

Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Analyse der Chromosomeninstabilität bei
Fanconi-Anämie-Patienten mittels
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und konventioneller Zytogenetik**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Paul

aus Heidelberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. H. Neitzel
2. Prof. Dr. mrd. R. Rossi
3. Prof. Dr. rer. nat. R.-D.Wegner

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

PROTOKOLLVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 11 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 2.1 | Materialien | 19 |
| 2.1.1 | Standard-Puffer und Lösungen | 19 |
| 2.1.2 | Reagenzien | 20 |
| 2.1.3 | Medien und Zusätze | 21 |
| 2.1.4 | Enzyme | 21 |
| 2.1.5 | Weitere Materialien und Geräte | 21 |
| 2.2 | Patienten und Negativkontrollen | 23 |
| 2.3 | Zellkultur | 24 |
| 2.4 | Mitomycin C-Behandlung | 25 |
| 2.5 | Chromosomenpräparation | 26 |
| 2.6 | Sondenherstellung der Chromosomen 1, 3 und 7 | 27 |
| 2.6.1 | Vorbereitung der Mikrodisektion mit und ohne Trypsin | 27 |
| 2.6.2 | Mikrodisektion | 29 |
| 2.6.3 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 30 |
| 2.6.4 | Agarose-Gelelektrophorese | 32 |
| 2.6.5 | Fluoreszenz-Markierung | 33 |
| 2.6.6 | Agarose-Gelelektrophorese | 34 |
| 2.7 | Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH) | 34 |
| 2.8 | Auswertung der Sondenqualität | 37 |
| 2.9 | Auswertung wcp-assay und konventionelle Zytogenetik | 37 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.9.1 | Auswertung konventionelle Zytogenetik | 37 |
| 2.9.2 | Auswertung wcp-assay | 38 |
| 2.9.3 | Bruchereignisse/Zelle (B/Z) | 38 |
| 2.9.4 | Korrelation zwischen Bruchhäufigkeit und Chromosomengröße | 39 |
| 2.9.5 | Aberrante Zellen [%] und Bruchereignisse pro aberrante Zelle | 40 |
| 2.9.6 | Verteilung der Aberrationstypen | 40 |
| 2.9.7 | Verteilung der Aberrationstypen (#1, #3, #7 isoliert) | 40 |
| 2.10 | Statistik | 41 |
| 2.10.1 | Diagnoseparameter: | 41 |
| 2.10.2 | Korrelationskoeffizient | 42 |
| 2.11 | Aberrationstypen bei konventioneller Zytogenetik und beim wcp-assay. | 43 |
| 3 | ERGEBNISSE | 46 |
| 3.1 | Auswertung der Sondenqualität | 46 |
| 3.2 | Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) bei wcp-assays und konventioneller Zytogenetik | 48 |
| 3.3 | Aberrante Zellen [%] und Bruchereignisse/aberranter Zellen | 57 |
| 3.4 | Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 | 65 |
| 3.5 | Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen bei wcp-assays und konventioneller Zytogenetik | 68 |
| 3.6 | Verteilung der Aberrationstypen (Chromosomen 1, 3 und 7 isoliert) | 75 |
| 4 | DISKUSSION | 83 |
| 4.1 | Beurteilung der Sondenqualität | 83 |
| 4.2 | Vergleich: konventionelle Zytogenetik – wcp-assay | 84 |
| 4.3 | Bruchhäufigkeit und Größe der untersuchten Chromosomen 1, 3 und 7 | 87 |
| 4.4 | Untersuchung der Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen | 88 |
| 5 | AUSBLICK | 92 |
| | ZUSAMMENFASSUNG | 93 |
| | LITERATURVERZEICHNIS | 95 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| ace | acentric fragment (Azentrisches Fragment) |
| AML | Akute Myeloische Leukämie |
| bp | Basenpaare |
| CGH | Comparative Genomic Hybridisation |
| csb | Chromosomenbruch |
| CC | conventional cytogenetics (Konventionelle Zytogenetik) |
| Cot-DNA | hochrepetitive menschliche DNA |
| ctb | Chromatidbruch |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-phenylindol |
| DEB | Diepoxybutan |
| dic | Dizentrisches Chromosom |
| DNA | desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure) |
| DOP | Degenerierte Oligonukleotidprimer |
| et al. | et alii bzw. et aliae |
| FA | Fanconi-Anämie |
| FB | Fibroblasten |
| FISH | Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung |
| fn | falsch negativ |
| fp | falsch positiv |
| HLA | Human Leukocyte Antigen |
| kb | Kilobasen |
| KG | Komplementationsgruppe |
| Klon. Aberr. | Klonale Aberrationen |
| KM | Knochenmark |
| KMT | Knochenmarktransplantation |
| K | Kontrolle |
| m | männlich |
| MDS | Myelodysplastisches Syndrom |
| MMC | Mitomycin C |
| OT | Objektträger |
| P | Patient |

| | |
|----------|--|
| PBS | phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Saline) |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| pH-Wert | potentia Hydrogenii-Wert |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| rb | Reunionsfigur |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| rn | richtig negativ |
| rp | richtig positiv |
| RPMI | Rosswell Park Memorial Institute (Medium) |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | sodium dodecyl sulphate (Natriumsulfat) |
| SSC | standard saline citrate (Standardsalzcitrat) |
| t | Translokation |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| T-Lymph. | T-Lymphozyten |
| w | weiblich |
| wcp | whole chromosome painting |
| # | Symbol für Chromosom |
| UV-Lampe | Ultra-Violett-Lampe |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Translokation #7 (Pfeil) (wcp-assay) | 43 |
| Abb. 2: Reunionsfigur (konventionelle Zytogenetik) | 43 |
| Abb. 3: Chromatidbruch (konventionelle Zytogenetik)..... | 44 |
| Abb. 4: Chromosomenbruch (konventionelle Zytologie) | 44 |
| Abb. 5: Deletion #1 (Pfeil) (wcp-assay) | 45 |
| Abb. 6: Duplikation #1 (Pfeil) (wcp-assay) | 45 |
| Abb. 7: Azentrisches Fragment #7 (Pfeil) (wcp-assay) | 45 |
| Abb. 8: Dizentrisches Chromosom (konventionelle Zytogenetik)..... | 45 |
| Abb. 9: #1 (rot) ohne Trypsin-Behandlung..... | 47 |
| Abb. 10: : #1 (rot) ohne Trypsin-Behandlung..... | 47 |
| Abb. 11: #1 (rot) mit Trypsin-Behandlung..... | 47 |
| Abb. 12: #1 (rot) mit Trypsin-Behandlung | 47 |
| Abb. 13: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Patienten beim wcp-assay I | 50 |
| Abb. 14: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Negativkontrollen beim wcp-assay I | 50 |
| Abb. 15: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Patienten beim wcp-assay II | 51 |
| Abb. 16: Bruchereignisse/Zelle (B/Z)) bei Negativkontrollen beim wcp-assay II | 51 |
| Abb. 17: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Patienten bei Konventioneller Zytogenetik | 52 |
| Abb. 18: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Negativkontrollen bei Konventioneller Zytogenetik | 52 |
| Abb. 19: Differenz zwischen Patient und zugehöriger Negativkontrolle bezüglich B/Z..... | 54 |
| Abb. 20: Differenz zwischen Patient und zugehöriger Negativkontrolle bezüglich B/Z..... | 54 |
| Abb. 21: Differenz zwischen Patient und zugehöriger Negativkontrolle bezüglich (B/Z) | 55 |
| Abb. 22: Aberrante Zellen [%] beim wcp-assay I (Patienten) | 59 |
| Abb. 23: Aberrante Zellen [%] beim wcp-assay I (Negativkontrollen) | 59 |
| Abb. 24: Aberrante Zellen [%] beim wcp-assay II (Patienten)..... | 60 |
| Abb. 25: Aberrante Zellen [%] beim wcp-assay II (Negativkontrollen)..... | 60 |
| Abb. 26: Aberrante Zellen [%] bei konventioneller Zytogenetik (Patienten) | 61 |

| | |
|--|----|
| Abb. 27: Aberrante Zellen [%] bei konventioneller Zytogenetik (Negativkontrollen)..... | 61 |
| Abb. 28: Bruchereignisse pro aberrante Zelle beim wcp-assay I (Patienten) | 62 |
| Abb. 29: Bruchereignisse pro aberrante Zelle beim wcp-assay I (Negativkontrollen) | 63 |
| Abb. 30: Bruchereignisse pro aberrante Zelle Zelle beim wcp-assay II (Patienten)..... | 63 |
| Abb. 31: Bruchereignisse pro aberrante Zelle, wcp-assay II (Negativkontrollen)..... | 64 |
| Abb. 32: Bruchereignisse pro aberranter Zelle, konventionelle Zytogenetik (Patienten) | 64 |
| Abb. 33: Bruchereignisse pro aberranter Zelle bei konventioneller Zytogenetik (Negativkontrollen) | 65 |
| Abb. 34: Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 beim wcp-assay I (Patienten)..... | 66 |
| Abb. 35: Bruchhäufigkeit Chromosomen 1, 3 und 7 beim wcp-assay II (Patienten)..... | 67 |
| Abb. 36: Spontane Verteilung der Aberrationstypen beim wcp-assay I (24 h MMC)..... | 69 |
| Abb. 37: Verteilung der Aberrationstypen nach MMC-Behandlung beim wcp-assay I (24 h MMC)..... | 70 |
| Abb. 38: Spontane Verteilung der Aberrationstypen beim wcp-assay II (48 h MMC) | 71 |
| Abb. 39: Verteilung der Aberrationstypen nach MMC-Behandlung beim wcp-assay II (48 h MMC) | 71 |
| Abb. 40: Spontane Verteilung der Aberrationstypen beim bei konventioneller Zytogenetik..... | 73 |
| Abb. 41: Verteilung der Aberrationstypen nach MMC-Behandlung bei konventioneller Zytogenetik..... | 73 |
| Abb. 42: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 1 der Patienten beim wcp-assay I (24 h MMC)..... | 76 |
| Abb. 43: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 3 der Patienten beim wcp-assay I (24 h MMC)..... | 77 |
| Abb. 44: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 7 der Patienten beim wcp-assay I (24 h MMC)..... | 79 |
| Abb. 45: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 1 der Patienten beim wcp-assay II (48 h MMC) | 80 |
| Abb. 46: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 3 der Patienten beim wcp-assay II (48 h MMC) | 81 |
| Abb. 47: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 7 der Patienten beim wcp-assay II (48 h MMC) | 82 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Patienten und Negativkontrollen | 24 |
| Tab. 2: Abkürzungen Mitomycin C-Konzentrationen..... | 25 |
| Tab. 3: Übersicht Analyse-Methoden | 38 |
| Tab. 4: Vierfeldertafel..... | 41 |
| Tab. 5: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei konventioneller Zytogenetik (CC), wcp- assay I und II | 49 |
| Tab. 6: Differenz bezüglich B/Z zwischen Patienten und zugehöriger Negativkontrolle | 53 |
| Tab. 7: Vierfeldertafel für wcp-assay I..... | 55 |
| Tab. 8: Korrelation zwischen konventioneller Zytogenetik (CC) und wcp-assay I bezüglich B/Z..... | 56 |
| Tab. 9: Korrelation zwischen konventioneller Zytogenetik (CC) und wcp-assay II bezüglich B/Z | 57 |
| Tab. 10: Aberrante Zellen [%], Brüche/aberrante Zelle bei konventioneller Zytogenetik und wcp-assays..... | 58 |
| Tab. 11: Korrelation von Bruchhäufigkeit und Chromosomengröße beim wcp-assay I | 66 |
| Tab. 12: Korrelation von Bruchhäufigkeit und Chromosomengröße beim wcp-assay II..... | 67 |
| Tab. 13: Verteilung der Aberrationstypen beim wcp-assay I in %..... | 68 |
| Tab. 14: Verteilung der Aberrationstypen beim wcp-assay II in %..... | 70 |
| Tab. 15: Verteilung der Aberrationstypen bei der konventionellen Zytogenetik in % | 72 |
| Tab. 16: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 1 beim wcp-assay I in % | 75 |
| Tab. 17: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 3 beim wcp-assay I in % | 77 |
| Tab. 18: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 7 beim wcp-assay I in % | 78 |
| Tab. 19: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 1 beim wcp-assay II in % | 79 |
| Tab. 20: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 3 beim wcp-assay II in % | 80 |
| Tab. 21: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 7 beim wcp-assay II in % | 81 |

Protokollverzeichnis

| | |
|---|----|
| Protokoll 1: Zellkultur..... | 26 |
| Protokoll 2: Mitomycin C-Behandlung..... | 27 |
| Protokoll 3: Aufarbeitung und Anfertigung der Chromosomenpräparate | 28 |
| Protokoll 4: Vorbereitung Mikrodissektion | 30 |
| Protokoll 5: Mikrodissektion der Chromosomen 1, 3 und 7 | 31 |
| Protokoll 6: Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 33 |
| Protokoll 7: Agarose-Gelelektrophorese | 34 |
| Protokoll 8: Fluoreszenzmarkierung der mikrodissezierten Chromosomen mittels PCR | 36 |
| Protokoll 9: Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung | 38 |

1 Einleitung

Der Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi veröffentlichte im Jahr 1927 einen Artikel mit dem Titel „Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution)“ [1]. Hierin beschrieb er drei Brüder, die neben angeborenen Fehlbildungen im Laufe ihrer Kindheit ein Knochenmarkversagen mit lebensbedrohlicher Anämie entwickelten. Dieses bis dahin noch unbekanntes Krankheitsbild wurde ab 1931 nach seinem Entdecker als „Fanconi-Anämie“ bezeichnet. Heute, also über 80 Jahre später, ist das Wissen über die Fanconi-Anämie (FA) aufgrund kontinuierlicher Forschungsarbeit deutlich gewachsen. Der nun folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über den heutigen Wissensstand vermitteln.

Die Fanconi-Anämie ist eine genetische, in fast allen Fällen schwer verlaufende Erkrankung, die weltweit etwa einen von 100000 Neugeborenen betrifft [2]. Hauptmerkmale der Fanconi-Anämie sind angeborene Fehlbildungen, Knochenmarksversagen und ein extrem erhöhtes Risiko für die akute myeloische Leukämie (AML), das Myelodysplastische Syndrom (MDS) und für solide Tumoren [3-5]. Häufig sind bei den Patienten auch Minderwuchs, Hautverfärbungen durch Hyperpigmentierungen und Mikrozephalie zu beobachten [6]. Die angeborenen Fehlbildungen können in nahezu allen Organsystemen vorkommen. Oft betroffen sind Daumen, Radius und Nieren [7]. Anzahl und Art der angeborenen Fehlbildungen können dabei von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sein. Bei bis zu einem Drittel der Patienten sind keine Fehlbildungen nachweisbar [6].

Die Fehlbildungen stellen oft eine große Belastung und Einschränkung der Lebensqualität für die Patienten dar. Die schwerwiegendsten Komplikationen gehen allerdings zumeist von den hämatologischen Störungen aus [6]. Die Lebenserwartung ist von Patient zu Patient sehr unterschiedlich. Die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei circa 24 Jahren [8]. Nahezu alle FA-Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens ein Knochenmarksversagen in Form einer aplastischen Anämie. Zumeist kommt es bereits zwischen dem 5.-10. Lebensjahr erstmals zu Blutbildungsstörungen. Diese entwickeln sich dann fortschreitend zur aplastischen Anämie, also einer verminderten Bildung aller drei Zellreihen im Knochenmark [2]. In zwei umfangreichen Studien konnte gezeigt werden, dass 84 % bzw. 80 % der FA-Patienten bereits im Alter von zwanzig Jahren eine aplastische Anämie hatten [8, 9]. Für die Patienten, die das Erwachsenenalter erreichen, steigt zusätzlich das ohnehin schon im Kindes- und Jugendalter erhöhte Risiko für die Entwicklung eines MDS oder einer AML nochmals deutlich an. So entwickelten bis zum Alter von zwanzig Jahren je nach Studie 27% bzw. 18 % und bis zum

Alter von dreißig Jahren 43 % bzw. 28 % der FA-Patienten ein MDS oder eine AML [8, 9]. Aber nicht nur die Blutzellen der FA-Patienten haben ein erhöhtes Entartungsrisiko. Patienten, die die hämatologischen Störungen des Kindes- und Jugendalters überleben, haben ein deutlich erhöhtes Risiko, solide Tumoren zu entwickeln. Diese Tumoren entstehen hauptsächlich im Kopf- und Halsbereich, in Mund, Ösophagus und Genitalbereich [4, 10].

Ursache für das Krankheitsbild der Fanconi-Anämie sind Genmutationen in unterschiedlichen Genen [2, 11]. Es sind bisher 13 Gene bekannt, deren Mutationen zur Fanconi-Anämie führen. Dementsprechend werden die Patienten genetisch in 13 Untergruppen, so genannte Komplementationsgruppen, eingeteilt. Die Gene FANCA, FANC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCI, FANCL, FANCM und FANCN werden autosomal rezessiv vererbt [11-22]. FANCB dagegen wird X-chromosomal rezessiv weitergegeben [23]. Zusätzlich zu der Bestimmung der Komplementationsgruppe kann bei den meisten Genen die genaue Lokalisation der Mutation innerhalb des Gens bestimmt werden [2]. Die von diesen Genen kodierten Proteine haben wichtige Funktionen bei der Reparatur und Erhaltung der chromosomalen Struktur [24-26]. Diese Funktion macht diese Gene zu so genannten Caretaker-Genen [27]. Der genaue Reparatur-Mechanismus, den diese Gene in Gang setzen, ist noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Es wurde aber beschrieben, dass das FANCD2-Protein und dessen Aktivierung durch Monoubiquitinierung eine zentrale Rolle bei der DNA-Reparatur spielt [28, 29]. Auch konnte bereits gezeigt werden, dass die durch die FA-Gene kodierten Proteine in einem gemeinsamen Pfad direkt oder indirekt an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind [30, 31]. Durch die fehlerhafte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen können Chromosomenaberrationen entstehen [32]. Die bei FA-Patienten vorhandene Mutation in einem dieser dreizehn Caretaker-Gene führt auf diesem Weg zu einer erhöhten Rate von Chromosomenaberrationen und Bruchereignissen, was erstmals 1964 beobachtet wurde [33]. Die erhöhte Bruchhäufigkeit der Chromosomen ist vermutlich für die oben beschriebene erhöhte Rate von Leukämien und anderen soliden Tumoren bei Patienten der Fanconi-Anämie verantwortlich [34, 35]. Bei der Untersuchung der FA-Gene wurde zudem entdeckt, dass das FANCD1-Gen und das BRCA2-Gen, dessen mono-allelische Mutationen mit einem hohen Risiko für das Mammakarzinom assoziiert sind, identisch sind [13, 36]. So könnte das bisher geringe, aber wachsende Verständnis der genauen Funktion der FA-Gene auch wichtige Informationen über die Entstehung anderer Tumoren hervorbringen [28].

Aufgrund des genetischen Ursprungs der Fanconi-Anämie werden Hoffnungen in die Gentherapie gesetzt. Während die Gentherapie in einem Tiermodell viel versprechende Ergebnisse lieferte, verliefen Studien mit menschlichen FA-Patienten bislang ohne durchschlagenden Erfolg [37, 38]. Somit sind eine erfolgreiche Gentherapie und damit eine kausale Therapie der Fanconi-Anämie zurzeit nicht absehbar. Allerdings ereignet sich bei circa 15 % der Patienten im Laufe des Lebens in einer Stammzelle des Knochenmarks oder einer Vorläuferzelle eine spontane Selbstkorrektur der Genmutation, also sozusagen eine natürliche Gentherapie [39, 40]. Dies führt zu einer starken Vermehrung der selbstkorrigierten Stammzelle, vermutlich aufgrund eines Wachstumsvorteils gegenüber den FA-Zellen [41]. In der Folge sind bei diesen Patienten sowohl unauffällige Zellen als auch FA-Zellen im peripheren Blut nachweisbar, was als Mosaik bezeichnet wird [39]. Die Verdrängung der FA-Zellen schreitet häufig fort, so dass nach längerer Zeit keine FA-Zellen mehr im Blut nachweisbar sind. Durch diese spontane Selbstkorrektur der Genmutation verbessert sich die Blutbildung und verringert sich das Risiko für ein MDS oder eine AML zumeist langjährig, während das Risiko für solide Tumoren unverändert weiter besteht [42].

Für die übrigen Patienten sind, wie oben beschrieben, die hämatologischen Störungen, also die aplastische Anämie, das MDS und die AML die größte Gesundheitsgefährdung. Somit liegt auf deren Behandlung das Hauptaugenmerk der Therapie [6]. Bluttransfusionen mit Thrombozyten- und Erythrozytenkonzentraten stellen die klassische Methode der Behandlung der aplastischen Anämie dar [43]. Bei einigen Patienten kann die Blutbildung im Knochenmark durch Gabe von Wachstumsfaktoren und Androgenen verbessert werden [43]. Diese Therapien sollten frühzeitig bei den Blutbildungsstörungen der aplastischen Anämie eingesetzt werden. Bei einer verzögerten Therapie der aplastischen Anämie sind aufgrund der niedrigen Leukozyten- und Thrombozytenzahlen im Blut lebensbedrohliche Lungenentzündungen bzw. Hirnblutungen gefürchtete Komplikationen. Das Ansprechen auf die oben beschriebenen Therapien der aplastischen Anämie variiert stark. Da das Knochenmarkversagen und damit die Blutbildungsstörung bei nahezu allen Patienten im Laufe der Zeit fortschreitet, bleibt bei der Mehrheit der Patienten als langfristig wirkungsvolle Maßnahme nur eine hämatopoetische Stammzelltransplantation in Form einer Knochenmarktransplantation übrig [44, 45]. Auch bei MDS oder AML ist die Knochenmarktransplantation die einzige effektive Therapie [46]. Die Knochenmarktransplantation ist allerdings mit hohen, häufig lebensgefährlichen Risiken verbunden. Diese hohen Risiken betreffen vor allem Patienten, für die kein Spender mit hoher HLA-Übereinstimmung gefunden werden konnte [47]. Zuvorderst hängt der Erfolg der

Transplantation also von einer hohen HLA-Übereinstimmung zwischen Patient und Spender ab [48]. Darüber hinaus haben unter anderem eine FA-spezifische Transplantations-Vorbehandlung, ein geringes Alter des Patienten, ein stabiler klinischer Ausgangszustand des Patienten und eine hohe Thrombozytenzahl einen positiven Einfluss auf das Ergebnis der Transplantation [48-51]. Deshalb ist die Früherkennung der aplastischen Anämie, des MDS und der AML für die Therapie von großer Bedeutung. Diese ermöglicht nämlich die so wichtige frühe Suche nach einem Spender mit hoher HLA-Übereinstimmung, die im Durchschnitt über vier Monate in Anspruch nimmt [52]. Auch ist durch die Früherkennung ein FA-Patient am ehesten in einem klinisch stabilen Zustand.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine Früherkennung der hämatologischen Störungen der Fanconi-Anämie die Erfolgsaussichten sowohl der medikamentösen als auch der Transplantationsbehandlung deutlich erhöht. Auf die Früherkennung der hämatologischen Störungen wird nun in den nächsten Abschnitten näher eingegangen.

Die Früherkennung hämatologischer Störungen lässt sich durch zwei Maßnahmen erreichen. Entscheidend ist die frühzeitige Diagnosestellung des Vorliegens einer Fanconi-Anämie, was wiederum die nachfolgend engmaschigen Blutbild- und Knochenmarkkontrollen ermöglicht.

Die frühzeitige Diagnosestellung ist allerdings bei vielen Patienten nicht sichergestellt. So gilt die Fanconi-Anämie als unterdiagnostizierte Erkrankung [53-56]. Eine viele Patienten umfassende Studie beschreibt, dass bei der Mehrzahl der Patienten trotz angeborener Fehlbildungen die Fanconi-Anämie erst nach dem Auftreten hämatologischer Störungen diagnostiziert wurde. Das Durchschnittsalter dieser Patienten lag zum Zeitpunkt der Diagnose bei über sechs Jahren [53]. Bei mindestens 10 % der Patienten wird die Fanconi-Anämie erst erkannt, wenn die Patienten älter als 16 Jahre alt sind [57].

Das Standard-Diagnoseverfahren der Fanconi-Anämie ist die Chromosomenbruchanalyse mittels konventioneller Zytogenetik [2]. Wie oben beschrieben weisen die Patienten der Fanconi-Anämie im Vergleich zu den Negativkontrollen eine erhöhte Anzahl von Bruchereignissen auf [33]. Nach Behandlung mit DNA kreuzverbindenden Substanzen wie Mitomycin C und Diepoxybutan erhöht sich der Unterschied in der Anzahl der Bruchereignisse der Chromosomen zwischen FA-Patient und Negativkontrollen nochmals deutlich [58, 59]. Bei der konventionell zytogenetischen Chromosomenbruchanalyse werden mit Giemsa gefärbte Chromosomenpräparate auf die Anzahl der Bruchereignisse untersucht. Auf diese Weise kann anhand der Auszählung der spontan und nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC) entste-

henden Bruchereignisse in T-Lymphozyten die Fanconi-Anämie mit hoher Sensitivität diagnostiziert werden [6]. Bei Patienten mit der oben beschriebenen Mosaikbildung müssen allerdings aufgrund der selbstkorrigierten T-Lymphozyten zusätzlich die Bruchereignisse der Chromosomen in Fibroblasten gezählt werden, um die Fanconi-Anämie sicher diagnostizieren zu können. Auch die Spezifität der konventionell zytogenetischen Chromosomenbruchanalyse nach MMC-Behandlung ist sehr hoch [6]. Allerdings sind Fälle beschrieben worden, in denen Patienten des seltenen Nijmegen-Breakage-Syndroms und des seltenen Seckel-Syndroms nach MMC-Behandlung der Zellen ebenfalls vermehrt Bruchereignisse aufwiesen [60-62]. Die nach einem auffälligen Befund der konventionell zytogenetischen Chromosomenbruchanalyse durchzuführende Bestimmung der Komplementationsgruppe kann in diesen Fällen die Diagnose Fanconi-Anämie bestätigen oder ausschließen [6].

Neben der Chromosomenbruchanalyse über die konventionelle Zytogenetik gibt es mit der Durchflußzytometrie und der Messung der FANCD2-Ubiquitinilierung noch weitere Diagnoseverfahren. Die Durchflußzytometrie kann dabei über die Messung einer bei Fanconi-Anämie vorkommenden Zellzyklusstörung die Fanconi-Anämie diagnostizieren [63, 64]. Sie ist in ihrer Verlässlichkeit vergleichbar mit der konventionellen zytogenetischen Chromosomenbruchanalyse [65-67]. Allerdings ist die Durchflußzytometrie bei bereits an MDS oder AML erkrankten Patienten nicht zuverlässig [65, 66]. Durch die Messung der FANCD2-Ubiquitinilierung kann man über das Fehlen der Aktivierung des FANCD2-Proteins das Vorliegen einer Fanconi-Anämie diagnostizieren [68]. Sie kann allerdings Patienten der seltenen Komplementationsgruppen FANCD1, FANCI und FANCF nicht erfassen [2]. Trotz dieser Alternativen ist die Chromosomenbruchanalyse über die konventionelle Zytogenetik weiterhin das Standard-Diagnoseverfahren [2].

Die Nachteile der konventionell zytogenetischen Chromosomenbruchanalyse resultieren aus der anspruchsvollen Auswertung. So sind für dieses Verfahren gute zytogenetische Kenntnisse und ein hoher Zeitaufwand notwendig. Aus diesen Gründen wird die Diagnostik der Fanconi-Anämie nur in speziellen Laboren durchgeführt. Diese Tatsache führt zusammen mit der sehr variablen Klinik, die sich aus der großen Variabilität der Fehlbildungen ergibt, zu der oben beschriebenen oft erst späten Diagnose der Fanconi-Anämie [53, 54, 56]. Zusätzlich kommt es aus den gleichen Gründen, die zu einer späten Diagnose führen, auch zu Fehldiagnosen. Eine häufige Fehldiagnose ist dabei die idiopathische aplastische Anämie. Da sich die Therapie und Transplantationsvorbehandlung bei Patienten mit idiopathischer, aplastischer Anämie von denen der Fanconi-Anämie-Patienten unterscheiden, kann diese Fehldiagnose schwer-

wiegende Folgen haben [56, 69-71]. Die konventionelle zytogenetische Chromosomenbruchanalyse kann die idiopathische aplastische Anämie sehr sensitiv von der FA unterscheiden [70, 72], so dass eine Routinediagnostik auf FA bei idiopathischer aplastischer Anämie hilfreich wäre [69]. Die für die Therapie sehr wichtige Früherkennung hämatologischer Störungen wird also bei einigen FA-Patienten durch fehlende und fehlerhafte Diagnosen erheblich verzögert.

Sobald die Fanconi-Anämie nun diagnostiziert ist, werden zur Früherkennung hämatologischer Störungen das Blutbild und das Knochenmark regelmäßig kontrolliert. Über die Morphologie, die Zelldichte und die Art der Knochenmarkzellen können auf diesem Weg eine aplastische Anämie, ein MDS und eine AML und deren Vorstufen frühzeitig erkannt werden [73]. Diese durch die regelmäßigen Kontrollen verbesserte Früherkennung eines MDS oder einer AML sorgt für eine bessere, aber weiterhin relativ schlechte Prognose des MDS und der AML [6]. Für eine bessere Prognose müssten Faktoren gefunden, die sogar schon vor der Entwicklung von Vorstufen die AML erkennen lassen. Deshalb werden die Knochenmarkzellen auf klonale Chromosomenaberrationen untersucht. Dahinter steckt die Vermutung, dass spezifische klonale Aberrationen im Knochenmark von FA-Patienten einen ersten Schritt zur Entwicklung eines MDS oder einer AML darstellen [41, 51, 57].

Wie oben beschrieben kommt es bei FA-Patienten zu einer erhöhten Anzahl von Bruchereignissen, also zu einer erhöhten Anzahl von Chromosomenaberrationen. Wenn eine Chromosomenaberration einer Knochenmarkzelle einen Wachstumsvorteil verschafft und sich als Folge dessen die entsprechende Knochenmarkzelle in großer Zahl vermehrt, so entsteht eine klonale Chromosomenaberration [41]. Mehrere Studien konnten bei FA-Patienten mit klonalen Aberrationen im Knochenmark eine erhöhtes MDS- und AML-Risiko und eine geringere 5-Jahres-Überlebensrate nachweisen [9, 74]. FA-Patienten mit klonaler Chromosomenaberration im Knochenmark hatten demnach eine 5-Jahres-Überlebensrate von 40 %, während FA-Patienten ohne klonale Aberration eine 5-Jahres-Überlebensrate von 94 % aufwiesen [74].

In weiteren Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, welche spezifischen klonalen Chromosomenaberrationen bei der Fanconi-Anämie für eine ungünstige Prognose stehen. So wurde eine klonale Monosomie des Chromosoms 7 gehäuft bei Patienten mit MDS oder AML entdeckt [3, 74-78]. Auch verschiedene klonale Aberrationen des Chromosoms 1, vor allem eine partielle Trisomie des langen Arms, konnten mehrfach mit einem erhöhten Risiko für eine AML oder ein MDS in Verbindung gebracht werden [76, 78, 79]. Schließlich wurde neben den Chromosomen 1 und 7 auch klonale Aberrationen des Chromosoms 3 im Knochenmark von FA-Patienten beschrieben, die an einem MDS oder einer AML erkrankten [80, 81].

Bei diesen Studien handelt sich allerdings in der Regel um kleine Fallzahlen bzw. Einzelfallbeschreibungen, die eine statistische Aussage nicht zulassen. Da zudem auch ein Verschwinden und Fluktuationen von klonalen Aberrationen des Knochenmarks beobachtet wurden, wurde die prognostische Aussagekraft von klonalen Aberrationen bezüglich der hämatologischen Störungen lange Zeit kontrovers diskutiert [75, 82, 83].

