

Fankoni Anemisinin Moleküler Biyolojisi ve Genetiği

Dr. Günay BALTA

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, Ankara

Fankoni anemisi (FA) kemik iliği yetmezliği, çeşitli konjenital fiziksel anomaliler, kansere yatkınlık, kromozomal kararsızlık ve çapraz bağlayıcı ajanlara aşırı duyarlılıkla karakterize otozomal çekinik kalıtım gösteren bir çocukluk çağı hastalığıdır. Her ırk ve etnik grupta oldukça nadir olarak gözlenen bu hastalığın dünyada sıklığı milyonda 1-5 olmasına karşın, Türkiye’de akraba evlilikleri nedeniyle bu prevalansın daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Taşıyıcı sıklığı ise % 0.3-1 olarak bildirilmektedir¹.

Klinik Özellikler

Hastalıkta hayati tehlikeyi hematolojik bulgular oluşturmaktadır. Hastalığın en belirgin klinik özelliği ortalama 6-8 yaş civarında ilerleyici aplastik aneminin başlamasıdır. Tüm kan elemanlarında zaman içerisinde hızlanarak devam eden azalma sonucu oluşan kemik iliği yetmezliği daha 10’lu yaşların başında transfüzyona bağlı aneminin gelişmesine kadar gidebilir. Hemoglobinde azalma, fetal hemoglobin ve alfa fetö protein miktarında artma söz konusudur.

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, hiperpigmentasyon, hipopigmentasyon, cafe-au-lait

lekeleri gibi cilt pigmentasyonunda anomaliler de sıklıkla gözlenmektedir.

Bu hastalıkta çeşitli tip kanser gelişme riski de oldukça yüksektir. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, AML gelişme riski 15.000 kat daha fazla, 40 yaş öncesi MDS veya AML gelişme risk de %52 civarındadır². Bütün bu hematolojik problemler, hastaların kısa ömürlü olmasına neden olur (ortalama 20 yıl). FA hastalığında baş, boyun, ağız, özofagus, cilt, gastrointestinal ve jinekolojik sistemlerde, anüs, beyin, meme, akciğer ve karaciğerde solid tümör gelişme riski yüksektir.

Hücresel Özellikler

Kromozomal kararsızlık (instability): FA hücrelerinin en önemli özelliği, kendiliğinden (spontan) kromozom kırıklarının oluşmasıdır. Metafaz fazında mikroskop altında incelenen hücrelerde, tipik kromatit kırıkları görülür. Farklı kromozomların kırılma noktalarında, kromatitler arası oluşan rastgele hibridizasyonlar, mikroskop altında ilginç yapılı (quadri radial) kromozomların görülmesine neden olabilir³.

Çapraz bağlayıcı ajanlara aşırı duyarlılık: Mitomisin C (MMC) ve diepoksibutan (DEB) gibi DNA’nın iki zinciri arasında ve aynı zincirde bitişik bazlar arasında çapraz bağ oluşturan (cross-linking) ajanların normal hücrelerde etkisiz olan konsantrasyonları, FA hücrelerinde fazla sayıda kromozom kırığının oluşmasına neden olur⁴.

Tanısal Testler

FA’nin 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 kullanılmaktadır⁵.

Somatik Mozaiklik

Somatik mozaiklik bir kişide farklı genetik yapıya sahip iki veya daha fazla hücre popülasyonunun bulunması olarak tanımlanmaktadır. FA hastalarının yaklaşık % 10-25'unun kanlarında mozaiklik gözlenmektedir. Bu hastalarda, FA özelliğine sahip yüksek oranda kromozomal kırık içeren T hücreleriyle birlikte, artık bu özelliğini kaybetmiş MMC/DEB'e dirençli T hücreler de bulunmaktadır⁶. Bazı mozaik hastaların daha hafif hematolojik bulgulara sahip olması nedeniyle, mozaiklik doğal gen tedavisi olarak düşünülmektedir.

Genetik Heterojenlik

FA klinik olduğu kadar, genetik olarak da son derece heterojen bir hastalıktır. Hastalıkta yakın zamanlara kadar FA-A, FA-B, FA-C, FA-D1, FA-D2, FA-E, FA-F, FA-G olarak adlandırılan en az 8 farklı komplementasyon grubunun bulunduğu bildirilmiştir⁷. Ancak, son günlerde yayınlanan makalelerde FA-I, FA-J ve FA-L gruplarının olduğuda bildirilmiştir^{8,9}. Böylece şu ana kadar hastalıkta toplam 11 farklı komplementasyon grubunun ve buna bağlı olarak 11 farklı genin bulunduğu belirlenmiştir. Bu durumda, bir hastanın fenotipinden sorumlu moleküler patolojinin hangi gende olduğunun anlaşılabilmesi, ancak hastanın komplementasyon grubunun belirlenmesi ile mümkün olabilmektedir.

