Klinisches Bild	Lymphozyten-Kultur	% aberrante Zellen	Brüche/Zelle	Aberrationen pro Zelle	Diagnose in Heidelberg	Σ G2/GF	Diagnose in Würzburg	Fall Nr.
AA transiente Thrombo- zytopenie	endog. 1	5	0,05	1.0	FA-like	0.478	FA	1
	endog. 2	6	0.09	1.3	-			
	MMC 1	48	1.20	1.75	nicht			
	MMC 2	14	0.22	1.3	„klassisch“			
	DEB 1	33	1.10	2.3				
Gesund	DEB 2	32	0.90	2.3				
kongenitale Granulo- zytopenie	endog.	38	0.56	1.5	FA-like	0.400	FA	2
	MMC	44	0.92	2.0	-			
	DEB	50	1.40	2.8	„klassisch“			
Anämie; Thrombo- zytopenie KMT	endog.	3	0.03	1.0	FA-like	0.347	FA	3
	MMC	28	0.56	1.8	atypisch			
	DEB	29	0.65	1.8	FA			
AA transiente Anämie Thrombo- zytopenie gesund	endog. 1	12	0.13	1.1	atypisch	0.397	FA	4
	endog. 2	5	0.05	1.0	FA			
	MMC 1							
	MMC 2	54	3.20	3.2				
	DEB 1	12	1.30	1.3				
DEB 2	64	2.20	2.2					
AA schwerer Verlauf mit Exitus	endog. 1	11	0.13	1.2	atypisch FA	0.516	FA	5
	endog. 2	11	0.12	1.1				
	MMC 1							
	MMC 2	52	1.60	2.3				
	DEB 1	10	0.40	1.1				
DEB 2	68	2.30	2.6					
AA ALL Exitus	endog.	85	2.85	35.0	FA	0.097	keine FA	6
	MMC	100	10.0	10.0				
AA Präleukämie (AML) Exitus	endog. 1					0.305	FA	7
	endog. 2							
	MMC	64	2.20					
DEB	100	7.20				0.212	keine FA	
AA ALL KMT		5	0.05	1.0	keine FA	0.319		8
		10	0.14	1.2				

Abkürzungen

HD = Heidelberg
 Σ G2/GF = Summe der G2 Phasen/growth fraction
 WÜ = Würzburg
 FA = Fanconi Anämie
 AA = Aplastische Anämie
 ALL = akute lymphoblastische Leukämie
 KMT = Knochenmarktransplantation
 endog = endogen
 MMC = mitomycin C
 DEB = diepoxybutan

der unterschiedlichen FA-Gene an, die einen „FA core complex“ im Cytoplasma und Kern bilden und mit BRCA 1 assoziiert sind.

Die vermuteten Funktionen der einzelnen Gene und ihr Zusammenspiel im Repairmechanismus sowie ihre Bedeutung für den Ablauf der S-Phase bleibt nachzuweisen. Die Rolle der Oxyen-Sensitivität (Joenje et al. 1981; Schindler and Hoehn, 1988), die phänotypischen Auffälligkeiten und die Manifestationsunterschiede der Pancytopenie im homozygoten Zustand bleiben weiterhin und weitgehend unverstanden; zum Teil warten diese

Fragen auf Klärung durch neue Untersuchungs-möglichkeiten.

5. Zu den Problemen der Phänotyp-Genotyp-Korrelationen

Die Arbeitsgruppe Auerbach, zu der Verlander gehört, konnte ihre molekulargenetischen Befunde und die Erfassung von klinischen Daten im IFAR nutzen, um zu demonstrieren, dass die unterschiedlichen Mutationen im FANCC-Gen auf Chromosom 9 zu unterscheidbaren Phänotypen führen. Auch für die Mutationen im FANCA-Gen ergeben sich erste Genotyp-Phänotyp Korrelationen (Faivre et al, 2000 (siehe Tab. 2).