Im Jahr 2003 konnte nun allerdings eine Studie bei einer größeren Patientenzahl eindeutige Ergebnisse bezüglich der prognostischen Aussagekraft einer spezifischen klonalen Chromosomenaberration erzielen. Patienten mit einer klonalen, partiellen Tri- und Tetrasomie des langen Arms von Chromosom 3 (Segment 3q26q29), in einigen Fällen gefolgt von einer Monosomie 7, hatten demnach ein extrem erhöhtes Risiko, an einem MDS oder einer AML zu erkranken [84]. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der comparative genomic hybridization (CGH) und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) erzielt. Diese neuen Erkenntnisse lassen vermuten, dass diese 3q-Aberration einen ersten Schritt zur Entwicklung eines MDS oder einer AML darstellt [84]. Dieses Wissen könnte in Zukunft eine deutlich verbesserte Früherkennung des MDS oder der AML bei FA-Patienten ermöglichen. Durch eine frühzeitige Therapie könnte auf diesem Weg verhindert werden, dass bei den Patienten eine Progression in die AML erfolgt, was weiterhin mit einer sehr ungünstigen Prognose einhergeht [6]. Auch lassen die Ergebnisse hoffen, dass weitere Untersuchungen über die klonalen Chromosomenaberrationen in Zukunft die Früherkennung hämatologischer Störungen bei FA-Patienten weiter verbessern werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein wcp-assay der Chromosomen 1, 3 und 7 bei Fanconi-Anämie getestet. Die Abkürzung wcp steht für whole chromosome paint. Ein wcp-assay basiert auf der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), bei der mit Hilfe von Sonden Chromosomen in ihrer Ganzheit fluoreszenzmarkiert sind. Damit ist die gezielte Untersuchung bestimmter Chromosomen möglich. So wurden in dieser Arbeit mittels wcp-assay die Bruchereignisse und die dahinter stehenden Aberrationen der Chromosomen 1, 3 und 7 in T-Lymphozyten von FA-Patienten und Negativkontrollen untersucht. Ein wcp-assay zur Untersuchung des Bruchverhaltens dreier Chromosomen (1, 2 und 4) wurde auch schon bei den Chromosomen-Instabilitätssyndromen Ataxia Telangiectasia und Nijmegen-Breakage-Syndrome durchgeführt [85]. Die für den wcp-assay notwendigen Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7 wurden zuvor mittels Mikrodissektion hergestellt. Bei der Auswertung des wcp-assays der Chromosomen 1, 3 und 7 wurde zwei Fragen nachgegangen.

Fragestellung:

Die erste Frage war, wie zuverlässig mit dem wcp-assay über die Anzahl der Bruchereignisse der Chromosomen 1, 3 und 7 die Fanconi-Anämie diagnostiziert werden kann. Gleichzeitig wurde bei den mit dem wcp-assay untersuchten Patienten und Negativkontrollen eine Chromosomenbruchanalyse über die konventionelle Zytogenetik durchgeführt. So konnte die diagnostische Aussagekraft des wcp-assays direkt mit der des Standard-Diagnoseverfahrens verglichen werden. Im Gegensatz zum wcp-assay untersucht die konventionelle Zytogenetik die Bruchereignisse des gesamten Chromosomensatzes. Der wcp-assay hätte als Diagnose-Verfahren der Fanconi-Anämie Vorteile gegenüber der konventionellen Zytogenetik. Diese Vorteile beruhen auf der möglichen Automatisierung der Auswertung eines wcp-assays. Eine mögliche Automatisierung würde eine erhebliche Zeitersparnis bei erhöhter Analysezahl mit sich bringen und könnte somit die Routinediagnostik der FA ermöglichen. Auf diesem Weg könnte bei vielen Patienten die gerade für die Früherkennung und Behandlung der hämatologischen Störungen sehr wichtige frühzeitige Diagnose der unterdiagnostizierten Fanconi-Anämie vermehrt gewährleistet werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit ist es, einen Überblick über das Bruchverhalten der Chromosomen 1, 3 und 7 in T-Lymphozyten zu erlangen. Klonale Aberrationen der Chromosomen 1, 3 und 7 sind, wie oben beschreiben, mit einer erhöhten Auftretswahrscheinlichkeit für ein MDS und eine AML in Verbindung gebracht worden. Hinter der Untersuchung des Bruchverhaltens der Chromosomen 1, 3 und 7 steht die Hoffnung, dass wachsendes Wissen über das Bruchverhalten dieser Chromosomen in Zukunft einen Beitrag zur Verbesserung der Prognostik der hämatologischen Störungen der Fanconi-Anämie leisten kann. In dieser Arbeit wurden unter anderem die Verteilung der Aberrationstypen und die Korrelation zwischen Chromosomengröße und Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 untersucht. Auch hier wurden die Ergebnisse des wcp-assays mit denen der konventionellen Zytogenetik bei denselben Patienten und Negativkontrollen verglichen. So können eventuelle Unterschiede zwischen den mit dem wcp-assay untersuchten Chromosomen 1, 3 und 7 und dem mit der konventionellen Zytogenetik untersuchten kompletten Chromosomensatz erkannt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Standard-Puffer und Lösungen

| | |
|---------------------------|--|
| Agarosegellösung: | 1 g Agarose 100 ml 1x TBE Puffer 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) |
| DAPI: | 150 µl DAPI (200µg/ml) 60 ml PBS |
| collection drop solution: | 856,7 µl H ₂ O 100µl PE PCR-Puffer (15mM MgCl ²) 40 µl MgCl ² (25 mM) 3,3 µl Brij35 (30%) |
| Dye: | 20 g Saccharose 0,125 g Bromphenolblau ad 50 ml Aqua bidest. |
| Formamidlösung: | 3,5 ml 20x SSC 24,5 ml Formamid absolut 7 ml H ₂ O ca. 18 µl 10NHCl (37%) für pH 7 |
| Fixativ: | 75 ml Methanol 25 ml Essigsäure |
| Giemsa (4%): | 4 ml Giemsa 96 ml Phosphatpuffer |
| Mastermix: | 20 % Dextransulfat in 4x SSC |
| 10x Phosphatpuffer: | 34 g KH ₂ PO ₄ 44,5 g Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O ad 1000 ml Aqua dest. |
| 20x SSC (pH 7.0): | 3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O |

| | |
|-----------------------------------|---|
| 0,4x SSC/0,3% IGEPAL: | 100 ml 2x SSC 400 ml Aqua dest. 1,5 ml IGEPAL |
| 2x SSC/0,1% IGEPAL: | 50 ml 20x SSC 450 ml Aqua dest. 0,5 ml IGEPAL |
| 10x TBE-Puffer (pH 8,3): | 900 mM Tris/HCl 900 mM Borsäure 40 mM EDTA |
| Trypsin-Lösung (Mikrodissektion): | 2 ml Trypsin 35 ml 1x Phosphatpuffer |
| Giemsa-Lösung: | 5 ml Giemsa 35 ml 1x Phosphatpuffer |

2.1.2 Reagenzien

| | |
|------------------------|---------------------|
| Agarose: | Life Technologies |
| Aqua dest.: | Braun |
| 100-bp-Leiter: | Gibco |
| Brij 35: | Sigma |
| BSA: | Roche |
| Colcemid: | Gibco |
| Cot-1 DNA: | Gibco |
| DAPI: | Serva |
| Dextransulfat: | Merck |
| dNTPs: | Promega |
| Eisessig (Essigsäure): | Merck |
| Ethanol (100 %): | Merck |
| Ethidiumbromid: | Boehringer Mannheim |
| Fluor-dUTPs: | Abbott-Vysis |
| Formamid: | Merck |
| Giemsa: | Merck |

| | |
|----------------|---------------------|
| Glykogen: | Boehringer Mannheim |
| IGEPAL: | Sigma Aldrich |
| KCl: | Merck |
| Methanol: | J.T.Backe |
| Mitomycin C: | Sigma |
| Natriumacetat: | Sigma |
| PCR-Puffer: | Perkin Elmer |
| 20x SSC: | Merck |

2.1.3 Medien und Zusätze

| | |
|--------------------------|-----------------------|
| Foetal Calf Serum: | PAA Laboratories GmbH |
| Penicillin/Streptomycin: | Biochrom |
| Phytohämagglutinin: | Difco |
| RPMI 1640: | Gibco |

2.1.4 Enzyme

| | |
|---------------------|--------------|
| Taq DNA-Polymerase: | Perkin Elmer |
| Trypsin: | Gibco |

2.1.5 Weitere Materialien und Geräte

| | |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Antifading: | Vectashield |
| Axiovert S100 (für Mikrodissektion): | Zeiss |
| Begasungsbrutschrank 6220: | Heraeus |
| Biofuge 15: | Heraeus |
| CCD-Kamera: | Hamamatsu |
| Electrophoresis Power Supply PS303: | Gibco/BRL |
| Elektrophoresekammer: | Renner |
| FIX-O-Gum: | Marabu |
| Fluoreszenzmikroskop: | Axioskop |
| Glasnadeln: | World Precision Instruments |
| Heizblock: | Medax |

| | |
|---------------------|----------------------|
| ISIS-Software: | Metasystems |
| Megafuge 2.0: | Heraeus |
| Objektträger: | Menzel |
| Pipetten: | Gilson/Eppendorf |
| Pipettenspitzen: | Gilson/Eppendorf |
| Puller: | Bachhofer-Reutlingen |
| Spitzröhrchen: | Sarstedt |
| Template Tamer: | Quantum Appligene |
| Thermocycler: | Perkin Elmer |
| Vortex VibrofixVF1: | Jahnke & Kunkel |
| Waagen: | Sartorius |
| Wärmeplatte: | Medax |
| Wasserbad: | GFL |
| Zellkulturflaschen: | TPP |

2.2 Patienten und Negativkontrollen

In dieser Arbeit wurden die Bruchereignisse der Chromosomen bei sechs FA-Patienten und vier Negativkontrollen untersucht. Die untersuchten Zellen waren PHA-stimulierte T-Lymphozyten des peripheren Blutes. Die Chromosomen der sechs Patienten und vier Negativkontrollen wurden in dieser Arbeit sowohl mittels konventioneller Zytogenetik als auch mittels wcp-assay untersucht.

Zu jedem der sechs Patienten war eine Negativkontrolle vorhanden, die im selben Ansatz aufgearbeitet wurde und somit zum selben Zeitpunkt mit demselben Mitomycin C (MMC) behandelt wurde. Da die Bruchereignisse induzierende Wirkung des organischen Mitomycin C zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschieden stark ausfallen kann, war für einen aussagekräftigen Vergleich zwischen Patienten und Negativkontrollen die zeitgleiche MMC-Behandlung der Zellen der zu vergleichenden Patienten und Negativkontrollen notwendig. In dieser Arbeit wurde die Anzahl der Bruchereignisse von Patienten und Negativkontrollen sowohl spontan als auch nach Behandlung mit unterschiedlichen MMC-Konzentrationen verglichen.

Die sechs Patienten wurden mit dem Buchstaben P, die Kontrollen mit dem Buchstaben K abgekürzt. Dabei wurden Patienten und Kontrollen so durchnummeriert, dass die gleichzeitig aufgearbeiteten Patienten und Kontrollen, also die bezüglich ihrer Bruchereignisse zu vergleichenden Proben, auch die gleiche Zahl tragen. Der Patient P1 wurde also zusammen mit der Negativkontrolle K1, der Patient P2 gleichzeitig mit der Negativkontrolle K2 aufgearbeitet. Die Aufarbeitung der Patienten P3 und P4 fand gemeinsam mit der Negativkontrolle K3/4 statt. Die Negativkontrolle K3/4 dient also als Vergleich für zwei Patienten. Dies trifft auch auf die Negativkontrolle K5/6 zu, die mit den Patienten P5 und P6 aufgearbeitet wurde.

Die Tab. 1 gibt einen Überblick über Eigenschaften der Patienten und Negativkontrollen. Beim Patient P3 war eine klonale Aberration unter Beteiligung der Chromosomen 1 und 3 im Knochenmark bekannt. Bei ihm lag ein Isochromosom von 3q vor [i(3) (q10)]. In dieser Zelllinie ist dann sekundär eine Duplikation des chromosomalen Bereiches 1q21 bis 1qter entstanden. Die klonale Aberration des Chromosoms 3 umfasst die oben beschriebene partielle Trisomie für das Segment 3q26q29, die mit einem erhöhten Risiko für MDS und AML einhergeht. Von allen sechs FA-Patienten war die Komplementationsgruppe bekannt. Es wurden drei Patienten mit der Komplementationsgruppe A und drei Patienten mit der Komplementationsgruppe C einbezogen. Patienten und Negativkontrollen waren beiderlei Geschlechts und hatten ein Durchschnittsalter von 10 bzw. 42 Jahren (Tab. 1).

Tab. 1: Patienten und Negativkontrollen

| Patient/Kontrolle | FA | Material | Klonale Aberration in Knochenmark (ISCN) | KG | Alter | m / w |
|-------------------|------|----------|--|----|----------|-------|
| P1 | JA | T-Lymph. | - | A | 13 Jahre | w |
| P2 | JA | T-Lymph. | - | A | 6 Jahre | m |
| P3 | JA | T-Lymph. | 47,XY,+i(3)(q10)[28]/47,XY,sl,dup(1)(1pter-1q44::1q21-1qter)[4]/46,XY[22]) | C | 16 Jahre | m |
| P4 | JA | T-Lymph. | 47,XX,+9[33]/46,XX[17] | C | 17 Jahre | w |
| P5 | JA | T-Lymph. | - | A | 6 Jahre | m |
| P6 | JA | T-Lymph. | - | C | 1 Jahr | m |
| K1 | Nein | T-Lymph. | - | - | 29 Jahre | m |
| K2 | Nein | T-Lymph. | - | - | 55 Jahre | w |
| K3/4 | Nein | T-Lymph. | - | - | 38 Jahre | m |
| K5/6 | Nein | T-Lymph. | - | - | 46 Jahre | w |

FA = Fanconi-Anämie; KG = Komplementationsgruppe; T-Lymph. = T-Lymphozyten; m = männlich; w = weiblich

2.3 Zellkultur

Für die Untersuchung der Bruchereignisse musste eine ausreichend große Anzahl an Zellen der Patienten und Negativkontrollen vorhanden sein. Deshalb wurden die T-Lymphozyten der Patienten und der Negativkontrollen für 72 Stunden in einem Blutkulturmedium bei 37 Grad Celsius kultiviert. Das Blutkulturmedium enthielt Inhaltsstoffe, die die Vermehrung der T-Zellen stimulieren. Hauptbestandteil war das Zellkulturmedium RPMI-1640. Dieses besteht aus einer isotonen Lösung aus Salzen, Glukose, Aminosäuren und Vitaminen. Zusätzlich enthielt es ein Hydrogencarbonat-Puffersystem, um den für die Zellkultur wichtigen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 zu gewährleisten. Das zugesetzte Phenolrot diente als Indikator für den pH-Wert. Ergänzt wurde das Zellkulturmedium RPMI-1640 mit fötalem Kälberserum, welches unter anderem durch enthaltene Wachstumsfaktoren, Spurenelementen und Hormonen das Zellwachstum unterstützt. Schließlich wurde noch Streptomycin zur Verhinderung einer bakteriellen Kontamination und Phytohämagglutinin zur Stimulation der Zellteilung dem Blutkulturmedium beigegeben. In diesem wurden die T-Lymphozyten der Patienten und Negativkontrollen für 72 Stunden bei einer Temperatur von 37 Grad Celsius kultiviert.

Protokoll 1: Zellkultur

- Blutkulturmedium ansetzen (100 ml RPMI-1640 + 20 ml fötales Kälberserum + 2,5 ml Phytohämagglutinin + 1 ml Streptomycin/Penicillin)
- Je Patient und Negativkontrolle 5 ml Blutkulturmedium und anschließend 0,5 ml heparinisiertes Blut in Zellkulturflaschen geben
- Blut und Medium mischen
- 72 h bei 37°C Blutkulturmedien in Brutschrank kultivieren

2.4 Mitomycin C-Behandlung

Der nächste Schritt war die Induktion von DNA-Interstrang-Crosslinks mit Hilfe von Mitomycin C (MMC). Das Zellgift Mitomycin C stellt zwischen zwei DNA-Strängen kovalente Bindungen her. T-Lymphozyten von Patienten mit Fanconi-Anämie (FA) reagieren auf DNA-Interstrang-Crosslinks mit einer deutlich erhöhten Rate an Bruchereignissen der Chromosomen.

Um die spontane Anzahl an Bruchereignissen zu messen, wurde ein Teil der Zellen jedes Patienten und jeder Negativkontrolle nicht mit Mitomycin C behandelt. Darüber hinaus wurden Zellen der sechs FA-Patienten und Negativkontrollen für 24 Stunden drei unterschiedlichen Mitomycin C-Konzentrationen ausgesetzt. Desweiteren wurden die Zellen der Patienten P1 und P2 und deren Kontrollen K1 und K2 noch zusätzlich für 48 Stunden mit drei Mitomycin C-Konzentrationen behandelt. Tab. 2 zeigt die Abkürzungen der drei MMC-Konzentrationen. Bei der MMC-Konzentration von 0 ng/ml (0 MMC) wurde kein MMC zugesetzt d.h. sie steht für die spontan entstandenen Bruchereignisse.

Tab. 2: Abkürzungen Mitomycin C-Konzentrationen

| Konzentration | Abkürzung |
|-----------------------|-----------|
| Mitomycin C 0 ng/ml | 0 MMC |
| Mitomycin C 10 ng/ml | 10 MMC |
| Mitomycin C 50 ng/ml | 50 MMC |
| Mitomycin C 100 ng/ml | 100 MMC |

Protokoll 2: Mitomycin C-Behandlung:

Mitomycin C-Behandlung 24 h:

- Je Patienten und Negativkontrolle Blutkultur auf vier Schnappdeckelröhrchen verteilen
- Je Patient und Negativkontrolle vier unterschiedliche Mitomycin C-Konzentrationen (0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) zugeben
- Mitomycin C-Zugabe nach 48 Stunden Kultivierung
- Nach Mitomycin C-Zugabe Blutkulturen weitere 24 h kultivieren

Mitomycin C-Behandlung 48 h:

- Je Patient (P1, P2) und Negativkontrolle (K1, K2) Blutkultur auf vier Schnappdeckelröhrchen verteilen
- Je Patient (P1, P2) und Negativkontrolle (K1, K2) vier unterschiedliche Mitomycin C-Konzentrationen (0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) zugeben
- Mitomycin C-Zugabe nach 24 Stunden Kultivierung
- Nach Mitomycin C-Zugabe Blutkulturen weitere 48 h kultivieren

2.5 Chromosomenpräparation

Nach der Kultivierung der Zellen und der Behandlung mit Mitomycin C (MMC) folgte nun die Aufarbeitung der Blutkulturen und die Anfertigung der Chromosomenpräparate. Ziel dabei ist, dass die Chromosomen der Patienten und Negativkontrollen unter dem Mikroskop bestmöglich erkennbar und somit bestmöglich auswertbar sind. Die Zellen wurden nach 72 Stunden Kultivierung mit Colcemid behandelt, um sie in der Metaphase zu arretieren. Zur Vergrößerung des Zellvolumens und zur besseren Ausbreitung der Metaphase-Chromosomen wurden die Zellen in einem hypotonem Medium inkubiert, woraufhin es durch Osmoregulation zu einem Anschwellen der Zellen kam. Daraufhin wurden die Zellen mit einer Mischung aus Methanol und Essigsäure (3:1) fixiert, wodurch den Zellen das Wasser entzogen und die Membran stabilisiert wurde. Nach der Fixierung der Zellen folgte das Auftropfen der Zellsuspension auf Objektträger. Hierbei wurde das Verdunsten des Fixativs mit Hilfe von Wasserdampf verzögert, um eine bessere Spreitung der Chromosomen zu erzielen. Anschließend wurden die Objektträger an der Luft getrocknet.

Schließlich wurden die Chromosomenpräparate, die über die konventionelle Zytogenetik ausgewertet wurden, mit Giemsa gefärbt. Die Chromosomenbruchanalyse mittels konventioneller Zytogenetik konnte an diesem Punkt begonnen werden. Für die Auswertung der Chromosomenpräparate mittels des wcp-assays mussten zunächst noch die Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7 hergestellt und anschließend eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchgeführt werden. Diese Schritte werden in den nächsten Kapiteln beschrieben.

Protokoll 3: Aufarbeitung und Anfertigung der Chromosomenpräparate

Aufarbeitung der Blutkulturen:

- 1,5 Stunden vor Aufarbeitung den Blutkulturen Colcemid zugeben (Endkonzentration 0,06µl/ml)
- Kulturen mischen
- Nach 1,5 Stunden Kultur in Spitzröhrchen überführen
- Spitzröhrchen 10 min bei 174 x g zentrifugieren
- Überstand mit Pipette vorsichtig abnehmen und verwerfen
- Pellet resuspendieren
- 5 ml 37°C warmes KCl (0,4 %) hinzugeben
- Spitzröhrchen bei 37°C für 10 min inkubieren
- Spitzröhrchen 10 min bei 174 x g zentrifugieren
- Überstand abnehmen, verwerfen, Pellet resuspendieren
- Spitzröhrchen schräg stellen
- 1 ml eisgekühltes Fixativ (Methanol: Essigsäure = 3+1) langsam hinzugeben

- Inhalt des Spitzröhrchens gut resuspendieren
- Spitzröhrchen bis auf 5 ml mit eisgekühltem Fixativ auffüllen und Inhalt resuspendieren
- Spitzröhrchen 10 min bei 174 x g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Fixativ-Zugabe mit anschließender Zentrifugation 3x wiederholen bis die Suspension milchig weiß ist
- Ergebnis: Zellsuspension der Patienten und Negativkontrollen

Anfertigung der Chromosomenpräparate:

- Objektträger in Ethanol 80 % waschen
- Mit Tuch Objektträger abtrocknen
- Zellsuspension vorsichtig mit Pipette durchmischen
- Einen Tropfen Suspension auf Objektträger auftropfen und auf dem Objektträger verteilen
- Zur besseren Spreitung der Chromosomen Objektträger evtl. anhauchen
- 10 sec. Objektträger über Wasserbad (73°C) halten, dann zur besseren Spreitung auf einem feuchten Tuch auf den Heizblock (60°C) legen
- Im Mikroskop mit Phasenkontrastobjektiv Zelldichte und Spreitung der Chromosomen überprüfen
- Für den wcp-assay die Objektträger über Nacht altern lassen
- Für die konventionelle Zytogenetik Chromosomen mit Giemsa (4%) für 10 min anfärben

2.6 Sondenherstellung der Chromosomen 1, 3 und 7

Für den wcp-assay mussten Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7 hergestellt werden. Die einzelnen Schritte der Herstellung, von der Präparation des Objektträgers bis zur Fluoreszenzmarkierung der Sonden, werden im Folgenden beschrieben.

2.6.1 Vorbereitung der Mikrodissektion mit und ohne Trypsin

Ziel der Vorbereitung war die Herstellung von Deckgläsern, von denen die Chromosomen 1, 3 und 7 mikrodisseziert werden können. Dafür sollten die Chromosomen unter dem Mikroskop gut erkennbar und möglichst weit ausgebreitet sein. Die Schritte der Aufarbeitung und Chromosomenpräparation, die zur Herstellung eines gut auswertbaren Chromosomenpräparats führten, entsprachen dabei den in Kapitel 2.5 beschriebenen. Die Zellen stammten dabei von Lymphozyten einer gesunden Person mit unauffälligem Chromosomensatz. Der einzige Unterschied zur oben beschriebenen Chromosomenpräparation bestand darin, dass die Zellen auf ein Deckglas aufgetropft wurden, weil die Mikrodissektion damit vereinfacht wird.

Nach dem Auftropfen wurden die Deckgläser auf zwei unterschiedliche Arten behandelt. Bei der einen Hälfte der Deckgläser wurde eine GTG-Bänderung durchgeführt. Hier wurde also die Giemsa-Färbung mit vorheriger Trypsin-Behandlung der Chromosomen durchgeführt.

Trypsin verdaut mit der DNA assoziierte Proteine und dient somit der charakteristischen Bänderung der Chromosomen. Bei der zweiten Hälfte der Deckgläser erfolgte nur eine Giemsa-Färbung ohne Trypsin-Behandlung der Chromosomen. Eine Giemsa-Färbung ohne Trypsin-Behandlung färbt die Chromosomen einheitlich an, ohne die für jedes Chromosom charakteristische Bänderung herzustellen. Hier mussten die Chromosomen 1, 3 und 7 bei der Mikrodissektion also nur anhand ihrer Größe und der Lage ihrer Zentromere identifiziert werden. Anhand dieser zwei unterschiedlichen Ansätze wurden nun über die Mikrodissektion zwei Sonden-Mixe, die jeweils die Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7 enthielten, hergestellt.

Protokoll 4: Vorbereitung Mikrodissektion (Von Zellkultur bis Giemsa-Färbung)

Zellkultur:

- Blut von Negativkontrolle benutzen
- Blutkulturansatz wie in Kapitel 2.3

Aufarbeitung der Blutkultur:

- Wie in Kapitel 2.5

Anfertigung der Chromosomenpräparate:

- Benutzen von 24 x 60 mm großen, elastischen Deckgläsern
- Sonst bis zur Giemsa-Färbung wie in Kapitel 2.5

Giemsa-Färbung:

- Deckgläser 30 Sekunden in 1x Phosphatpuffer geben
- 1. Ansatz: Deckgläser ca. 7-10 Sekunden in Trypsin-Lösung bei 37°C geben (2 ml Trypsin + 35 ml 1 x Phosphatpuffer)
- Deckgläser kurz in 70 % Ethanol-Lösung schwenken
- Deckgläser 2,5 min in Giemsa-Lösung (5ml Giemsa + 35 ml 1x Phosphatpuffer) geben
- 2. Ansatz: Ohne Trypsin-Behandlung Deckgläser 2,5 min in Giemsa-Lösung (s.o.) geben
- Nach Giemsa-Färbung Deckgläser kurz in Aqua bidest. schwenken
- Deckgläser auf Heizblock trocknen lassen (45-50 °C)
- Im Mikroskop Spreitung und Zellzahl beurteilen
- Fertige Deckgläser bis zur Mikrodissektion in feuchter Box lagern

2.6.2 Mikrodissektion

Die Mikrodissektion ist ein Verfahren zur Isolierung chromosomalen Materials von einzelnen Chromosomen oder Chromosomenabschnitten aus Metaphasepräparationen. In dieser Arbeit war das Ziel der Mikrodissektion, die DNA der Chromosomen 1, 3 und 7 zu erlangen. Mit dieser DNA sollten Sonden für die Chromosomen 1, 3 und 7 hergestellt werden. Für die Mikrodissektion wurde ein spezielles Mikroskop (Axiovert S100), das mit einem Mikromanipulator ausgestattet ist, verwendet. In diesen Mikromanipulator wurden feine Glasnadeln eingespannt, die zuvor mit Hilfe eines Pullers hergestellt worden waren. Daraufhin wurden die Deckgläser eingespannt und mit Hilfe des Mikroskops geeignete Metaphasen gesucht.

Vor der Mikrodissektion mussten die Chromosomen 1, 3 und 7 eindeutig identifiziert werden. Die Identifikation der Chromosomen erfolgte bei dem Ansatz mit Trypsin-Behandlung vor der Giemsa-Färbung über die charakteristischen Banden der Chromosomen 1, 3 und 7. Bei dem Ansatz mit Giemsa-Färbung ohne Trypsin-Behandlung musste die Identifikation der Chromosomen 1, 3 und 7 über die Größe und die Lage der Zentromere erfolgen. Zur Vermeidung der Mikrodissektion von Teilen anderer Chromosomen mussten Zellen gefunden werden, in denen sich die Chromosomen 1, 3 und 7 nicht mit anderen Chromosomen überlagerten. Nun wurden die Chromosomen 1, 3 und 7 mit Hilfe der feinen Glasnadel mikrodissiziert. Zunächst wurde dabei das zu mikrodissizierende Chromosom über den beweglichen Objektträger-Tisch in eine geeignete Position zur Glasnadel gebracht. Diese konnte über den Mikromanipulator und den Joystick in drei Ebenen gesteuert werden. Die Mikrodissektion der Chromosomen erfolgte in einer Vorwärtsbewegung der Nadel, während die Aufnahme des Chromosoms durch eine Rückwärtsbewegung vollzogen wurde. Die mikrodissizierten Chromosomen 1, 3 und 7 wurden in unterschiedliche Reaktionsgefäße gegeben. Diese Reaktionsgefäße enthielten jeweils eine Pufferlösung (collection drop solution). Es wurden von den Chromosomen 1, 3 und 7 jeweils sieben pro Ansatz mikrodissiziert. So standen für die beiden Ansätze (mit und ohne Trypsin-Behandlung) am Ende drei Reaktionsgefäße mit jeweils sieben Chromosomen zur Verfügung.

Protokoll 5: Mikrodissektion der Chromosomen 1, 3 und 7

- collection drop solution 1 ml: 856,7 μ l H₂O
100 μ l PE PCR-Puffer (15mM MgCl₂)
40 μ l MgCl₂ (25 mM)
3,3 μ l Brij35 (30%)
- Für die Chromosomen 1, 3 und 7 je 20 μ l collection drop solution bereitstellen
- Mit Hilfe eines Pullers Glasnadeln (1 mm x 15 cm) herstellen
- Diese in Template Tamer für mindestens 30 min mit UV-Licht bestrahlen, um potentiell vorhandene DNA zu zerstören
- Deckgläser in Tisch des Mikrodisektions-Mikroskops einspannen
- Frei liegende und somit für die Mikrodisektion geeignete Chromosomen 1, 3 und 7 suchen
- Chromosomen mikrodisektieren und von Nadelspitze in collection drop solution überführen
- Für die zwei Ansätze mit und ohne Trypsin- Behandlung die Chromosomen 1, 3 und 7 jeweils 7 x mikrodisezieren
- Die Reaktionsgefäße zentrifugieren, vortexen und zentrifugieren
- Die Reaktionsgefäße mit den mikrodisektierten Chromosomen und eine collection drop solution ohne mikrodiseziertes Material (als Negativkontrolle) in Thermocycler stellen
- Programm Premic laufen lassen:
15 Zyklen je: 30°C 1 min
50°C 1 min

2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Aufgabe der PCR war die Vervielfältigung der geringen Menge mikrodisektierter DNA der Chromosomen 1, 3 und 7. Um eine Vervielfältigung der DNA zu ermöglichen, wurden in die drei Reaktionsgefäße mit den mikrodisektierten Chromosomen und in ein als Negativkontrolle dienendes, DNA-freies Reaktionsgefäß die Grundbausteine der DNA, also die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) dATP, dGTP, dCTP und dTTP zugegeben. Zusätzlich wurde die thermostabile Taq-Polymerase beigefügt, mit deren Hilfe die Bausteine der DNA zu den angestrebten Kopien der drei Chromosomen zusammengebaut werden. Die Taq-Polymerase braucht dafür Startermoleküle in Form von Oligonukleotid-Primern.

Da Taq-Polymerase und Primer ihre volle Wirkung nur unter bestimmten Temperaturbedingungen erfüllen können, wurden die Reaktionsgefäße nach Zugabe der PCR-Zutaten in einen so genannten Thermocycler gestellt. Dieser enthält einen temperierbaren Reaktionsraum, der die Reaktionsgefäße aufnimmt. Eine automatische Steuerung regelt ein zyklisches Temperaturprogramm, mit dem die jeweiligen Temperaturen und Zeiten der verschiedenen Reaktionsschritte sowie die Zyklenzahl programmiert wurden.

Die nun folgende Polymerase-Kettenreaktion läuft in sich wiederholenden Zyklen ab. Begonnen wurde mit dem Denaturierungsschritt, einer Temperaturerhöhung auf 94 Grad Celsius. Diese sorgt dafür, dass sich bei jedem der mikrodisektierten Chromosomen die komplementären DNA-Stränge voneinander trennen und die DNA nun einzelsträngig vorliegt. Im Anschluss wird die Temperatur auf 55 Grad Celsius heruntergekühlt, um die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer, der Startermoleküle für die Taq-Polymerase, an die DNA zu ermöglichen. Dies ist der Annealingschritt der PCR. Damit die Taq-Polymerase nun die Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen synthetisiert, wird die Temperatur auf 72 Grad Celsius erhöht. Dies ist das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Es folgt der Elongationsschritt der PCR. Die Arbeitsrichtung der Taq-Polymerase geht dabei immer vom 3'-Ende aus. Die Taq-Polymerase ist thermostabil und übersteht auch die Denaturierungsschritte einer PCR unbeschadet. Das PCR-Programm des Thermocyclers bestand also aus einem Denaturierungsschritt (94 Grad Celsius für 30 Sekunden), einem Annealing-Schritt (55 Grad Celsius für 30 Sekunden) und einem Elongationsschritt (72 Grad Celsius für 90 Sekunden). Nach Abschluss dieses Verfahrens sollte die DNA der Chromosomen 1, 3 und 7 in den Reaktionsgefäßen vervielfältigt worden sein.

Die PCR wurde auf diese Weise bei beiden im Kapitel 2.6.1 beschriebenen Ansätzen (mit und ohne Trypsin-Behandlung) durchgeführt.

