

Fankoni anemisinin genetik ve moleküler temelleri: Meme kanseri (BRCA1, BRCA2) ve ataksi telanjektazi yolaklarıyla buluşan ilginç birçok genli hastalık modeli

Günay Balta¹, Fatma Gümrük², Çiğdem Altay³

Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü ¹Moleküler Genetik Doktoru, Tıp Fakültesi, ²Pediyatri Profesörü, ³Emekli Pediyatri Profesörü

SUMMARY: Balta G, Gümrük F, Altay Ç. (Department of Pediatrics, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey). Genetic and molecular basis of Fanconi anemia: an interesting model of a multigenic disorder interacting with breast cancer (BRCA1, BRCA2) and ataxia telangiectasia (ATM) pathways. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2003; 46: 308-316.

Fanconi anemia (FA) is an autosomal recessive disorder characterized by multiple congenital abnormalities, bone marrow failure, cancer susceptibility and cellular sensitivity to cross-linking agents. To date, at least eight complementation groups (A-C, D1, D2, E-G) have been described and seven FA genes have been cloned. The protein products of these genes interact in a common pathway in response to DNA damage with cross-linking agents or during the S-phase of cell cycle. Five FA proteins (A, C, E, F, G) form a nuclear complex and mediate activation of D2 protein (FANCD2) by monoubiquitination. Activated FANCD2 is targeted to a nuclear DNA repair foci where it interacts with the breast cancer susceptibility (BRCA1, BRCA2) and other DNA repair proteins. Recent studies have revealed that FANCD1 and BRCA2 are in fact the same gene. On the other hand, the ataxia telangiectasia kinase (ATM) phosphorylates FANCD2 protein in response to ionizing radiation. Phosphorylated FANCD2 activates S-phase checkpoint to arrest cell cycle progression and allow time for DNA repair. These findings have indicated that FANCD2 functions at the intersection of two independent signaling pathways of the DNA repair.

Key words: Fanconi anemia, genetics, molecular basis, breast cancer, ataxia telangiectasia.

ÖZET: Fankoni anemisi (FA) çeşitli konjenital anomaliler, kemik iliği yetmezliği, kansere eğilim ve çapraz bağlayıcı ajanlara hücrel duyarlılıkla karakterize otozomal çekinik bir kalıtsal hastalıktır. Bu güne kadar, en az sekiz komplementasyon grubu (A-C, D1, D2, E-G) tanımlanmış ve bunlardan yedisinin geni klonlanmıştır. Bu genlerin protein ürünleri, çapraz bağlayıcı ajanlarla oluşan DNA zedelenmesine yanıtta veya hücre döngüsünün S-fazında ortak bir yolda etkileşim içine girerler. FA proteinlerinden beşi (A, C, E, F, G) bir nükleer kompleks oluşturup, monoübikütilasyonla D2 proteininin (FANCD2) aktivasyonuna aracılık eder. Aktif FANCD2, meme kanseri duyarlılık proteinleri (BRCA1, BRCA2) ve diğer DNA tamir proteinleriyle etkileşime gireceği bir nükleer DNA tamir fokusuna gönderilir. Son araştırmalar, FANCD1 ve BRCA2'nin gerçekte aynı gen olduğunu göstermiştir. Öte yandan, iyonize radyasyona yanıtta ise ataksi telenjektazi kinaz (ATM) FANCD2 proteinini fosforile eder. Fosforile FANCD2, S-faz kontrol noktalarını aktive ederek, ilerleyen hücre siklusunun duraklamasına ve DNA tamiri için zaman verilmesine olanak sağlar. Bu bulgular, FANCD2 proteininin DNA tamir mekanizmasında yer alan iki bağımsız sinyal yolağı arasında işlev gördüğünü göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Fankoni anemisi, genetik, moleküler temeller, meme kanseri, ataksi telenjektazi.

Guido Fanconi, ilk kez 1927 yılında, doğuştan çeşitli anomalileri ve ilerleyici aplastik anemisi olan üç kardeş tanımlamıştır. O tarihten itibaren literatürde Fanconi anemili pek çok hasta bildirilmiş ve yüzlerce hastada uluslararası kayıtlarda araştırılmak üzere toplanmıştır. Fanconi anemisi (FA), her ırk ve etnik grupta oldukça seyrek gözlenen, otozomal çekinik bir çocukluk çağı hastalığıdır. Dünyada hastalığın sıklığı milyonda 1-5, taşıyıcı sıklığı ise %0.3-1 olarak bildirilmektedir¹. Türkiye’de akraba evliliklerinin sıklığı nedeniyle bu prevalansın daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Çok erken yaşlarda kemik iliği yetmezliğinin gelişmesine bağlı komplikasyonlar ve başta AML olmak üzere çeşitli kanser türlerinin ortaya çıkmasına yatkınlık nedeniyle, bu hastalarda ortalama yaşam uzunluğu 20 yıl civarındadır (dağılım 0-50 yıl)².

