

Kapitel 18

Mutationsanalyse in den Fanconi-Anämie-Genen

Kornelia Neveling, Reinhard Kalb, Michaela Gross
Institut für Humangenetik, Universität Würzburg

Hintergrund

Drei Faktoren erscheinen im Einzelfall von maßgeblicher Bedeutung für Schweregrad und Krankheitsverlauf bei Fanconi-Anämie (FA): (1) Der spezielle Typ der Mutation(en) bei einem Patienten, (2) Entstehung oder Ausbleiben eines somatischen Mosaiks in hämatopoetischen Zellen (vgl. Kapitel 20) und (3) das im jeweiligen Falle betroffene FA-Gen, welches durch die Zuordnung zu einer Komplementationsgruppe bestimmt wird (s. u.). Für die Untersuchung aller drei Aspekte sind Mutationsanalysen notwendig.

Mutationen in den FA-Genen führen generell zur Ausprägung des charakteristischen Krankheitsbildes. Es gibt aber Mutationen, die einen leichteren Krankheitsverlauf bedingen, da eine Restfunktion des Genproduktes erhalten bleibt. Im Laufe des Lebens erworbene Rückmutationen oder zusätzliche „kompensierende“ Mutationen, die den krankheitsauslösenden Mutationen entgegenwirken, können dazu führen, dass eine „Selbstreparatur“ bei einem Teil der Blutzellen stattfindet, was sich in einem günstigeren Verlauf mit einer plötzlichen Änderung der Blutwerte zum Besseren äußert. In diesem Fall wird von einem „somatischen Mosaik im blutbildenden System“ gesprochen.

Sicheren Hinweis auf die Entwicklung einer Mosaik-Konstellation gibt der Nachweis einer FA-Mutation in Hautzellen, die sich in Blutzellen des Patienten in derselben Form nur (noch) teilweise oder gar nicht (mehr) finden lässt.

Um herauszufinden, in welchem Gen die krankheitsauslösende Mutation zu finden ist, wird vor der Mutationsanalyse eine „Komplementationsgruppen“-Bestimmung durchgeführt (vgl. Kapitel 17). Die Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe wird anschließend durch Mutationsnachweis bestätigt.

Eine Mutationsanalyse kann daher für verschiedene Fragestellungen der FA-Diagnostik, auch der pränatalen Diagnostik und Heterozygoten-Erkennung innerhalb von Familien, sowie der Prognose hilfreich sein.

Strategie

Ist bei einem Patienten der Verdacht auf FA bestätigt, wird versucht, die zugrunde liegende Mutation zu identifizieren. Ein hilfreicher Schritt für diese Mutationsanalyse ist die Einteilung der Patienten in Komplementationsgruppen, wobei alle Patienten einer Komplementationsgruppe Veränderungen im gleichen Gen zeigen.

Zurzeit sind 11 verschiedene Komplementationsgruppen (FA -A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J und -L) bekannt. Neun der zugrunde liegenden Gene sind beschrieben (*FANCA*, *-B*, *-C*, *-D1*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G* und *-L*). Eine erfolgreiche Zuordnung eines Patienten zu einer Komplementationsgruppe bedeutet also gleichzeitig die Identifikation des betroffenen Gens, das dann auf Mutationen hin untersucht werden kann.

Manchmal kann die regionale oder ethnische Herkunft eines Patienten den Ablauf der Mutationssuche bestimmen und vereinfachen. Beispielsweise existiert innerhalb der Komplementationsgruppe C eine Spleißmutation (IVS4 +4 A →T), die in über 80% der FA-Fälle bei Ashkenazi-Juden nachgewiesen werden kann. Die Exon-1-Mutation 67delG (früher 322delG) in *FANCC*, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führt, ist besonders in den Niederlanden recht verbreitet (Joenje et al., 2004). Gegebenenfalls kann daher bei Patienten bestimmter Herkunft nach solchen Mutationen zuerst gesucht werden.

Technischer Ablauf

Als Untersuchungsmaterial dienen meist Blutproben (Heparinblut). Bei der Fragestellung einer Mosaik-Konstellation ist zusätzlich ein Hautbiopsat erforderlich. Aus diesem Untersuchungsmaterial werden in der Regel zunächst in Kultur wachsende Zelllinien angelegt. Sind solche Linien einmal etabliert, werden sie zunächst zur Komplementationsanalyse eingesetzt. Später kann daraus auch wiederholt DNA gewonnen werden, welche die Erbinformation des Patienten enthält (Abb. 1a).