Protokoll 6: Polymerase-Kettenreaktion

- PCR-Reagenzien auftauen, vortexen, zentrifugieren und auf Eis stellen
- Je Reaktionsgefäß:
 - 3 µl 10x Puffer (15mM MgCl₂)
 - 1,2 µl MgCl₂ (25mM)
 - 1 µl dNTPs (10mM)
 - 1 µl BSA (1:2000=5ng/µl)
 - 1µl DOP Primer (50pmol/µl)
 - 0,1 µl Taq-Pol (5U/µl)
 - 22,7 µl dH₂O
- Die Reaktionsgefäße kurz vortexen und zentrifugieren
- Reaktionsgefäße in Thermocycler stellen und Programm MICDOP starten
- Programm MICDOP:
 - 8 Zyklen je:
 - 94°C 5 min
 - 94°C 1 min
 - 30°C 1 min
 - 45°C 1 min
 - 72°C 3 min
 - gefolgt von 28 Zyklen je:
 - 94°C 1 min
 - 56°C 1 min
 - 72°C 3 min
 - 72°C 7 min

2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Stücke nach ihrer Größe getrennt und somit ihre Größe bestimmt werden. Die zu untersuchenden DNA-Stücke werden dazu in ein zuvor hergestelltes Agarose-Gel pipettiert. Anschließend wird ein elektrisches Feld erzeugt, wodurch die DNA-Stücke aufgrund ihrer negativen Ladung durch das Agarose-Gel zu wandern beginnen. Dabei wandern größere DNA-Moleküle langsamer als kleinere, so dass sich die DNA-Moleküle nach ihrer Größe auftrennen. Nach circa 60-90 Minuten kann das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese begutachtet werden. Da die DNA nicht sichtbar ist, wird dem Gel Ethidiumbromid beigelegt. Während der Wanderung der DNA durch das Agarose-Gel interkaliert Ethidiumbromid in die DNA und kann anschließend im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Anhand einer Basenpaar-Leiter können unter der UV-Lampe sowohl die Länge der untersuchten DNA-Stücke als auch die Konzentration der DNA abgeschätzt werden.

In dieser Arbeit stand nicht die Bestimmung der Länge der DNA-Stücke im Vordergrund. Vielmehr sollte die DNA-Konzentration und damit der Erfolg der Polymerase-Kettenreaktion und der Mikrodissektion überprüft werden. Eine hohe DNA-Konzentration würde dabei für eine erfolgreiche Vervielfältigung der mikrodissektierten DNA der Chromosomen 1, 3 und 7 durch die PCR sprechen.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde auf diese Weise bei beiden im Kapitel 2.6.1 beschriebenen Ansätzen (mit und ohne Trypsin-Behandlung) durchgeführt.

Protokoll 7: Agarose-Gelelektrophorese

- 1gr. Agarose + 100 ml 1x TBE-Puffer zur Herstellung eines Agarose-Gels mischen
- Agarose-Gel (1%) in Mikrowelle erwärmen
- Unter dem Abzug 5 µl Ethidiumbromid in die Glasflasche pipettieren
- Glasflasche schwenken und unter Abzug ca. 25 min. abkühlen lassen
- Gel in die Kammern füllen
- Gel in Kammer weiter abkühlen und fest werden lassen
- In vier Reaktionsgefäße 5 µl H₂O, 3 µl Dye und 5 µl PCR-Produkt (Negativkontrolle, #1, #3, #7) pipettieren, anschließend kurz vortexen und zentrifugieren
- Als Basenpaarleiter 9 µl H₂O, 3 µl Dye und 1 µl 100- bp-Leiter in Reaktionsgefäß geben
- Gel mit 1x TBE-Puffer bedecken
- Inhalt der Reaktionsgefäße in slots pipettieren
- Gel 75-90 min. bei 95 Volt und 65-70 mA Gel laden
- Mit Hilfe eines Transilluminators Ergebnis kontrollieren

2.6.5 Fluoreszenz-Markierung

Das Ziel des nächsten Schrittes war es, die nun mittels PCR vervielfältigte DNA der mikrodissektierten Chromosomen 1, 3 und 7 zu fluoreszenzmarkieren. Die Fluoreszenzmarkierung macht die mikrodissektierte DNA definitionsgemäß zu Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7. Die Fluoreszenz-Markierung der Sonden ermöglicht die selektive Markierung der Chromosomen 1, 3 und 7 der Patienten und Negativkontrollen und somit deren Untersuchung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Zum Zweck der Fluoreszenz-Markierung wurde wiederum eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Der entscheidende Unterschied zu der nach der Mikrodissektion durchgeführten PCR war, dass den Reaktionsgefäßen fluoreszenzmarkiertes Desoxyuridintriphosphat (Fluor.-dUTP) hinzugefügt wurde. In der PCR wurden die dUTPs in die sich vervielfältigende DNA der Chromosomen 1, 3 und 7 eingebaut, so dass Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7 entstanden. Zur Differenzierung wurden die einzelnen Chromosomen mit unterschiedlichen Farben fluoreszenzmarkiert. Das Chromosom 1 wurde dabei sowohl mit spectrum green als auch spectrum orange markiert, so dass eine Mischung der verschiedenfarbigen Sonden des Chromosom 1 unter dem Fluoreszenzmikroskop orange erschien. Die Chromosomen 3 (spectrum orange) und 7 (spectrum green) wurden so markiert, dass sie unter dem Fluoreszenzmikroskop rot beziehungsweise grün erschienen. Abgesehen von der Beigabe des fluoreszenzmarkierten dUTP entsprach die PCR weitestgehend der unter Kapitel 2.6.3 beschriebenen. Auch der Ablauf der PCR glich dem oben beschriebenen mit jeweils aufeinander folgendem Denaturierungs-, Annealing- und Elongations-Schritten.

Das angestrebte Ergebnis dieser PCR war, dass Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7 zur Verfügung standen. Da diese Sonden die Chromosomen 1, 3 und 7 in ihrer Ganzheit markieren, werden sie auch whole chromosome paint (wcp)-Sonden genannt. Mit ihnen war also die angestrebte Untersuchung der Chromosomen 1, 3 und 7 über einen wcp-assay möglich.

Die Fluoreszenz-Markierung der DNA wurde auf diese Weise bei beiden im Kapitel 2.6.1 beschriebenen Ansätzen (mit und ohne Trypsin-Behandlung) durchgeführt.

Protokoll 8: Fluoreszenzmarkierung der mikrodisszierten Chromosomen mittels PCR

- PCR-Lösungen auftauen lassen, vortexen, zentrifugieren und auf Eis stellen
- Fluor-dUTPs (spectrum orange für #1 und #3 und spectrum green für #1 und #7) lichtgeschützt auftauen lassen, vortexen, zentrifugieren und auf Eis stellen
- Je 4 µl der vier PCR-Produkte (Negativkontrolle, #1, #3, #7) in neues Reaktionsgefäß pipettieren
- Je Reaktionsgefäß zusätzlich:
 - 2,5 µl 10x Puffer (15mM MgCl₂)
 - 0,5 µl dNTPs
 - 0,5 µl Fluor.-dUTP (1mM)
 - 2 µl DOP-Primer (50pmol/µl)
 - 14,375 µl dH₂O
 - 1,0 µl MgCl₂ (25mM)
 - 0,125 µl Taq Pol (2 units)
- Die Reaktionsgefäße (je 25 µl) kurz vortexen und zentrifugieren
- Reaktionsgefäße in Thermocycler stellen und Programm DOPSHORT starten
- Programm DOPSHORT:
 - 5 Zyklen je:
 - 95°C 5 min
 - 94°C 30 sec
 - 30°C 30 sec
 - 72°C 1,5 min
 - gefolgt von 35 Zyklen je:
 - 94°C 30 sec
 - 62°C 30 sec
 - 72°C 1,5 min
 - 72°C 7 min

2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Der Erfolg dieser PCR mit Fluoreszenzmarkierung der Chromosomen 1, 3 und 7 wurde wiederum mit der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Agarose-Gelelektrophorese entsprach in ihrem Ablauf der in Kapitel 2.6.4 beschriebenen Agarose-Gelelektrophorese.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde auf diese Weise bei beiden im Kapitel 2.6.1 beschriebenen Ansätzen (mit und ohne Trypsin-Behandlung) durchgeführt.

2.7 Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH)

Hybridisierung bezeichnet einen Vorgang, bei dem sich an einen Einzelstrang einer DNA ein komplementärer DNA-Einzelstrang über Wasserstoffbrücken anlagert. Bei der Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung ist zusätzlich einer der DNA-Stränge fluoreszenzmarkiert. Ziel der Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung dieser Arbeit war, dass sich bei den Patienten und den Negativkontrollen die fertig gestellten Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7 an ihre komplementäre

DNA anlagern. Die komplementäre DNA der Sonden sind die Chromosomen 1, 3 und 7 der Patienten und Negativkontrollen. Wenn sich die mit unterschiedlichen Farben fluoreszenzmarkierten Sonden an die Chromosomen 1, 3 und 7 anlagern, so sind diese Chromosomen der Patienten und Negativkontrollen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop leicht identifizierbar. Dies ermöglicht die angestrebte Auswertung der Bruchereignisse der Chromosomen 1, 3 und 7 mittels wcp-assay. Für eine erfolgreiche Hybridisierung müssen sowohl die Sonden als auch die Chromosomen der Patienten und Negativkontrollen einzelsträngig vorliegen.

Deshalb wurden vor der Hybridisierung sowohl die Sonden als auch die Chromosomen der Patienten und Negativkontrollen, die nach der Chromosomenpräparation auf Objektträgern vorlagen, bei 73 Grad Celsius denaturiert. Die Temperatur von 73 Grad Celsius löst die Wasserstoffbrücken der DNA und lässt sie somit einzelsträngig zurück. Die Denaturierung wurde durch Formamid unterstützt. Zur Vorbereitung der Denaturierung wurden die Sonden und die Chromosomenpräparate vorbehandelt. Die Sonden wurden gefällt und gelöst. Die Chromosomenpräparate wurden dehydriert. Unmittelbar im Anschluss wurden die Sonden und die Chromosomenpräparate denaturiert. Nach der Denaturierung wurden die Sonden auf die Objektträger pipettiert. Die nun folgende Hybridisierung dauerte 24 Stunden und erfolgte bei 37 Grad Celsius. Die Hybridisierung der Sonden 1, 3 und 7 erfolgte in zwei Schritten. Am ersten Tag wurden die Sonden der Chromosomen 1 und 3 hybridisiert. Da sie erfahrungsgemäß schlechter hybridisiert, wurde die Sonde des Chromosoms 7 am darauf folgenden Tag auf die gleiche Weise nachhybridisiert. Nach den Hybridisierungs-Schritten folgten Waschvorgänge der Objektträger. Abschließend wurden die Objektträger mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt, wodurch alle Chromosomen im Fluoreszenz-Mikroskop blau angefärbt erscheinen.

Zunächst wurde die Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung an Test-Objektträgern durchgeführt, um die Güte der zwei unterschiedlichen Sondenmixe (siehe 2.6.1) zu beurteilen. Da der Sondenmix ohne Trypsin-Behandlung der Chromosomen vor der Mikrodissektion besser für die Auswertung des wcp-assays geeignet war (siehe 3.1 und 4.1), wurde mit diesem Sondenmix die Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung der FA-Patienten und Negativkontrollen durchgeführt.

Protokoll 9: Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH)

1. Hybridisierungsschritt:

Fällung, Lösung und Denaturierung der Sonden der Chromosomen 1 und 3 :

- Pro Objektträger werden 7 µl Sonde # 1 (spectrum green), 7 µl Sonde # 1 (spectrum orange) und 7 µl Sonde # 3 (spectrum orange) benötigt
- Je Objektträger in Reaktionsgefäß:
 - 7 µl Sonden-DNA
 - 4 µl Cot-1-DNA
 - 1 µl Glycogen
 - 1,2 µl Natriumacetat (3M)
 - 30 µl EtOH (eisgekühlt)
- Reaktionsgefäße kurz zentrifugieren (lichtgeschützt) und mindestens 1 h bei -80 °C lagern
- Reaktionsgefäße 30 Minuten bei 14000 U/min und 4 °C zentrifugieren
- Überstand abpipettieren, zum Waschen 1 ml Ethanol 70% hinzugeben
- 10 min bei 14000 U/min (4 °C) zentrifugieren, danach Überstand abpipettieren
- Reaktionsgefäße offen bei 37 °C in den Heizblock stellen, bis Ethanol vollständig verdampft ist
- Pellets mit 3,5 µl Formamid lösen
- Geschlossene Reaktionsgefäße bei 37 °C 30 min in Heizblock stellen, dazwischen vortexen
- Je Reaktionsgefäß 3,5 µl Mastermix (4x SSC + 20 % Dextransulfat) dazu pipettieren
- Reaktionsgefäße 5 min in den Heizblock bei 37 °C stellen
- Zur Denaturierung der Sonden Reaktionsgefäße 6 min in Wasserbad (73°C) geben

Dehydrierung und Denaturierung des OT :

- OTs durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%-85%-100%) ziehen (jeweils 2 Minuten)
- OT > 30 sec auf die Heizplatte (45 °C) legen , bis OT trocken ist
- OT für 3 min in Formamidlösung (70 % Formamid /2x SSC) (73°C) stellen, danach 5 sec in 2x SSC-Küvette (RT) schwenken
- OTs durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%-85%-100%) ziehen (jeweils 2 Minuten)
- OT > 30 sec auf die Heizplatte (45 °C) legen , bis OT trocken ist

Hybridisierung der Sonden:

- 3 x 7 µl Sonden (#3 spectrum orange, #1 spectrum green, #1 spectrum orange) auf Objektträgerfeld pipettieren
- Deckgläschen (18 x 18 cm) luftblasenfrei auflegen, Fix-O-Gum ums Deckgläschen zum Abdichten geben
- bei allen Vorgängen die OT vor Licht schützen
- OT 24 h bei 37 °C in feuchter Kammer hybridisieren lassen
- Fix-O-Gum und Deckgläschen vom OT entfernen
- OT für 2 min. in Waschlösung (Igepal 0,3 %, 0,4x SSC) bei 73°C stellen
- Kurz in weitere Waschlösung (2x SSC, 0,1 % Igepal) schwenken (Raumtemperatur)

2. Hybridisierungsschritt:

Fällung, Lösung und Denaturierung der Sonde # 7:

- findet am darauf folgenden Tag statt
- Siehe: Fällung, Lösung und Denaturierung der Sonden #1 und #3

Denaturierung des OT:

- siehe oben

Hybridisierung OT mit Sonde # 7:

- Hybridisierung wie bei Sonden #1 und #3 (siehe oben)
- Im Anschluss OT abtropfen lassen und für 14 min mit DAPI färben
- OT zweimal in Aqua bidest. spülen und lufttrocknen lassen
- Vectashield Antifading auf OT geben und Deckglas luftblasenfrei auflegen

2.8 Auswertung der Sondenqualität

Es wurden zwei unterschiedliche, über Mikrodissektion hergestellte Sondenmixe mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops ausgewertet. Jeder Sondenmix bestand jeweils aus drei Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7. Die Sondenmixe unterschieden sich darin, dass die Chromosomen nur bei dem einen vor der Mikrodissektion mit Trypsin behandelt wurden. Die Auswertung der Sondenmixe bestand in der Untersuchung der Homogenität der Markierung und der Lichtstärke der Sondenmixe, wobei eine möglichst große Homogenität der Markierung und möglichst hohe Lichtstärke für die Auswertung der wcp-assays angestrebt wurde.

2.9 Auswertung wcp-assay und konventionelle Zytogenetik

2.9.1 Auswertung konventionelle Zytogenetik

Die Chromosomenbruchanalyse mittels konventioneller Zytogenetik erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Sie wurde in dieser Arbeit so durchgeführt, wie es in der Standarddiagnostik der Fanconi-Anämie üblich ist. Es wurden je Patient und Kontrolle pro MMC-Konzentration 25 Zellen ausgewertet. Es wurden nur Zellen ausgewertet, in denen 46 Zentromere zu finden waren. Zellen mit mehr als acht Bruchereignissen wurden nach institutsinterner Regelung als multiaberrant definiert und von der Auswertung ausgeschlossen.

2.9.2 Auswertung wcp-assay

Die Chromosomenbruchanalyse mittels wcp-assays erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen der Sonden ausgesandte Licht wird dabei erst mit Hilfe geeigneter Filter mikroskopisch sichtbar. Während bei der konventionellen Zytogenetik der vollständige Chromosomensatz untersucht wird, wurden bei den wcp-assay lediglich die Chromosomen 1, 3 und 7 untersucht.

Die Zellen aller sechs Patienten und deren Negativkontrollen waren im Vorfeld 24 Stunden lang mit Mitomycin C (MMC) behandelt worden (siehe Kapitel 2.4). Zusätzlich wurden Zellen von zwei Patienten (P1 und P2) und deren Negativkontrollen (K1 und K2) für 48 Stunden mit MMC behandelt (siehe Kapitel 2.4). Zur besseren Unterscheidung wird der wcp-assay, der die Bruchereignisse nach 24 Stunden MMC-Behandlung untersucht, wcp-assay I genannt. Der wcp-assay nach 48 Stunden MMC-Behandlung wird als wcp-assay II bezeichnet (Tab. 3). Beim wcp-assay I wurden im Durchschnitt je MMC-Konzentration 273 Zellen, beim wcp-assay II im Durchschnitt 213 Zellen ausgewertet. Auch bei den wcp-assays wurden nur Zellen ausgewertet, die nicht multiaberrant waren und in denen 46 Zentromere zu finden waren.

Tab. 3: Übersicht Analyse-Methoden

| | CC | wcp I | wcp II |
|-----------------------|-----------|--------------|---------------|
| MMC-Behandlung | 24h | 24h | 48h |
| Patienten | alle | alle | P1, P2 |
| Kontrollen | alle | alle | K1, K2 |

*CC = Konventionelle Zytogenetik; wcp = whole chromosome paint;
MMC = Mitomycin C*

2.9.3 Bruchereignisse/Zelle (B/Z)

Der Quotient B/Z drückt aus, wie viele Bruchereignisse pro Zelle entdeckt wurden. Die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle wurde sowohl bei den wcp-assay als auch bei der konventionellen Zytogenetik anhand der beobachteten Chromosomenaberrationen je Patient und Negativkontrolle sowohl spontan als auch bei drei unterschiedlichen MMC-Konzentrationen ermittelt.

Die im Kapitel 2.11 definierten Chromosomenaberrationen wurden bei der Ermittlung der Anzahl der Bruchereignisse unterschiedlich bewertet. Chromosomenbrüche (csb), Chromatidbrüche (ctb), Deletionen (del), azentrische Fragmente (ace) und Duplikationen (dup) wurden sowohl bei den wcp-assays als auch bei der konventionellen Zytogenetik je-

weils als ein Bruchereignis gewertet. Bei der konventionellen Zytogenetik wurden Translokationen (t), Reunionsfiguren (rb) und dizentrische Chromosomen (dic) als zwei Bruchereignisse gewertet, da bei diesen Aberrationen immer zwei Chromosomen gebrochen sein müssen. Da bei den wcp-assay nur die Bruchereignisse der Chromosomen 1, 3 und 7 untersucht werden sollten, wurden Translokationen und Reunionsfiguren der Chromosomen 1, 3 und 7 mit einem nicht fluoreszenzmarkierten Chromosom nur als ein Bruchereignis gewertet. Translokationen und Reunionsfiguren zwischen den Chromosomen 1, 3 und 7 allerdings wurden als zwei Bruchereignisse gewertet.

Über den Quotienten B/Z wird in der konventionellen Zytogenetik die Fanconi-Anämie diagnostiziert. Wenn der Quotient B/Z nach MMC-Behandlung den B/Z-Quotienten bei einer im selben MMC-Ansatz aufgearbeiteten Negativkontrolle deutlich übersteigt, so gilt der Test als positiv für Fanconi-Anämie. Wie in der Einleitung beschrieben, besitzt die Chromosomenbruchanalyse mittels konventioneller Zytogenetik eine hohe Spezifität und Sensitivität. In Verbindung mit der Klinik kann die Fanconi-Anämie auf diese Weise zuverlässig diagnostiziert werden.

Um die diagnostische Aussagekraft des wcp-assay zu ermitteln, wurde deshalb die Höhe des B/Z-Quotienten zwischen Patienten und deren Negativkontrollen verglichen. Anhand der Ergebnisse dieses Vergleichs wurden für die wcp-assays und die konventionelle Zytogenetik anschließend die Diagnoseparameter Sensitivität und Spezifität bestimmt.

2.9.4 Korrelation zwischen Bruchhäufigkeit und Chromosomengröße

Mit Hilfe eines Korrelationskoeffizienten wurde errechnet, ob eine lineare Korrelation zwischen der Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 und deren Chromosomengröße besteht. Die Bruchhäufigkeit steht für die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle der einzelnen Chromosomen. Dabei wurden bei jedem Chromosom die Bruchereignisse aller vier MMC-Konzentrationen (0 MMC-100 MMC) addiert und durch die Gesamtzahl der Zellen aller MMC-Konzentrationen geteilt.

Bei dem Vergleich der Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 wurde für die Bruchhäufigkeit des Chromosoms 7 als Bezugsgröße der Wert 1 festgelegt. Die Größe der Chromosomen 1, 3 und 7 wurde anhand eines Artikels von Kong et al. aus dem Jahr 2004 in Megabasenpaare (mbp) angegeben [88].

2.9.5 Aberrante Zellen [%] und Bruchereignisse pro aberrante Zelle

Der Prozentsatz der aberranten Zellen wurde mittels wcp-assays als auch konventioneller Zytogenetik bei Patienten und Negativkontrollen sowohl spontan als auch bei drei MMC-Konzentrationen bestimmt. Eine Zelle wurde als aberrant gewertet, sobald mindestens eine Chromosomenaberration in ihr beobachtet wurde. Der Quotient Bruchereignisse pro aberrante Zelle (B/aberr. Zelle) bezeichnet die Anzahl der Bruchereignisse pro aberrante Zelle.

2.9.6 Verteilung der Aberrationstypen

Die Verteilung der Aberrationstypen beschreibt, in welchem prozentualen Verhältnis die einzelnen Aberrationen an der Gesamtzahl der Chromosomenaberrationen bei den einzelnen Patienten und Negativkontrollen beteiligt waren. Die Verteilung der Aberrationstypen wurde bei den wcp-assays als auch der konventionellen Zytogenetik untersucht. Es wurde dabei die spontan (0 MMC) auftretende der unter MMC-Behandlung (10-100 MMC) auftretenden Verteilung der Aberrationstypen gegenübergestellt. Für die Zusammenfassung der Konzentrationen 10-100 MMC wurde zunächst von jeder Aberrationsart die Anzahl aus den drei einzelnen MMC-Konzentrationen summiert. Anschließend wurde das prozentuale Verhältnis dieser Summe zur Gesamtzahl aller Aberrationen der drei MMC-Konzentrationen gebildet. Die Verteilung der Aberrationstypen wurde dabei sowohl bei den wcp-assays als auch der konventionellen Zytogenetik je Patient und je Negativkontrolle für alle untersuchten Chromosomen zusammengefasst.

2.9.7 Verteilung der Aberrationstypen (#1, #3, #7 isoliert)

Es wurde auch für jedes der drei Chromosomen 1, 3 und 7 isoliert die Verteilung der Aberrationstypen mittels der wcp-assays ermittelt. Aufgrund der niedrigen spontanen Aberrationszahlen wurde für jedes Chromosom die spontane mit der MMC-induzierten Verteilung der Aberrationstypen zusammengefasst. Dafür wurde zunächst von jeder Aberrationsart eines jeden Chromosoms die spontane mit der MM-induzierten Anzahl summiert. Anschließend wurde je

Chromosom das prozentuale Verhältnis dieser Summe zur Gesamtzahl aller spontanen und MMC-induzierten Aberrationen gebildet.

2.10 Statistik

2.10.1 Diagnoseparameter:

Die Güte eines Diagnoseverfahrens wird durch die Parameter Sensitivität und Spezifität wiedergespiegelt. Die Höhe dieser Parameter hängt davon ab, in welchem Maße das untersuchte Diagnoseverfahren die Diagnose der Erkrankung bei Patienten und Negativkontrollen ermöglicht. Die Ergebnisse des untersuchten Diagnoseverfahrens können bezüglich des Vorliegens der Erkrankung bei Patienten richtig positiv oder falsch negativ sein. Bei Negativkontrollen können sie falsch positiv oder richtig negativ sein. Diese Ergebnisse bezüglich des Vorliegens der Erkrankung werden in eine Vierfeldertafel eingetragen (Tab. 4) und mit deren Hilfe im Anschluss die Diagnoseparameter berechnet.

Tab. 4: Vierfeldertafel

| | | Gesundheitsstatus | | Summe |
|---------------------------------|--------|----------------------|----------------------|---------|
| | | Krank | gesund | |
| Neues Diagnose- Verfahren | krank | richtig positiv (rp) | falsch positiv (fp) | rp + fp |
| | gesund | falsch negativ (fn) | richtig negativ (rn) | fn + rn |
| Summe | | rp + fn | fp + rn | |

So wurden auch die richtigen und falschen Ergebnisse des wcp-assays bezüglich des Vorliegens einer Fanconi-Anämie in eine Vierfeldertafel eingetragen. Anhand dieser ließen sich im Anschluss die Diagnoseparameter für den wcp-assay bestimmen. Die Bedeutung und Formeln der Diagnoseparameter Sensitivität und der Spezifität sind im Folgenden näher erläutert.

Sensitivität: Die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich Erkrankten auch durch ein positives Testergebnis zu erkennen. Sie gibt also den Anteil der richtig als positiv (richtig positiv) erkannten Sachverhalte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit positiven Sachverhalte an. In dieser Arbeit gibt sie demnach an, wie viele der FA-Patienten vom wcp-assay auch als solche erkannt wurden.

$$\text{Formel: } (rp/(rp+fn))$$

Spezifität: Die Wahrscheinlichkeit, einen nicht Erkrankten auch durch ein negatives Testergebnis zu erkennen. Sie gibt also den Anteil der richtig als negativ (richtig negativ) erkannten Sachverhalte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit negativen Sachverhalte an. In dieser Arbeit gibt die Spezifität demnach an, wie viele der Negativkontrollen vom wcp-assay als solche erkannt wurden.

Formel: $(rn/(rn+fp))$

2.10.2 Korrelationskoeffizient

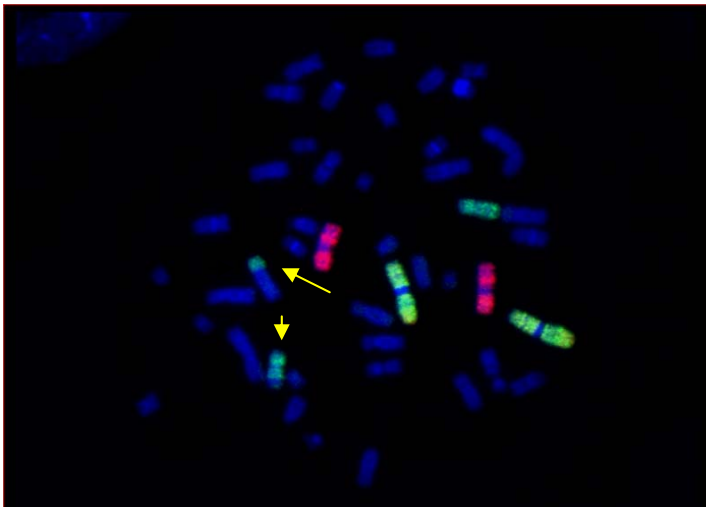
Der Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson stellt für metrisch skalierte Merkmale ein Maß für die lineare Abhängigkeit zweier statistischer Variablen dar. Er nimmt lediglich Werte zwischen +1 und -1 an. Ein vollständig positiver linearer Zusammenhang zwischen untersuchten Merkmalen besteht bei einem Wert von +1, ein vollständig negativer bei einem Wert von -1. Nimmt der Korrelationskoeffizient einem Wert von 0 an, besteht keine lineare Abhängigkeit zwischen den untersuchten Merkmalen. In dieser Arbeit wurde der lineare Zusammenhang bei zwei unterschiedlichen Gelegenheiten untersucht. Zuerst wurde untersucht, ob es einen linearen Zusammenhang zwischen der konventionellen Zytogenetik und den wcp-assays bezüglich der Zunahme der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) bei unterschiedlichen Mitomycin C-Konzentrationen gab. Es wurde also mit dem Korrelationskoeffizienten untersucht, ob die Zunahme der Bruchereignisse bei steigender MMC-Konzentration bei dem wcp-assay ähnlich verläuft wie bei der konventionellen Zytogenetik.

Mit dem Korrelationskoeffizienten wurde zudem ermittelt, ob die Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 mit deren Größe linear zusammenhängt. Der Korrelationskoeffizient wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm von Microsoft nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Kor}_e(X, Y) := \varrho_e(X, Y) := r_{xy} := \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

2.11 Aberrationstypen bei konventioneller Zytogenetik und beim wcp-assay.

Bei den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik wurden Chromosomenaberrationen wie folgt definiert [86, 87]:



Translokation (t) (Abb. 1):

Austausch von Chromosomenmaterial zwischen zwei oder mehreren Chromosomen. In dieser Arbeit wurde nicht zwischen reziproker und nicht reziproker Translokation unterschieden.

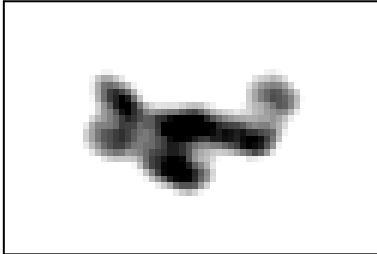
Abb. 1: Translokation #7 (Pfeil) (wcp-assay)



Reunionsfigur (rb) (Abb.2):

Verbindung zweier (komplette) oder einer Chromatide (inkomplette) mehrerer Chromosomen. In dieser Arbeit wurde nicht zwischen kompletter und inkompletter Reunionsfigur unterschieden.

Abb. 2: Reunionsfigur (konventionelle Zytogenetik)



Chromatidbruch (ctb) (Abb. 3):

Eine Chromatide des Chromosoms ist abgetrennt, wobei die entstandene Lücke größer als eine Chromatidenbreite ist.

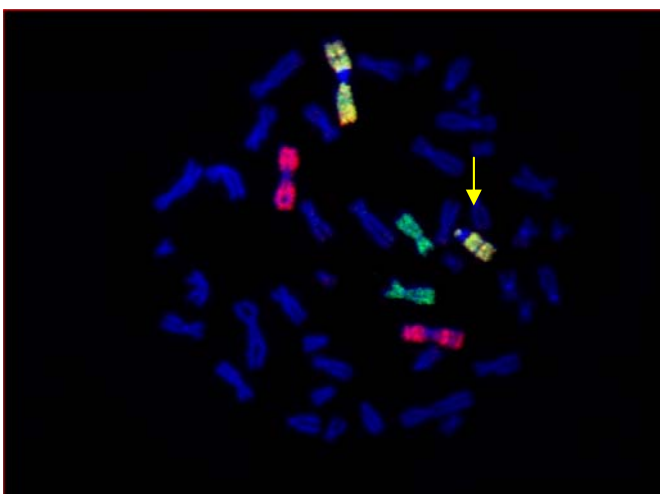
Abb. 3: Chromatidbruch (konventionelle Zytogenetik)



Chromosomenbruch (csb) (Abb.4):

Beide Chromatiden sind von dem Chromosom abgetrennt und liegen in unmittelbarer Nähe.

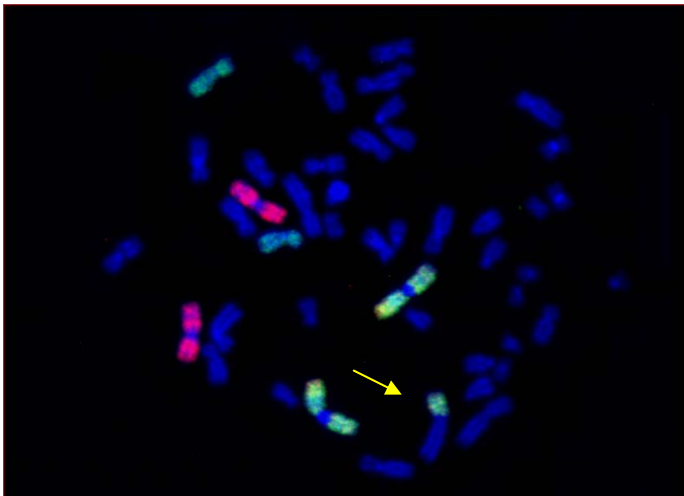
Abb. 4: Chromosomenbruch (konventionelle Zytologie)



Deletion (del) (Abb. 5):

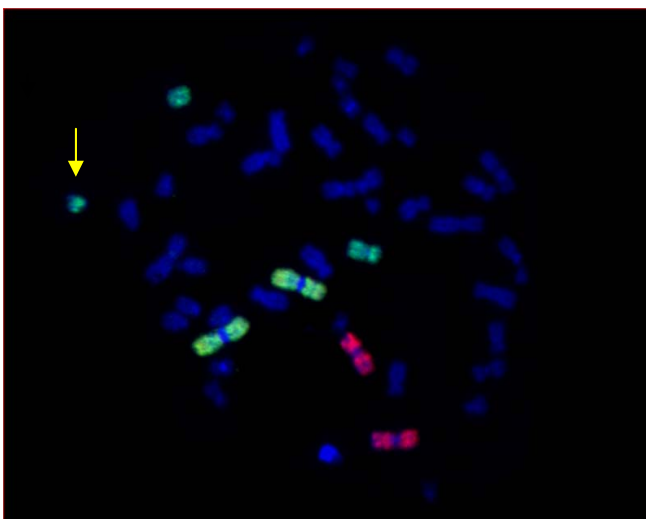
Verlust von genetischem Material.