Fanconi anemisi klinik ve genetik olarak son derece heterojen bir hastalıktır. Şu ana kadar, en az sekiz komplementasyon grubunun olduğu bildirilmiş ve bunlardan yedisinin geni belirlenmiştir (Tablo I). Son yıllarda, bu genlerin ürünü proteinlerin karakterizasyonu bu hastalığın moleküler temelleri konusunda çok önemli bulgular elde edilmeye başlanmış, FA yolağının DNA zedelenmesi sonrası normal hücresel yanıtta gerekli olduğu ve bu yolağın DNA tamir mekanizmasına katılan diğer yolaklarla sıradışı ilişkiler içinde bulunduğu anlaşılmıştır.

Bu makalenin amacı, son yılların çok yankı uyandıran bilimsel buluşlarının yapıldığı ilginç bir multigen hastalığı olan Fanconi anemisinin genetiği ve moleküler biyolojisi üzerine yapılan çarpıcı gelişmeleri derleyerek okuyucuya sunmaktır.

Klinik özellikler

Hastalığın en belirgin klinik özelliği ortalama 6-8 yaş civarında ilerleyici aplastik aneminin başlamasıdır. Hastalar arasında bazı farklılıklar gösterse de, aplastik anemi sırasıyla trombosit ve nötrofil sayısında düşme, hemoglobinde azalma ile kendini belli eder. Fetal özellik gösteren makrositik eritrositlerin sayısında, fetal hemoglobin ve alfa-fetoprotein düzeyinde artış söz konusudur. Tüm kan elemanlarında meydana gelen ve zaman içerisinde hızlanarak devam eden azalma, daha 10’lu yaşların başında transfüzyona bağlı aneminin gelişmesine kadar götürebilir. Bu hastalıkta, hematolojik anomalilerin yanında, çeşitli konjenital fiziksel anomalilerde sıklıkla gözlenir. Büyümede gerilik ve üst ekstremitelerde malformasyonlar en yaygın gözlenen fiziksel anomalilerdir. Hastaların yaklaşık %50’sinde, bazen radius hipoplazi ya da yokluğunun da eşlik ettiği başparmak anomalisi veya yokluğu gözlenir. Aynı zamanda, hastalar baş, yüz, boyun, omurga ve alt ekstremiteler gibi iskelet anomalileri veya böbrek, erkek üreme organı, idrar yolları, gastrointestinal sistem, kalp, kulak, santral sinir sistemi gibi organ anomalileriyle de doğabilirler. Ayrıca, hastalarda özgün yüz şekli, küçük gözler (mikroftalmi), düşük yerleşimli kulak ve hiperpigmentasyon, hipopigmentasyon, café-au-lait lekeleri gibi deri pigmentasyonunda anomaliler de sıklıkla gözlenmektedir. Buna karşın, hastaların yaklaşık üçte birinde belirgin hiçbir fiziksel anomaliye rastlanmaz³.

Bu hastalıkta çeşitli tip kanser gelişme riski oldukça yüksektir. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, akut myeloblastik lösemi (AML) gelişme riski 15.000 kat daha fazla, 40 yaş öncesi MDS veya AML gelişme risk de %52

Tablo I. Fanconi anemisi komplementasyon grupları, genleri ve özellikleri

Grup	Gen	Kromozom bölgesi	Ekzon	Patolojik mutasyon	Amino asit	Moleküler ağırlık
FA-A	FANCA	16q24.3	43	~100	1455	163 kD
FA-B	FANCB	–	–	–	–	–
FA-C	FANCC	9q22.3	14	10	558	63 kD
FA-D1	FANCD1/BRCA2	13q12.3	27	–	3418	384 kD
FA-D2	FANCD2	3p25.3	44	5	1451	155/162 kD
FA-E	FANCE	6p21.3	10	3	536	60 kD
FA-F	FANCF	11p15	1	6	374	42 kD
FA-G	FANCG/XRCC9	9p13	14	18	622	70 kD

civarındadır. Bazı hastalarda, diğer hematolojik belirtiler ortaya çıkmadan önce miyelodisplastik sendrom (MDS) veya AML geliştiği gözlenebilir. Bütün bu hematolojik problemler, hastaların kısa ömürlü olmasına neden olur^{2,4}. FA hastalığında baş, boyun, deri, ağız mukozasında skuamoz hücreli karsinom, gastrointestinal ve jinekolojik sistemlerde solid tümör gelişme riski de yüksektir. Kemik iliği yetmezliğinde uygulanan androjen tedavisi, sıklıkla karaciğer tümörü ve peliozis hepatis gelişmesine neden olur. FA'ya bağlı tümörler genelde 13 yaşından sonra (ortalama 23 yaşında) gelişir. Kemoterapi, radyoterapi gibi DNA zedelenmesi oluşturan ajanlara aşırı duyarlılık nedeniyle, bu hastalıkta kanser tedavisi çoğunlukla başarısızlıkla sonuçlanır².