Komplementasyon analizi: İki hastanın kültür hücresinin füzyonu sonrasında oluşan, 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; eğer hibrid hücreler MMC/DEB'e karşı artık dirençli hale gelmiş yani hatası düzelmiş veya 'tamamlanmış' (complemented) ise, başlangıçtaki hücreler farklı genlerde mutasyon taşıyor, yani hastalar farklı komplementasyon grubunda demektir. Bu şekilde belli bir komplementasyon grubunda olduğu belirlenen FA hastası veya kültür hücresinin alttipi, FA-A, FA-B, FA-C vb şeklinde belirtilmektedir. Dünyada bu şekilde komplementasyon grupları belirlenebilen hastala-

rın yaklaşık %65-70'inin FA-A'da, %13'ünün FA-G'de ve %7'sinin FA-C'de bulunduğu, diğer grupların ise dünya çapında 5'den az hasta ile temsil edildiği bildirilmektedir¹⁰.

Komplementasyon grup analizi ülkemizde yapılamadığı için, Türk hastaları hakkındaki 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.

FA Genleri ve Mutasyonları

Bu güne kadar, 11 FA komplementasyon grubundan 8'inin geni tanımlanmıştır. Genlerin ekzon sayıları bir (FANCF) ile 44 (FANCD2) arasında değişmekte olup, 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 bildirilmiştir¹⁰. Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda da, bu hastaların göğüs kanserine neden olan BRCA2 geninde iki allelli mutasyon taşıdığı gösterilerek, **FANCD1** geninin gerçekte **BRCA2** geni ile aynı olduğu ortaya çıkarılmıştır¹¹.

Grup A'dan sorumlu FANCA geni 80 kb uzunluğunda 43 ekzonlu bir gendir. Bu güne kadar bu gende 123 mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların çoğu bulunduğu hastaya özgün olup, başka bir hastada bulunmamaktadır. Mutasyonların büyük bir kısmı (1/3), genin bulunduğu bölgede sıkça rastlanan Alu tekrar bölgelerinin neden olduğu delesyonlardır. Çerçeve kayması (frameshift) ve anlamsız (nonsense) mutasyonlar diğer önemli grubu oluşturur. FANCA geninin aksine, grup C'den sorumlu FANCC geninde yaygın olarak gözlenen iki mutasyon bulunmaktadır. Benzer durum FA-G için de sözkonusudur¹⁰.

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. Bu güne kadar literatürde Türk hastalarında tanımlanmış; FANCA geninde ekzon 43'de 4262-4404del¹², ekzon 37'de 3760-3761del¹³ ve bizim tarafımızdan tanımlanan 3639delT¹⁴

homozigot mutasyonları, FANCG geninde ekzon 13'de yer alan 1649delC ve C1642T, ekzon 3'de T212C, intron 5'de IVS5+1G/T homozigot mutasyonları¹⁵, FANCE geninde ekzon 2'de C355T ve intron 5'de IVS5-8G/A homozigot mutasyonları¹⁶ bulunmaktadır.

Son yıllarda, Hacettepe Üniversitesi, Pediatrik Hematoloji Ünitesi'nde bulunan 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 FANCA geninde mutasyon analizine alınmaktadır. Çalışılan toplam 50 DEB+ FA hastasından, akraba evliliğinden olan 38 hastanın 23 ünün (%61), akraba evliliğinden olmayan 12 hastanın ise 3 ünün FANCA genine bağlantı gösterdiği tesbit edilmiştir. FANCA'ya bağlantı göstermeyen çalışılan toplam 17 hastadan akraba evliliğinden olan 14 hastanın 2 sinin FANCG genine bağlantı gösterdiği anlaşılmıştır. Bu iki gene bağlantı göstermeyen 14 hastadan sadece 1 hasta FANCE genine bağlantı göstermiştir. FA-A'da olduğu anlaşılan toplam 28 hasta, 43 ekzonlu FANCA geni için mutasyon analizine alınmış ve şu ana kadar alınan sonuçlarda da 8 hastanın mutasyonu tesbit edilebilmiştir. Yakın bir gelecekte diğer hastaların moleküler patolojilerinde tesbit edilebilmesi için gayretlerimiz devam etmektedir.