Abb. 5: Deletion #1 (Pfeil) (wcp-assay)



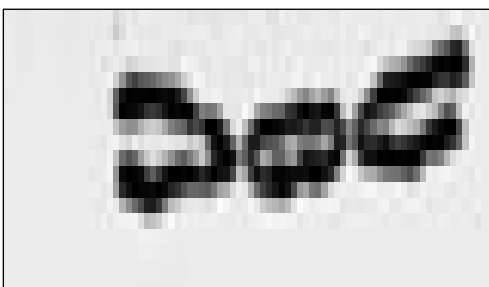
Duplikation (dup) (Abb. 6):
Verdopplung und Translokation von
genetischem Material.

Abb. 6: Duplikation #1 (Pfeil) (wcp-assay)



Azentrisches Fragment (ace) (Abb. 7):
Dieses besteht aus zwei Chromatiden
ohne Zentromer und entsteht bei einem
Chromosomenbruch, wobei die
chromosmale Herkunft nicht aufgrund
der direkten Nähe zum zugehörigen
Chromosom ersichtlich ist. Beim wcp-
assay wurde das azentrische Fragment als
Chromosomenbruch gewertet.

Abb. 7: Azentrisches Fragment #7 (Pfeil) (wcp-assay)



Dizentrisches Chromosom (dic) (Abb. 8):

Ein Chromosom mit zwei Zentromeren, das durch die
Fusion zweier Chromosomen entsteht.

Abb. 8: Dizentrisches Chromosom (konventionelle Zytogenetik)

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der Sondenqualität

Es wurden zwei unterschiedliche Sondenmixe der Chromosomen 1, 3 und 7 miteinander verglichen. Sie unterschieden sich nur darin, dass eine Trypsin-Behandlung der Chromosomen vor der Mikrodissektion nur bei dem einen Sondenmix durchgeführt wurde. Aus den Abb. 9-12 geht hervor, dass die Sonde des Chromosom 1 ohne Trypsin-Behandlung das Chromosom 1 deutlich homogener markierte als die Sonde mit Trypsin-Behandlung.

Das Chromosom 1 wurde in dieser Arbeit sowohl mit einer spectrum green-Sonde als auch mit einer spectrum orange-Sonde markiert, so dass es im Fluoreszenzmikroskop bei entsprechender Filterkombination orange erschien. Die Abb. 9-12 zeigen lediglich die spectrum orange-Sonde des Chromosom 1. Die Ergebnisse der spectrum green-Sonde des Chromosom 1 und der Sonden der Chromosomen 3 und 7 entsprachen den Ergebnissen der spectrum orange-Sonde des Chromosom 1, so dass die Abb. 9-12 beispielhaft für die übrigen Sonden stehen.

So erzielten die Sonden ohne Trypsin-Behandlung vor der Mikrodissektion bei den drei Chromosomen 1, 3 und 7 eine deutlich größere Homogenität bei der Markierung der Chromosomen 1, 3 und 7 als die Sonden mit Trypsin-Behandlung vor der Mikrodissektion.

Darüberhinaus wiesen die Sonden ohne Trypsin-Behandlung häufig eine höhere Lichtstärke als die Sonden mit Trypsin-Behandlung auf. Bei der Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese nach der PCR zeigten die DNA-Banden der Sonden ohne Trypsin-Behandlung zudem eine höhere Fluoreszenz als die DNA der Sonden mit Trypsin-Behandlung.

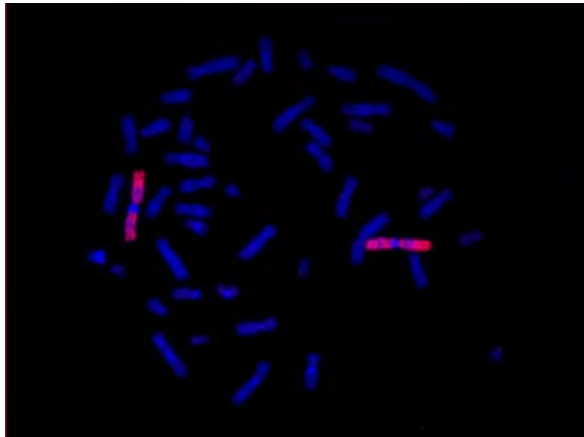


Abb. 9: #1 (rot) ohne Trypsin-Behandlung

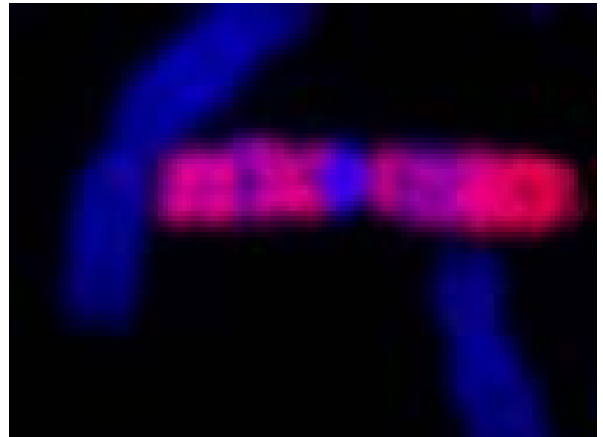


Abb. 10: : #1 (rot) ohne Trypsin-Behandlung

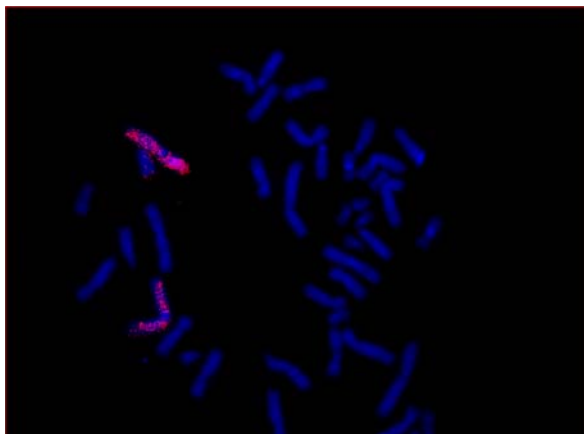


Abb. 11: #1 (rot) mit Trypsin-Behandlung

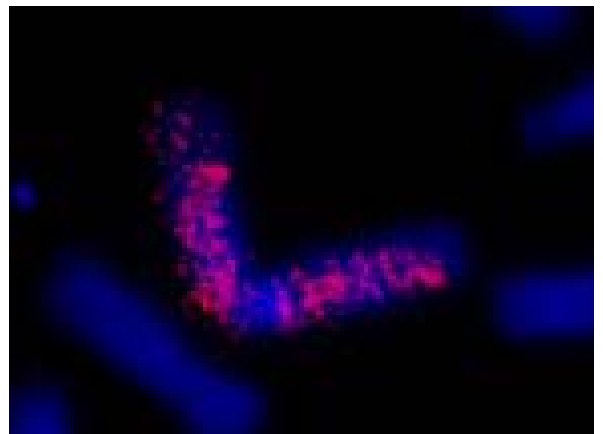


Abb. 12: #1 (rot) mit Trypsin-Behandlung

3.2 Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) bei wcp-assays und konventioneller Zytogenetik

Zur Prüfung der diagnostischen Aussagekraft der wcp-assays wurden die Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) von Patienten und Negativkontrollen verglichen. Mit Ausnahme der spontanen Brüchigkeit (0 MMC) des Patienten P2 lag sowohl bei den wcp-assays als auch bei der konventionellen Zytogenetik die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) bei allen Patienten sowohl spontan (0 MMC) als auch bei den Konzentrationen 10-100 ng/ml Mitomycin C höher als bei den Negativkontrollen (Tab. 5). Dies bedeutete zugleich, dass die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) jedes Patienten sowohl spontan (0 MMC) als auch bei den Konzentrationen von 10-100 ng/ml Mitomycin C höher lag als bei der jeweils zugehörigen Negativkontrolle. Die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) stieg bei den Patienten sowohl bei den wcp-assays als auch der konventionellen Zytogenetik mit steigender Mitomycin C - Konzentration deutlich an. Eingeschränkt war dieser Anstieg nur bei dem Patient P3, bei dem die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) bei der Mitomycin C -Konzentration von 100 ng/ml bei der konventionellen Zytogenetik leicht abfiel. Bei den Negativkontrollen war der Anstieg bei steigender Mitomycin C -Konzentration entweder nicht vorhanden oder deutlich geringer als bei den Patienten. Als Ergebnis dessen lag die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) der Patienten bei den Konzentrationen von 10-100 ng/ml Mitomycin C sowohl bei den wcp-assays als auch der konventionellen Zytogenetik mindestens dreimal und zumeist über zehnmal höher als bei den jeweils zugehörigen Negativkontrollen (Tab. 5).

Tab. 5: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei konventioneller Zytogenetik (CC), wcp- assay I und II

| Patient/Kontrolle | Bruchereignisse/Zelle (B/Z) | | | |
|-------------------|-----------------------------|------|-------|--------|
| | MMC | CC | wcp I | wcp II |
| P1 | 0 | 0.32 | 0.02 | 0.03 |
| | 10 | 0.48 | 0.08 | 0.11 |
| | 50 | 1.75 | 0.31 | 0.30 |
| | 100 | 3.90 | 0.46 | 0.84 |
| P2 | 0 | 0.12 | 0.01 | 0.02 |
| | 10 | 1.12 | 0.10 | 0.10 |
| | 50 | 1.16 | 0.21 | 0.63 |
| | 100 | 2.60 | 0.44 | 1.95 |
| P3 | 0 | 0.32 | 0.08 | - |
| | 10 | 1.24 | 0.15 | - |
| | 50 | 1.83 | 0.17 | - |
| | 100 | 1.65 | 0.38 | - |
| P4 | 0 | 0.08 | 0.03 | - |
| | 10 | 1.00 | 0.17 | - |
| | 50 | 1.88 | 0.31 | - |
| | 100 | 2.55 | 0.62 | - |
| P5 | 0 | 0.12 | 0.02 | - |
| | 10 | 0.52 | 0.08 | - |
| | 50 | 0.80 | 0.19 | - |
| | 100 | 2.50 | 0.32 | - |
| P6 | 0 | 0.12 | 0.02 | - |
| | 10 | 0.56 | 0.03 | - |
| | 50 | 1.64 | 0.19 | - |
| | 100 | 3.04 | 0.29 | - |
| K1 | 0 | 0.04 | 0.0 | 0.0 |
| | 10 | 0.0 | 0.01 | 0.01 |
| | 50 | 0.20 | 0.01 | 0.01 |
| | 100 | 0.24 | 0.01 | 0.02 |
| K2 | 0 | 0.0 | 0.01 | 0.02 |
| | 10 | 0.16 | 0.01 | 0.02 |
| | 50 | 0.12 | 0.01 | 0.02 |
| | 100 | 0.12 | 0.03 | 0.01 |
| K3/4 | 0 | 0.0 | 0.01 | - |
| | 10 | 0.04 | 0.01 | - |
| | 50 | 0.20 | 0.0 | - |
| | 100 | 0.24 | 0.06 | - |
| K5/6 | 0 | 0.0 | 0.0 | - |
| | 10 | 0.04 | 0.01 | - |
| | 50 | 0.12 | 0.01 | - |
| | 100 | 0.20 | 0.02 | - |

CC= konventionelle Zytogenetik; wcp I = whole chromosome painting nach 24 h Mitomycin C-Behandlung; wcp II = whole chromosome painting nach 48 h Mitomycin C-Behandlung; MMC = Mitomycin C; B/Z = Bruchereignisse/Zelle

Die Abb. 13-18 veranschaulichen die größere Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) der Patienten bei spontaner Brüchigkeit (0 MMC) und den drei Mitomycin C-Konzentrationen (10-100 MMC) bei den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik. Auch zeigen die Abb. 13-18 den im Vergleich zu den Negativkontrollen großen Anstieg der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) der Patienten bei steigender Mitomycin C-Konzentration.

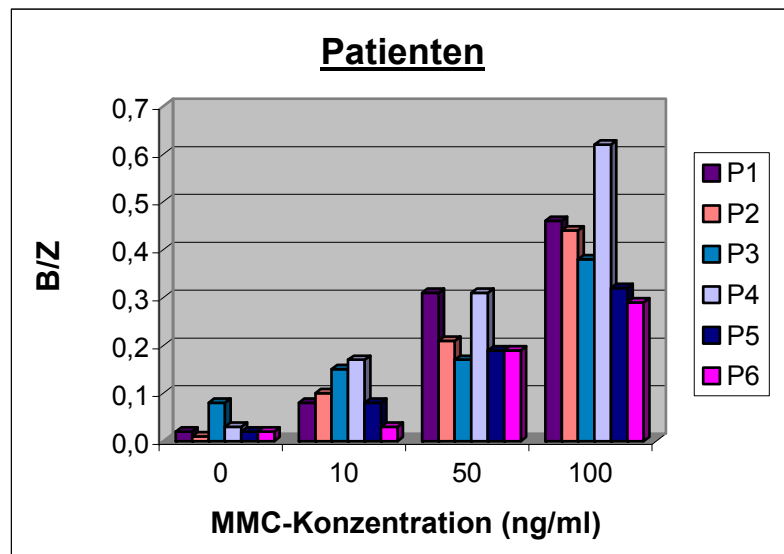


Abb. 13: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Patienten beim wcp-assay I

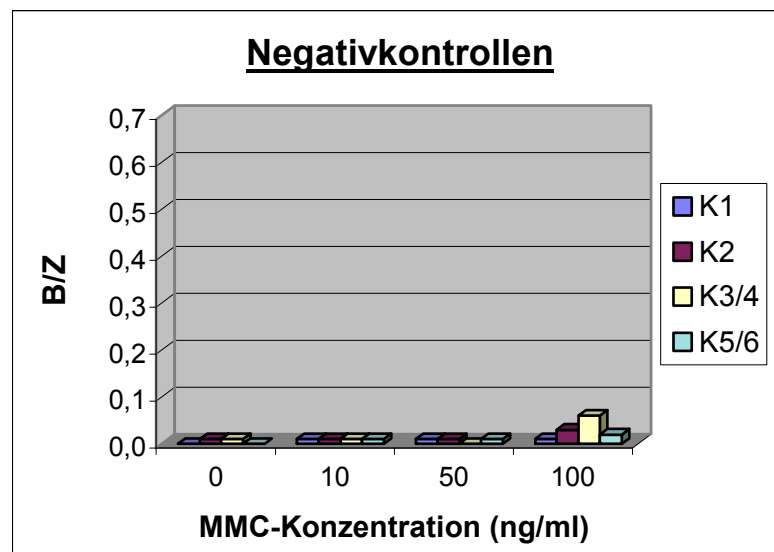


Abb. 14: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Negativkontrollen beim wcp-assay I

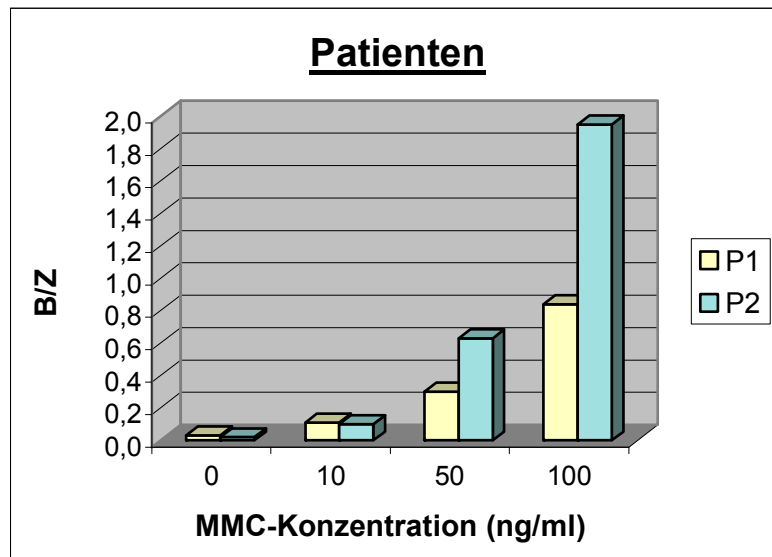


Abb. 15: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Patienten beim wcp-assay II

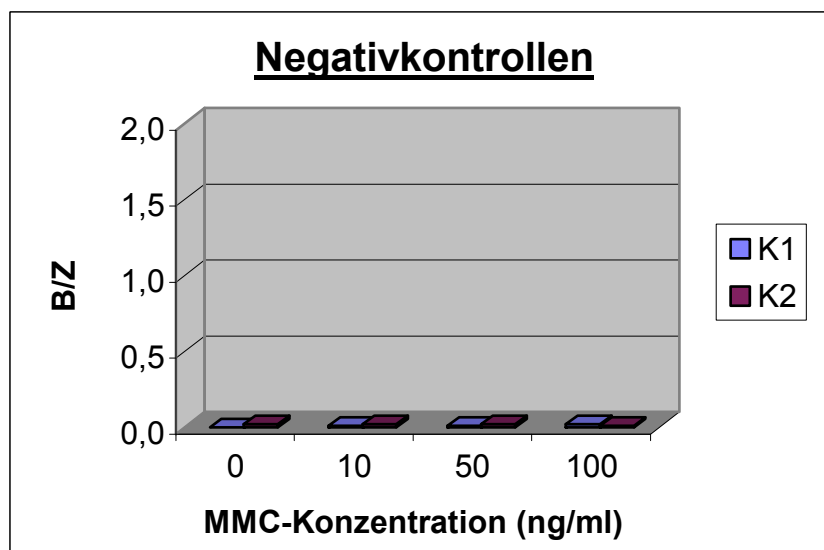


Abb. 16: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Negativkontrollen beim wcp-assay II

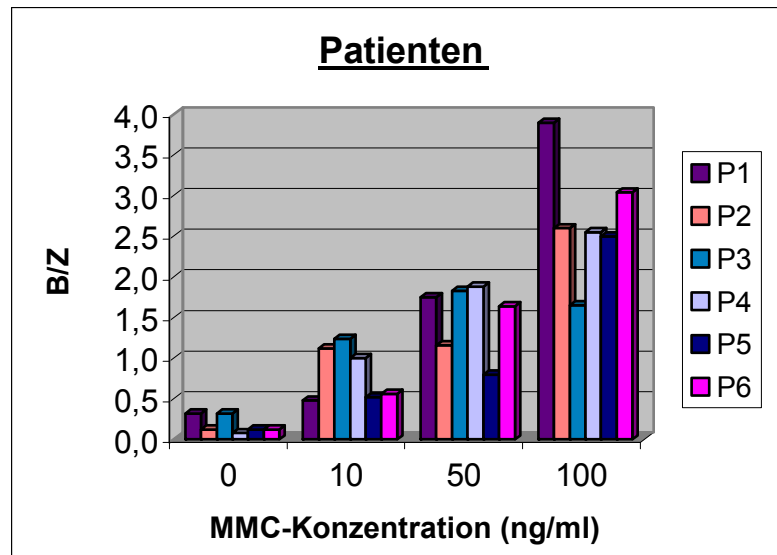


Abb. 17: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Patienten bei Konventioneller Zytogenetik

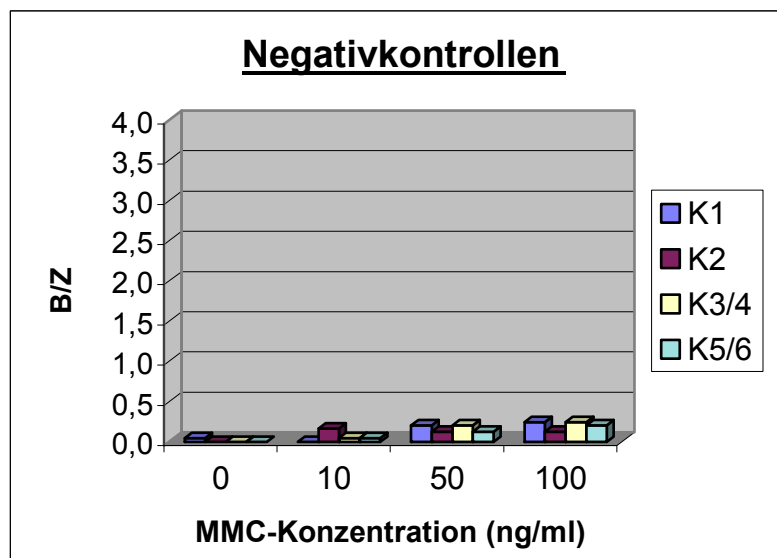


Abb. 18: Bruchereignisse/Zelle (B/Z) bei Negativkontrollen bei Konventioneller Zytogenetik

Die mit steigender Mitomycin C-Konzentration starke Zunahme der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) der Patienten und die nicht im gleichen Maße zunehmende Anzahl an Bruchereignissen pro Zellen (B/Z) der Negativkontrollen führen dazu, dass auch die für die Diagnostik der Fanconi-Anämie wichtige Differenz zwischen Patienten und Negativkontrollen bezüglich der Anzahl an Bruchereignissen pro Zellen (B/Z) mit steigender Mitomycin C-Konzentration zunimmt. Die Tab. 6 zeigt die mit steigender Mitomycin C-Konzentration zu-

nehmende Differenz bezüglich der Anzahl an Bruchereignissen pro Zellen (B/Z) zwischen den Patienten und den jeweilig zugehörigen Negativkontrollen bei den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik.

Tab. 6: Differenz bezüglich B/Z zwischen Patienten und zugehöriger Negativkontrolle

| Patient/Kontrolle | MMC | Differenz B/Z | | |
|-------------------|-----|---------------|-------|--------|
| | | CC | wcp I | wcp II |
| P1 - K1 | 0 | 0.28 | 0.02 | 0.03 |
| | 10 | 0.48 | 0.07 | 0.10 |
| | 50 | 1.55 | 0.30 | 0.29 |
| | 100 | 3.66 | 0.45 | 0.82 |
| P2 - K2 | 0 | 0.12 | 0.0 | 0.0 |
| | 10 | 0.96 | 0.09 | 0.08 |
| | 50 | 1.04 | 0.20 | 0.61 |
| | 100 | 2.48 | 0.41 | 1.94 |
| P3 - K3/4 | 0 | 0.32 | 0.07 | |
| | 10 | 1.20 | 0.14 | |
| | 50 | 1.63 | 0.17 | |
| | 100 | 1.41 | 0.32 | |
| P4 - K3/4 | 0 | 0.08 | 0.02 | |
| | 10 | 0.96 | 0.16 | |
| | 50 | 1.68 | 0.31 | |
| | 100 | 2.31 | 0.56 | |
| P5 - K5/6 | 0 | 0.12 | 0.02 | |
| | 10 | 0.48 | 0.07 | |
| | 50 | 0.68 | 0.18 | |
| | 100 | 2.30 | 0.30 | |
| P6 - K5/6 | 0 | 0.12 | 0.02 | |
| | 10 | 0.52 | 0.02 | |
| | 50 | 1.52 | 0.18 | |
| | 100 | 2.84 | 0.27 | |

CC = konventionelle Zytogenetik; wcp I = whole chromosome painting nach 24 h Mitomycin C-Behandlung; wcp II = whole chromosome painting nach 48 h Mitomycin C-Behandlung; MMC = Mitomycin C; B/Z = Bruchereignisse/Zelle

Diese mit steigender Mitomycin C-Konzentration zunehmende Differenz zwischen Patienten und jeweils zugehöriger Negativkontrollen in Bezug auf die Anzahl an Bruchereignissen pro Zelle (B/Z) bei den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik wird in den Abb. 19-21 deutlich.

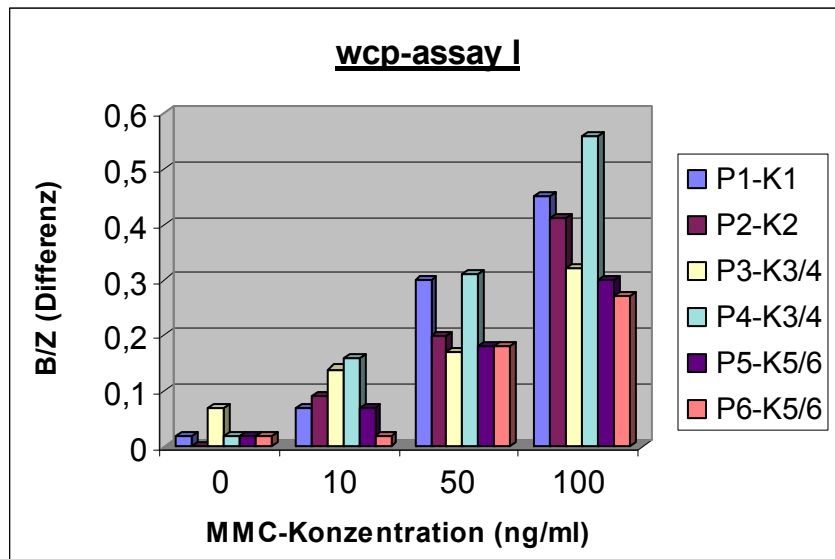


Abb. 19: Differenz zwischen Patient und zugehöriger Negativkontrolle bezüglich B/Z

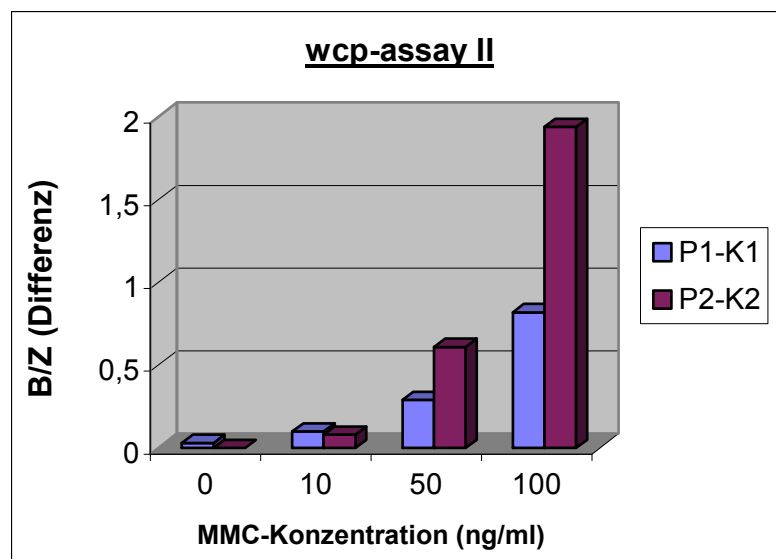


Abb. 20: Differenz zwischen Patient und zugehöriger Negativkontrolle bezüglich B/Z

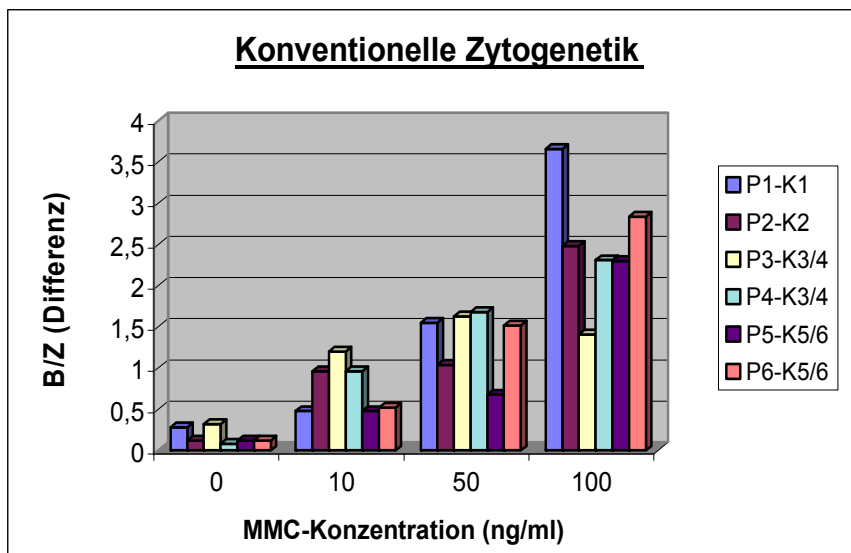


Abb. 21: Differenz zwischen Patient und zugehöriger Negativkontrolle bezüglich (B/Z)

Der Fragestellung folgend wurde anhand dieser Ergebnisse die diagnostische Aussagekraft der wcp-assays untersucht. Anhand der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) konnten mittels wcp-assays I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) alle sechs Patienten und vier Negativkontrollen als solche identifiziert werden. Dies bedeutet, dass anhand des wcp-assays I die sechs Patienten als richtig positiv und die vier zugehörigen Negativkontrollen als richtig negativ eingeschätzt wurden (Tab. 7). Auch über den wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) und die konventionelle Zytogenetik konnten anhand der der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) alle Patienten und Negativkontrollen als solche identifiziert werden. Daraus resultiert, dass beide wcp-assays als auch die konventionelle Zytogenetik in dieser Arbeit in Bezug auf die Diagnose der Fanconi-Anämie eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % erreichten.

Tab. 7: Vierfeldertafel für wcp-assay I

| | | Krankheitsstatus | | Summe |
|-------------|--------|------------------|--------|-------|
| | | FA | Gesund | |
| wcp I-assay | FA | 6 | 0 | 6 |
| | Gesund | 0 | 4 | 4 |
| Summe | | 6 | 4 | 10 |

*wcp I = whole chromosome painting nach 24 h Mitomycin C-Behandlung;
FA = Fanconi-Anämie*

Beim Vergleich zwischen den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik zeigte sich, dass die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) bei der den kompletten Chromosomensatz untersuchenden konventionellen Zytogenetik sowohl bei den Patienten als auch bei den Negativkontrollen höher war als bei den lediglich die Chromosomen 1, 3 und 7 untersuchenden wcp-assays (Tab. 5). Beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C) wiederum zeigten die Patienten und Negativkontrollen eine größere Anzahl an Bruchereignissen pro Zelle (B/Z) als beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C). Auch die Differenz zwischen Patient und zugehöriger Negativkontrolle war bei der konventionellen Zytogenetik am höchsten. Bei dem wcp-assays II (48 Stunden Mitomycin C) war sie zudem größer als bei dem wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C) (Tab. 6).

In Bezug auf den Anstieg der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) bei zunehmender Mitomycin C-Konzentration gab es bei den Patienten eine deutliche Korrelation zwischen der konventionellen Zytogenetik und dem wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung), die sich in dem an die Zahl 1 heranreichenden Korrelationskoeffizienten ausdrückt (Tab. 8). Lediglich bei dem Patienten Patient P3 war aufgrund der Abnahme der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) bei 100 ng/ml Mitomycin C-Behandlung (100 MMC) diese Korrelation nicht so ausgeprägt. Auch bei den Negativkontrollen war diese Korrelation vorhanden. Eine Ausnahme bildete die Negativkontrolle K5/6.

Tab. 8: Korrelation zwischen konventioneller Zytogenetik (CC) und wcp-assay I bezüglich B/Z

| | CC | CC | CC | CC | wcp I | wcp I | wcp I | wcp I | Korrelations-Koeffizient |
|-------------------|-------|--------|--------|---------|-------|--------|--------|---------|--------------------------|
| Patient/Kontrolle | MMC 0 | MMC 10 | MMC 50 | MMC 100 | MMC 0 | MMC 10 | MMC 50 | MMC 100 | |
| P1 | 0.32 | 0.48 | 1.75 | 3.90 | 0.02 | 0.08 | 0.31 | 0.46 | 0.97 |
| P2 | 0.12 | 1.12 | 1.16 | 2.60 | 0.01 | 0.10 | 0.21 | 0.44 | 0.97 |
| P3 | 0.32 | 1.24 | 1.83 | 1.65 | 0.08 | 0.15 | 0.17 | 0.38 | 0.64 |
| P4 | 0.08 | 1.00 | 1.88 | 2.55 | 0.03 | 0.17 | 0.31 | 0.62 | 0.96 |
| P5 | 0.12 | 0.52 | 0.80 | 2.50 | 0.02 | 0.08 | 0.19 | 0.32 | 0.95 |
| P6 | 0.12 | 0.56 | 1.64 | 3.04 | 0.02 | 0.03 | 0.19 | 0.29 | 0.98 |
| K1 | 0.04 | 0.00 | 0.20 | 0.24 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.45 |
| K2 | 0.00 | 0.16 | 0.12 | 0.12 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.19 |
| K3/4 | 0.00 | 0.04 | 0.20 | 0.24 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.06 | 0.54 |
| K5/6 | 0.00 | 0.04 | 0.12 | 0.20 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.92 |

CC = konventionelle Zytogenetik; wcp I = whole chromosome painting nach 24 h Mitomycin C-Behandlung;
MMC = Mitomycin C; B/Z = Bruchereignisse pro Zelle

Auch bei dem Vergleich zwischen wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) und konventioneller Zytogenetik zeigte sich bei den Patienten eine deutliche Korrelation bezüglich der Zunahme Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) bei steigender Mitomycin C -Konzentration (Tab. 9). Auch hier war die Korrelation bei den Negativkontrollen eingeschränkt.