Tedavi

Hayati tehlikeyi hematolojik bulgular oluşturduğundan, tedavi daha çok hastalığın bu yönüyle ilgilidir. Hastalıkta düşük kan sayımı, androjen tedavisi ve/veya kan transfüzyonuyla düzeltilmeye çalışılır. Androjen tedavisi başlangıçta iyi yanıt vermesine karşın, zaman içerisinde direnç gelişebilir. Tedavi destekleyici olmakla beraber, kemik iliği yetmezliğinin bugün için tek kesin tedavisi, doku grubu uyan aile bireylerinden kemik iliği veya kord kanı transplantasyonunun yapılmasıdır. Verilen iliğin tutmama (graft failure) riski bulunmakla beraber, aile bireylerinden yapılan kemik iliği transplantasyonunun başarı şansı bazı merkezlerde oldukça yüksektir (%70). Buna karşın, doku grubu uyan aile dışı bireylerden yapılan kemik iliği transplantasyonunun başarı şansı son derece düşüktür (%20)³. Son yıllarda, uygun donör bulma sorununu aşabilmek amacıyla, gen tedavi protokollerini kullanan klinik uygulamalar başlatılmıştır.

Hücresel özellikler

Kromozomal dengesizlik (instability): FA hücrelerinin en önemli özelliği, kromozomlarda kendiliğinden (spontan) oluşan bir takım bozuklukların gözlenmesidir. Başlıca kırık, aralık ve parça değişimleri gibi kromatitlerdeki zedelenmeleri içeren bu bozukluklar, genelde hücre siklusunun DNA replikasyonu sırasında oluşurlar. Metafaz fazında mikroskop altında incelenen hücrelerde, tipik kromatit kırıkları görülür. Farklı kromozomların kırılma noktalarında, kromatitler arası oluşan rastgele

hibridizasyonlar, mikroskop altında ilginç yapılı (kuadriradial) kromozomların görülmesine neden olabilir. Hastalıkta gözlenen yüksek kanser riski, bu şekilde kendiliğinden oluşan kromozom kırıklarına bağlanmaktadır⁵. Bu tür kromozomal kararsızlık, FA hastalığına özgün olup, diğer hastalıklarda gözlenenlerden farklıdır.

Çapraz bağlayıcı ajanlara aşırı duyarlılık: Mitomisin C (MMC) ve diepoksibutan (DEB) gibi çapraz bağlayıcı (cross-linking) ajanların normal hücrelerde etkisiz olan konsantrasyonları, FA hücrelerinde fazla sayıda kromozom kırığının oluşmasına neden olmaktadır. Hücrelerin yaklaşık %50'sinde hücre başına 1-3 kırık gözlenir. Bu ajanlar, DNA'nın iki zinciri arasında ve aynı zincirde bitişik bazlar arasında çapraz bağ oluşturarak, buralarda DNA replikasyonunun sonlanmasına neden olurlar⁶.

Hücre siklusu ve hücresel büyüme: Hücre siklusunda duraklama (arrest), G2 fazında uzama ve G2 fazında çapraz bağlayıcı ajanlarla uyarılan duraklama, FA hücrelerinin ortak özelliğidir⁷. Atmosferik oksijen, FA hücrelerinde yüksek oranda kromozom kırıklarının oluşmasına neden olur. Bu nedenle, FA kültür hücreleri %20'lik atmosferik oksijen yerine, %5'lik atmosferik oksijende daha iyi çoğalır⁸.

Tanısal testler

Fanconi anemisinin kesin tanısında, çapraz bağlayıcı ajanlara aşırı duyarlılık özelliğinden yararlanılmaktadır. DEB veya MMC'nin düşük konsantrasyonlarında, FA hücrelerinde pek çok kromozomal kırık gözlenirken, normal hücrelerde bu tür dramatik değişiklikler gözlenmez. FA'nin ayırıcı tanısında en güvenilir test olarak kabul edilen bu DEB veya MMC kromozomal kırılma testleri, prenatal tanı amacıyla da kullanılmaktadır^{3,9}.

Genetik heterojenlik

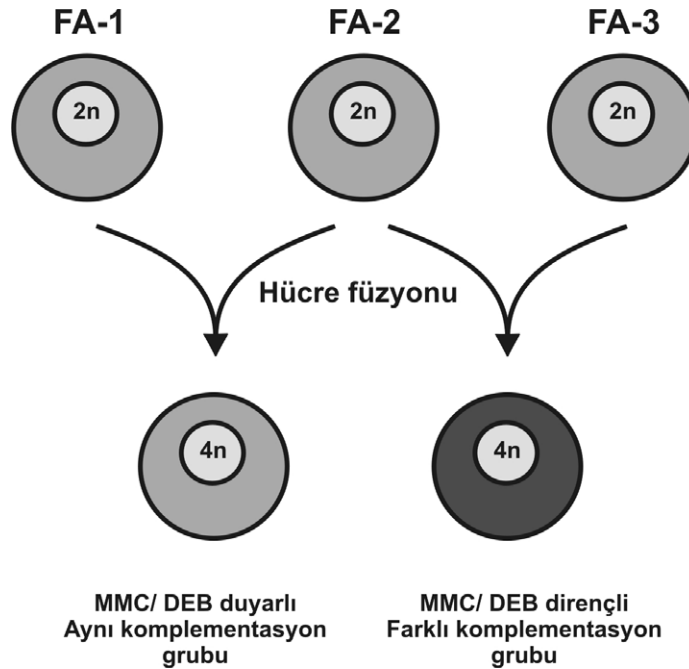
Fanconi anemisi klinik olduğu kadar, genetik olarak da son derece heterojen bir hastalıktır. Hastalıkta bugüne kadar en az sekiz farklı komplementasyon grubunun ve buna bağlı olarak sekiz farklı genin bulunduğu bildirilmiştir¹⁰. Bu nedenle, bir hastanın fenotipinden sorumlu mutasyonun hangi gende olduğunun belirlenebilmesi için öncelikle o hastanın komplementasyon grubunun bilinmesi gerekmektedir.