Die Zuordnung zu einer Komplementationsgruppe geschieht in Würzburg in Kooperation mit Herrn Priv. Doz. Dr. Hanenberg von der Kinderklinik der Universität Düsseldorf. Verwendet werden diagnostische „Retroviren“, die so modifiziert sind, dass sie die Erbinformation von jeweils einem bekannten Fanconi-Protein enthalten. Entsprechende Viren wurden in Deutschland von Priv. Doz. Dr. Helmut Hanenberg entwickelt (siehe Kapitel 17). Inzwischen sind 8 Typen solcher Retroviren hergestellt worden (mit den Genen *FANC-A*, *-C*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G* und *-L* bzw. ohne *FANC*-Gen als Kontrolle).

Die zu untersuchenden Zelllinien werden mit jeweils einem dieser Viren infiziert. Wurde eine Zelllinie mit einem Retrovirus infiziert, welches das beim Patienten betroffene Gen enthält, so kann dieses künstlich eingebrachte „gesunde“ Gen das mutierte Gen ersetzen: Das mutierte Gen wird durch die Anwesenheit des eingebrachten Gens „komplementiert“. Da sich die Empfindlichkeit der Patientenzellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen im Falle des passenden Gens in der Zellkultur normalisiert, lässt sich beispielsweise mit Hilfe der Methode der Durchflusszytometrie feststellen, ob eine Komplementation vorliegt oder nicht.

Ist ein Patient einer Komplementationsgruppe zugeordnet, so wird versucht, die zugrunde liegende Mutation im betroffenen Gen zu identifizieren. Hierzu wird zunächst die Erbinformation (DNA) des zu untersuchenden FA-Gens in Form kleiner Abschnitte vervielfältigt, um ausreichende Materialmengen für die Mutationsanalyse zu erhalten (Abb. 1b). Im Normalfall enthal-

ten diese Abschnitte jeweils ein Exon (kodierender Bereich der DNA) sowie den angrenzenden Intronbereich (nicht kodierend). Für jeden dieser kleinen Abschnitte wird dann die Aufeinanderfolge der vier DNA-Grundbausteine (Nukleotide) A, C, G und T bestimmt, ein Vorgang, der „Sequenzieren“ genannt wird.