Tab. 9: Korrelation zwischen konventioneller Zytogenetik (CC) und wcp-assay II bezüglich B/Z

| | CC | CC | CC | CC | wcp II | wcp II | wcp II | wcp II | Korrelations- |
|-------------------|-------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|---------|---------------|
| Patient/Kontrolle | MMC 0 | MMC 10 | MMC 50 | MMC 100 | MMC 0 | MMC 10 | MMC 50 | MMC 100 | Koeffizient |
| P1 | 0.32 | 0.48 | 1.75 | 3.90 | 0.03 | 0.11 | 0.30 | 0.84 | 0.99 |
| P2 | 0.12 | 1.12 | 1.16 | 2.60 | 0.02 | 0.10 | 0.63 | 1.95 | 0.93 |
| K1 | 0.04 | 0.00 | 0.20 | 0.24 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.69 |
| K2 | 0.00 | 0.16 | 0.12 | 0.12 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | -0.19 |

CC = konventionelle Zytogenetik; wcp II = whole chromosome painting nach 48 h Mitomycin C-Behandlung; MMC = Mitomycin C; B/Z = Bruchereignisse pro Zelle

Bei dem Vergleich der Patienten zeigte sich, dass der Patient P3 mit klonalen Aberrationen im Knochenmark beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) und der konventionellen Zytogenetik spontan (0 MMC) die höchste Anzahl an Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) aufwies (Tab. 5), bei dem wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) sogar eine 2-3fach höhere als bei den übrigen Patienten. Die zu diesem Patienten zugehörige Negativkontrolle K3/4 zeigte spontan sowohl bei der konventionellen Zytogenetik als auch bei dem wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) keine höhere Anzahl an Bruchereignissen pro Zelle (B/Z) als die übrigen Negativkontrollen. Nach Mitomycin C -Behandlung (10-100 MMC) wies der Patient P3 allerdings nicht mehr den höchsten B/Z-Quotienten auf, hier waren es bei der konventionellen Zytogenetik der Patient P1 und bei den wcp-assays I und II die Patienten P4 bzw. P2 (Tab. 5).

3.3 Aberrante Zellen [%] und Bruchereignisse/aberranter Zellen

Die Tab. 10 zeigt, dass bei den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik bei den Patienten der Prozentsatz der aberranten Zellen (aberrante Zellen (%)) sowohl spontan (0 MMC) als auch bei allen Mitomycin C -Konzentrationen (10-100 MMC) höher lag als bei den Negativkontrollen. Als Ausnahme ist der Patient P2 bei 0 Mitomycin C zu nennen.

Tab. 10: Aberrante Zellen [%], Brüche/aberrante Zelle bei konventioneller Zytogenetik und wcp-assays

| Patient/Kontrolle | MMC | Aberrante Zellen in [%] | | | Brüche/aberrante Zelle | | |
|-------------------|-----|-------------------------|-------|--------|------------------------|-------|--------|
| | | CC | wcp I | wcp II | CC | wcp I | wcp II |
| P1 | 0 | 28.0 | 2.0 | 2.5 | 1.14 | 1.0 | 1.0 |
| | 10 | 40.0 | 7.1 | 9.9 | 1.20 | 1.06 | 1.15 |
| | 50 | 76.0 | 22.1 | 23.7 | 2.33 | 1.38 | 1.27 |
| | 100 | 88.0 | 27.0 | 41.8 | 4.56 | 1.71 | 2.0 |
| P2 | 0 | 12.0 | 0.9 | 2.1 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| | 10 | 60.0 | 9.0 | 7.7 | 1.87 | 1.11 | 1.35 |
| | 50 | 60.0 | 17.4 | 34.7 | 1.93 | 1.22 | 1.81 |
| | 100 | 76.0 | 28.8 | 75.4 | 3.42 | 1.52 | 2.58 |
| P3 | 0 | 28.0 | 5.5 | - | 1.14 | 1.41 | - |
| | 10 | 56.0 | 13.0 | - | 2.21 | 1.16 | - |
| | 50 | 72.0 | 14.3 | - | 2.59 | 1.17 | - |
| | 100 | 78.0 | 20.9 | - | 2.24 | 1.83 | - |
| P4 | 0 | 8.0 | 2.7 | - | 1.0 | 1.20 | - |
| | 10 | 48.0 | 11.0 | - | 2.08 | 1.50 | - |
| | 50 | 60.0 | 23.4 | - | 3.21 | 1.33 | - |
| | 100 | 84.0 | 29.4 | - | 3.19 | 2.10 | - |
| P5 | 0 | 8.0 | 2.5 | - | 1.50 | 1.0 | - |
| | 10 | 44.0 | 6.7 | - | 1.18 | 1.17 | - |
| | 50 | 40.0 | 15.0 | - | 2.0 | 1.26 | - |
| | 100 | 72.0 | 24.5 | - | 3.53 | 1.32 | - |
| P6 | 0 | 16.0 | 2.1 | - | 0.75 | 1.17 | - |
| | 10 | 36.0 | 2.6 | - | 1.56 | 1.17 | - |
| | 50 | 64.0 | 17.1 | - | 2.56 | 1.10 | - |
| | 100 | 84.0 | 22.4 | - | 3.65 | 1.28 | - |
| K1 | 0 | 4.0 | 0.0 | 0.5 | 1.0 | 0.0 | 1.0 |
| | 10 | 0.0 | 0.7 | 1.2 | 0.0 | 1.0 | 1.0 |
| | 50 | 20.0 | 1.2 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| | 100 | 12.0 | 1.2 | 1.8 | 2.0 | 1.0 | 1.0 |
| K2 | 0 | 0.0 | 1.4 | 1.4 | 0.0 | 1.0 | 1.50 |
| | 10 | 8.0 | 0.6 | 1.1 | 2.0 | 2.0 | 1.50 |
| | 50 | 8.0 | 1.0 | 1.7 | 1.50 | 1.33 | 1.25 |
| | 100 | 12.0 | 2.5 | 1.3 | 1.0 | 1.25 | 1.0 |
| K3/4 | 0 | 0.0 | 1.3 | - | 0.0 | 1.0 | - |
| | 10 | 4.0 | 1.2 | - | 1.0 | 1.0 | - |
| | 50 | 16.0 | 0.0 | - | 1.25 | 0.0 | - |
| | 100 | 16.0 | 5.6 | - | 1.50 | 1.09 | - |
| K5/6 | 0 | 0.0 | 0.4 | - | 0.0 | 1.0 | - |
| | 10 | 4.0 | 0.9 | - | 1.0 | 1.0 | - |
| | 50 | 8.0 | 0.5 | - | 1.50 | 1.0 | - |
| | 100 | 16.0 | 1.9 | - | 1.25 | 1.0 | - |

CC = konventionelle Zytogenetik; wcp I = whole chromosome painting nach 24 h Mitomycin C-Behandlung; wcp II = whole chromosome painting nach 48 h Mitomycin C-Behandlung; MMC = Mitomycin C;

Mit steigender Mitomycin C -Konzentration stieg der Prozentsatz aberranter Zellen der Patienten bei den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik stark an. Der Prozentsatz der aberranten Zellen stieg bei den Negativkontrollen mit steigender Mitomycin C -Konzentration allenfalls leicht. Dieser bei Patienten mit steigender Mitomycin C -Konzentration zunehmende Prozentsatz aberranter Zellen bei den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik wird in den Abb. 22-27 veranschaulicht.

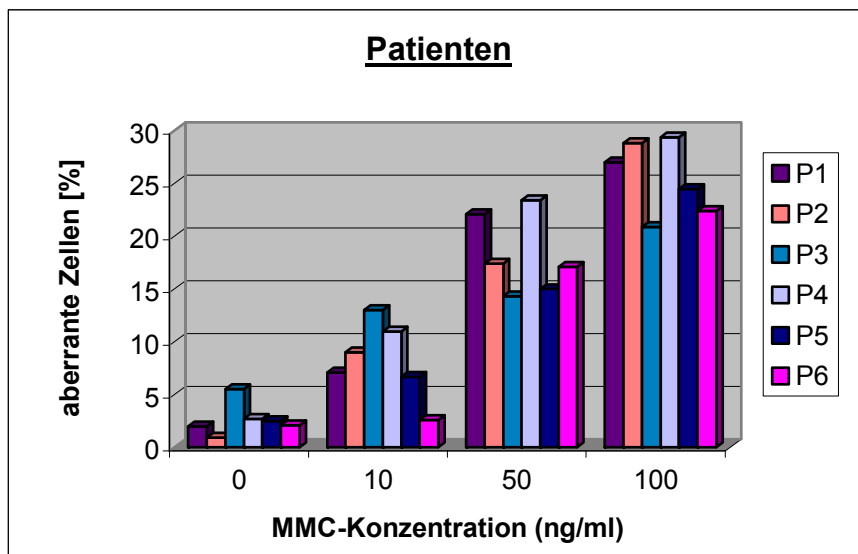


Abb. 22: Aberrante Zellen [%] beim wcp-assay I (Patienten)

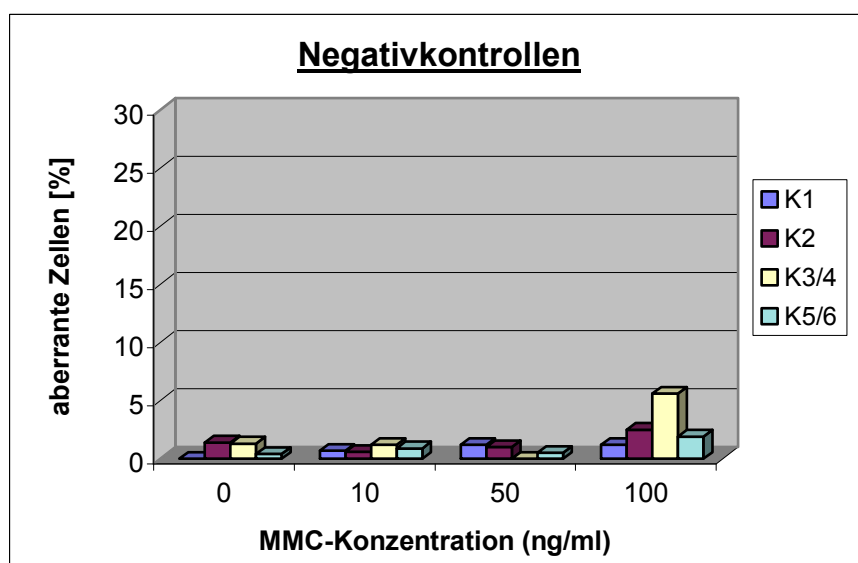


Abb. 23: Aberrante Zellen [%] beim wcp-assay I (Negativkontrollen)

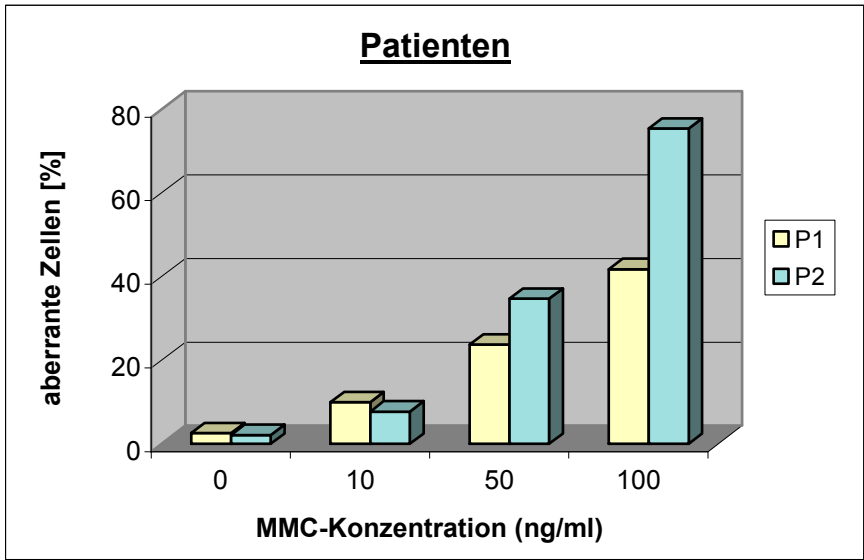


Abb. 24: Aberrante Zellen [%] beim wcp-assay II (Patienten)

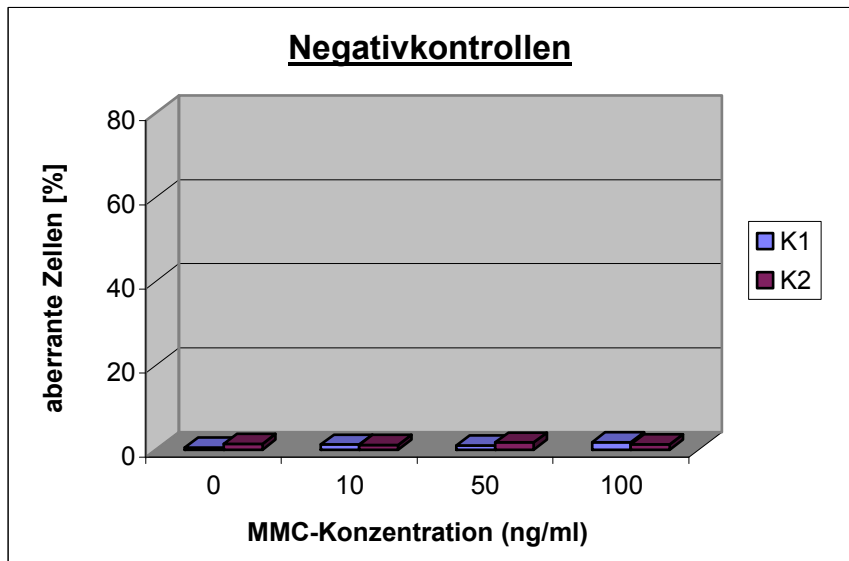


Abb. 25: Aberrante Zellen [%] beim wcp-assay II (Negativkontrollen)

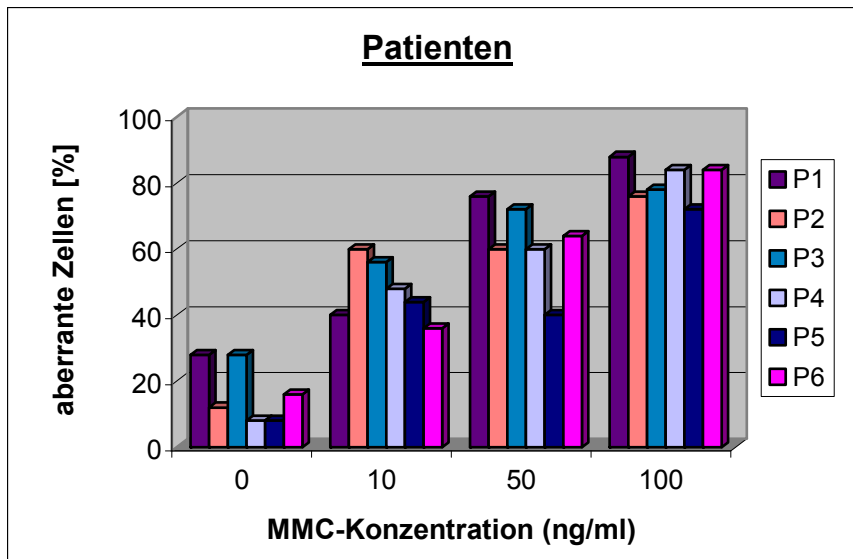


Abb. 26: Aberrante Zellen [%] bei konventioneller Zytogenetik (Patienten)

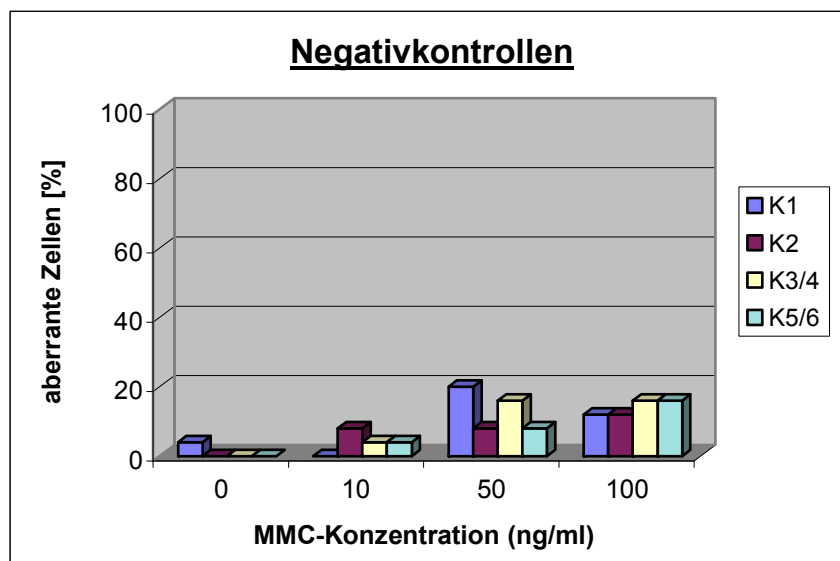


Abb. 27: Aberrante Zellen [%] bei konventioneller Zytogenetik (Negativkontrollen)

Beim Vergleich zwischen den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik zeigte sich, dass der Prozentsatz aberranter Zellen bei den Patienten bei der konventionellen Zytogenetik am höchsten war. Der Prozentsatz lag bei den Patienten außerdem beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) höher als beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung).

Die Tab. 10 zeigt zudem, dass bei der Anzahl der Bruchereignisse pro aberranter Zelle (B/aberr. Zelle) der Unterschied zwischen FA-Patienten und Negativkontrollen sowohl bei der konventionellen Zytogenetik als auch bei den wcp-assays weniger deutlich war. Erst bei einer Konzentration von 100 ng/ml Mitomycin C zeigten alle FA-Patienten beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) mehr Bruchereignisse pro aberranter Zelle als die Negativkontrollen. Auch bei der konventionellen Zytogenetik und dem wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) zeigten die Patienten erst bei den Konzentrationen von 50 ng/ml und 100 ng/ml Mitomycin C deutlich mehr Bruchereignisse als die Negativkontrollen. Die erst mit der Konzentration von 100 ng/ml Mitomycin C deutliche Differenz zwischen Patienten und Negativkontrollen verdeutlichen die Abb. 28-33.

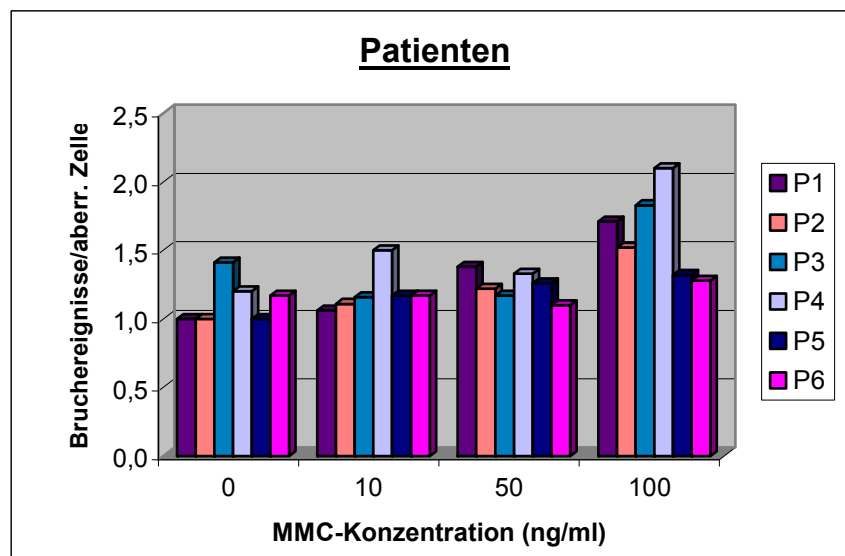


Abb. 28: Bruchereignisse pro aberrante Zelle beim wcp-assay I (Patienten)

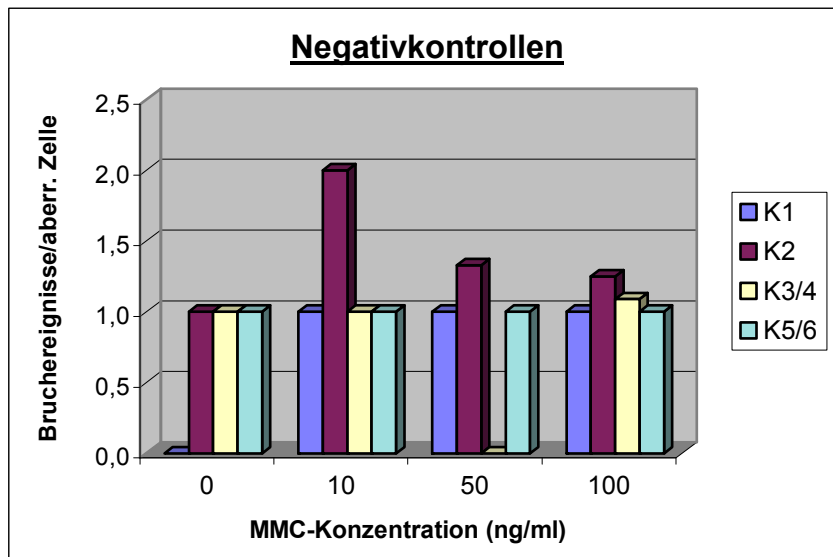


Abb. 29: Bruchereignisse pro aberrante Zelle beim wcp-assay I (Negativkontrollen)

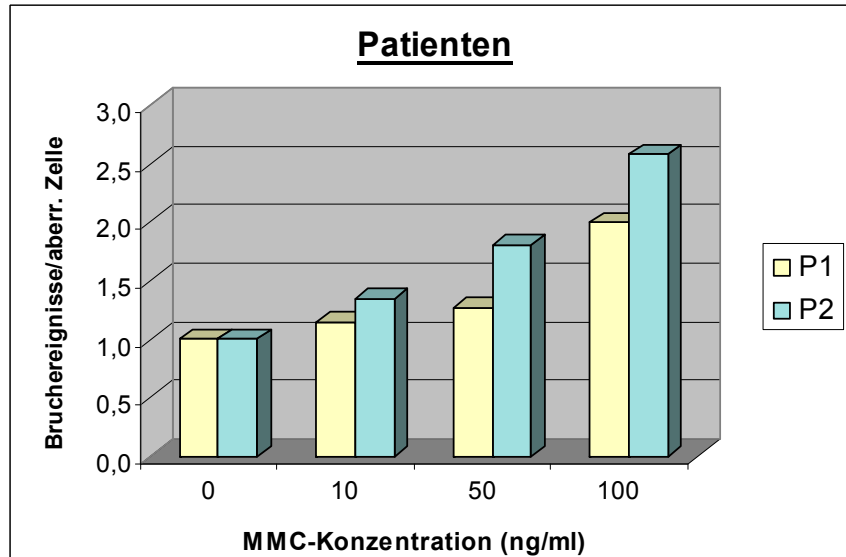


Abb. 30: Bruchereignisse pro aberrante Zelle beim wcp-assay II (Patienten)

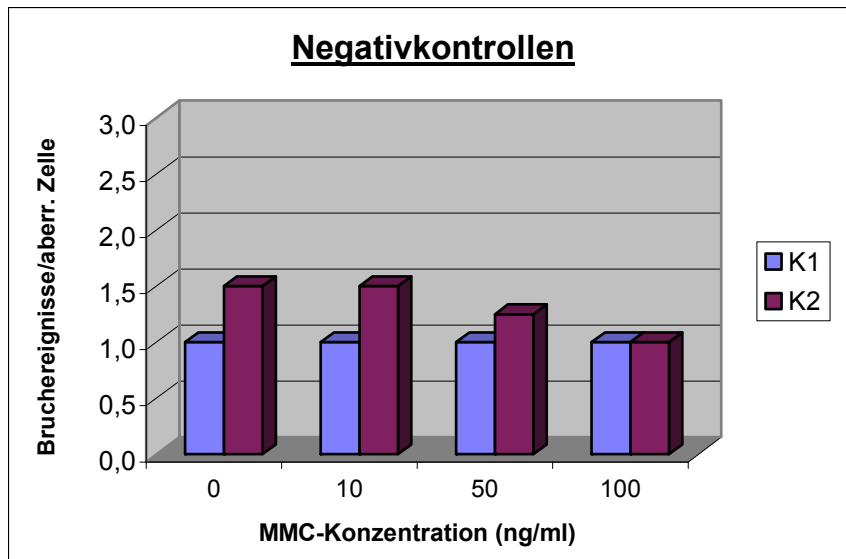


Abb. 31: Bruchereignisse pro aberrante Zelle, wcp-assay II (Negativkontrollen)

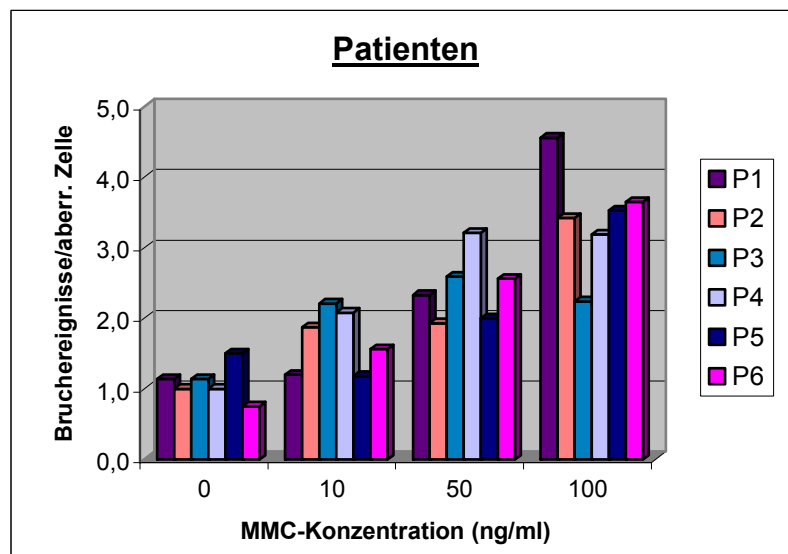


Abb. 32: Bruchereignisse pro aberranter Zelle, konventionelle Zytogenetik (Patienten)

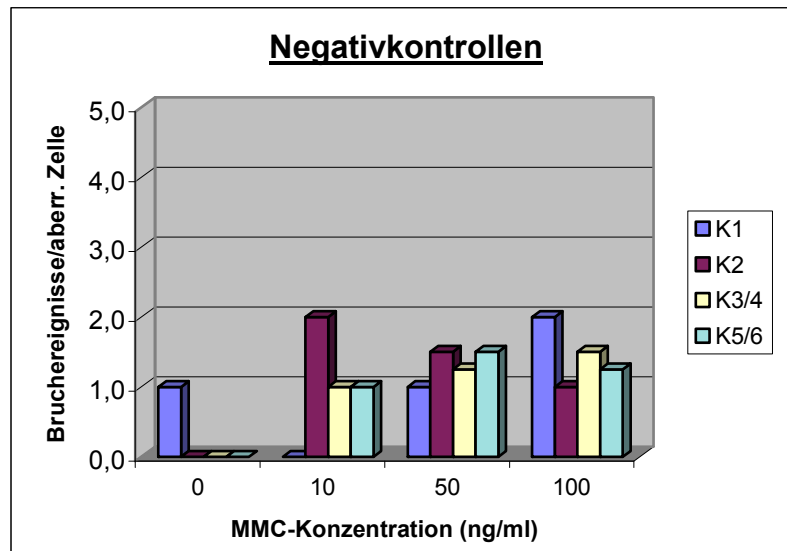


Abb. 33: Bruchereignisse pro aberranter Zelle bei konventioneller Zytogenetik (Negativkontrollen)

3.4 Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7

Die Bruchhäufigkeit beschreibt in dieser Arbeit, in welchem Verhältnis die Chromosomen 1, 3 und 7 an der Gesamtzahl der Bruchereignisse beteiligt waren. Die Tab. 11 zeigt, dass beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) bei den Patienten eine deutliche lineare Korrelation zwischen der Bruchhäufigkeit und der Größe der Chromosomen 1, 3 und 7 bestand. Dies lässt sich aus dem nahe an den Wert 1 heranreichenden Korrelationskoeffizienten erkennen. So wies bei allen Patienten das größte Chromosom, das Chromosom 1, die meisten Bruchereignisse auf. Bei vier von sechs Patienten brach das zweitgrößte Chromosom, das Chromosom 3, auch am zweithäufigsten. Lediglich bei den Patienten P3 und P4 wies das Chromosom 7 ähnlich viele Bruchereignisse wie das Chromosom 3 auf. Deshalb ist die Korrelation bei diesen Patienten etwas niedriger. Bei den vier Negativkontrollen ist bei einer insgesamt sehr geringen Anzahl an Bruchereignissen der Korrelationskoeffizient zwischen Größe und Bruchhäufigkeit zumeist niedriger. Bei der Negativkontrolle K5/6 war eine umgekehrte Korrelation zu beobachten.

Tab. 11: Korrelation von Bruchhäufigkeit und Chromosomengröße beim wcp-assay I

| Patient/Kontrolle | MMC | Bruchverhältnis | | | Größe in Mbp | | | Korrelations-Koeffizient |
|-------------------|--------------|-----------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------------------|
| | | Chr. 1 | Chr. 3 | Chr. 7 | Chr. 1 | Chr. 3 | Chr. 7 | |
| P1 | 0-100 | 2.0 | 1.5 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 1.00 |
| P2 | 0-100 | 2.6 | 1.6 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.99 |
| P3 | 0-100 | 1.3 | 1.0 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.87 |
| P4 | 0-100 | 1.4 | 1.0 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.87 |
| P5 | 0-100 | 2.5 | 1.3 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.95 |
| P6 | 0-100 | 2.7 | 1.4 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.96 |
| K1 | 0-100 | 1.3 | 0.3 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.29 |
| K2 | 0-100 | 1.2 | 1.5 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.40 |
| K3/4 | 0-100 | 3.7 | 0.5 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.78 |
| K5/6 | 0-100 | 0.5 | 0.7 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | -0.99 |

wcp-assay I = whole chromosome painting nach 24 h Mitomycin C-Behandlung; MMC = Mitomycin C; Chr. = Chromosom; Mbp = Megabasenpaare

In der Abb. 34 wird der Mittelwert der Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 aller Patienten dargestellt.

Die Abb. 34 zeigt, dass das Chromosom 1 bei den Patienten mit Abstand die meisten Bruchereignisse aufwies, gefolgt von den Chromosomen 3 und 7.

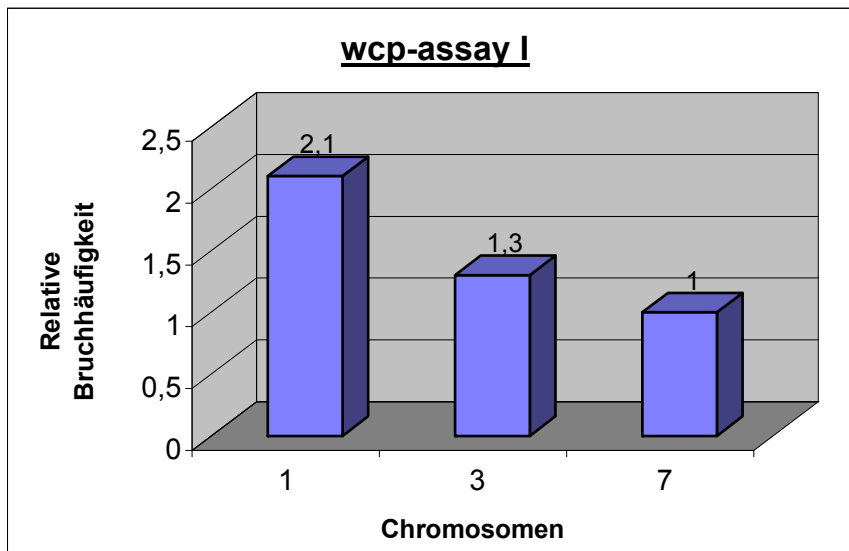


Abb. 34: Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 beim wcp-assay I (Patienten)

Auch beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) bestand bei den Patienten eine starke lineare Korrelation zwischen Chromosomengröße und Bruchhäufigkeit der einzelnen Chromosomen (Tab. 12). Diese deutliche Korrelation bestand auch bei der Negativkontrolle K1, während sie bei der Negativkontrolle K2 eingeschränkt war.