Komplementasyon analizinde iki hastanın kültür hücreleri, seçicilik kazandıran kuabain ve G418 gibi farklı ilaçlara dirençlilik genleri ile işaretlenir. Bu iki hücrenin füzyonu ve her iki ilaca direnç gösteren hibrid hücrelerin seçiminden sonra, hibrid hücrelerin MMC/DEB duyarlılıkları tesbit edilir. Hibrid hücrelerin MMC/DEB'e duyarlılıkları devam ediyorsa, başlangıçtaki iki hücre aynı gende mutasyon taşıyor, yani hastalar aynı komplementasyon grubunda demektir. Buna karşın, hibrid hücreler MMC/DEB'e karşı artık dirençli hale gelmiş, hatası düzelmiş veya "tamamlanmış" (complemented) ise, başlangıçtaki hücreler farklı genlerde mutasyon taşıyor, yani hastalar farklı komplementasyon grubunda demektir (Şekil 1). Bu şekilde belli bir komplementasyon grubunda olduğu belirlenen FA hastası veya kültür hücresinin alttipi, FA-A, FA-B, FA-C gibi belirtilmektedir¹¹.

Bugüne kadar literatürde, FA-A, FA-B, FA-C, FA-D1, FA-D2, FA-E, FA-F, FA-G olarak adlandırılan sekiz komplementasyon grubunun bulunduğu bildirilmiştir¹⁰. Ancak, henüz

yayınlanmamış son çalışmalarda, FA-I ve FA-J gruplarının bulunduğu da anlaşılmıştır. Dünyada hastaların yaklaşık %65-70'i FA-A'da, %13'ü FA-G'de ve %7'si FA-C'de yer almakta, diğer gruplar ise dünya çapında beşden az hasta ile temsil edilmektedir¹². Komplementasyon gruplarının dünyada dağılımı etnik gruplara göre farklılık gösterebilir. Örneğin, kurucu etki (founder effect) nedeniyle, yerli dili konuşan Güney Afrikalı FA hastalarında FA-A yaygın olarak gözlenirken, Askenazi Yahudilerinde FA-C en yaygın gözlenen komplementasyon grubudur^{13,14}.

Komplementasyon grup analizi ülkemizde yapılamadığı için, Türk hastaları konusundaki bilgi, bu tür çalışmaların araştırma amaçlı yapıldığı merkezlere gönderilen kısıtlı sayıdaki hastaya dayanmaktadır. Grupları tesbit edilebilen 21 Türk FA hastasının %66'sı FA-A'da, %14'ü FA-G'de, %10'u FA-E'de, %5'i FA-F'de ve %5'inde FA-A veya FA-G'de olduğu belirlenmiştir. Bugüne kadar FA-C'de hasta saptanamamış olması, bu grubun ülkemizde bulunmadığının bir işareti olabilir.



Şekil 1. Fankoni anemisinde komplementasyon grubu analizi. Verilen örnekteki FA-1 ve FA-2 hastalarında olduğu gibi, iki hastanın lenfoblast kültür hücrelerinin füzyonu ile oluşan hibrid hücrelerin MMC/DEB duyarlılıkları devam ederse, bu hastalar aynı komplementasyon grubunda, FA-3 hastasında olduğu gibi hibridizasyon sonrasında hataları düzeltilerek (complemented) duyarlı özelliğini kaybedip, artık dirençli hale gelirse farklı komplementasyon grubundadır.

Fanconi anemisi genleri ve mutasyonları

Fanconi anemisinden sorumlu genlerin saptanması pek çok nedenden dolayı önemlidir. FA fenotipine neden olan eksikliğin anlaşılması, öncelikle sorumlu genler ve onların proteinlerinin bilinmesiyle mümkün olabilir. Genlerin bilinmesi, prenatal tanı ve genotip/fenotip korelasyonunun yapılmasına olanak sağlayacağı için hasta ailelerine büyük yarar sağlamaktadır. Bunun yanında, hastalıktan sorumlu gen biliniyorsa, gen tedavisi olanağı doğmaktadır. Ayrıca, FA genlerinin AML ve bazı tümörlerin gelişmesinde rolü olabileceği düşünülmektedir. Böyle bir durumda, genler konusundaki bilgi sayesinde bu tür malignansilerin tanısı ve tedavisinin daha iyi yapılması olanağı doğabilir.