FA Yolağı ve FA Modeli

Tanımlanan 8 FA geni protein ürünlerinin FA yolağı olarak adlandırılan ortak bir hücresel yolda birlikte işlev gördükleri gösterilmiştir. Normal hücrelerde, FANCA, FANCC, FANCE, FANCF ve FANCG proteinleri bir araya gelerek bir nüklear kompleks oluşturur¹⁷. Son günlerde FANCB ve FANCL proteinlerinin de bu kompleksin bir komponenti olduğu bildirilmiştir¹⁸. Bu kompleksin, DNA'da çapraz bağ oluşturan ajanlara maruz kalındığı ya da DNA replikasyonu sırasında, bir ubikutin ligaz olduğu gösterilen FANCL aracılığıyla FANCD2 proteinine bir ubikutin molekülünün bağlanmasına (monoubikütilyasyon) neden olduğu gösterilmiştir^{9,19}. Ubikütilyasyonla FANCD2-S (kısa) formundan FANCD2-L (uzun) formuna dönüşerek aktive olan FANCD2 proteinin, meme kanseri duyarlılık proteinleri BRCA1 ve FANCD1/BRCA2'nin de bulunduğu DNA tamir proteinlerini içeren spesifik bir nüklear DNA tamir odağına transfer edildiği ve buradan DNA tamir mekanizmasına katıldığı bildirilmektedir^{19,20}.

Bu yolla meydana gelen bir eksiklik veya bozukluğun ise karakteristik FA fenotipini ortaya çıkardığı düşünülmektedir. FANCI ve FANCI genleri ve ürünleri bilinmemekle birlikte, FANCI'nın monoubikütilyasyondan önce, FANCI'nın de sonra görev yaptığı gösterilmiştir⁸.

FA-D1 ve muhtemelen FANCI hariç diğer komplementasyon grubu hücre hatlarında FANCD2 proteinine ubikutin bağlanamıyor olması, son zamanlarda standart DEB/MMC testine alternatif yeni bir tanısal testin gelişmesine olanak sağlamıştır. Çapraz bağlayıcı ajanlara (DEB/MMC) maruz bırakılan hasta hücrelerinde FANCD2-L proteininin bulunmadığının gösterilmesiyle FA tanısı konulabilmektedir²¹.

Öteyandan, yapılan son çalışmalarda, iyonize radyasyona hücresel yanıtta, ataksi telenjektazi kinazın (ATM), FANCD2 proteinini fosforile ettiği ve bu şekilde aktive olan FANCD2 proteininin S-faz kontrol noktalarını aktive ederek, ilerleyen hücre siklusunun duraklamasına ve DNA tamiri için zaman verilmesine olanak sağladığı bildirilmiştir²². FANCD2 proteininin DNA tamir mekanizmasında yer alan, kanser gelişimi ile yakından ilişkili iki bağımsız sinyal yolağı arasında işlev gördüğünün ve FANCD1 geninin de BRCA2 geniyle aynı olduğunun gösterilmesiyle, son zamanlarda FA yolağı kanser araştırmalarının en büyük ilgi odağı haline gelmiştir.

Sonuç olarak, FA'nın moleküler patolojisinin aydınlatılması, FA genlerine ait proteinlerin tanımlanması ve işlevlerinin anlaşılması ile çok genli 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. Schroeder TM, Kurth R. Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. Blood 1971; 37: 96-112.
4. 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.

5. Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and diepoxybutane (DEB) test. *Exp Hematol* 1993; 21: 731-733.
6. 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.
7. Joenje H, Oastra AB, Wijker M et. al. Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 940-944.
8. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J et. al. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 2004; 103:2498-2503.
9. Grompe M. FANCL, as in ligase. *Nature Genet* 2003; 35:113-114.
10. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 446-457.
11. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S et. al. Biallelic inactivation of BRCA2 in fanconi anemia. *Science* 2002; 297: 606-609.
12. 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.
13. Levrán O, Erlich T, Magdalena N et. al. Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13051-13056.
14. 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; Online MIB #330.
15. 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.
16. Winter JP, Leveille F, van Berkel CGM et. al. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1306-1308.
17. 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.
18. Meetei AR, Levitus M, Xue Y et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 2004; Oct 24 [Epub ahead of print].
19. Gregory RC, Taniguchi T, D'Andrea AD. Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 77-82.
20. 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.
21. 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.
22. Taniguchi T, Garcia -Higuera I, Xu B et. al. Convergence of Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 2002; 109: 459-472.