Tab. 12: Korrelation von Bruchhäufigkeit und Chromosomengröße beim wcp-assay II

| Patient/Kontrolle | MMC | Bruchverhältnis | | | Größe in Mbp | | | Korrelations-Koeffizient |
|-------------------|--------------|-----------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------------------|
| | | Chr. 1 | Chr. 3 | Chr. 7 | Chr. 1 | Chr. 3 | Chr. 7 | |
| P1 | 0-100 | 3.1 | 1.6 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.97 |
| P2 | 0-100 | 1.9 | 1.4 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 1.00 |
| K1 | 0-100 | 8.0 | 4.0 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 1.00 |
| K2 | 0-100 | 1.2 | 0.6 | 1.0 | 249 | 198 | 159 | 0.33 |

wcp II = whole chromosome painting nach 48 h Mitomycin C-Behandlung; MMC = Mitomycin C; Chr. = Chromosom; Mbp = Megabasenpaare

In der Abb. 35 wird der Mittelwert der Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) dargestellt. Die Abb. 35 zeigt, dass das Chromosom 1 bei den Patienten am häufigsten brach, gefolgt von den Chromosomen 3 und 7.

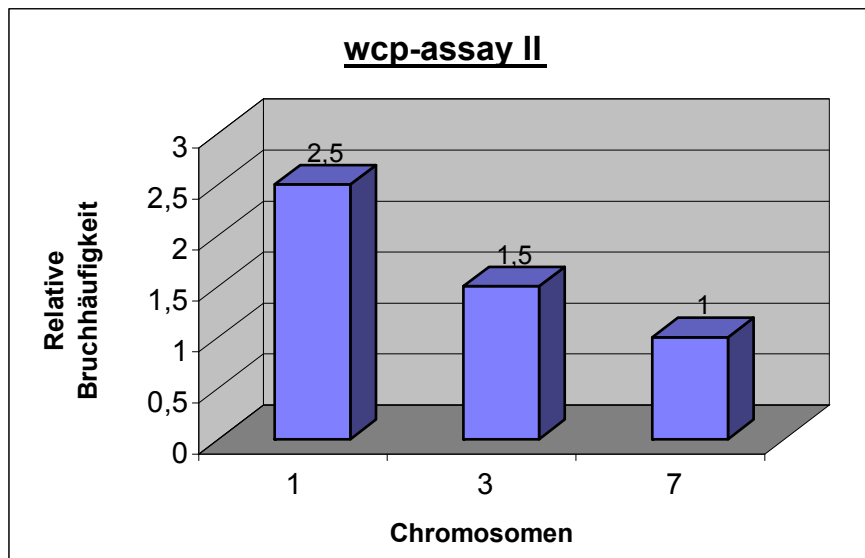


Abb. 35: Bruchhäufigkeit Chromosomen 1, 3 und 7 beim wcp-assay II (Patienten)

3.5 Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen bei wcp-assays und konventioneller Zytogenetik

Beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) zeigten bis auf P1 die Patienten spontan (0 MMC) vornehmlich Translokationen und Chromosomenbrüche. Beim Patienten P1 konnten spontan hauptsächlich Deletionen und Chromosomenbrüche festgestellt werden (Tab. 13). Nach Mitomycin C -Behandlung (10-100 MMC) wiesen die FA-Patienten hauptsächlich Reunionsfiguren und Chromatidbrüche auf. Die Negativkontrollen zeigten spontan hauptsächlich Translokationen. Auch bei 10-100 ng/ml Mitomycin C stellten die Translokationen den größten Anteil der Aberrationen. Zusätzlich erhöhte sich hier im Vergleich zur spontanen Brüchigkeit (0 MM) der Anteil an Deletionen und Chromosomenbrüchen.

Tab. 13: Verteilung der Aberrationstypen beim wcp-assay I in %

| Patient/Kontrolle | MMC | t | rb | csb | ctb | del | dup |
|-------------------|---------------|-------|------|------|------|------|------|
| P1 | 0 | 0.0 | 25.0 | 25.0 | 0.0 | 50.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 7.4 | 44.3 | 23.0 | 19.7 | 4.9 | 0.8 |
| P2 | 0 | 50.0 | 0.0 | 50.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 5.6 | 50.5 | 11.2 | 25.0 | 6.6 | 1.0 |
| P3 | 0 | 41.9 | 6.5 | 22.6 | 9.7 | 9.7 | 9.7 |
| | 10-100 | 11.7 | 43.6 | 18.1 | 27.0 | 0.0 | 0.0 |
| P4 | 0 | 33.3 | 16.7 | 16.7 | 16.7 | 16.7 | 0.0 |
| | 10-100 | 6.8 | 42.3 | 21.7 | 27.3 | 1.9 | 0.0 |
| P5 | 0 | 36.4 | 9.1 | 18.2 | 18.2 | 9.1 | 9.1 |
| | 10-100 | 11.8 | 35.7 | 14.5 | 25.5 | 8.0 | 3.0 |
| P6 | 0 | 28.6 | 0.0 | 14.3 | 28.6 | 14.3 | 14.3 |
| | 10-100 | 3.5 | 31.0 | 18.1 | 38.8 | 7.8 | 0.9 |
| K1 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 25.0 | 12.5 | 25.0 | 12.5 | 25.0 | 0.0 |
| K2 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 76.9 | 7.7 | 0.0 | 0.0 | 15.4 | 0.0 |
| K3/4 | 0 | 60.0 | 0.0 | 0.0 | 20.0 | 0.0 | 20.0 |
| | 10-100 | 6.3 | 18.8 | 31.3 | 6.3 | 18.8 | 18.8 |
| K5/6 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 36.4 | 0.0 | 36.4 | 0.0 | 27.3 | 0.0 |

wcp I = whole chromosome painting nach 24 h MMC-Behandlung; MMC = Mitomycin C; t = Translokation; rb = Reunionsfigur; csb = Chromosomenbruch; ctb = Chromatidbruch; del = Deletion; dup = Duplikation

Die folgenden Abbildungen zeigen die Verteilung der Aberrationstypen bei Patienten sowohl spontan als auch nach der Behandlung mit 10-100 ng/ml Mitomycin C. In diesen Abbildungen wird jeweils der Mittelwert aller Patienten beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) dargestellt.

Die Abb. 36 veranschaulicht, dass spontan (0 MMC) die Translokationen (t) mit 31 % bei den Patienten häufigste Aberration darstellten. Auch Chromosomenbrüche (csb) und Deletionen (del) konnten häufig beobachtet werden. Die Reunionsfiguren (rb) spielten mit 10 % eine untergeordnete Rolle.

Die Abb. 37 zeigt, dass bei den Mitomycin C -Konzentrationen von 10-100 ng/ml die Reunionsfigur (rb) mit 40 % den häufigsten Aberrationstyp darstellte. Chromatidbrüche (ctb) waren ebenfalls zahlreich vorhanden. Die Translokation (t) konnte bei 10-100 Mitomycin C mit 7 % nur selten beobachtet werden.

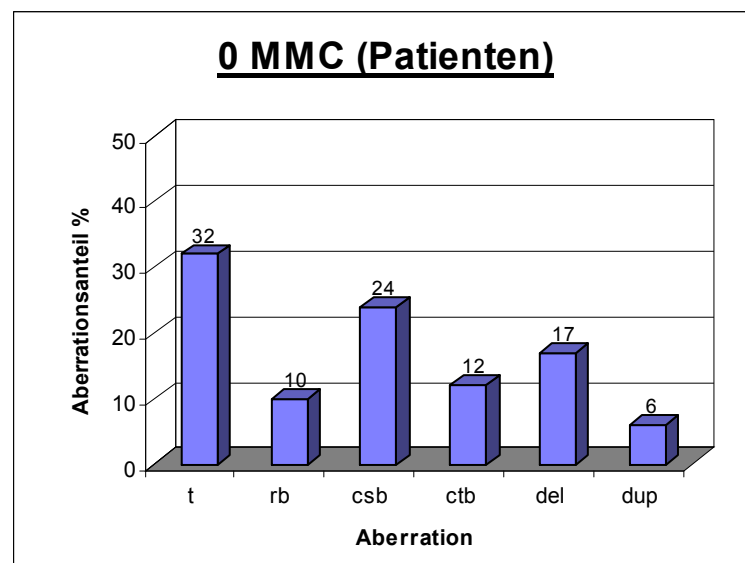


Abb. 36: Spontane Verteilung der Aberrationstypen beim wcp-assay I (24 h MMC)

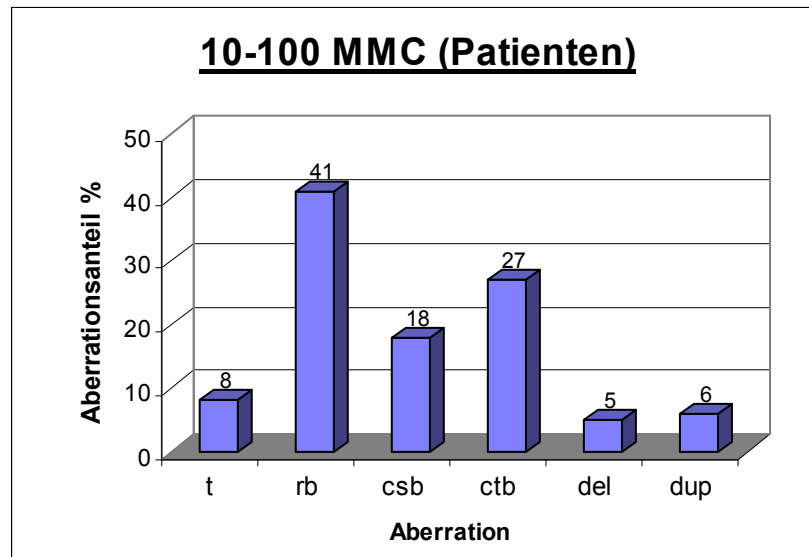


Abb. 37: Verteilung der Aberrationstypen nach MMC-Behandlung beim wcp-assay I (24 h MMC)

Beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) zeigten die zwei Patienten spontan (0 MMC) Chromatidbrüche und Deletionen und nach Mitomycin C -Behandlung (10-100 MMC) vornehmlich Reunionsfiguren und Chromatidbrüche (Tab. 14). Bei den Negativkontrollen konnten spontan nur Translokationen und nach Mitomycin C -Behandlung hauptsächlich Translokationen, Deletionen und Chromatidbrüche festgestellt werden (Tab. 14).

Tab. 14: Verteilung der Aberrationstypen beim wcp-assay II in %

| Patient/Kontrolle | MMC | t | rb | csb | ctb | del | dup |
|-------------------|--------|-------|------|------|------|------|------|
| P1 | 0 | 14.3 | 14.3 | 57.1 | 0.0 | 14.3 | 0.0 |
| | 10-100 | 7.6 | 32.2 | 16.1 | 34.8 | 8.5 | 0.9 |
| P2 | 0 | 0.0 | 0.0 | 20.0 | 20.0 | 60.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 4.8 | 45.6 | 17.8 | 27.0 | 3.6 | 1.3 |
| K1 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 16.7 | 0.0 | 33.3 | 8.3 | 41.7 | 0.0 |
| K2 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 40.0 | 0.0 | 20.0 | 0.0 | 30.0 | 10.0 |

wcp II = whole chromosome painting nach 48 h MMC-Behandlung; MMC = Mitomycin C; t = Translokation; rb = Reunionsfigur; csb = Chromosomenbruch; ctb = Chromatidbruch; del = Deletion; dup = Duplikation

Die folgenden Abbildungen zeigen die Verteilung der Aberrationstypen bei Patienten sowohl spontan (0 MMC) als auch nach 10-100 ng/ml Mitomycin C-Behandlung (10-100 MMC). In diesen Abbildungen wird jeweils der Mittelwert aller Patienten beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) dargestellt.

Die Abb. 38 veranschaulicht, dass bei den Patienten spontan (0 MMC) die Chromosomenbrüche (csb) und Deletionen (del) die häufigsten Aberrationen waren. Die Reunionsfiguren (rb) spielten mit 7 % eine untergeordnete Rolle.

Bei einer Konzentration von 10-100 ng/ml Mitomycin C waren die Reunionsfiguren (rb) mit 39 % die häufigste Chromosomenaberration. Die Chromatidbrüche (ctb) bildeten mit 31 % den zweitgrößten Anteil (Abb. 39).

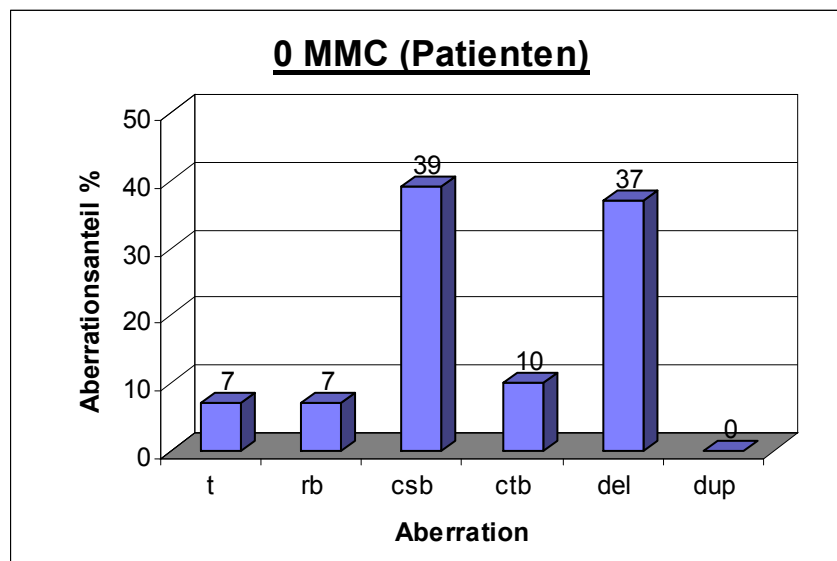


Abb. 38: Spontane Verteilung der Aberrationstypen beim wcp-assay II (48 h MMC)

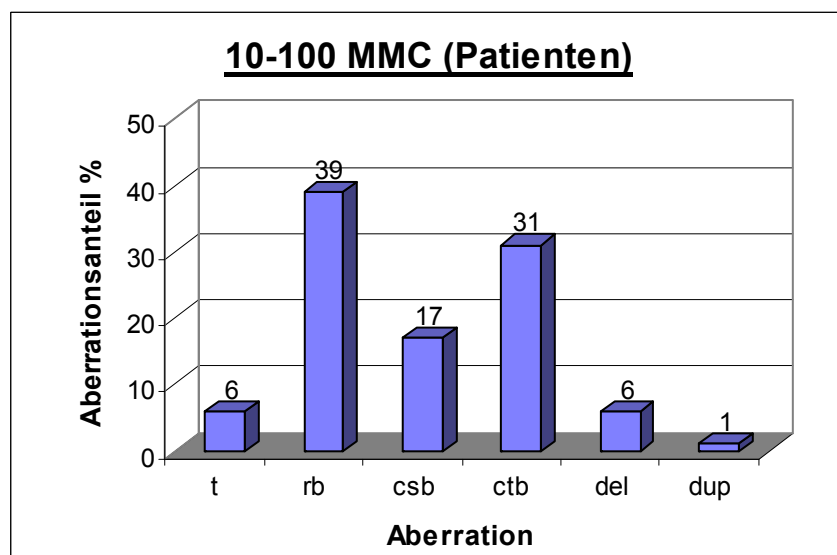


Abb. 39: Verteilung der Aberrationstypen nach MMC-Behandlung beim wcp-assay II (48 h MMC)

Bei der konventionellen Zytogenetik zeigten die FA-Patienten spontan (0 MMC) und nach Mitomycin C -Behandlung hauptsächlich Chromatidbrüche. Nach Mitomycin C -Behandlung (10-100 MMC) zeigten sie zudem auch einen hohen Reunionsfiguren-Anteil (Tab. 15). Bei den Negativkontrollen wies spontan (0 MMC) lediglich K1 Chromosomenaberrationen, nämlich Chromatidbrüche, auf. Nach Mitomycin C -Behandlung (10-100 MMC) zeigten die Negativkontrollen bei der konventionellen Zytogenetik hauptsächlich Chromatidbrüche, desweiteren noch Chromosomenbrüche und Reunionsfiguren.

Tab. 15: Verteilung der Aberrationstypen bei der konventionellen Zytogenetik in %

| Patient/Kontrolle | MMC | t | rb | csb | ctb | dic | ace |
|-------------------|--------|------|------|------|-------|-----|------|
| P1 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 75.0 | 0.0 | 25.0 |
| | 10-100 | 0.0 | 27.1 | 5.6 | 60.7 | 0.9 | 5.6 |
| P2 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 0.0 | 45.2 | 2.4 | 45.2 | 2.4 | 4.8 |
| P3 | 0 | 0.0 | 0.0 | 25.0 | 75.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 0.0 | 11.9 | 10.9 | 73.3 | 0.0 | 4.0 |
| P4 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 0.0 | 23.5 | 7.1 | 62.2 | 0.0 | 7.1 |
| P5 | 0 | 0.0 | 0.0 | 33.3 | 66.7 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 0.0 | 16.3 | 6.3 | 76.3 | 0.0 | 1.3 |
| P6 | 0 | 0.0 | 0.0 | 33.3 | 66.7 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 0.0 | 13.3 | 14.2 | 71.7 | 0.0 | 0.9 |
| K1 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 0.0 | 22.2 | 11.1 | 55.6 | 0.0 | 11.1 |
| K2 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 12.5 | 12.5 | 0.0 | 75.0 | 0.0 | 0.0 |
| K3/4 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 0.0 | 20.0 | 20.0 | 60.0 | 0.0 | 0.0 |
| K5/6 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10-100 | 0.0 | 0.0 | 33.3 | 66.7 | 0.0 | 0.0 |

MMC = Mitomycin C; t = Translokation; rb = Reunionsfigur; csb = Chromosomenbruch; ctb = Chromatidbruch; dic = dizentrisches Chromosom; ace = azentrisches Fragment

Die folgenden Abbildungen zeigen die Verteilung der Aberrationstypen bei Patienten sowohl spontan (0 MMC) als auch nach Behandlung mit 10-100 ng/ml Mitomycin C. In diesen Abbildungen wird jeweils der Mittelwert aller Patienten bei der konventionellen Zytogenetik dargestellt.

Die Abb. 40 verdeutlicht, dass die Chromatidbrüche (ctb) spontan (0 MMC) den Hauptanteil der Aberrationen bei den Patienten ausmachten.

Bei den Konzentrationen 10-100 ng/ml Mitomycin C bildeten die Chromatidbrüche (ctb) mit 64 % weiterhin den Hauptanteil der Aberrationen der Patienten. Allerdings hat der Anteil der Reunionsfiguren (rb) mit 23 % im Vergleich zur spontanen Verteilung der Aberrationen deutlich zugenommen (Abb. 41).

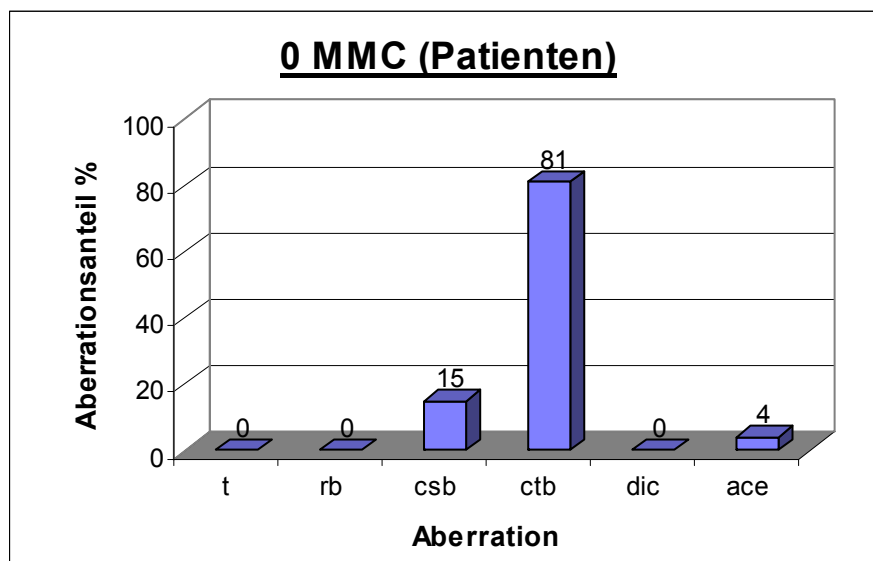


Abb. 40: Spontane Verteilung der Aberrationstypen beim bei konventioneller Zytogenetik

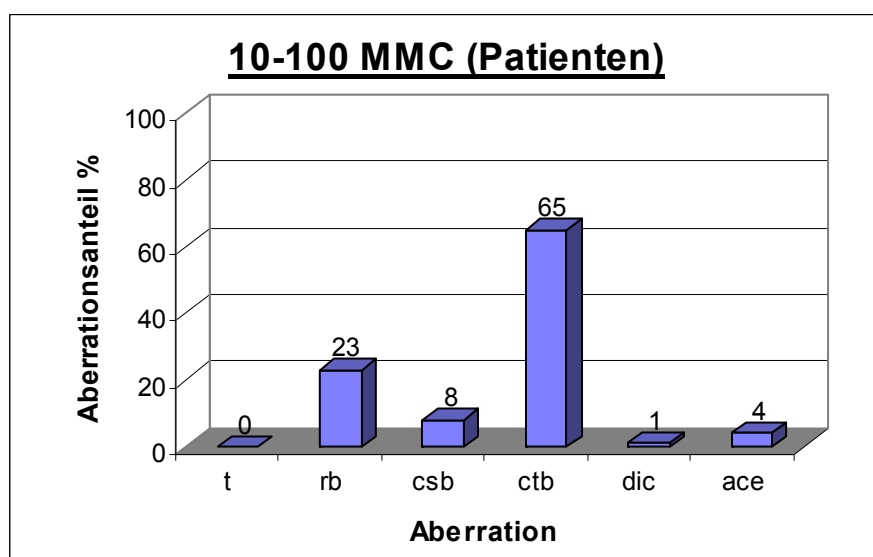


Abb. 41: Verteilung der Aberrationstypen nach MMC-Behandlung bei konventioneller Zytogenetik

Der folgende Abschnitt fasst die wichtigsten Ergebnisse bezüglich der Verteilung der Aberrationstypen zusammen und vergleicht die Ergebnisse der wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Mitomycin C -Konzentrationen zeigten sich bei den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik sowohl bei Patienten als auch bei Negativkontrollen Unterschiede zwischen spontaner (0 MMC) und Mitomycin C -induzierter (10-100 MMC) Verteilung der Aberrationstypen. Die Art der Unterschiede zwischen spontaner und Mitomycin C -induzierter Verteilung der Aberrationstypen variierte sowohl zwischen Patienten und Negativkontrollen als auch zwischen den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik. Mit Ausnahme der Negativkontrollen beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C -Behandlung), war aber den Patienten und Negativkontrollen sowohl bei den wcp-assays als auch der konventionellen Zytogenetik gemeinsam, dass sie nach Mitomycin C -Behandlung (10-100 MMC) der Zellen einen zum Teil deutlich höheren Anteil an Reunionsfiguren als spontan (0 MMC) aufwiesen.

Beim Vergleich der Verteilung der Aberrationstypen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen der wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik. Vor allem die über die wcp-assays häufig beobachteten Translokationen und Deletionen bei Patienten und Negativkontrollen konnten mit der konventionellen Zytogenetik nur in sehr geringem Maße festgestellt werden. Andererseits wurden bei der konventionellen Zytogenetik sowohl bei den Patienten als auch den Negativkontrollen häufiger Chromatidbrüche gefunden. Die zwei wcp-assays zeigten bezüglich der Verteilung der Aberrationstypen große Ähnlichkeit.

Beim Vergleich zwischen Patienten und Negativkontrollen zeigten sich sowohl bei den wcp-assays als auch bei der konventionellen Zytogenetik Unterschiede in der Verteilung der Aberrationstypen zwischen Patienten und Negativkontrollen. Im Vergleich zu den Negativkontrollen zeigten die FA-Patienten bei den wcp-assays spontan (0 MMC) einen deutlich höheren Anteil an Chromosomenbrüchen und Deletionen und nach Mitomycin C -Behandlung (10-100 MMC) der Zellen einen erheblich höheren Anteil an Reunionsfiguren und Chromatidbrüchen.

Die Patienten verschiedener Alters- und Komplementationsgruppen (A und C) und unterschiedlichen Geschlechts zeigten eine ähnliche Verteilung der Aberrationstypen. Auch der Patient P3 mit klonalen Aberrationen, unter anderem des Segments 3q26q29, im Knochenmark unterschied sich nicht von den übrigen Patienten.

3.6 Verteilung der Aberrationstypen (Chromosomen 1, 3 und 7 isoliert)

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Verteilung der Aberrationstypen bei der konventionellen Zytogenetik und bei den wcp-assays I und II erfasst. Bei der konventionellen Zytogenetik wurden dabei die Aberrationen aller Chromosomen zusammengefasst. Bei den wcp-assays wurden die Aberrationen der Chromosomen 1, 3 und 7 zusammengefasst. Diese drei Chromosomen wurden auch isoliert voneinander mittels wcp-assays I und II auf ihre Verteilung der Aberrationstypen hin untersucht. Dieses Kapitel legt die Ergebnisse dieser Untersuchungen dar. Im Gegensatz zum vorangegangenen Kapitel wurde dabei nicht zwischen spontaner Brüchigkeit (0 MMC) und Mitomycin C-induzierter Brüchigkeit (10-100 MMC) unterschieden. Dies liegt an der größtenteils sehr geringen spontanen (0 MMC) Aberrationszahl.

Die Untersuchung des Chromosom 1 mittels wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) zeigte, dass bei den Patienten die Reunionsfiguren die häufigste Aberration darstellte (Tab. 16). Daneben waren auch Chromatid- und Chromosomenbrüche bei den Patienten häufig (Tab. 16). Bei den Negativkontrollen wurde dagegen bei niedriger Aberrationszahl keine einheitliche Verteilung der Aberrationstypen beobachtet. Deletionen und Translokationen waren bei den Negativkontrollen am häufigsten zu finden. Die bei den Patienten am häufigsten auftretenden Reunionsfiguren spielten bei den Negativkontrollen nur eine untergeordnete Rolle.

Tab. 16: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 1 beim wcp-assay I in %

| Patient/Kontrolle | MMC | t | rb | csb | ctb | del | dup |
|--------------------------|--------------|----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| P1 | 0-100 | 7.0 | 43.9 | 24.6 | 14.0 | 8.8 | 1.8 |
| P2 | 0-100 | 4.1 | 48.0 | 13.3 | 23.5 | 9.2 | 2.0 |
| P3 | 0-100 | 12.0 | 42.0 | 22.0 | 16.0 | 2.0 | 6.0 |
| P4 | 0-100 | 10.4 | 34.3 | 25.4 | 26.9 | 3.0 | 0.0 |
| P5 | 0-100 | 11.3 | 36.9 | 14.9 | 24.8 | 9.9 | 2.1 |
| P6 | 0-100 | 1.5 | 27.7 | 15.4 | 38.5 | 13.8 | 3.1 |
| K1 | 0-100 | 25.0 | 0.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 0.0 |
| K2 | 0-100 | 80.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 20.0 | 0.0 |
| K3/4 | 0-100 | 13.3 | 13.3 | 26.7 | 6.7 | 13.3 | 26.7 |
| K5/6 | 0-100 | 0.0 | 0.0 | 33.3 | 0.0 | 66.7 | 0.0 |

wcp I = whole chromosome painting nach 24 h MMC-Behandlung; MMC = Mitomycin; del = Deletion; t = Translokation; rb = Reunionsfigur; csb = Chromosomenbruch; ctb = Chromatidbruch; dup = Duplikation

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 1 bei den Patienten. In dieser Abbildung wird der Mittelwert der Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 1 aller Patienten beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) dargestellt.

Die Abb. 42 zeigt, dass die Reunionsfigur (rb) mit 39 % die häufigste Aberration des Chromosom 1 beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) darstellt. Auch die Chromatidbrüche (ctb) und die Chromosomenbrüche (csb) stellen einen großen Anteil an den Chromosomenaberrationen.

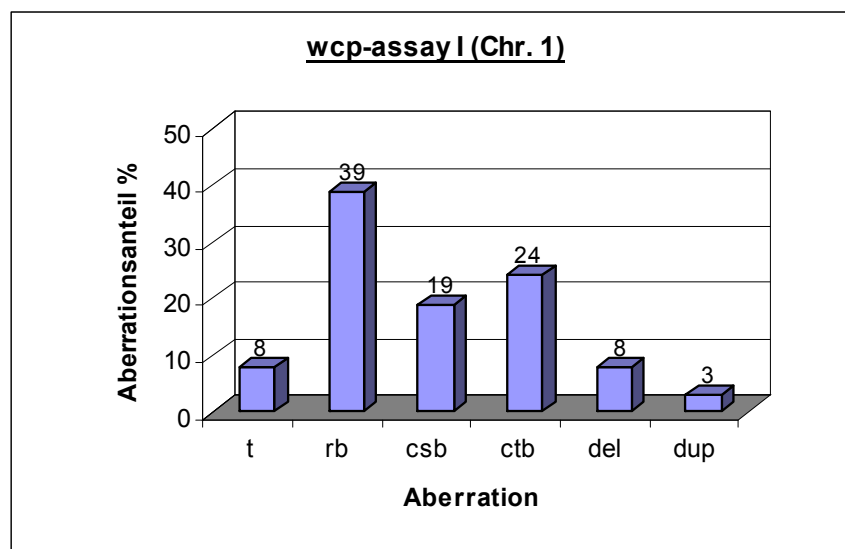


Abb. 42: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 1 der Patienten beim wcp-assay I (24 h MMC)

Die Untersuchung des Chromosoms 3 mittels wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) zeigte, dass bei den Patienten die Reunionsfigur vor dem Chromatidbruch die häufigste Aberration darstellte (Tab. 17). Bei den Negativkontrollen zeigte sich bei sehr geringer Aberrationszahl keine einheitliche Verteilung der Aberrationstypen. Translokationen, Reunionsfiguren und Chromosomenbrüche waren die häufigsten Aberrationen der Negativkontrollen.

Tab. 17: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 3 beim wcp-assay I in %

| Patient/Kontrolle | MMC | t | rb | csb | ctb | del | dup |
|-------------------|-------|------|-------|------|------|------|-----|
| P1 | 0-100 | 7.3 | 36.6 | 26.8 | 22.0 | 7.3 | 0.0 |
| P2 | 0-100 | 8.1 | 48.4 | 11.3 | 27.4 | 4.8 | 0.0 |
| P3 | 0-100 | 5.4 | 29.7 | 21.6 | 40.5 | 2.7 | 0.0 |
| P4 | 0-100 | 4.0 | 51.0 | 13.7 | 31.4 | 0.0 | 0.0 |
| P5 | 0-100 | 12.2 | 27.0 | 20.3 | 28.4 | 8.1 | 4.1 |
| P6 | 0-100 | 8.8 | 41.2 | 20.6 | 26.5 | 2.9 | 0.0 |
| K1 | 0-100 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| K2 | 0-100 | 66.7 | 16.7 | 0.0 | 0.0 | 16.7 | 0.0 |
| K3/4 | 0-100 | 0.0 | 0.0 | 50.0 | 0.0 | 50.0 | 0.0 |
| K5/6 | 0-100 | 50.0 | 0.0 | 50.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

wcp I = whole chromosome painting nach 24 h MMC-Behandlung; MMC = Mitomycin C; t = Translokation; rb = Reunionsfigur; csb = Chromosomenbruch; ctb = Chromatidbruch; del = Deletion; dup = Duplikation

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 3 bei den Patienten. In der Abbildung wird der Mittelwert der Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 3 der Patienten beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) dargestellt.

Die Abb. 43 belegt, dass die Reunionsfigur (rb) die häufigste Chromosomenaberration des Chromosoms 3 bei den Patienten darstellt. Auch die Chromatidbrüche (ctb) und die Chromosomenbrüche (csb) sind häufige Aberrationen.