Bugüne kadar, sekiz FA geninden yedisi tanımlanmıştır (Tablo I). Genom boyunca dağılmış olan bu genlerin her hangi bir ortak özelliği bulunmamaktadır. Bir (FANCF) ile 44 (FANCD2) arasında değişen genlerin ekzon sayıları, sentezlenen proteinin büyüklüğü ile orantılıdır. FA-D grubunda bulunan bazı hastaların bu gruptan sorumlu bulunan gende (FANCD2) mutasyon taşımadığı anlaşılmış ve bu hastaların geni FANCD1 olarak adlandırılan farklı bir komplementasyon grubunu oluşturduğu bildirilmiştir^{12,15}. Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda da, bu hastaların göğüs kanserine neden olan BRCA2 geninde iki alleli mutasyon taşıdığı gösterilerek, FANCD1 geninin BRCA2 geni ile aynı olduğu ortaya çıkarılmıştır¹⁶.

Bu güne kadar, grup A'dan sorumlu FANCA geninde 100'e yakın mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların çoğu bulunduğu hastaya özgün olup, başka bir hastada bulunmamaktadır. Mutasyonların büyük bir kısmı (üçte biri), genin bulunduğu bölgede sıkça rastlanan Alu tekrar bölgelerinin neden olduğu delesyonlardır. Çerçeve kayması (frameshift) ve anlamsız (nonsense) mutasyonlar diğer önemli grubu oluşturur. Bu gende protein sentezine olanak sağlayan bir kaç yanlış anlamlı (missense) ve mikrolelesyon mutasyonları da tanımlanmıştır^{17,18}. FANCA geninin aksine, grup C'den sorumlu FANCC geninde yaygın olarak gözlenen iki mutasyon bulunmaktadır. Örneğin, Askenazi Yahudisi FA-C hastalarının %80'i homozigot IVS4+4A>T mutasyonunu, Hollanda'lı FA-C hastalarının çoğu homozigot

322delG çerçeve kayması mutasyonu taşımaktadır¹⁴. Benzer durum FA-G için de söz konusudur. Almanya'daki FANCG mutasyonlarının %44'ünü, pozisyon 105 deki glutamik asidi dur (stop) kodona çeviren E105X mutasyonu oluşturmaktadır¹⁹.

Türk FA hastalarının mutasyonları hakkındaki bilgi oldukça kısıtlıdır. Şu anda dünyada yapılan bu tür çalışmalar henüz araştırma düzeyinde olduğundan, elimizdeki bilgiyi çoğu zaman bir komplementasyon grubundan sorumlu genin bulunması aşamasında tanımlanan mutasyonlar oluşturmaktadır. Bugüne kadar literatürde Türk hastalarında tanımlanmış; FANCA geninde ekzon 43'de 4262-4404del¹⁷, ekzon 37'de 3760-3761del¹⁸ ve bizim tarafımızdan tanımlanan 3639delT²⁰ homozigot mutasyonları, FANCG geninde ekzon 13'de yer alan 1649delC ve C1642T, ekzon 3'de T212C, intron 5'de IVS5+1G/T homozigot mutasyonları¹⁹, FANCE geninde ekzon 2'de C355T ve intron 5'de IVS5-8G/A homozigot mutasyonları²¹ bulunmaktadır. Son yıllarda, Hacettepe Üniversitesi'ndeki laboratuvarımızda FA üzerine moleküler genetik çalışmalar başlatılmıştır. Şu an için bu çalışmalarda, "linkage" analizi kullanılarak hastalarımızın A, G, E komplementasyon gruplarından birinde olup olmadıkları belirlenmeye çalışılmakta, grup A'da olduğu anlaşılanlar 43 ekzonlu FANCA geninde mutasyon analizine alınmaktadır. Bu çalışmaların zaman içerisinde genişletilmesi planlanmıştır.

Genotip-fenotip ilişkisi

Farklı grupta bulunan hastaların analizleri, komplementasyon grubunun klinik bulgular üzerinde çok güçlü bir etkisinin bulunmadığını ortaya çıkarmıştır²². Grup C'de büyümede gerilik, baş ve radius anomalilerinin grup A ve G'ye kıyasla daha az gözlendiği, grup D, E ve F'de ise yüksek oranda somatik anomali gözlendiği bildirilmektedir. AML'nin daha sık ve erken yaşta gözlenmesi nedeniyle, FA-G hastalarının FA-A ve C hastalarından daha kısa ömürlü olduğu bildirilmiştir. Gen ürünü proteinin yokluğuyla sonuçlanan "null" mutasyon taşıyan FANCA hastalarının, null taşımayanlara göre daha ağır hematolojik bulgularının olduğu ve AML geliştirmeye daha yatkın oldukları bildirilmiştir. Grup G'de bulunan ve FANCA null mutasyonlarını taşıyan hastaların nispeten daha ağır hematolojik