Derartige Phänotyp-Genotyp-Korrelationen könnten bei anderen FA-Gen-Defekten und vielleicht auch bei den unterschiedlichen Mutationen innerhalb der verschiedenen FA-Gene entdeckt werden. Vielleicht ergeben sich dann auch Erklärungen für die Unterschiede von Sensitivitäten gegenüber den verschiedenen Klastogenen, auf die wir so intensiv aufmerksam gemacht haben (Schroeder-Kurth et al, 1989). Hierzu müssten allerdings breit angelegte cytogenetische Untersuchungen weitergeführt und die Ergebnisse mit den klinischen Verläufen der einzelnen Patienten mit den Zuordnungen zu Subtypen bzw. zu bestimmten Mutationen in den FA-Ge-

Tab 4 Beschreibung europäischer Patienten im internationalen Fanconi Anämie Register (IFAR) bis März 1992 (Schroeder-Kurth, unpublizierte Daten)
Europäische Fanconi-Anämie-Patienten im IFAR-Register
(Einträge bis März 1992)

	FA	Non-FA
Gesamtzahl	91	91
Weiblich	44 (= 48,4 %)	47 (= 51,6 %)
Männlich	47 (= 51,6 %)	44 (= 48,4 %)
Fehlbildungen		
Radiusdysplasie / Aplasie	56.0 %	30.8 %
Hautveränderungen (z.B. café au lait Flecken)	53.8 %	26.4 %
Mikrozephalie	42.9 %	14.3 %
Anomalien der Harnwege	36.3 %	9.9 %
Mikrophtalmie/Augenveränderungen	36.3 %	12.1 %
Taubheit / HNO-Auffälligkeiten	28.6 %	9.9 %
Skelettanomalien (ohne Radialstrahl-Defekte)	15.4 %	5.5 %
	28.6 %	25.3 %
Hämatologische Auffälligkeiten		
Erythrozyten Anämie	74.7 %	67,0 %
Thrombozyten Thrombopenie	80.2 %	63.7 %
Leukozyten Leukopenie	60.4 %	53.8 %
Aplastische Anämie AA	74.7 %	49.5 %

nen dokumentiert werden. Nach unseren Erfahrungen mit IFAR ist ein solches Projekt außerordentlich zeit- und kostenaufwändig, personalintensiv, es verlangt ein jahrelanges Interesse der betroffenen Familien und Patienten sowie deren Betreuer, und es beansprucht Experten für die Programmierungen und Auswertungen an Großrechnern.

Als einen ersten Ansatz haben Carreau et al. (1999) mit ihren Labordaten eine Korrelation der cytogenetischen Befunde nach Testung mit einer großen Anzahl von Klastogenen zu FA-Komplementierungsgruppen unternommen. Dabei hat sich bestätigt, dass FA-Zellen mit unterschiedlichen Mutationen ein breites Spektrum an Sensitivitäten gegenüber unterschiedlichen Agenzien haben. Unsere Befunde sind allerdings damit nicht vergleichbar, weil die Daten über die Komplementierungsgruppen-Zugehörigkeit/Gen-Mutationen zu den untersuchten Patienten/Familien fehlen.

6. Zum Problem der Differential-Diagnostik

Seit vielen Jahren untersuchen die Kollegen im Institut für Humangenetik in Würzburg Lymphozyten von FA-Patienten sowie ihrer Familienangehörigen, von Probanden und Patienten mit anderen Erkrankungen auf Störungen des Zellzyklus. Die Ergebnisse zeigen einen G2-Block bei den diagnostizierten FA-Patienten.

In einer gemeinsamen, blind angelegten Studie mit der Frage nach dem differentialdiagnostischen Wert beider

Untersuchungen – Cytogenetik und Zell-Zyklus-Analysen – wurde eine eindrucksvolle Übereinstimmung bei 63 von 66 untersuchten FA-Patienten und anderen Non-FA-Personen gefunden, wobei sich der DEB-Test als die empfindlichste Methode erweisen konnte (Seyschab et al, 1995).

Bei diesen Untersuchungen fanden sich schwer interpretierbare cytogenetische Befunde bei acht Patienten mit Diskordanzen zwischen DEB/MMC-Sensitivitäten und Zellzyklus-Störungen. Darunter waren sowohl cytogenetisch einer FA schwer zuzuordnende Fälle, die im Zellzyklus-Test eindeutig als FA identifiziert wurden, als auch cytogenetisch eindeutige FA-Fälle, die im Zellzyklus-Test als Non-FA gelten müssen (siehe Tab. 3).