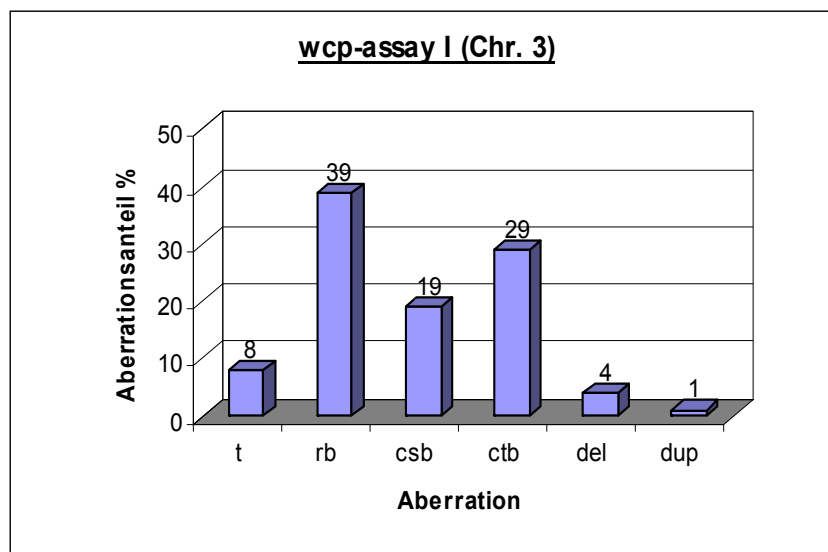


Abb. 43: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 3 der Patienten beim wcp-assay I (24 h MMC)

Die Untersuchung des Chromosoms 7 über den wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) zeigte, dass bei fünf von sechs Patienten, wie schon bei den Chromosomen 1 und 3 auch, die Reunionsfiguren, die Chromatid- und Chromosomenbrüche die häufigsten Abberationen darstellten. Der Patient P3 allerdings unterschied sich von diesem Verteilungsmuster deutlich, bei ihm war die Translokation die mit Abstand häufigste Aberration (Tab. 18). Bei den Negativkontrollen war bei niedriger Aberrationszahl bei allen Patienten die Translokation die am meisten festgestellte Aberration des Chromosoms 7.

Tab. 18: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 7 beim wcp-assay I in %

| Patient/Kontrolle | MMC | t | rb | csb | ctb | del | dup |
|--------------------------|--------------|----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| P1 | 0-100 | 7.1 | 53.6 | 14.3 | 25.0 | 0.0 | 0.0 |
| P2 | 0-100 | 7.9 | 57.9 | 7.9 | 23.7 | 2.6 | 0.0 |
| P3 | 0-100 | 42.1 | 28.9 | 13.2 | 13.2 | 2.6 | 0.0 |
| P4 | 0-100 | 8.2 | 40.8 | 24.5 | 22.4 | 4.1 | 0.0 |
| P5 | 0-100 | 17.9 | 42.9 | 7.1 | 23.2 | 3.6 | 5.4 |
| P6 | 0-100 | 8.3 | 16.7 | 20.8 | 54.2 | 0.0 | 0.0 |
| K1 | 0-100 | 33.3 | 0.0 | 33.3 | 0.0 | 33.3 | 0.0 |
| K2 | 0-100 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| K3/4 | 0-100 | 50.0 | 25.0 | 0.0 | 25.0 | 0.0 | 0.0 |
| K5/6 | 0-100 | 66.7 | 0.0 | 16.7 | 0.0 | 16.7 | 0.0 |

wcp I = whole chromosome painting nach 24 h MMC-Behandlung; MMC = Mitomycin C; t = Translokation; rb = Reunionsfigur; csb = Chromosomenbruch; ctb = Chromatidbruch; del = Deletion; dup = Duplikation

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 7 bei den Patienten. In dieser Abbildung wird der Mittelwert der Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 7 aller Patienten beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) dargestellt.

Die Abb. 44 zeigt, dass beim Chromosom 7 der Patienten am häufigsten Reunionsfiguren (rb) vorlagen. Chromatidbrüche (ctb) waren auch zahlreich.

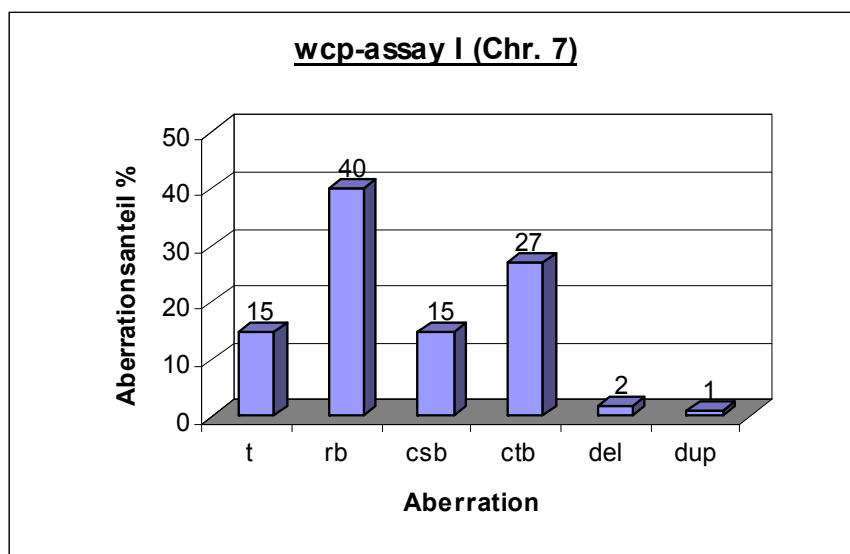


Abb. 44: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 7 der Patienten beim wcp-assay I (24 h MMC)

Die Untersuchung des Chromosoms 1 über den wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) zeigte, dass die Reunionsfigur bei den zwei Patienten die häufigste Aberration darstellte (Tab. 19). Auch Chromatidbrüche und Chromosomenbrüche waren zahlreich vorhanden. Bei den Negativkontrollen zeigten sich bei niedriger Aberrationszahl vornehmlich Deletionen. Die bei den Patienten dominierenden Reunionsfiguren kamen bei den Negativkontrollen nicht vor.

Tab. 19: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 1 beim wcp-assay II in %

| Patient/Kontrolle | MMC | t | rb | csb | ctb | del | dup |
|-------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|
| P1 | 0-100 | 1.5 | 32.4 | 20.6 | 32.4 | 11.8 | 1.5 |
| P2 | 0-100 | 4.0 | 45.5 | 20.5 | 23.3 | 5.1 | 1.7 |
| K1 | 0-100 | 12.5 | 0.0 | 25.0 | 0.0 | 62.5 | 0.0 |
| K2 | 0-100 | 20.0 | 0.0 | 20.0 | 0.0 | 40.0 | 20.0 |

wcp II = whole chromosome painting nach 48 h MMC-Behandlung; MMC = Mitomycin C; t = Translokation; rb = Reunionsfigur; csb = Chromosomenbruch; ctb = Chromatidbruch; del = Deletion; dup = Duplikation

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 1 bei den Patienten. In dieser Abbildung wird der Mittelwert der Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 1 aller Patienten beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) dargestellt.

Aus Abb. 45 geht hervor, dass die Reunionsfiguren (rb) den größten Anteil der Aberrationen des Chromosoms 1 ausmachten. Chromatidbrüche (ctb) und Chromosomenbrüchen (csb) waren ebenfalls häufig zu finden.

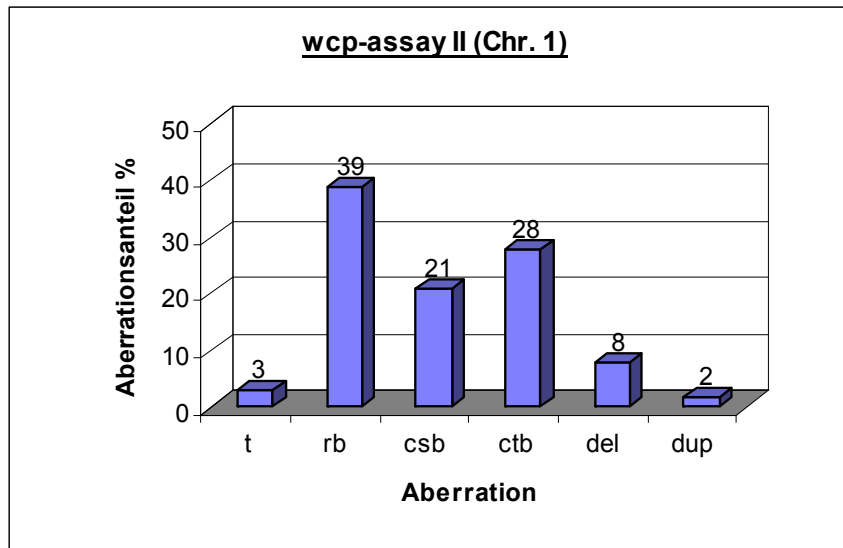


Abb. 45: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 1 der Patienten beim wcp-assay II (48 h MMC)

Bei der Untersuchung des Chromosoms 3 über den wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) stellte sich heraus, dass die Chromatidbrüche und die Reunionsfiguren bei den zwei Patienten die häufigsten Aberrationen darstellten (Tab. 20). Bei niedriger Aberrationszahl waren bei den Negativkontrollen Translokationen und Chromosomenbrüche häufig.

Tab. 20: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 3 beim wcp-assay II in %

| Patient/Kontrolle | MMC | t | rb | csb | ctb | del | dup |
|-------------------|--------------|------|------|------|------|------|-----|
| P1 | 0-100 | 17.1 | 25.7 | 11.4 | 37.1 | 8.6 | 0.0 |
| P2 | 0-100 | 6.9 | 45.0 | 10.7 | 30.5 | 5.3 | 1.5 |
| K1 | 0-100 | 50.0 | 0.0 | 50.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| K2 | 0-100 | 33.3 | 0.0 | 33.3 | 0.0 | 33.3 | 0.0 |

wcp II = whole chromosome painting nach 48 h MMC-Behandlung; MMC = Mitomycin C; t = Translokation; rb = Reunionsfigur; csb = Chromosomenbruch; ctb = Chromatidbruch; del = Deletion; dup = Duplikation

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 3 bei den Patienten. In dieser Abbildung wird der Mittelwert der Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 3 aller Patienten beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) dargestellt.

Die Abb. 46 veranschaulicht, dass die Chromatidbrüche (ctb) und Reunionsfiguren (rb) den größten Anteil der Aberrationen des Chromosoms 3 bei den Patienten ausmachen.

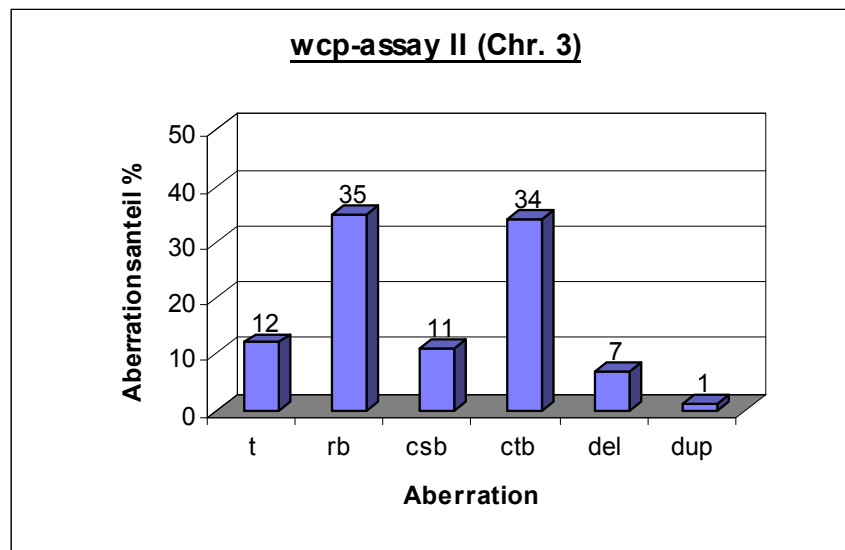


Abb. 46: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 3 der Patienten beim wcp-assay II (48 h MMC)

Die Untersuchung des Chromosoms 7 mittels wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) zeigte, dass die Reunionsfigur bei den Patienten die häufigste Aberration darstellte (Tab. 21). Dazu waren auch hier Chromosomenbrüche und Chromatidbrüche zahlreich. Bei den Negativkontrollen waren bei jeweils sehr kleiner Aberrationszahl bei K1 nur Chromatidbrüche und bei K2 lediglich Translokationen festzustellen.

Tab. 21: Verteilung der Aberrationstypen Chromosom 7 beim wcp-assay II in %

| Patient/Kontrolle | MMC | t | rb | csb | ctb | del | dup |
|-------------------|-------|-------|------|------|-------|-----|-----|
| P1 | 0-100 | 13.6 | 36.4 | 22.7 | 27.3 | 0.0 | 0.0 |
| P2 | 0-100 | 3.3 | 44.0 | 23.1 | 28.6 | 1.1 | 0.0 |
| K1 | 0-100 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| K2 | 0-100 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

wcp II = whole chromosome painting nach 48 h MMC-Behandlung; MMC = Mitomycin C; t = Translokation; rb = Reunionsfigur; csb = Chromosomenbruch; ctb = Chromatidbruch; del = Deletion; dup = Duplikation

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 7 der Patienten. In Abb. 47 wird der Mittelwert der Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 7 aller Patienten beim wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) dargestellt.

Die Abb. 47 zeigt den großen Anteil der Reunionsfiguren (rb) an den Aberrationen des Chromosoms 7 der Patienten.

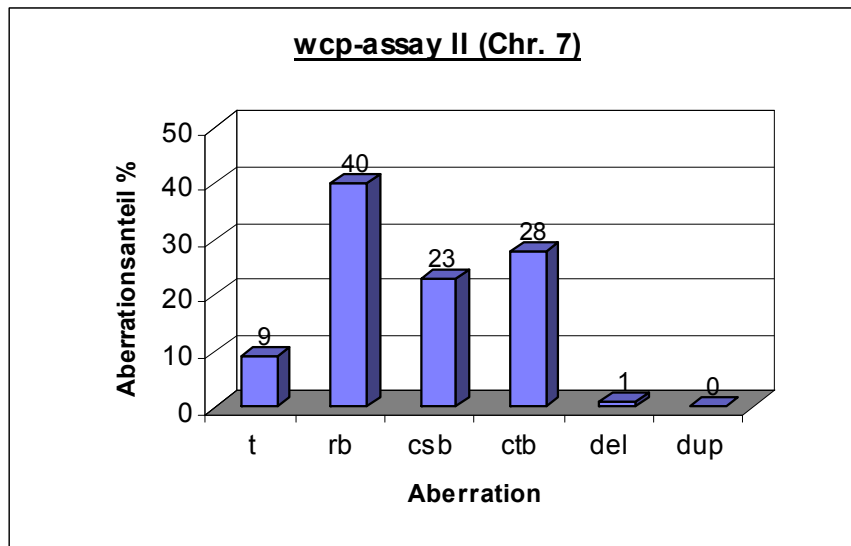


Abb. 47: Verteilung der Aberrationstypen des Chromosom 7 der Patienten beim wcp-assay II (48 h MMC)

Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Ergebnisse bezüglich der Verteilung der Aberrationstypen der Chromosomen 1, 3 und 7 bei den wcp-assays zusammengefasst.

Mit Ausnahme der Chromosomen des Patienten P3 zeigten die Chromosomen 1, 3 und 7 bei den FA-Patienten gleichermaßen vornehmlich Reunionsfiguren, Chromosomen- und Chromatidbrüche. Auch beim Patient P3 zeigten die Chromosomen 1 und 3 vornehmlich Reunionsfiguren, Chromosomen- und Chromatidbrüche. Allerdings wies das Chromosom 7 hauptsächlich Translokationen auf.

Beim Vergleich zwischen dem wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C-Behandlung) und wcp-assay II (48 Stunden Mitomycin C-Behandlung) zeigten sich große Ähnlichkeiten zwischen den Patienten bezüglich der Verteilung der Aberrationstypen.

Die Verteilung der Aberrationstypen bei den Negativkontrollen als auch der Vergleich zwischen Patienten und Negativkontrollen waren aufgrund niedriger Aberrationszahlen nicht aussagekräftig.

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der Sondenqualität

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden eigene DNA-Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7 mittels Mikrodissektion hergestellt. Dabei wurden die Chromosomen entweder aufgrund ihrer Morphologie unterschieden oder aber anhand der GTG-Bänderung identifiziert, die eine Trypsinbehandlung der Chromosomen voraussetzt.

Bei der Auswertung der Sondenqualität der zwei unterschiedlichen Methoden zeigte sich, dass sowohl die Homogenität der Markierung als auch die Fluoreszenzintensität des Sondenmixes ohne Trypsin-Behandlung besser waren als jene des Sondenmixes mit Trypsin-Behandlung vor der Mikrodissektion. Somit ermöglichte nur der Sondenmix ohne Trypsin-Behandlung eine schnelle und unkomplizierte Auswertung der wcp-assays und wurde deshalb in dieser Arbeit verwendet. Zudem zeigte der Sondenmix ohne Trypsin-Behandlung bei der Agarose-Gelelektrophorese eine stärkere DNA-Bande unter dem UV-Licht als der Sondenmix mit Trypsin-Behandlung.

Die beiden durch Mikrodissektion hergestellten Sondenmixe unterschieden sich in der Herstellung nur durch die Trypsin-Behandlung der Chromosomen vor der Mikrodissektion. Dies lässt den Schluss zu, dass das Trypsin bei dem einen Sondenmix für die geringere Homogenität der Markierung, für die niedrigere Lichtstärke der Sonden als auch für die geringere Fluoreszenz der DNA-Banden bei der Agarose-Gelelektrophorese verantwortlich war. Eine geringere Fluoreszenz der DNA ist gleichbedeutend mit einer geringeren DNA-Konzentration. Die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese lassen somit vermuten, dass die Vervielfältigung der mikrodissezierten DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bei dem Ansatz mit Trypsin-Behandlung nicht so effektiv war wie bei dem Ansatz ohne Trypsin-Behandlung der Chromosomen oder aber dass die Menge der Ausgangs-DNA bereits vermindert war.

Trypsin ist ein Verdauungsenzym, das mit der DNA assoziierte Proteine abbaut. Da die Proteine dabei an den unterschiedlich stark kondensierten Bereichen der DNA unterschiedlich schnell abgebaut werden, ermöglicht Trypsin das nach der Giemsa-Färbung entstehende charakteristische Bandenmuster der einzelnen Chromosomen. Somit können lediglich Chromosomen wie die Chromosomen 1, 3 und 7, die aufgrund ihrer Größe oder Zentromerlage eindeutig identifizierbar sind, ohne Trypsin-Behandlung mikrodisseziert werden. Die erste Mikrodissektion ist bereits vor über 25 Jahren durchgeführt worden [89]. Neben der Gewinn-

nung von DNA für wcp-Sonden wird die Mikrodissektion auch zur Identifizierung von Markerchromosomen durchgeführt [90].

Mit der Einführung der GTG-Bänderung mit Trypsin konnte die gezielte Mikrodissektion einzelner Chromosomen aufgrund der nun besseren Identifizierung der Chromosomen deutlich verbessert werden [91]. Seitdem wird gewöhnlich bei der Mikrodissektion zur besseren Identifizierung der Chromosomen Trypsin benutzt [92].

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann aber schlussfolgernd gesagt werden, dass die Sonden durch eine Trypsin-Behandlung vor der Mikrodissektion sowohl eine geringere Homogenität der Markierung der Chromosomen als auch eine geringere Fluoreszenzintensität erzielten. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte womöglich, wenn die Identifizierung der Chromosomen über die Größe und Zentromerlage möglich ist, auf eine Trypsin-Behandlung vor der Mikrodissektion verzichtet werden.

4.2 Vergleich: konventionelle Zytogenetik – wcp-assay

Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) – Sensitivität und Spezifität

Die Chromosomenbruchanalyse mittels konventioneller Zytogenetik, bei der die spontanen und Mitomycin C-induzierten Bruchereignisse pro Zelle gezählt werden, dient als Standard-Diagnoseverfahren der Fanconi-Anämie und besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität [2, 6]. So entdeckten bereits 1964 Schröder-Kurth et al. mittels konventioneller Zytogenetik, dass die Lymphozyten von Fanconi Anämie-Patienten spontan eine erhöhte Anzahl von Bruchereignissen pro Zelle entwickeln [33]. Im Jahr 1987 entdeckten German et al. mit Hilfe der konventionellen Zytogenetik, dass Fanconi Anämie-Patienten im Vergleich zu Negativkontrollen mit einer deutlich höheren Anzahl an Bruchereignissen pro Zelle auf das Zellgift Mitomycin C, das DNA-Interstrand-Crosslinks induziert, reagieren [58].

In dieser Arbeit wurde die diagnostische Aussagekraft eines wcp-assays der Chromosomen 1, 3 und 7 mit der Chromosomenbruchanalyse mittels konventioneller Zytogenetik, dem Standard-Diagnose-Verfahren, verglichen.

Anhand der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) konnten in dieser Arbeit sowohl mittels der wcp-assays als auch mittels konventioneller Zytogenetik alle Patienten und Negativkontrollen als solche identifiziert werden. Aufgrund der größeren Anzahl der untersuchten Chromosomen war die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) der Patienten und Nega-

tivkontrollen bei der konventionellen Zytogenetik größer als bei den wcp-assays. Sowohl bei der konventionellen Zytogenetik als auch bei den wcp-assays stieg mit steigender Mitomycin C-Konzentration die Differenz zwischen Patienten und Negativkontrollen deutlich an. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml Mitomycin C war die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) der Fanconi Anämie-Patienten bei den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik mindestens dreimal und zumeist über zehnmal höher als derjenige der zugehörigen Negativkontrollen. Daraus resultierte, dass sowohl die wcp-assays als auch die konventionelle Zytogenetik mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % die bestmögliche diagnostische Aussagekraft erreichten. Die diagnostische Aussagekraft der nur die Chromosomen 1, 3 und 7 untersuchenden wcp-assays war damit der erwartungsgemäß hohen diagnostischen Aussagekraft des den kompletten Chromosomensatz untersuchenden Standard-Diagnoseverfahrens, der Chromosomenbruchanalyse mittels konventioneller Zytogenetik, gleichwertig.

Es muss kritisch erwähnt werden, dass die untersuchte Anzahl von sechs Patienten für die Prüfung eines neuen Diagnose-Verfahrens klein ist. Die diagnostische Aussagekraft der wcp-assays wird zurzeit im Rahmen eines Krebsforschungsprojektes an einer größeren Anzahl von Patienten überprüft (siehe Kapitel 5 Ausblick).

Die Vorteile eines wcp-assays gegenüber der konventionellen Zytogenetik als Diagnose-Verfahren liegen in der potentiellen Möglichkeit der Automatisierung der Auswertung. So könnte in Zukunft mittels einer Fluoreszenzsignale zählenden Software die automatische Auswertung der wcp-assays ermöglicht werden [93, 94]. Eine automatisierte FA-Diagnostik würde eine große Zeitersparnis bei vergrößerter Analysezahl und größere Unabhängigkeit von zytogenetischen Kenntnissen mit sich bringen. Diese Eigenschaften sind die Voraussetzung für eine Routinediagnostik. Eine Routinediagnostik könnte in vielen Fällen ein frühzeitigere Diagnose der unterdiagnostizierten Fanconi-Anämie und somit die wichtige frühzeitige Therapie der hämatologischen Störungen ermöglichen [69].

Beim Vergleich der einzelnen Fanconi Anämie-Patienten fiel auf, dass Patient P3 sowohl bei der konventionellen Zytogenetik als auch, noch ausgeprägter, beim wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C) die meisten spontanen (0 MMC) Bruchereignisse pro Zelle aufwies. Patient P3 war einer von zwei Patienten, bei denen eine klonale Chromosomenaberration (P3 Karyotyp: 47,XY,+i(3)(q10)[28]/47,XY,sl,dup(1)(1pter-1q44::1q21-1qter)[4]/46,XY[22]) im Knochenmark nachgewiesen worden war, und der einzige Patient mit einer klonalen Aberration des Segments 3q26q29, die die Auftrittswahrscheinlichkeit eines Myelodysplastischen Syndroms

(MDS) oder einer akuten myeloischen Leukämie (AML) bei Fanconi Anämie-Patienten stark erhöht [84]. Es gab in mehreren Studien Hinweise darauf, dass eine hohe Anzahl an spontanen Bruchereignissen in den Lymphozyten von Fanconi Anämie-Patienten mit schwereren hämatologischen Störungen [95] und einer größeren Anzahl an klonalen Aberrationen [96] korreliert. So erscheint es sinnvoll, an einer größeren Anzahl von Patienten, den Zusammenhang zwischen der Anzahl der spontanen Bruchereignisse pro Zelle und klonaler Aberrationen im Knochenmark zu untersuchen.

Ein weiteres Ergebnis bestand darin, dass kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) ohne Mitomycin C-Behandlung (0 MMC) und der nach Mitomycin C-Behandlung (10-100 MMC) festgestellt werden konnte. So zeigte der die meisten spontanen Bruchereignisse pro Zelle aufweisende Patient P3 bei weitem nicht die größte Anzahl an Bruchereignissen pro Zelle (B/Z) nach Mitomycin C-Behandlung (10-100 MMC). Die fehlende Vorhersagbarkeit der Höhe der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) nach Mitomycin C-Behandlung der Zellen ist bekannt. Grund dafür ist, dass die Bruch-induzierende Wirkung des organischen Mitomycin C variabel sein kann. So kann unter anderem auch schon die Länge der Lagerung des Mitomycin C großen Einfluss auf die Anzahl der Bruchereignisse haben [72].

Prozentsatz aberranter Zellen und Bruchereignisse pro aberrante Zelle

Neben der Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) war sowohl bei den wcp-assays als auch der konventionellen Zytogenetik der Prozentsatz aberranter Zellen (Aberrante Zellen in %) bei den Patienten zumeist deutlich höher als bei den Negativkontrollen. Einen Anstieg des Prozentsatzes an aberranten Zellen und der Bruchereignisse pro aberranter Zelle nach Behandlung der Lymphozyten mit cross-linkenden Substanzen zeigten auch Auerbach et al. [97].

In dieser Arbeit war allerdings bei der Anzahl der Bruchereignisse pro aberranter Zelle (B/aberr. Zelle) der Unterschied zwischen FA-Patienten und Negativkontrollen sowohl bei der konventionellen Zytogenetik als auch bei den wcp-assays spontan (0 MMC) und bei den Mitomycin C-Konzentrationen von 10-50 ng/ml (10-50 MMC) weniger deutlich. Erst bei einer Konzentration von 100 ng/ml Mitomycin C (100 MMC) konnten alle FA-Patienten beim wcp-assay über die Bruchereignisse pro aberranter Zelle von den Negativkontrollen eindeutig unterschieden werden. Auch bei der konventionellen Zytogenetik war dies erst bei den Kon-

zentrationen von 50 ng/ml Mitomycin C (50 MMC) und 100 ng/ml Mitomycin C (100 MMC) möglich.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass Fanconi Anämie-Patienten und Negativkontrollen am besten über die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z), wie bei dem Standard-Diagnose-Verfahren durchgeführt, diskriminiert werden können. Während der Prozentsatz aberranter Zellen (Aberrante Zellen in %) auch eine sehr hohe diagnostische Aussagekraft hatte, war dies bei der Anzahl der Bruchereignisse pro aberranter Zelle (B/aberr. Zelle) nicht der Fall.

4.3 Bruchhäufigkeit und Größe der untersuchten Chromosomen 1, 3 und 7

Bei der Untersuchung der wcp-assays der Chromosomen 1, 3 und 7 zeigte sich, dass mit steigender Größe des betreffenden Chromosoms auch die Bruchhäufigkeit zunahm. Es konnte mittels eines Korrelationskoeffizienten gezeigt werden, dass bei allen Patienten die Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 mit deren Größe linear korrelierte. Eine für den kompletten Chromosomensatz geltende lineare Korrelation zwischen Chromosomengröße und Bruchhäufigkeit würde bedeuten, dass die Chromosomen 2 und 4 aufgrund ihrer Größe häufiger brechen würden als das Chromosom 7. Allerdings entwickeln hauptsächlich die Chromosomen 1, 3 und 7 klonale Aberrationen im Knochenmark von Fanconi Anämie-Patienten. Deshalb kann schlussfolgernd die Vermutung geäußert werden, dass die klonalen Aberrationen der Chromosomen 1, 3 und 7, die in den somatischen Knochenmarkzellen von Fanconi Anämie-Patienten bevorzugt gefunden wurden, vermutlich auf einen Selektionsvorteil der betroffenen Zellen zurückzuführen sind. Diese Vermutung wurde in Bezug auf die klonale Aberration des Chromosom 3-Segments 3q26q29 von Tönnies et al. 2003 geäußert [84].

Studien, die die in dieser Arbeit vorhandene Proportionalität zwischen Chromosomengröße und Bruchhäufigkeit bei Lymphozyten untersuchten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So konnten Johnson et al. über eine wcp-Analyse eine hohe Proportionalität zwischen Größe und Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1-6 in Lymphozyten gesunder Testpersonen feststellen [98]. Auch nach in vitro Bestrahlung von Lymphozyten zeigten Johnson et al. und Luomahaara et al. über eine wcp-Analyse eine hohe Proportionalität zwischen Größe und Bruchhäufigkeit der Chromosomen 3, 5 und 6 bzw. 1, 2 und 4 [98, 99]. Allerdings entdeckten Barrios et al. große Abweichungen von einer Größen-proportionalen Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 bei Lymphozyten von Tumorpatienten nach Bestrahlungstherapie

[100]. Auch weitere Studien stellten bei der Untersuchung von Lymphozyten nach in vitro Bestrahlung zum Teil deutliche Abweichungen von einer DNA-proportionalen Bruchhäufigkeit der Chromosomen fest [101-103]. Die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse konnten noch nicht eindeutig geklärt werden [98]. Da in den genannten Studien weder Chromosomen nach Mitomycin C-Behandlung noch Fanconi Anämie-Patienten untersucht wurden, ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die in dieser Arbeit untersuchte Proportionalität zwischen Bruchhäufigkeit und Chromosomengröße bei der Fanconi-Anämie fraglich.

4.4 Untersuchung der Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen

Bei den wcp-assays bestanden Unterschiede zwischen spontaner (vor allem Translokationen, Chromosomenbrüche und Deletionen) und Mitomycin C-induzierter (vor allem Reunionsfiguren und Chromatidbrüche) Verteilung der Aberrationstypen bei den Fanconi Anämie-Patienten. Eine spontan hohe Anzahl von Translokationen wurde auch von Sakamoto et al. mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) beobachtet, allerdings in Fibroblasten von FA-Patienten [104].

Auch bei der konventionellen Zytogenetik bestanden bei den Patienten Unterschiede zwischen spontaner und MMC-induzierter Verteilung der Aberrationstypen, wobei ein starker Anstieg der Reunionsfiguren nach Mitomycin C-Behandlung auffällt. Sonst gab es bei der konventionellen Zytogenetik bei den Patienten sowohl spontan [5, 33, 95] als auch nach Mitomycin C-Behandlung hauptsächlich Chromatidbrüche.

Somit war den Patienten und in geringerem Maße auch den Negativkontrollen sowohl bei den wcp-assays als auch der konventionellen Zytogenetik gemeinsam, dass sich nach Mitomycin C-Behandlung der Zellen ein deutlich höherer Anteil an Reunionsfiguren entwickelte als ohne Mitomycin C-Behandlung. Reunionsfiguren gelten als typische Folge von Mitomycin C-Behandlung [108]. So ist ein hoher Anteil von Reunionsfiguren nach Mitomycin C-Behandlung schon sowohl bei FA-Patienten [105] als auch bei gesunden Kontrollpersonen beschrieben worden [109].

Mitomycin C (MMC) ist eine DNA-strangvernetzende Substanz [110, 111]. Unrepariert führen die durch Mitomycin C verursachten kovalenten Bindungen zwischen den beiden DNA-

Strängen zu einer erhöhten Anzahl von Chromosomenaberrationen und damit Bruchereignissen [111].

Als Schlussfolgerung kann festgehalten werden, dass Mitomycin C neben der Erhöhung der Anzahl von Aberrationen auch eine Veränderung der Verteilung der Aberrationstypen, vor allem in Form der Erhöhung des Reunionsfiguren-Anteils, bewirkte und somit sowohl bei den Patienten als auch den Negativkontrollen nicht von der Mitomycin C -induzierten auf die spontane Verteilung der Aberrationstypen geschlossen werden kann.

Zudem bestanden auch Unterschiede in der Verteilung der Aberrationstypen zwischen Fanconi Anämie-Patienten und Negativkontrollen. Bei den wcp-assays zeigten die Patienten spontan einen deutlich höheren Anteil an Chromosomenbrüchen und Deletionen und nach Mitomycin C-Behandlung einen erheblich höheren Anteil an Reunionsfiguren und Chromatidbrüchen als die Negativkontrollen. Der höhere Anteil an Reunionsfiguren bei den Patienten konnte auch bei der konventionellen Zytogenetik festgestellt werden.

Die Gründe für die unterschiedliche Verteilung der Aberrationstypen bei Patienten und Negativkontrollen ist nicht bekannt. Welche Bedingungen allgemein über die Art der Aberration entscheiden, ist auch noch weitgehend unbekannt.

