

Carola Rohrbeck
Dr. med.

G₂-Arrest und G₂-Verlängerung in Fanconi-Anämie-Zellen, dargestellt mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung

Geboren am 07.11.1971 in Hamburg
Reifeprüfung am 21.06.1991 in Hamburg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis SS 1998
Physikum am 15.03.1994 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Ludwigsburg und in Zürich
Staatsexamen am 09.11.98 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. C. R. Bartram

Die Fanconi-Anämie ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, die unbehandelt meist schon im Kindesalter zum Tode führt. Sie manifestiert sich in einer aplastischen Anämie. Neben der Knochenmarkinsuffizienz besteht eine Prädisposition für Neoplasien, insbesondere für die akute myeloische Leukämie. Die meisten Fanconi-Anämie-Patienten sind weiterhin durch Fehlbildungen an Daumen, Unterarm oder der Haut betroffen. Auf zellulärer Ebene findet man als typische Veränderung eine Chromosomeninstabilität und eine Zellzyklusabweichung in Form einer G₂-Phase-Verlängerung. Für die Therapie der Fanconi-Anämie ist eine frühzeitige und sichere Diagnostik ausschlaggebend.

In dieser Arbeit wurde die FISH-Analyse (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung) eingesetzt, um Zellzyklusabweichungen bei Fanconi-Anämie-Patienten zu messen. Die FISH wurde zwei diagnostischen Methoden, dem DEB-Test und der Durchfluß-Zytometrie gegenübergestellt, die beide in der Fanconi-Anämie-Diagnostik zum Einsatz kommen.

Mittels der FISH lassen sich die Kerne einer Blutkultur, die sich in der G₂-Phase des Zellzyklus befinden, quantitativ bestimmen. Eine G₂-Verlängerung von Fanconi-Anämie-Zellen äußert sich in einem erhöhten G₂-Phase-Anteil.

Für die Fanconi-Anämie-Diagnostik mit der FISH empfiehlt es sich, eine Sonde einzusetzen, die an eine DNA-Sequenz hybridisiert, welche in der spätesten S-Phase repliziert wird. Um den Replikationszeitpunkt dieser sogenannten spätest replizierenden Sonde zu bestimmen, wurden DNA-Einbau-Studien mit chloriertem und jodiertem Uridin durchgeführt. Diese ergaben, daß das für die Diagnostik eingesetzte Cosmid durchschnittlich nach 3 bis 4 Stunden S-Phase repliziert.

In dieser Arbeit wurden 35 Personen, davon 15 mit Verdacht auf Fanconi-Anämie der FISH-Analyse unterzogen. Der Test ergab 15 positive und 20 negative Patienten. Alle 35 Personen wurden zusätzlich auch einem DEB-Test und zum Teil auch einer Durchfluß-zytometrischen Untersuchung unterzogen. Sämtliche Testergebnisse waren konkordant.

An einer EBV-transformierten Fanconi-Zelllinie wurde mittels derselben DNA-Einbautechnik festgestellt, daß es innerhalb einer Kultur von Fanconi-Anämie-Zellen eine Population gibt, die einen normalen Zellzyklus durchläuft und eine andere Population, die eine deutliche G₂-Verlängerung aufweist. Diese Population befindet sich unter den ruhenden (inaktiven) Zellen, die keine markierten Nukleotide einbauen, weil sie die S-Phase nicht durchlaufen. Für die Diagnostik brauchen auf markierten Präparaten nur noch die inaktiven Kerne eines Präparates ausgewertet werden. Das Ergebnis bei Fanconi-Anämie-Patienten weist einen durchschnittlich 3fach erhöhten Anteil an Kernen mit Doppelpunktsignalen (35,5%) gegenüber dem Anteil bei gesunden Personen (10,8%) auf.

Bei der FISH-Analyse auf nichtmarkierten Kernen erhält man einen 1,4fach erhöhten Anteil an Kernen mit Doppelpunkten bei Fanconi-Anämie-Patienten (41,9%) gegenüber dem gleichen Anteil bei Gesunden (35,9%).

Bei der Auswertung der FISH am Fluoreszenz-Mikroskop fielen neben Einzel- und Doppelpunktsignalen auch fadenförmige Hybridisierungssignale auf. Es stellte sich die Frage, wie diese zu deuten sind und ob sie in einer bestimmten Zellzyklus-Phase entstehen. Mittels Einbau von chloriertem und jodiertem Uridin in die DNA konnte gezeigt werden, daß diese Hybridisierungssignale typischerweise in Kernen zu sehen sind, die gerade die sptste S-Phase durchlaufen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß es sich um Replikationsfiguren handelt.

Obwohl die Zellzyklusbestimmungen in dieser Arbeit keine Fehldiagnosen lieferten, ist zu erwarten, daß bei einigen Fllen falsch-negative Diagnosen gestellt werden, wenn man den untersuchten Personenkreis erweitert. Mosaik-Patienten, die in der Literatur beschrieben sind, prleukmische und leukämische Patienten, die auf Grund der erhöhten Proliferationsrate keine G₂-Verlängerung mehr aufweisen, können mit der FISH und auch mit allen anderen Methoden, die eine G₂-Verlängerung nachweisen, nicht erfaßt werden.

Seit der Klonierung von zwei der fünf Fanconi-Anämie-Genen (FAA und FAC) ist es möglich, FA-Patienten, die durch Mutationen in diesen beiden Genen charakterisiert sind, auch mit molekulargenetischen Verfahren zu diagnostizieren. Diese Verfahren bieten eine hohe Sicherheit. Auch eine künftige Gentherapie setzt den Nachweis des molekularen Defektes voraus. Trotz aller Vorteile der molekularen Verfahren werden die Funktionstests zur FA-Diagnostik, zu denen auch die FISH-Analyse zählt, weiterhin ihre Anwendung finden. Man benötigt sie, wenn der Verdacht auf Fanconi-Anämie besteht, jedoch Unklarheit über die Komplementationsgruppe herrscht. In diesen Fllen werden indirekte Funktionstest zuerst als Art Screenig-Test angewandt werden können, bevor weiterführende diagnostische Maßnahmen ergriffen werden. Die FISH-Analyse eignet sich insbesondere wegen ihres geringen Zeit- und Kostenaufwands als Nachweismethode für die Fanconi-Anämie. Sie ist zudem in einem Labor, in dem die FISH-Analyse bereits als Nachweismethode für andere genetische Erkrankungen z.B. der Trisomie 21 eingesetzt werden, ohne zusätzlichen Aufwand durchführbar.