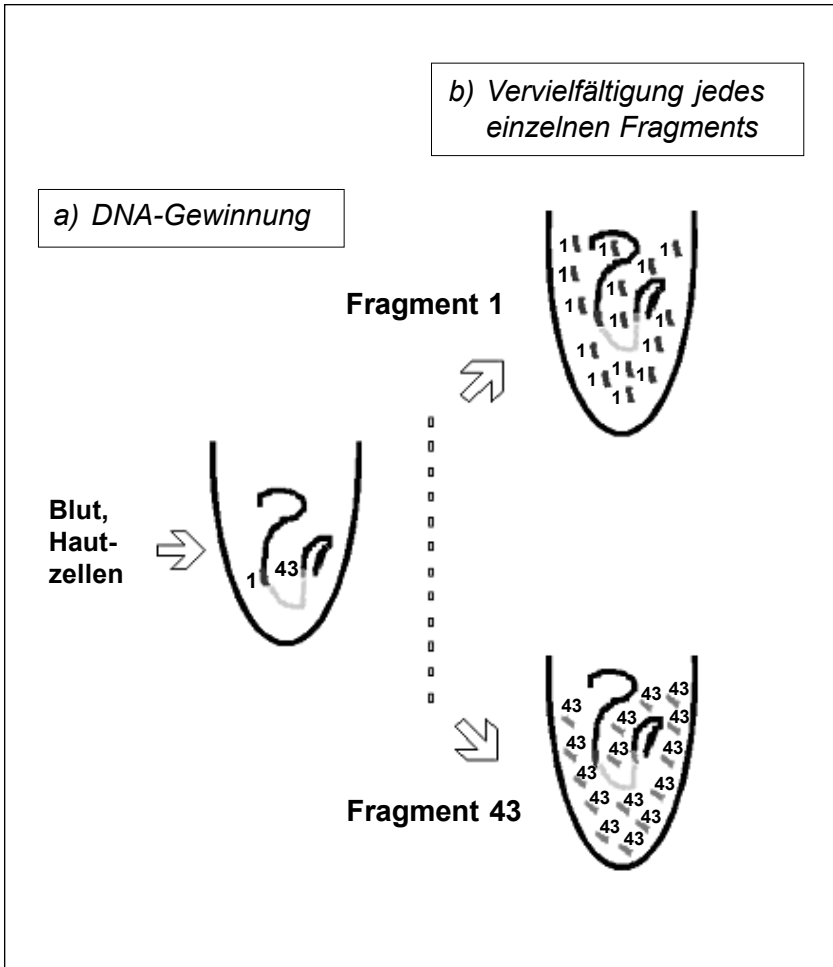


Abb. 1: schematische Darstellung des Ablaufs der Mutationsanalyse im betroffenen FANC-Gen - a) Aus kultivierten Blut- oder Hautzellen wird zunächst DNA isoliert - b) Alle Exonabschnitte des FANC-Gens mit angrenzenden Intronbereichen werden vervielfältigt.

Im Anschluss an die Sequenzierung wird die ermittelte Aufeinanderfolge der Basenbausteine mit der normalen Referenzsequenz des jeweiligen FA-Gens verglichen (Abb. 1c, siehe obere Farbbildung auf der hinteren Umschlagseite). Die Referenzsequenzen aller bislang identifizierten FA-Gene sind in Datenbanken öffentlich zugänglich. Wichtig ist, dass nicht jede Abweichung in der Aufeinanderfolge der Basen gegenüber der Kontrollsequenz zwingend eine Mutation darstellt: Es gibt Abweichungen, die nicht zur Funktionsbeeinträchtigung führen (Polymorphismen).

Die häufigsten Arten von Gen-Veränderungen

DELETION: Dies bedeutet, dass ein mehr oder weniger großer Abschnitt eines Gens verloren gegangen ist, d. h. es kann von einem einzelnen Nukleinsäurebaustein bis hin zum gesamten Gen alles fehlen. Diese Veränderungen führen in der Regel zum Funktionsverlust des Eiweißes.

INSERTION: Bei einer Insertion ist ein mehr oder weniger großer DNA-Abschnitt zusätzlich in ein Gen eingefügt. Auch hierbei handelt es sich in der Regel um krankheitsrelevante Mutationen.

SPLEISSMUTATION: „Spleißen“ bedeutet das natürliche Herausschneiden eines Abschnitts aus der Botschaft eines Gens, der nicht direkt zur Eiweißbildung benötigt wird. Liegt eine Spleißmutation vor, so werden entweder wichtige Informationen aus der Gen-Botschaft fälschlicherweise herausgeschnitten oder unsinnige Informationen fälschlicherweise in der Botschaft belassen. Auch in diesen Fällen ergibt sich ein verändertes Genprodukt (Eiweiß) meist mit Funktionsverlust.

BASENAUSTAUSCH: Von Basenaustauschen spricht man, wenn innerhalb der Erbinformation an einer bestimmten Position eine der vier Basen (A, G, C, oder T) durch eine andere ersetzt wurde. Dies ist ein recht häufiger Fehler, der zum Beispiel bei der Weitergabe der Erbinformation passieren kann. Oft hat so ein Basenaustausch keinerlei Auswirkungen. Problematisch wird es, wenn der Basenaustausch einen Aminosäureaustausch zur

Folge hat: Hierbei handelt es sich um Veränderungen einzelner Eiweiß-Bausteine (Aminosäuren) aufgrund fehlerhaft veränderter Informationen an einem Punkt des Gens (also aufgrund eines Basenaustausches). Je nachdem, ob ähnliche oder unähnliche Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht werden, kann es sich um Mutationen oder Polymorphismen handeln. Um beide Möglichkeiten voneinander zu unterscheiden, wird bei einer derartigen Veränderung eine größere Anzahl normaler Kontrollpersonen auf diesen Austausch hin untersucht. Wird der Austausch auch in den Kontrollen gefunden, spricht diese Tatsache für einen harmlosen Polymorphismus, ansonsten wird er als Mutation klassifiziert. Selbst dann bleiben aber solche Aminosäureaustausche noch unsicher in ihrer möglichen Bedeutung als Krankheitsursache. Letztlich können nur Funktionstests zwischen Polymorphismen und echten Mutationen unterscheiden.