Bekannt ist, dass Chromosomenaberrationen durch eine fehlerhafte Reparatur von Doppelstrangbrüchen entstehen [32, 106]. Doppelstrangbrüche werden hauptsächlich über zwei Mechanismen repariert. Bei der homologen Rekombinationsreparatur (homologous recombination repair, HRR) wird als Reparatur-Vorlage zumeist eine Schwesterchromatide benutzt, was eine sehr genaue Wiederherstellung ermöglicht [107]. Bei der nicht-homologen Reparatur (nonhomologous DNA end joining, NEHJ) von Doppelstrangbrüchen werden die beiden DNA-Stränge wieder direkt miteinander verknüpft, was die Wiederherstellung fehleranfälliger macht. Da sie unabhängig von Sequenz-Homologie arbeiten kann, ist die nicht-homologe Reparatur universeller [32]. Es ist bekannt, dass sowohl bei der HRR als auch der NEHJ grundsätzlich jede der Aberrationen entstehen kann. Allerdings ist unklar, welche Bedingungen über die Wahl des Reparaturmechanismus entscheiden und in welchem Ausmaß einer der Reparaturmechanismen eine bestimmte Aberration begünstigt [32].

Aufgrund der Unterschiede in der Verteilung der Aberrationstypen zwischen Patienten und Negativkontrollen kann schlussfolgernd festgehalten werden, dass Mutationen in einem der Fanconi Anämie-Gene neben der Erhöhung der Anzahl der Bruchereignisse vermutlich auch eine Veränderung der Verteilung der Aberrationstypen bewirken.

Beim Vergleich zwischen den Ergebnissen der wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik zeigten sich deutliche Unterschiede. Vor allem die über die wcp-assays häufig beobachteten Translokationen und Deletionen bei Patienten und Negativkontrollen konnten mit der konventionellen Zytogenetik nur in sehr geringem Maße festgestellt werden. Andererseits wurden bei der konventionellen Zytogenetik sowohl bei den Patienten als auch den Negativkontrollen häufiger Chromatidbrüche gefunden.

Da die Zellen der Patienten und Negativkontrollen bei der konventionellen Zytogenetik und den wcp-assays im gleichen Ansatz aufgearbeitet und mit Mitomycin C behandelt wurden, sind die Gründe für die Unterschiede nicht in der Aufarbeitung zu suchen. Dies lässt den Schluss zu, dass dem Unterschied zwischen den wcp-assays und der konventionellen Zytogenetik eine größere Fähigkeit der wcp-assays zur Erkennung von Translokationen und Deletionen zu Grunde liegt. Die Annahme einer im Vergleich zur konventionellen Zytogenetik besseren Erkennung von Translokationen und Deletionen durch ein whole chromosome paint (wcp) unterstützen auch die Ergebnisse von Bram et al. bei 35 Patienten mit einem Myelodysplastischen Syndrom oder einer akuten myeloischen Leukämie [112]. Die Vorteile eines wcp-assays bei der Erkennung von Translokationen haben außerdem Stumm et al. 2001 bei Patienten der Ataxia Telangiectasia und des Nijmegen Breakage Syndroms beschrieben [85]. Auch hat die Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung mit wcp-Sonden bekanntlich Vorteile bei der Erkennung von komplexen Rearrangements [113].

Translokationen werden als stabile Aberrationen bezeichnet, da Zellen mit Translokationen teilungsfähig bleiben können und somit als Klon für aberrante Tochterzellen fungieren können. Deshalb wird eine erhöhte Translokationsrate, vor allem von unbalanzierten Translokationen, mit einem erhöhten Risiko für maligne Entartungen in Verbindung gebracht [85, 114]. Die bessere Erkennung von Translokationen und Deletionen ist somit ein wichtiger Vorteil des wcp-assays gegenüber der konventionellen Zytogenetik.

Andererseits lässt der bei der konventionellen Zytogenetik höhere Anteil an Chromatidbrüchen vermuten, dass die konventionelle Zytogenetik bei der Erkennung von Chromatidbrüchen den wcp-assays überlegen ist. Der Grund dafür könnte der Fluoreszenzfarbstoff sein, durch den die einzelnen Chromatiden unter dem Fluoreszenzmikroskop vergrößert erscheinen und somit feine Chromatidbrüche schwerer erkennbar werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei den wcp-assays eine erheblich bessere Erkennung der mit einem erhöhten Entartungs-Risiko in Verbindung gebrachten Translokationen

und Deletionen gewährleistet war, während die konventionelle Zytogenetik bei der Erkennung von Chromatidbrüchen Vorteile aufwies.

Die Chromosomen 1, 3 und 7 wurden mit den wcp-assays auch isoliert voneinander untersucht. Mit Ausnahme des Patienten P3 zeigten die Chromosomen 1, 3 und 7 bei den Fanconi Anämie-Patienten bei beiden wcp-assays gleichermaßen vornehmlich Reunionsfiguren, Chromosomen- und Chromatidbrüche. Auch bei dem Patienten P3, der nur mit dem wcp-assay I (24 Stunden Mitomycin C) untersucht wurde, zeigten die Chromosomen 1 und 3 vornehmlich Reunionsfiguren, Chromosomen- und Chromatidbrüche. Allerdings wies das Chromosom 7 hauptsächlich Translokationen auf. Patient P3 war einer von zwei Patienten, bei denen eine klonale Chromosomenaberration im Knochenmark nachgewiesen worden war, und der einzige Patient mit einer klonalen Aberration des Segments 3q26q29.

So könnte bei Patient P3 ein Zusammenhang zwischen der klonalen Aberration im Knochenmark, u.a. des Segments 3q26q29, und dem im Vergleich zu den anderen Patienten deutlich höheren Translokationsanteil des Chromosoms 7 bestehen.

Aufgrund der niedrigen spontanen (0 MMC) Aberrationszahlen wurden bei der Verteilung der Aberrationstypen des Chromosoms 7 die spontane (0 MMC) mit der Mitomycin C-induzierten (10-100 MMC) Verteilung der Aberrationstypen zusammengefasst. Da sich, wie oben dargestellt, die spontane von der Mitomycin C-induzierten Verteilung der Aberrationstypen unterscheiden kann, wäre eine Betrachtung der spontanen Verteilung der Aberrationstypen der einzelnen Chromosomen interessant.

5 Ausblick

Als Teil eines Krebsforschungsprojektes wird im Institut für Humangenetik der Charite die Untersuchung der Chromosomen 1, 3 und 7 mittels wcp-assay an einer großen Anzahl von Fanconi Anämie-Patienten und Negativkontrollen fortgesetzt. Dabei soll die diagnostische Aussagekraft des wcp-assays überprüft und mit der konventionellen Zytogenetik verglichen werden. Zudem wird mit Hilfe der Software Metafer und einem speziellen Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging Mot) eine semiautomatische Auswertung des wcp-assays getestet. Die Software Metafer ermöglicht eine automatische Suche und Aufnahme der Zellen. Diese semiautomatische Auswertung des wcp-assays führt damit im Vergleich zur konventionellen Zytogenetik zu einer großen Zeitersparnis bei gleichzeitig deutlich steigender Analysezahl. Allerdings wäre die semiautomatische Diagnostik mittels wcp-assay auch teurer und weiterhin von guten zytogenetischen Kenntnissen abhängig. Über den Schritt der semiautomatischen Auswertung ist in einem weiteren Schritt eine vollautomatische Auswertung angedacht. Die vollautomatische Auswertung eines wcp-assays soll mittels einer Software erfolgen, die die Fluoreszenzsignale der Chromosomen 1, 3 und 7 zusammenzählt, die bei FA-Patienten aufgrund der großen Chromosomenbrüchigkeit erhöht sind. Eine vollautomatische Auswertung könnte in Zukunft aufgrund der Zeitersparnis und der Unabhängigkeit von zytogenetischen Kenntnissen eine Routine-Diagnostik der Fanconi-Anämie möglich machen. Diese könnte die bisher oft erst verzögerte Diagnose zu einem früheren Zeitpunkt ermöglichen und somit die wichtige frühzeitige Therapie der Fanconi-Anämie gewährleisten. In diesem Projekt wird mit Hilfe der semiautomatischen Auswertung des wcp-assays neben der Anzahl der Bruchereignisse auch das qualitative Bruchverhalten der Chromosomen 1, 3 und 7 von Fanconi Anämie-Patienten sowohl in Lymphozyten als auch im Knochenmark untersucht. In einer Studie konnte bei FA-Patienten mit einer klonalen Aberration des Chromosoms 3 (3q26q29) ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer akuten myeloischen Leukämie (AML) oder eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) festgestellt werden [84]. Es besteht die Hoffnung, über steigendes Wissen des Bruchverhaltens der Chromosomen 1, 3 und 7 bei der Fanconi-Anämie weitere Zusammenhänge zwischen Aberrationen dieser Chromosomen in T-Lymphozyten und Knochenmarkzellen und der Entstehung einer AML oder eines MDS zu erlangen. Auf diesem Weg könnte die Therapie der weiterhin mit einer schlechten Prognose verbundenen AML verbessert werden. Über eine automatische Auswertung von wcp-assays könnte zukünftig auch die umfassende Chromosomenbruch-Analyse anderer Erkrankungen mit Tumordisposition ermöglicht bzw. vereinfacht werden.

Zusammenfassung

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine genetische Erkrankung, die durch angeborene Fehlbildungen, Knochenmarkversagen und ein extrem erhöhtes Risiko für das Myelodysplastische Syndrom (MDS), die akute myeloische Leukämie (AML) und solide Tumoren gekennzeichnet ist. Die hämatologischen Erkrankungen stellen die größte Gesundheitsgefährdung dar, so dass deren Früherkennung von großer Bedeutung für den Therapieerfolg ist.

Das Standard-Diagnoseverfahren, die Chromosomenbruchanalyse mittels konventioneller Zytogenetik, kann aufgrund des hohen Zeitaufwands und der erforderlichen zytogenetischen Erfahrung nicht als Routine-Diagnostik eingesetzt werden, wodurch sich oftmals die FA-Diagnose verzögert. Neben der frühzeitigen Diagnosestellung gewinnt bei der Früherkennung hämatologischer Störungen die Untersuchung des Knochenmarks auf klonale Chromosomenaberrationen zunehmend an Bedeutung. Eine Studie aus dem Jahr 2003 zeigte ein deutlich erhöhtes Risiko für MDS und AML bei FA-Patienten mit klonaler Aberration des Chromosoms 3 (3q26q29), oft mit anschließender Monosomie 7. Auch klonale Aberrationen des Chromosoms 1 wurden in Studien mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht.

In dieser Arbeit wurde an Zellen von FA-Patienten und Negativkontrollen ein wcp-assay der Chromosomen 1, 3 und 7 getestet. Zum einen wurde dabei untersucht, ob über die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle (B/Z) der Chromosomen 1, 3 und 7 die Fanconi-Anämie diagnostiziert werden kann, also wie hoch die diagnostische Aussagekraft eines wcp-assays dieser Chromosomen ist. Zum anderen sollte mittels wcp-assay ein Überblick über das qualitative Bruchverhalten der bei der Prognostik eventuell wichtigen Chromosomen 1, 3 und 7 gewonnen werden. Zum Vergleich wurden dieselben Patienten und Negativkontrollen auch mittels konventioneller Zytogenetik, also dem Standard-Diagnoseverfahren, untersucht.

Die T-Lymphozyten von Patienten und deren Negativkontrollen wurden kultiviert, aufgearbeitet und zur Induktion von Bruchereignissen mit drei Konzentrationen Mitomycin C (MMC) für 24 bzw. 48 Stunden behandelt. Für die wcp-assays wurden Sonden der Chromosomen 1, 3 und 7 mittels Mikrodissektion, PCR und Fluoreszenzmarkierung hergestellt und anschließend eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der Sonden mit den Chromosomenpräparaten durchgeführt. Es wurden Sonden mit und ohne Trypsin-Behandlung der zu mikrodissezierenden Chromosomen hergestellt.

Die Ergebnisse der Sondenherstellung zeigten sowohl eine größere Homogenität der Markierung als auch eine größere Fluoreszenzintensität der Sonden ohne vorherige Trypsin-Behandlung. So sollte womöglich, wenn die Identifizierung der Chromosomen über die Größe und Zentromerlage möglich ist, auf die gängige Trypsin-Behandlung vor der Mikrodissektion verzichtet werden.

Die Ergebnisse der Bruchanalyse zeigten, dass die wcp-assays die Fanconi-Anämie über die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle genauso fehlerfrei wie die konventionelle Zytogenetik diagnostizieren konnten und eine Sensitivität und Spezifität von 100 % erreichten. Falls sich diese Ergebnisse an einer größeren Patientenzahl bestätigen lassen, so könnte über den wcp-assay aufgrund der potentiellen Automatisierbarkeit seiner Auswertung in Zukunft eine Routinediagnostik und somit frühzeitigere Diagnostik der FA ermöglicht werden.

Es zeigte sich zudem, dass bei den FA-Patienten eine klare Korrelation zwischen Bruchhäufigkeit der Chromosomen 1, 3 und 7 und deren Größe bestand. Zudem war bei den wcp-assays als auch bei der konventionellen Zytogenetik ein hoher Anteil von Reunionsfiguren nach MMC-Behandlung FA-spezifisch.

Sowohl die FA-Patienten als auch die Negativkontrollen zeigten spontan eine andere Verteilung der Aberrationstypen als nach MMC-Behandlung. Es kann daher nicht von der Verteilung der Aberrationstypen nach Mitomycin C-Behandlung auf die spontane Verteilung der Aberrationstypen geschlossen werden.

Im Einklang mit früheren Studien ergaben sich bei den wcp-assays gegenüber der konventionellen Zytogenetik deutliche Vorteile bei der Erkennung von Translokationen und Deletionen, was vor allem wegen der Erkennung der spontan häufig zu beobachtenden und mit einem erhöhten Entartungsrisiko in Verbindung gebrachten Translokationen einen wichtigen Vorteil des wcp-assays darstellt.

Der einzige Patient mit der prognostisch ungünstigen klonalen Chromosomenaberration des Segments 3q26q29 im Knochenmark wies sowohl bei den wcp-assays als auch bei der konventionellen Zytogenetik in den T-Lymphozyten die höchste spontane Anzahl an Bruchereignissen als auch einen deutlich höheren Translokations-Anteil beim Chromosom 7 auf. Dies deutet auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der klonalen Aberration des Segments 3q26q29 im Knochenmark, der Höhe der spontanen Bruchereignisse und dem Translokations-Anteil des Chromosoms 7 in T-Lymphozyten hin.

Literaturverzeichnis

1. Fanconi G. Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung*. Wien, 1927, 117:257-280.
2. Zwaan, Joenje H, Pals G, et al. Fanconi anemia: an overview. *European Cytogeneticists Association Newsletter* [2005; 15:16-19](#).
3. Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. *Am J Hematol*. [1996; 53:99-110](#).
4. Alter BP, Greene MH, Velazquez I, et al. Cancer in Fanconi anemia. *Blood* [2003; 101\(5\):2072](#).
5. Schroeder TM, Kurth. Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. *Blood* [1971; 37:96-112](#).
6. Tischkowitz MD, Hodgson SV. Fanconi anaemia. *J Med Genet*. [2003; 40:01-10](#).
7. De Kerviler, Guermazi A, Zagdanski, et al. The clinical and radiological features of Fanconi's anemia. *Clin Radiol* [2000; 55:340-345](#).
8. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-Year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* [2003; 101\(4\):1249-56](#).
9. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, et al. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an international Fanconi Anemia Registry study. *Blood* [1994; 84\(5\):1650-5](#).
10. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* [2003; 101\(3\):822-6](#).
11. Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet*. [1992; 1:196-8](#).
12. Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, et al. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet*. [1996; 14\(4\):488](#).
13. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* [2002; 297:606-9](#).

14. Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, et al. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 2001; 7:241-8
15. de Winter JP, Leveille F, van Berkel CG, et al. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(5):1306-08.
16. de Winter JP, Rooimans MA, van der Weel L, et al. The Fanconi anemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet.* 2000; 24:15-16.
17. de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, et al. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet.* 1998; 20:281-3
18. Dorsman JC, Levitus M, Rockx D et al. Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol* 2007; 29(3):211-8.
19. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence of two new genetic subtypes. *Blood* 2004; 103(7):2498-2503.
20. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet.* 2003; 35(2):165-170.
21. Meetei AR, Medhurst AL, Ling C et al. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet.* 2005; 37(9):958-63.
22. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet.* 2007; 39(2):162-4.
23. Meetei AR, Levitus M, Xue Y et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet.* 2004; 36(11):1219-24.
24. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Nat Rev Genet.* 2001; 2:446-57.
25. Wang X, D'Andrea AD. The interplay of fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA repair (Amst).* 2004; 3:1063-69.
26. Grompe M, D'Andrea A. Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(20):2253-9.
27. Kinzler S, Vogelstein B. Cancer susceptibility genes: gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386(6627):761-3.

28. Higuera IG, Taniguchi, Ganesan S, et al. Interaction of Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. *Molecular Cell*. 2001; 7(2):249-62.
29. Digweed M, Hoehn H, Sperling K. Milestones in Fanconi Anemia Research. Hrsg: Schindler D, Hoehn H. *Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the understanding of cancer and Aging*. *Monogr Hum Genet*. Basel: Karger, 2007; 15:23-38.
30. Escarceller M, Rousset S, Moustacchi E et al. The fidelity of double strand breaks processing is impaired in complementation group B and D of Fanconi anemia, a genetic instability syndrome. *Somat Cell Mol Genet*. 1997; 23(6):401-11.
31. Smith J, Andrau JC, Kallenbach S, et al. Abnormal rearrangements associated with V(D)J recombination in Fanconi anemia. *J Mol Biol*. 1998; 281(5):815-25.
32. Obe G, Pfeiffer P, Savage RJ, et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res*. 2002; 504(1-2):17-36.
33. Schröder TM, Anschutz F, Knopp A. Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathie. *Humangenetik* 1964; 1(2):194-6.
34. Duker NJ. Chromosome breakage syndromes and cancer. *Am j Med Genet*. 2002; 115(3):125-9.
35. Charames GS, Bapat B. Genomic instability and cancer. *Curr Mol Med*. 2003; 3(7):589-96.
36. Joenje H, Arwert F. Connecting Fanconi anemia to BRCA1. *Nat Med*. 2001; 7(4):406-7.
37. Gush KA, Fu KL, Grompe M, et al. Phenotypic correction of fanconi anemia group C knockout mice. *Blood* 2000; 95(2):700-4.
38. Liu JM, Kim S, Read EJ, et al. Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther*. 1999; 10(14):2337-46.
39. Lo Ten Foe JR, Kwee MR, Rooimans MA. Somatic mosaicism in Fanconi Anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet* 1997; 5(3):137-58.
40. Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, et al. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genom Res*. 2002; 98(2-3):126-35.

41. Neitzel H, Tönnies H. Bestimmung von klonalen Chromosomenveränderungen im Knochenmark von Fanconi-Anämie-Patienten. Hrsg.: [Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte](#). Hagen: [Druck Thiebes](#), [2005: 131-48](#).
42. Soulier J, Leblanc T, Larghero J, et al. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. [Blood](#) 2005; [105\(3\):1329-36](#).
43. Rackoff W. Treatment of bone marrow failure. Hrsg: [Owen J. Fanconi anemia - standards for clinical care](#). Oregon: [Fanconi Anemia Research Fund Inc](#), 1999: 9-20.
44. Guardiola P, Pasquini R, Dokal I, et al. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. [Blood](#) 2000; [95\(2\): 422-29](#).
45. Kook H. Fanconi anemia: current management. [Hematology](#) 2005; [1:108-10](#).
46. Guardiola P, Kurre P, Vlad A, et al. Effective graft-versus-leukaemia effect after allogeneic stem cell transplantation using reduced-intensity preparative regimens in Fanconi anaemia patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukaemia. [Br J Haematol](#). 2003; [122\(5\):806-9](#).
47. MacMillan ML, Auerbach AD, Davies SM et al. Haematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anaemia using alternate donors: results of a total body irradiation dose escalation trial. [Br J Haematol](#). 2000;[109\(1\):121-9](#).
48. Gluckman E, Auerbach AD, Horowitz MM, et al. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. [Blood](#) 1995; [86\(7\): 2856-62](#).
49. Wagner JE, Eapen M, MacMillan ML, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of fanconi anemia. [Blood](#) 2007; [109\(5\):2256-62](#).
50. Gluckman E, Rocha V, Ionescu I, et al. Results of unrelated cord blood transplant in fanconi anemia patients: risk factor analysis for engraftment and survival. [Biol Blood Marrow Transplant](#) [2007; 13\(9\):1073-82](#).

51. Frohnmayer L, Frohnmayer D. Definition, Merkmale und Diagnose der Fanconi-Anämie. Hrsg.: [Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte](#). Hagen: [Druck Thiebes](#), [2005:57-68](#).
52. Wagner JE, MacMillan M, Auerbach AD. Hematopoietic Cell Transplantation for Fanconi Anemia. Hrsg.: [Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation](#). Oxford: [Blackwell Publishing Ltd.](#),2003.
53. Giampietro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC, et al. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the international Fanconi Anemia Registry. [Pediatrics](#) 1993; 91(6): 1116-20.
54. Giampietro PF, Verlander PC, Davis JG, et al. Diagnosis of Fanconi anemia patients without congenital malformations: an international Fanconi Anemia registry Study. [Am J Med Genet](#). 1997; 68(1):58-61.
55. Huck K, Hanenberg H, Gudowius S, et al. Delayed diagnosis and complications of Fanconi anaemia at advanced age--a paradigm. [Br. J Haematol](#). 2006; 133(2): 188-97.
56. Esmer C, Sanchez S, Ramos S, et al. DEB test for Fanconi anemia detection in patients with atypical phenotypes. [Am J Med Genet A](#). 2004; 124(1):35-9.
57. Frohnmayer L, Frohnmayer D. Behandlung und Therapie der Fanconi-Anämie. Hrsg.: [Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte](#). Hagen: [Druck Thiebes](#), [2005:37-56](#).
58. German J, Schonberg S, Caskie S, et al. A test for Fanconi's anemia. [Blood](#) 1987; 69(6): 1637-41.
59. Auerbach AD. A test for Fanconi's anemia. [Blood](#) [1988](#); [72\(1\)](#):[366-67](#).
60. New HV, Cale CM, Tischkowitz, et al. Nijmegen breakage syndrom diagnosed as Fanconi anemia. [Pediatr Blood Cancer](#) 2005; 44(5):494-99.
61. Gennery AR, Slatter MA, Bhattacharya A, et al. The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia. [Clin Immunol](#) 2004; 113(2):214-9.

62. Bobabilla-Morales L, Corona-Rivera A, Corona-Rivera JR, et al. Chromosome instability induced in vitro with mytomyacin C in five Seckel syndrome patients. *Am J Med Genet* [2003; 123\(2\):148-52.](#)
63. Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, et al. The cell cycle of lymphocytes in fanconi anemia. *Hum Genet.* [1982; 62\(4\):327-32.](#)
64. Miglierina R, Le Coniat M, Berger R. A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow-cytometry. *Anal Cell Pathol.* 1991; 3(2):111-118.
65. Berger R, Le Coniat M, Gendron MC. Fanconi anemia. Chromosome breakage and cell cyclus studies. *Cancer Genet Cytogenet.* [1993; 69\(1\):13-16.](#)
66. Seyschab H, Friedl R, Sun Y, et al. Comparative Evaluation of diepoxybutane Sensitivity and Cell Cycle Blockage in the Diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 1995; [85\(8\):2233-7.](#)
67. Miglierina R, Le Coniat M, Gendron M, et al. Diagnosis of Fanconi anemia by flow cytometry. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1990; 32(6): 391-3.
68. Shimamura A, Montes de Oca R, Svenson J, et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood* 2002; [100\(13\):4649-54.](#)
69. Kook H, Cho D, Cho SH, et al. Fanconi anemia screening by diepoxybutane and mitomyacin C test in Korean children with bone marrow failure syndromes. *J Korean Med Sci.* 1998; [13\(6\):623-8.](#)
70. Talwar R, Choudry VP, Kucheria K. Differentiation of fanconi anemia from idiopathic aplastic anemia by induced chromosomal breakage study using mitomyacin-C (MMC). *Indian Pediatr.* 2004; [41\(5\):473-7.](#)
71. Gluckman E. Radiosensitivity in Fanconi anemia: application to the conditioning for bone marrow transplantation. *Radiother Oncol.* 1990;18 Suppl 1:88-93.
72. Cervenka J, Hirsch BA. Cytogenetic differentiation of Fanconi anemia, "idiopathic" aplastic anemia, and Fanconi anemia heterozygotes. *Am J Med Genet.* 1983; [15\(2\):211-23.](#)
73. Shimamura A. Behandlung der hämatologischen Probleme von Patienten mit Fanconi-Anämie. Hrsg.: *Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte.* Hagen: *Druck Thiebes*, [2005: 105-124.](#)

74. Alter BP, Caruso JP, Drachtman RA, et al. Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000; 117(2):125-131.
75. Maarek O, Jonveaux P, Le Coniat M, et al. Fanconi anemia and bone marrow clonal chromosome abnormalities. *Leukemia* 1996; 10(11):1700-4.
76. Auerbach AD, Allen RG. Leukemia and preleukemia in Fanconi Anemia patients: a review of the literature and report of the international Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet Cytogenet.* 1991; 51(1):1-12.
77. Yilmaz Z, Alioglu B, Ozalp O, et al. Clonal monosomy 7 in megakaryoblastic leukemia developed on the basis of Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2005; 27(10):565-6.
78. Berger R, Le Coniat M, Schaison G. Chromosome abnormalities in bone marrow of Fanconi anemia patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 65(1):47-50.
79. Oliveira NI, Ribeiro EM, Raimondi SC, et al. Two different karyotypes with 1q abnormalities in a patient with Fanconi anemia. *Leuk Res.* 2002; 26(11):1047-9.
80. Berger R, Bernheim A, Le Coniat M, et al. Chromosomal studies of leukemic and preleukemic Fanconi's anemia patients: examples of acquired 'chromosomal amplification'. *Hum Genet.* 1980; 56(1):59-62.
81. Ferro MT, Vazquez-Mazariego Y, Ramiro S, et al. Triplication of 1q in Fanconi anemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 127(1):38-41.
82. Alter BP, Scalise A, McCombs J, et al. Clonal chromosomal abnormalities in Fanconi's anaemia: what do they really mean? *Br J Haematol.* 1993; 85(3):627-630.
83. Berger R, Jonveaux P. Clonal chromosome abnormalities in Fanconi anemia. *Hematol Cell Ther.* 1996; 38(4): 291-6.
84. Tönnies H, Huber S, Kühl JS, et al. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood* 2003; 101(10):3872-4.
85. Stumm M, Neubauer S, Keindorff S, et al. High frequency of spontaneous translocations revealed by FISH in cells from patients with the cancer-prone syndromes ataxia te-

- langiectasia and Nijmegen breakage syndrom. *Cytogenet Cell Genet.* 2001; 92(3-4):186-91.
86. Brown MG, Lawce HJ. *Peripheral blood cytogenetic methods.* Hrsg.: Barch M, Knutsen T, Spurbeck JK. The AGT Cytogenetics Laboratory manual. Basel: Karger, 1991.
87. Shaffer LG, Tommerup N. *ISCN 2005: An International System for human Cytogenetic Nomenclature.* Basel: Karger, 2005.
88. Kong X, Murphy K, Raj T, et al. A combined Linkage-Physical Map of the human genome. *Am J Human Genet.* 2004; 75(6):1143-8.
89. Scalenghe F, Turco E, Edström, et al. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of Drosophila melanogaster polytene chromosomes. *Chromosoma* 1981; 82(2):205-16.
90. Tönnies H. Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *Trends in molecular Medicine* 2002; 8(6):246-50.
91. Senger G, Lüdecke HJ, Horsthemke B, et al. Microdissection of banded human chromosomes. *Hum Genet.* 1990; 84(6):507-11.
92. Rautenstrauß B, Liehr T. *FISH Technology: Lab Manual.* Berlin-Heidelberg: Springer, 2002.
93. Plesch A, Loerrch T. Metafer- a novel Ultra High Throughput Scanning System for rare Cell Detection and Automatic Interphase FISH Scoring. *Metasystems* 2001; 329-39.
94. Schunck C, Johannes T, Varga D, et al. New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 104(1-4):383-9.
95. Callen E, Ramirez MJ, Creus A, et al. Relationship between chromosome fragility, aneuploidy and severity of the haematological disease in Fanconi anaemia. *Mutat Res.* 2002; 504(1-2):75-83.
96. Tischkowitz M, Dokal I. Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *British Journal of Haematology* 2004; 126(2):176-91.
97. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* 1989; 73(2):391-6.

98. Johnson KL, Tucker JD, Nath J. Frequency, distribution and clonality of chromosome damage in human lymphocytes by multi-color FISH. *Mutagenesis* 1998; 13(3):217-27.
99. Luomahaara S, Lindholm C, Mustonen R, et al. Distribution of radiation-induced exchange aberrations in human chromosomes 1, 2 und 4. *Int J Radiat Biol.* 1999; 75(12):1551-6.
100. Barrios L, Miro R, Caballin MR, et al. Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989; 41(1):61-70.
101. Knehr S, Zitzelsberger H, Braselmann H, et al. Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations. *Int J Radiat Biol.* 1996; 70(4):385-92.
102. Barquinero JF, Knehr S, Braselmann H, et al. DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype. *Int J Radiat Biol.* 1998; 74(3):315-23.
103. Braselmann H, Kulka U, Huber R, et al. Distribution of radiation-induced exchange aberrations in all human chromosomes. *Int J Radiat Biol.* 2003; 79(6):393-403.
104. Sakamoto Hojo ET, van Diemen PC, Darroudi F, et al. Spontaneous chromosomal aberrations in Fanconi anaemia, ataxia telangiectasia fibroblast and Bloom's syndrome lymphoblastoid cell lines as detected by conventional cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridisation (FISH) technique. *Mutat Res.* 1995; 334(1):59-69.
105. Richardson AM. Chromosome Analysis. Hrsg.: Barch M, Knutsen T, Spurbeck JK. *The agt cytogenetics laboratory manual.* USA: Lippincott-Raven, 1991.
106. Natarajan AT, Obe G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. I. Utilization of Neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle. *Mutat Res.* 1978; 52(1):137-149.
107. Johnson RD, Liu N, Jasin M. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature* 1999; 401(6751):397-99

108. Digweed M, Sperling K. Molecular analysis of Fanconi anaemia. *Bioessays* [1996; 18\(7\):579-85.](#)
109. Bourgeois. Distribution of mitomycin C-induced damage in human chromosomes with special reference to regions of repetitive DNA. *Chromosoma* [1974; 48\(2\):203-11.](#)
110. Keyes SR, Loomis R, DiGiovanna, et al. Cytotoxicity and DNA crosslinks produced by mitomycin analogs in aerobic and hypoxic EMT6 cells. *Cancer Commun.* [1991;3\(10-11\):351-6.](#)
111. Dronkert ML, Kanaar R. Repair of interstrand cross-links. *Mutat Res.* [2001; 486\(4\):217-47.](#)
112. Bram S, Swolin B, Rödger S, et al. Is monosomy 5 an uncommon aberration? Fluorescence in situ hybridization reveals translocations and deletions in myelodysplastic syndromes or acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* [2003; 142\(2\):107-14.](#)
113. Stumm M, Tönnies H, Wieacker PF. Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood disease. *Eur J Pediatr* [1999; 158\(7\):531-6.](#)
114. Aten JA, Stap J, Krawczyk PM, et al. Dynamics of DNA double strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* [2004; 303\(5654\):92-5.](#)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Hier möchte ich zuerst Frau Professor Heidemarie Neitzel nennen, die mir dieses hochinteressante Projekt ermöglicht hat. Ihr kompetenter Rat, große Erfahrung und warmherzige Unterstützung kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute und bildeten das Grundgerüst zum Gelingen dieser Arbeit. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die sie mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte.

Des Weiteren möchte ich mich besonders herzlich bei Herr Professor Holger Tönnies bedanken. Mit großem Einsatz gewährte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige und wertvolle Unterstützung. Seine wegweisenden Ideen und seine motivierende Grundhaltung gerade in frustrierenden Abschnitten der Dissertation haben wesentlich zum erfolgreichen Erstellen der Arbeit beigetragen.

Für die unermüdliche, sehr geduldige und professionelle Einführung in sämtliche humangenetische Laborkünste danke ich Frau Gerlach und Frau Teubner ganz herzlich. Frau Gerlachs kreativen Ideen und Ihren persönlichen Einsatz bei der Sondenherstellung werde ich immer in dankbarer Erinnerung behalten. Ein großes Dankeschön auch an Diplom-Biologin Anne-Susan Müller, von deren Erfahrung ich vielfach profitieren konnte.

Auch sei Marion, Marek, Jens, Vivian, Karl und Wolfgang herzlichst gedankt für die finanzielle und emotionale Unterstützung dieser Arbeit. Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mutter, die Korrektur gelesen hat und eine große, liebevolle Stütze in schwierigen Phasen war.

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Erklärung

„Ich, Daniel Paul , erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse der Chromosomeninstabilität bei Fanconi-Anämie-Patienten mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und konventioneller Zytogenetik“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

05.10.10