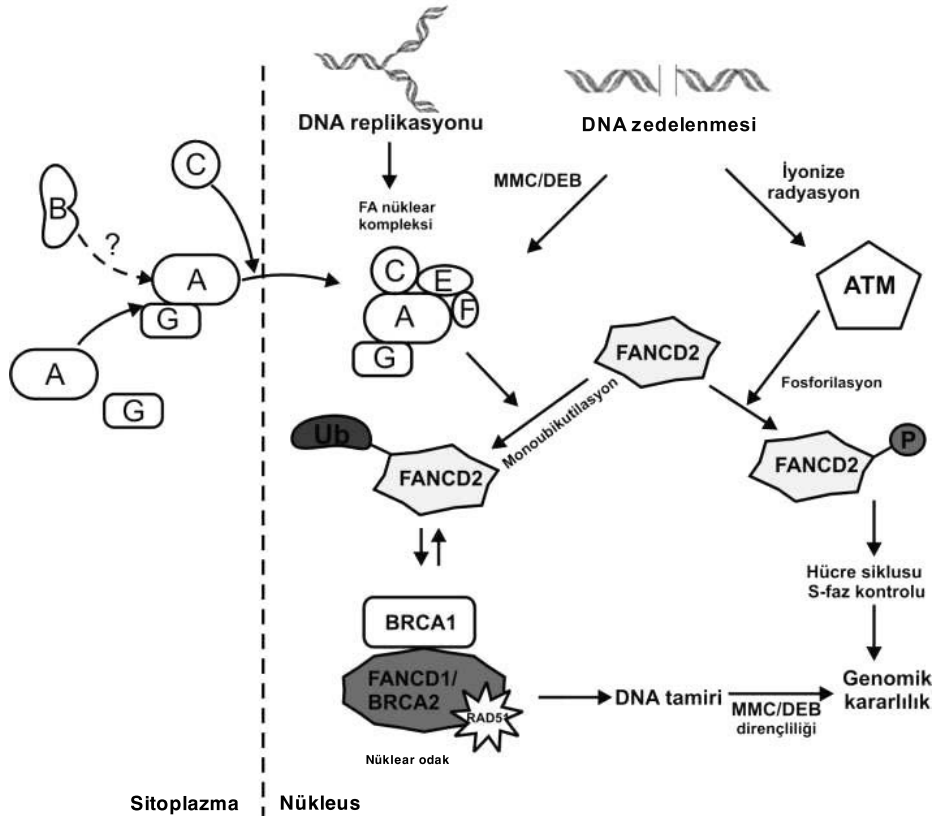
bulgularının olması, bu hastaların daha agresif tedaviye aday olduklarını düşündürülebilir²². Şu ana kadar bilinen üç FA-D2 hastasında iki alleli null mutasyona rastlanamamış olması, bu durumun ölümcül olabileceğinin bir işareti olabilir.

Fanconi anemisi yolağı ve modeli

Tanımlanan yedi FA proteinin FA yolağı olarak adlandırılan ortak bir hüresel yolda birlikte işlev gördükleri bildirilmektedir (Şekil 2). Normal hücrelerde, FANCA, FANCC, FANCE, FANCF ve FANCG proteinleri bir araya gelerek multisubunit bir nükleer kompleks oluşturur^{23,24}. Bu kompleks, DNA'da çapraz bağ oluşturan ajanlarla karşı kalındığı veya DNA replikasyonu sırasında, FANCD2 proteinine bir ubiquitin molekülünün bağlanmasına (monoubikütilyasyon) aracılık ederek, onu FANCD2-S (kısa) şeklinden

FANCD2-L (uzun) şekline dönüştürür²⁴. Bu şekilde aktive olan FANCD2 proteinin, meme kanseri duyarlılık proteinleri BRCA1 ve BRCA2/FANCD1'in da bulunduğu DNA tamir proteinlerini içeren özgün nükleer DNA tamir odağına transfer edildiği ve buradan DNA tamir mekanizmasına katıldığı bildirilmektedir^{24,25}. Bu yolakta meydana gelen bir eksiklik veya bozukluğun ise karakteristik FA fenotipini ortaya çıkardığı düşünülmektedir.

FA-B hücrelerinde FA nükleer kompleksinin (A/C/E/F/G) oluşmadığının gözlenmesi, FANCB proteininin, kompleksi oluşturan proteinlerin biraraya gelmesi veya kararlılığı (stability) için gerekli olduğunu ve bu proteinin de FANCD-2 proteininin monoubikütilyasyonundan önce işlev gördüğünü düşündürmektedir²⁴. FA-D1 dışındaki diğer komplementasyon grubu hücre hatlarında (A, B, C, E, F, G), FA nükleer



Şekil 2. Fankoni anemisi yolağını, meme kanseri (BRCA1, BRCA2) ve ataksi telenjektazi yollarıyla buluşturan modelin şematik olarak gösterilmesi. Çapraz bağlayıcı ajanlarla oluşan DNA hasarına hüresel yanıtta veya DNA replikasyonu sırasında, FA protein kompleksi tarafından ubiquitin bağlanan FANCD2 proteinini, BRCA1, BRCA2/FANCD1 ve diğer proteinlerle birlikte DNA tamir mekanizmasına katılır. İyonize radyasyona yanıtta ise, ATM tarafından fosfor grubu bağlanan FANCD2 proteinini, hücre döngüsü kontrol noktalarını aktive ederek, sentez fazında DNA tamiri için zaman verilmesine olanak sağlar.

kompleksi oluşamadığından, FANCD2 proteinine ubikutin bağlanamaz. Bu durum, son zamanlarda standart DEB/MMC testine alternatif yeni bir tanısal testin gelişmesine olanak sağlamıştır. Çapraz bağlayıcı ajanlarla (DEB/MMC) karşı karşıya bırakılan hasta hücrelerinde FANCD2-L proteininin bulunmadığının gösterilmesiyle FA tanısı konulabilmektedir²⁶. Ancak FA-D1 hücrelerinde FA nüklear kompleksi ve FANCD2 ubikutilasyonunun normal olduğunun gösterilmesi, FANCD1 proteininin FANCD2 monoubikutilasyonundan sonra veya FA yolağından bağımsız olarak işlev gördüğü sonucunun çıkarılmasına yol açmıştır²⁴. Bu nedenle, bu testte FANCD2-L proteini gözlenen bir hastanın FANCD1 grubunda bulunan FA hastası olma olasılığı bulunmaktadır. Bu durumda, kesin tanı için standart DEB/MMC testi kullanılmalıdır.