Genau diese Patienten sind für die Differential-Diagnostik am interessantesten:

Es könnte sich bei sechs Patienten um Mosaik-Bildungen mit DEB/MMC-resistenten Lymphozyten handeln, die aber ihre FA-typischen Zellzyklus-Störungen behalten haben, oder die Patienten gehören zu besonderen Komplementierungsgruppen mit geringeren DEB/MMC Sensitivitäten. Zwei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) (Fall 6 und 7) gehören nach dem Zellzyklus-Test zur Non-FA-Gruppe, aber die hohen Bruchraten weisen sie als FA aus, falls die leukämischen Zellen nicht extrem sensitiv auf *in vitro* Bedingungen und MMC/DEB reagieren. Ein weiterer Patient (8) mit ALL ist cytogenetisch un-

auffällig, aber im Zellzyklus-Test als FA charakterisiert.

Im Fall 1 ist nach unseren Ergebnissen und dem klinischen Verlauf eine FA wahrscheinlich. Über die beiden EZ-Zwillinge (Fall 2 und 3) haben Toronto et al. 1998 nochmals ausführlich berichtet. Die Komplementierung erbrachte Zugehörigkeit zu FANCA. Die cytogenetischen Befunde über 5 Jahre sind ein Beispiel für Unterschiede in den Ergebnissen aus verschiedenen Labors und für die Interpretationsschwierigkeiten, die derartige Diskrepanzen hervorrufen.

Heute müssen bei Verdacht auf Mosaik-Bildung Komplementationsstudien bzw. molekulargenetische Untersuchungen an Fibroblasten durchgeführt werden. Komplementations-Experimente und Mutationsanalysen sind relativ aufwändig und machen nur Sinn, wenn die Verdachtsdiagnose FA aus klinischer Sicht und Erfahrung tatsächlich begründet ist.

7. Zum Problem der FA-Erfassung im Internationalen FA-Register (IFAR)

Genetische Beratung und Betreuung von Familien mit FA machten es schließlich möglich, eine epidemiologische Studie über das facettenreiche Krankheitsbild der FA zu beginnen. Patienten und Eltern waren damit einverstanden, dass der Aufbau des IFAR in Zusammenarbeit mit A. Auerbach an der Rockefeller Universität, New York, begonnen werden konnte (Auerbach und Schroeder-Kurth, 1982). Fragebögen und Auswertungs-

modus waren Resultate unserer gemeinsamen Überlegungen, wie einige problematische Fragen zu dieser Erkrankung beantwortet werden könnten. Die ersten Berichte über IFAR weisen den Erfolg der Sammlung von klinischen und cytogenetischen Familien-Daten aus (Rogatko und Auerbach, 1988, Auerbach et al, 1989).

Der europäische Teil von IFAR ist laut Aufklärung und Einwilligung der Patienten/Familien ausschließlich durch Auerbach und Schroeder-Kurth auswertbar. So stehen diese wertvollen Daten heute dem sehr erfolgreichen europäischen FA-Forschungs-Konsortium nicht zur Verfügung. Diese Entwicklung war 1981 nicht vorhersehbar. Zu einer gemeinsamen abschließenden internationalen IFAR-Auswertung ist es nicht gekommen, weil sich die verfügbaren Datensätze in den USA und in den europäischen Ländern erheblich unterscheiden. So hatte der europäische Teil des IFAR nur einen begrenzten Erfolg (siehe Tab. 4).

Die Daten haben sich nach 1992 nicht mehr wesentlich verändert. Danach gibt es keine signifikanten Unterschiede im Fehlbildungsmuster und der Erfassung von Patienten mit hämatologischen Symptomen zwischen den FA-Fällen in den USA und Europa (Rogatko und Auerbach, 1988, Auerbach et al, 1989). Die Mehrzahl von FA Patienten mit Fehlbildungen werden nach wie vor erst mit dem Auftreten der ersten hämatologischen Symptome erfasst, die am häufigsten im Alter zwischen 4 und 8 Jahren manifest werden. Das IFAR hat nicht dazu beigetragen, die Zeit zwischen ersten Symptomen und Diagnose einer FA zu verkürzen, obwohl die Pädiater, Hämatologen und Humangenetiker durch die Fragebögen des IFAR, durch Publikationen und Dank der Aktivitäten der Selbsthilfe-Organisationen heute wesentlich besser informiert sind als zu Beginn von IFAR.