Mutationen in den Fanconi-Anämie-Genen

Die meisten FA-Patienten gehören den Komplementationsgruppen FA-A, -C und -G an. Ebenfalls wichtig sind die Gruppen FA-D1 (=BRCA2) und FA-D2. Deshalb wird im Folgenden speziell auf die Mutationsanalyse in den häufigen FA-Genen eingegangen.

FANCC war das erste identifizierte FA-Gen. Ungefähr 10% aller Patienten weisen hierin Mutationen auf (Abb. 2). Wie bereits erwähnt, existieren innerhalb von *FANCC* zwei Mutationen, die in bestimmten ethnischen Gruppen wiederkehren. Früher wurde angenommen, dass die Suche nach diesen beiden Veränderungen die meisten *FANCC* Mutationen erfassen würde. Da aber inzwischen auch viele sogenannte „private“ Mutationen über das ganze Gen verteilt gefunden wurden, wird auch in Zukunft im Regelfall das komplette Gen untersucht werden müssen (Rischewski et al., 2004).

Die Häufigkeit von Patienten, die Mutationen in *FANCG* aufweisen, bewegt sich bei etwa 9% (Abb. 2). Auch hier liegen die Mutationen relativ verstreut vor. Das *FANCG* Gen ist als solches wenig polymorph, d. h. ein großer Teil der bei der

Mutationsanalyse aufgefundenen Veränderungen stellt echte Mutationen dar (Demuth et al., 2000). Manche Patienten der Komplementationsgruppe G scheinen früher im Leben Knochenmarkversagen zu bekommen als Patienten der Gruppen A und C (Joenje et al., 2004).

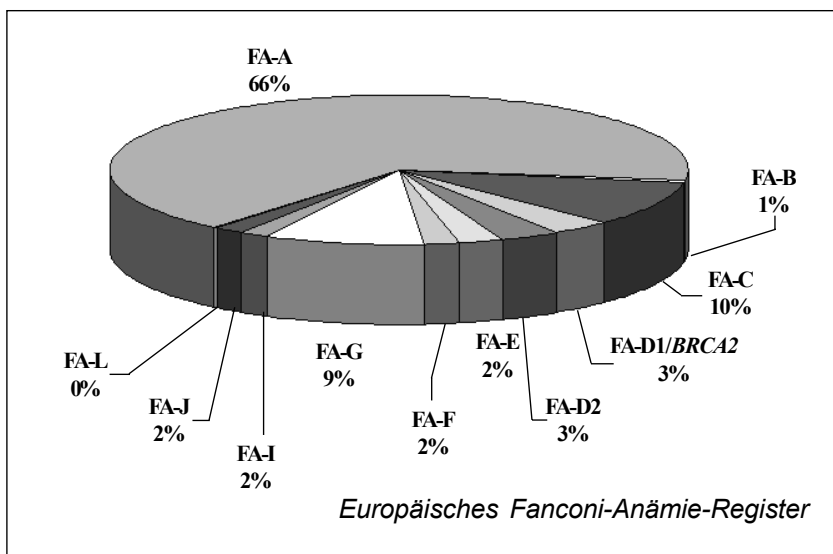


Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der Patienten in den Komplementationsgruppen - Dargestellt ist die Verteilung bisher klassifizierter europäischer FA-Patienten in den verschiedenen Komplementationsgruppen. Die Daten entstammen dem European Fanconi Anemia Registry (EUFAR). Die am häufigsten vorkommenden Komplementationsgruppen sind FA-A (66%), FA-C (10%), FA-G (9%), FA-D2 (3%) und FA-D1 (3%). Von FA-L existiert bisher nur 1 Patient, daher ergab die per Computer errechnete Prozentzahl einen Wert von 0% (Levitus et al., 2004).