Yapılan son çalışmalar, FANCD2 proteininin iki sinyal yolağı arasında işlev gördüğünü ortaya çıkarmıştır. Bunlardan biri yukarıda açıklanan, MMC/DEB'le muamele edildiğinde, FA nüklear kompleksi tarafından ubikutin bağlanarak aktive edilen FANCD2 proteininin, DNA tamir mekanizmasına katılmasıdır. Diğeri ise, iyonize radyasyonla karşılaşıldığında, ataksi telenjektazi kinazın (ATM) FANCD2 proteinini fosforile etmesi, bu şekilde aktive olan FANCD2 proteini de hücre siklisu kontrol noktalarını aktive ederek, DNA tamirine olanak sağlamak amacıyla sentez fazında (S-faz) duraklamaya neden olmasıdır (Şekil 2)²⁷. Ancak ATM'e bağlı FANCD2 fosforilasyonu ve FA yolağına bağlı FANCD2 monoubikutilasyonu farklı hücresel sinyal yolaklarının kontrolünde, birbirlerinden tamamen bağımsız modifikasyonlardır. Şöyleki, komplementasyon grubu A, C, G, F olan hücrelerde iyonize radyasyondan sonra FANCD2 proteini normal olarak fosforile olurken, bu hücrelerde FANCD2 proteinine ubikutin bağlanamaz. Öte yandan, ATM geninin homozigot mutant olduğu hücrelerde FANCD2 ubikutilasyonu, nüklear fokus oluşumu ve MMC direçliliği normal olmasına karşın, bu hücrelerde FANCD2 fosforilasyonu ve S-faz kontrolü bulunmaz^{24,27}.

Somatik mozaiklik

Somatik mozaiklik bir kişide farklı genetik yapıya sahip iki veya daha fazla hücre popülasyonunun bulunması olarak tanımlanmaktadır. FA hastalarının yaklaşık %10-25'inin kanlarında

mozaiklik gözlenmektedir¹⁵. Bu hastalarda, FA özelliğine sahip yüksek oranda kromozomal kırık içeren T hücrelerle birlikte, artık bu özelliğini kaybetmiş MMC/DEB'e dirençli T hücreler de bulunmaktadır²⁸. Ölümsüz hücre kültürleri MMC/DEB'e dirençli olan bu hastalarda komplementasyon grup analizi yapmak mümkün değildir¹². Bu hücrelerde gözlenen fenotipik geri dönüşüm, hastalık lokusunda meydana gelen genetik geri dönüşümle sağlanmaktadır. Genetik geri dönüşüm, gen içi rekombinasyon, yeni bir geri mutasyon, gen konversiyonu gibi mekanizmalarla gerçekleşebilir^{12,15,28}. Mozaik hastalarda, düzelmiş kan hücreleri oranının zaman içerisinde artıyor olması, bu hücrelerin seçici bir avantaja sahip olduğuna işaret edebilir. Hasta hücrelerin nispeten daha düşük çoğalma hızına ve/veya düzelmiş hücrelerin seçici çoğalma avantajına sahip olmaları bu durumun ortaya çıkmasında rol oynayabilir.

Mozaikliğin hastaya verdiği yarar ve zararlar henüz tam olarak bilinmemekle beraber, bazı mozaik hastaların daha hafif hematolojik bulgulara sahip olduğu ve yaşları hastalıkta beklenilenden daha ileri olan bazı FA hastalarının mozaik olduğu bildirilmektedir^{12,28}. Bu nedenle, mozaiklik doğal gen tedavisi olarak düşünülebilmektedir. Buna karşın, FA'ne özgü konjenital anomalileri olan, ancak hematolojik bulguları olmaması ve MMC/DEB testi negatif olması nedeniyle FA olmadığı düşünülen bazı hastaların, aslında tamamen düzelmiş lenfosit veya tam kan hücre popülasyonuna sahip mozaik hasta olma olasılığı bulunmaktadır. Ek olarak, mozaiklik kemik iliği transplantasyonu yapılmasında da karışıklık yaratabilir. Şu anda ünitemizde tedavi gören iki mozaik hasta bulunmaktadır.