Deshalb zählt die FA auch weiterhin zu den Erkrankungen mit unsicherer Erfassung, mit schwer interpretierbaren cytogenetischen Befunden und Diskordanzen zwischen unterschied-

lichen Untersuchungs-Methoden/Laboratorien, was häufig auf besondere Fälle hinweist. FA-Patienten brauchen kontinuierliche Beobachtung und Betreuung.

Für die Interpretationen der nicht-therapeutischen Diagnostikforschung ist die Dokumentation aller Befunde essentiell, damit die Frage: „Was ist Fanconi Anämie“ wissenschaftlich befriedigend und für die Familien verständlich beantwortet werden kann. Ein funktionierendes Register mit akribischer Aufnahme-Dokumentation und Nachmeldungen sämtlicher Befunde und Verläufe wäre erforderlich und notwendig, um das Krankheitsbild der FA klinisch, genetisch, prognostisch und therapeutisch in optimaler Weise zu verstehen.

Literatur

- Auerbach AD, Adler B, Chaganti RSK (1981) Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi's anaemia by a cytogenetic method. *Pediatrics*, 67:128-135
- Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM (1989) International Fanconi Anemia Registry: Relation of Clinical Symptoms to Diepoxybutane Sensitivity. *Blood*, 73:391-396
- Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM (1989) International Fanconi Anemia Registry: First Report. In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G (eds): *Fanconi Anemia. Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects*. Springer Verlag Heidelberg, p.3-17
- Auerbach AD, Schroeder-Kurth TM (1982) First announcement of the Fanconi Anemia International Registry. *Hum.Genet.* 61:83
- Awert F, Kwee ML (1989) Chromosomal Breakage in Response to Cross-linking Agents in the Diagnosis of Fanconi Anemia. In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G (eds): *Fanconi Anemia. Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects*, Springer Verlag Heidelberg, p. 83-92
- Carreau M, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Joenje H, Buchwald M (1999) Drug sensitive spectra in Fanconi anemia lymphoblastoid cell lines of defined complementation groups. *Mutat Res* 435:103-109
- Cremer T, Bremer C, Baumann H, Luedtke EK, Sperling K, Teubner V, Zorn C (1982) Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese Hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum.Genet.* 60:46-56
- Digweed M (1999) Molekulare Grundlagen der Fanconi Anämie. *Klein.Pädiatr.* 211:192-197

Hager HD, Schroeder-Kurth TM, Vogel F (1982) Position of Chromosomes in the Human Interphase Nucleus. *Hum.Genet.* 61:342-356

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, Matthew CG (2000) Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. *European Fanconi Anemia Research Group. Blood* 96:4064-70

Joenje A, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB (1981) Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anemia. *Nature* 290:142-43

Joenje H, Ostra AB, Wijker M, di Summa FM, van Berkel CGM, Rooimans MA, Ebell W, van Weel M, Pronk JC, Buchwald M, Awert F (1997) Evidence for at least Eight Fanconi Anemia Genes. *Am.J.Hum.Genet.* 61:940-944

Joenje H, Patel KJ (2001) The emerging genetic and molecular Basis of Fanconi Anemia. *Nature Reviews Genet* 2:446-457

Kantner G, Schroeder TM, Tariverdian G, Wunder E, Fücksel HJ (1986) Autosomal recessive radius displasia with 8-methoxypsoralen sensitivity in lymphocytes (Abstract). 7th International Congress of Human Genetics, Berlin, Part 2, p.700

Kwee ML, Joenja H (1984) Unusual response to bifunctional alkylating agents in a case of Fanconi's Anaemia, Abstracts from Workshop at Free University, Amsterdam, 22. April 1983, *Clin.Genet.* 25-208

Lensch MW, Rathbun RK, Olson SB, Jones GR, Bagby GCR Jr (1999) Selective pressure as an essential force in molecular evolution of myeloid leukemic clones: a view from the window of Fanconi anemia. *Leukemia* 13:1784-1789