Die Mutationssuche im *FANCA*-Gen erweist sich als schwierig, weil dieses Gen wesentlich größer ist als *FANCC* und *FANCG*. Die Zahl der betroffenen Patienten in diesem Gen liegt bei 66% (Abb. 2). Darüber hinaus ist *FANCA* hochpolymorph, d. h. es kann mit sehr vielen Veränderungen (Polymorphismen) durchsetzt sein, die aber nicht krankheitsrelevant sind. Ferner sind die Typen der aufgefundenen Mutationen sehr vielfältig und ihre Lokalisation ist über das gesamte *FANCA*-Gen verteilt.

Die meisten Patienten der Komplementationsgruppe A zeigen sogenannte „private“ Mutationen. Diese liegen nur selten in homozygoter Form (auf beiden Allelen des *FANCA*-Gens) vor; die meisten Patienten sind sogenannte „Compound“-Heterozygote, d. h. sie haben von ihrer Mutter und ihrem Vater jeweils unterschiedliche Mutationen ererbt. Dies alles hat zur Folge, dass die Mutationssuche im *FANCA*-Gen sehr aufwendig ist und in der Regel lange dauert (Gross et al., 2002).

Nachweis des Proteins für FANCD2

Können Zellen von FA-Patienten im Labor mit Hilfe der Retroviren keiner häufigen Komplementationsgruppe zugeordnet werden, so wird versucht, das FANCD2-Protein nachzuweisen. D2 ist ein FA-Protein, das als Antwort auf DNA-Schäden auf eine bestimmte Art modifiziert wird und so einen wichtigen Schritt zur DNA-Reparatur einleitet. Einige FA-Proteine (wie z. B. die oben erwähnten A, C und G) sind für diese Modifikation notwendig, andere (wie z. B. D1) wirken erst im Anschluss daran.

Der Nachweis von D2 und damit die Untersuchung, ob die Modifikation stattgefunden hat oder nicht, erfolgt mit der Methode des „Western Blotting“. Hierbei werden alle Proteine einer Patienten-Zelllinie isoliert und in einer Gelmatrix elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine werden anschließend auf eine Membran übertragen („geblottet“), wo sie mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden (Abb. 3).

Wurde nun D2 aufgrund eines Defektes in einem vorgeschalteten FA-Gen nicht modifiziert, so lässt sich auf der Membran nur ein einziges Signal nachweisen. Sieht man dagegen zwei Signale, so funktioniert die D2-Modifikation noch. In diesem Fall ist ein FA-Gen mutiert, das für die Modifikation von D2 nicht notwendig ist. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass gar kein Signal zu sehen ist, was bedeutet, dass das D2-Gen selbst mutiert ist und folglich kein D2-Protein gebildet wird (Van der Heijden, 2004). Dieser Nachweis kann inzwischen auch mit diagnostischen retroviralen Vektoren erfolgen.

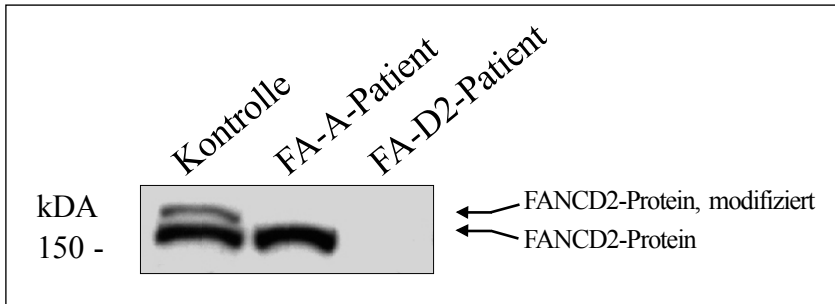


Abb. 3: FANCD2-Western-Blot - Dargestellt ist ein Ausschnitt eines FANCD2-Western-Blots mit 3 Proben. In der ersten Spur ist eine gesunde Kontrolle aufgetragen. Die Modifikation von FANCD2 funktioniert normal, daher sind 2 Banden erkennbar. In der zweiten Spur ist Proteinextrakt eines FA-Patienten aufgetragen. Die FANCD2-Modifikation funktioniert nicht, man sieht nur eine Bande. Spur 3 zeigt den Proteinextrakt eines FA-D2-Patienten. Bei diesem wird kein FANCD2-Protein gebildet, daher ist kein Signal zu sehen.