Gen tedavisi

Doku grubu uygun donör bulma sorununu aşmak amacıyla, son yıllarda, gen tedavi protokollerini kullanan klinik uygulamalar başlatılmıştır. Bu uygulamalarda, hastanın hematolojik progenitor veya kök hücreleri toplanmakta, genin cDNA'sını içeren viral vektörlerle bu hücrelere canlı dışında (in vitro) sağlam gen transferi yapılmaktadır. Transfer edilen sağlam cDNA ekspresyonunun hasta kültür hücrelerinin karakteristik FA fenotipini düzelttiği gösterilmiştir²⁹. Bu şekilde sağlam gen transferi yapılan hücrelerin, hastaya

verildikten ve kan yapımına başladıktan sonra hayatta kalma ve kendini yenileme kapasitelerinin daha iyi olacağı düşünülmektedir. Mozaik hücrelerde gözlenen durum da bu sanıyı desteklemektedir. Ancak hemapoietik kök hücrelere gen transfer verimliliğinin düşük olması ve transfer edilen genin uzun süreli ekspresyonunun sağlanamaması gibi teknik sorunlar henüz aşılanamamıştır. Bunun yanında, verilen düzelmiş hücreler tarafından sentezlenen bir proteine karşı immün atak oluşturulması veya residual mutant hücreler tarafından sitogenetik anomaliler geliştirilmesi nedeniyle normal hematopoietik fonksiyonun engellenmesi veya lösemi geliştirilmesi gibi komplikasyonların ortaya çıkması da mümkündür. Bütün bu sorunlara rağmen, gen tedavi uygulamalarından ilk ümit verici sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Örneğin, FA-A'da bulunan bir hastada, gen transferinden iki buçuk yıl sonra iyileşmenin devam ettiği ve normal FANCA genini taşıyan kan hücrelerinin sayısında zaman içerisinde artış gözleendiği bildirilmiştir³⁰.

Son yıllarda, FA'nın moleküler patolojisinin aydınlatılması, FA genlerine ait proteinlerin tanımlanması ve işlevlerinin anlaşılması ile multigenik bir hastalığın sırrı büyük oranda çözülmüştür. Bunun yanında, bir model olarak ele alındığında, bu çalışmalar, genlerin ve ürünü olan proteinlerin hücre savunmasındaki rollerine, birbirleriyle olan sıradışı ilişkilerine ve kanser oluşumuna katılım mekanizmalarına kadar ışık tutmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill Press, 2001: 753-768.
2. Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. Am J Hematol 1996; 53: 99-110.
3. Young NS, Alter BP. Clinical features of Fanconi's anemia: pathophysiology of Fanconi's anemia. In: Young NS, Alter BP (eds). Aplastic Anemia Acquired and Inherited. Philadelphia: WB Saunders, 1994: 275-324.
4. Auerbach AD, Allen RG. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients: a review of the literature and report of the International Fanconi Registry. Cancer Genet Cytogenet 1991; 51: 1-12.
5. Schroeder TM, Kurth R. Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. Blood 1971; 37: 96-112.
6. Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. Cancer Res 1973; 33: 1829-1836.
7. Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, Buriot D, Prieur M. The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. Hum Genet 1982; 62: 327-332.
8. Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Ostra AB. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. Nature 1981; 290: 142-143.
9. Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and diepoxybutane (DEB) test. Exp Hematol 1993; 21: 731-733.
10. Joenje H, Oastra AB, Wijker M, et al. Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. Am J Hum Genet 1997; 61: 940-944.
11. Joenje H, Lo ten Foe JR, Oostra AB, et al. Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype. Blood 1995; 86: 2156-2160.
12. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. Nat Rev Genet 2001; 2: 446-457.
13. Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV, et al. Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 5734-5739.
14. Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, et al. A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. Nat Genet 1993; 4: 202-205.
15. Tischkowitz MD, Hodgson SV. Fanconi anemia. J Med Genet 2003; 40: 1-10.
16. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. Science 2002; 297: 606-609.
17. Wijker M, Morgan NV, Herterich S, et al. Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anemia group A gene. Eur J Hum Genet 1999; 7: 52-59.
18. Levran O, Erlich T, Magdalena N, et al. Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 13051-13056.
19. Demuth I, Wlodarski M, Tipping AJ, et al. Spectrum of mutations in the Fanconi anemia group G gene, FANCG/XRCC9. Eur J Hum Genet 2000; 8: 1-8.
20. Balta G, Winter JP, Kayserili H, Pronk JC, Joenje H. Fanconi anemia A due to a novel frameshift mutation in hotspot motifs: lack of FANCA protein. Hum Mutat 2000; 15: 578.
21. 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: 1306-1308.
22. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. Blood 2000; 96: 4064-4070.
23. Medhurst AL, Huber PA, Waisfisz Q, de Winter JP, Mathew CG. Direct interactions of the five known Fanconi anemia proteins suggest a common functional pathway. Hum Mol Genet 2001; 10: 423-429.

24. Gregory RC, Taniguchi T, D'Andrea AD. Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 77-82.
25. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, et al. Interaction of Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 2001; 7: 249-262.
26. Shimamura A, de Oca RM, Svenson JL, et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood* 2002; 100: 4649-4654.
27. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, et al. Convergence of Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 2002; 109: 459-472.
28. Loe Ten Foe JR, Kwee MI, Rooimans MA, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet* 1997; 5: 137-148.
29. Liu JM. Gene transfer for eventual treatment of Fanconi anemia. *Semin Hematol* 1998; 35:168-169.
30. Walsh C. Gene therapy for group A FA patients: current update and future trials. *FA Research Fund, Science Letter* 2002; 32: 2, 8.