Löhr GW, Waller HD, Anshütz F, Knopp A (1965) Hexokinasmangel in Blutzellen bei einer Sippe mit familiärer Panmyelopathie (Typ Fanconi). *Klin.Wschr.* 43:870

Rogatko A, Auerbach AD (1988) Segregation Analysis with Uncertain Ascertainment: Application to Fanconi Anemia. *Am.J.Hum.Genet.* 42:889-897

Schroeder TM (1966a) Cytogenetische und cytologische Befunde bei enzymopenischen Panmyelopathien und Pancytopenien. *Humangenetik* 2:287-316

Schroeder TM (1966b) Cytogenetischer Befund und Ätiologie bei Fanconi Anämie. Ein Fall von Fanconi Anämie ohne Hexokinasedefekt. *Humangenetik* 2:76-81

Schroeder TM (1972) Genetische Faktoren der Krebsentstehung. *Fortschr.Med.* 90:603-608

Schroeder TM (1974) Relationship between chromosomal instability and leukemia. In Neth R (ed): *Modern trends in human leukemia. Hämatol.Bluttransfus.* p.94-96

Schroeder-Kurth T (1984) What is Fanconi Anemia? Clinical and Genetic Aspects of Fanconi's Anaemia. Workshop at the Free University Amsterdam, 22.April 1983. *Clin.Genet.* 25:206-207

Schroeder TM, Anschütz F, Knopp A (1964) Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik* 1:194-196

Schroeder TM, Kurth R (1971) Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. *Blood* 87:96-112

Schroeder TM, German J (1974) Bloom's Syndrome and Fanconi's Anemia: Demonstration of two distinctive patterns of chromosomal disruption and rearrangement. *Hum.Genet.* 25:299-306

Schroeder TM, Drings P, Beilner P, Buchinger G (1976) Clinical and Cytogenetic Observations During a Six-Year-Period in an Adult with Fanconi's Anaemia. *Blood* 34:119-132

Schroeder TM, Tilgen D, Krüger J, Vogel F (1976) Formal Genetics of Fanconi's Anemia. *Hum.Genet.* 32:257-288

Schroeder TM, Stahl-Mauge Ch (1979) Mutagenic Effects of Isonicotinic Acid Hydracide in Fanconi's Anemia. *Hum.Genet.* 52:309-321

Schroeder-Kurth TM, Zhu TH, Hong Y, Westphal I (1989) Variation in Cellular Sensitivities among Fanconi Anemia Patients, their Parents and Siblings, and Control Proband. In: Schroeder-Kurth et al. (eds): *Fanconi Anemia. Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects.* Springer Verlag Heidelberg, p.105-136

Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, Hentze S, Schroeder-Kurth TM (1995) Comparative Evaluation of Diepoxybutane Sensitivity and Cell Cycle Blockage in the Diagnosis of Fanconi Anemia. *Blood* 85: 2233-2237

Todaro R, Canino G, Tolone C, D'Avanzo M, Porfirio B, Hoehn H, Schroeder-Kurth T, Pistoia V (1998) Variable response to the diepoxybutane test in two dizygotic twins with Fanconi's anemia and flow cytometry for diagnosis confirmation. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 15:45-54

Toennis H (2000) Klonale Chromosomenaberrationen im Knochenmark von Fanconi-Anämie-Patienten. Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Otzenhausen, 1-3.6. Abstract-Band

Verlander PC, Lin JD, Udono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG, Auerbach AD (1994) Mutation analysis of Fanconi anemia gene FACC. *AmJ.Hum.Genet.* 54:595

Vogel F, Schroeder TM (1974) The internal order of the interphase nucleus. *Humangenetik* 25:265-297

Zakrezewski S, Sperling K (1980) Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum.Genet.* 56:81-84

Zakrezewski S, Koch M, Sperling K (1983) Complementation studies between Fanconi's anemia cells with different DNA repair characteristics. *Hum.Genet.* 64:55-57

Zhu TH (1986) Internationales Fanconi Anämie-Register. I. Phase der Untersuchungen: Erfassung von Patienten, klinische und zytogenetische Differentialdiagnose. Dissertation Medizinische Fakultät Heidelberg