FANCD2 ist das vierthäufigste mutierte FA-Gen (mindestens 3%, Abb. 2). Mutationen in *FANCD2* sind über das ganze Gen hinweg zu finden. Allerdings gibt es auch hier sogenannte „Gründer-Mutationen“, die in Patientengruppen gleicher ethnischer Herkunft vermehrt auftreten. Auffällig ist weiterhin, dass die meisten Mutationen im *FANCD2*-Gen zu fehlerhaftem Spleißen führen.

Ein Protein, das nicht für die FANCD2-Modifikation notwendig ist und folglich nach *FANCD2* wirkt, ist *FANCD1* (3%, Abb. 2). Dieses Gen bildet eine Ausnahme unter den FA-Genen. Unter dem Namen *BRCA2* war es schon lange als Brustkrebs-Gen bekannt, ehe es sich als ein Fanconi-Anämie-Gen erwies. Patienten, die Defekte in diesem Gen aufweisen, sind meist schwerer betroffen als andere FA-Patienten. Dies deutet darauf hin, dass dieses Gen nicht nur mit den anderen FA-Genen zusammenarbeitet, sondern weitere wichtige Aufgaben hat. Eine mögliche Veränderung in *BRCA2* wird nach Ausschluss der anderen FA-Gene ebenfalls mit Hilfe des Western-Blot-Suchverfahrens überprüft. Liegt keine Mutation im *BRCA2*-Gen vor, so wird das Protein normal gebildet und lässt sich als Bande nachweisen.

Erhält man dagegen kein Signal, so ist das betroffene Gen gefunden (Popp et al., 2003). Es sind relativ wenige FA-Patienten mit *BRCA2*-Mutationen bekannt. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass Mutationen in diesem Gen so schwerwiegende Folgen haben, dass solche Patienten vorgeburtlich sterben oder früh in der Kindheit an Leukämie erkranken und nicht überleben.

Es gibt Patienten-Zelllinien, die trotz Vektoren- und Western-Blot-Analyse keiner bekannten Komplementationgruppe zugeordnet werden können. Da manche von diesen im Western-Blot die D2-Modifikation zeigen und andere dies nicht tun, lässt sich daraus schließen, dass es noch mindestens zwei unbekannte FA-Gene, genannt *FANCI* und *FANCIJ*, geben muss, von denen das eine vor und das andere nach *FANCD2* wirkt. Die Identifikation dieser Gene ist für das Verständnis der FA und der Beteiligung des FA/BRCA-Weges an DNA-Reparaturprozessen von großer Bedeutung und daher ein weiteres Ziel der Mutationsanalyse.

-
1. Demuth I, Wlodarski M, Tipping AJ, Morgan NV, de Winter JP, Thiel M, Grasl S, Schindler D, D'Andrea AD, Altay C, Kayserili H, Zatteralie A, Kunze J, Ebell W, Mathew CG, Joenje H, Sperling K, Digweed M (2003) Spectrum of mutations in the Fanconi anemia group G gene, *FANCG/XRCC9*. *Eur J Hum Genet.* 8(11):861-8.
 2. Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H (2002) Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* 98:126-135.
 3. Joenje H, Pals G, Zwaan M (2004) Fanconi Anemia. In: Fuchs J, Podda M (eds) *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*.
 4. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, de Winter JP, Joenje H (2003) Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* Apr1; 103(7):2498-503.
 5. Popp H, Kalb R, Fischer A, Lobitz S, Kokemohr L, Hanenberg H, Schindler D (2003) Screening Fanconi anemia lymphoid cell lines of non- A, C, D2, E, F, G subtypes for defects in *BRCA2/FANCD1*. *Cytogenet Genome Res* 103:54-57
 6. Rischewski J, Gross M, zur Stadt U, Michael K, Kalb R, Hanenberg H, Schneppenheim R, Schindler D (2004) Revised Mutation Spectrum of the Fanconi Anemia Gene, *FANCC* (in preparation)
 7. van der Heiden MS, Brody JR, Kem SE (2004) Functional Screen of the Fanconi Anemia Pathway in Cancer Cells by *Fancd2* Immunoblot. *Cancer Biologie & Therapie* Vol.3 Issue 5