

Received: 19.05.2020
Accepted: 27.10.2020
Published: 31.12.2020

Genetyczne podłoże i diagnostyka anemii Fanconiego

Genetic background and diagnosis of Fanconi anemia

Anna Repczyńska, Olga Haus

Katedra Genetyki Klinicznej, Wydział Lekarski Collegium Medicum w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie:

Anemia Fanconiego (FA) jest rzadką chorobą genetyczną wywołaną mutacjami w genach, których produkty białkowe zaangażowane są w ważne procesy zachodzące w komórce, takie jak: replikacja, kontrola cyklu komórkowego oraz naprawa uszkodzeń DNA. Charakteryzuje się wadami wrodzonymi, niewydolnością szpiku oraz zwiększoną predyspozycją do nowotworów. Objawy fenotypowe, obecne u około 75% chorych, najczęściej obejmują nieprawidłowości: niskorosłość, małogłowie, wady kciuka i promieniowej strony kończyn górnych, zaburzenia pigmentacji skóry, wady układu pokarmowego i moczowo-płciowego. Postępująca niewydolność szpiku pojawia się w pierwszej dekadzie życia, często początkowo z leukopenią lub małopłytkowością. Najczęstszymi nowotworami występującymi u chorych z FA są: zespoły mielodysplastyczne (MDS) i ostra białaczka szpikowa oraz guzy łite głowy i szyi, skóry, przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego.

Dotychczas zidentyfikowano 22 geny anemii Fanconiego (FANC). Ich loci znajdują się na chromosomach autosomalnych, poza *FANCB* umiejscowionym na chromosomie X. Produkty białkowe tych genów biorą udział w ścieżce zwanej szlakiem anemii Fanconiego, która reguluje działanie systemów naprawy uszkodzeń DNA.

Diagnostykę anemii Fanconiego rozpoczyna się od badania różnicującego zespołu niestabilności chromosomowej – testu z mitomycyną C (MMC) lub z diepoksybutanem (DEB), w których u chorych z anemią Fanconiego obserwuje się liczne złamania i pęknięcia chromosomów oraz charakterystyczne figury promieniste.

W celu wykrycia mutacji leżącej u podłoża anemii Fanconiego stosuje się metody molekularne. Badaniem z wyboru jest analiza DNA metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS).

Słowa kluczowe:

niestabilność chromosomowa, niewydolność szpiku, związki sieciujące DNA, mitomycyna C, geny FANC

Summary:

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease caused by mutations in genes whose protein products are involved in important cell processes such as replication, cell cycle control and repair of DNA damage. FA is characterized by congenital malformations, bone marrow failure and high risk of cancer. Phenotypic symptoms, present in about 75% of patients, most often include such abnormalities as short stature, microcephaly, thumb and radial side of the limb defects, abnormal skin pigmentation, gastrointestinal and genitourinary defects. Progressive bone marrow failure occurs in the first decade of life, often initially with leukopenia or thrombocytopenia. The most common cancers occurring in patients with FA are myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia, as well as solid tumors of the head and neck, skin, gastrointestinal system and genitourinary system.

So far, 22 genes of Fanconi anemia (FANC) have been identified, which are located on the autosomal chromosomes, except for *FANCB*, which is located on the X chromosome. Protein products of FANC genes are the elements of Fanconi anemia pathway, which regulates DNA damage repair systems.

Genetic diagnostics of Fanconi anemia should start by testing crosslinking agents: mitomycin C (MMC) or diepoxybutane (DEB) assuring differential diagnosis of chromosome instability syndromes. In patients with Fanconi anemia, an increased number of chromosomal gaps and breaks

Keywords:	as well as specific radial structures are observed. In order to detect a mutation underlying Fanconi anemia, molecular techniques should be used, preferentially next generation sequencing (NGS). chromosomal instability, bone marrow failure, crosslinking agents, mitomycin C, FANC genes
GICID DOI:	01.3001.0014.6332 10.5604/01.3001.0014.6332
Word count:	6 443
Tables:	2
Figures:	4
References:	88

Adres autorki: Anna Repczyńska, Katedra Genetyki Klinicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: annasz@cm.umk.pl

WSTĘP

Anemia Fanconiego (FA) (OMIM 227560) jest rzadką chorobą genetyczną, zaliczaną do zespołów niestabilności chromosomowych oraz wrodzonych zespołów niewydolności szpiku, wywołaną przez mutacje w jednym z 22 zidentyfikowanych dotychczas genów FANC: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1* (*BRCA2*), *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* (*XRCC9*), *FANCI* (*KIAA1794*), *FANCL* (*PHF9*), *FANCM* (*KIAA1596*), *FANCN* (*PALB2*), *FANCO* (*RAD51C*), *FANCP* (*SLX4*), *FANCQ* (*ERCC4*), *FANCR* (*RAD51*), *FANCS* (*BRCA1*), *FANCT* (*UBE2T*), *FANCU* (*XRXX2*), *FANCV* (*MAD2L2/REV7*) i *FANCW* (*RFWD3*). Wszystkie geny FA zlokalizowane są na autosomach, z wyjątkiem *FANCB*, który mieści się na chromosomie X (tabela 1) [15, 19, 80, 82, 86].

W 1927 r. ukazał się pierwszy opis pacjentów z anemią Fanconiego. Szwajcarski pediatra Guido Fanconi opisał rodzinę, w której trzech braci z wadami wrodzonymi (niskorosłość, hipogonadyzm i hiperpigmentacja skóry) zmarło na skutek anemii złośliwej. W 1964 r. wykazano, że tego typu zaburzenia wynikają z niestabilności chromosomowej i wiążą się z niewydolnością szpiku kostnego i predyspozycją do nowotworów [25].

Wiele rzadkich chorób genetycznych człowieka, dziedziczonych w sposób autosomalny recesywny, charakteryzuje zwiększona wrażliwość na czynniki mutagenne, np.: promieniowanie ultrafioletowe (UV), promieniowanie jonizujące (IR) czy związki sieciujące DNA (DNA cross-linking agents), takie jak mitomycyna C (MMC). Do chorób tych, oprócz anemii Fanconiego, zalicza się m.in. *xeroderma pigmentosum*, zespół Blooma, zespół Wernera i zespół Nijmegen. Wspólną ich cechą jest niestabilność chromosomowa, która powoduje nagromadzenie zmian genetycznych, transformacji komórek i rozwoju nowotworów [17, 20, 41, 53, 60, 73, 80, 84].

Częstotliwość występowania FA w ogólnej populacji wynosi około 1 na 160 000–360 000 żywych urodzeń, jednak może być wyższa w niektórych grupach etnicznych. Nosicielstwo stwierdza się średnio

u 1 na 300 osób, przy czym u mieszkańców południowej Afryki częstość wynosi 1 na 80, a u mieszkańców Stanów Zjednoczonych 1 na 181 osób. Najczęściej występującymi podtypami są: *FANCA* (60–70%), *FANCC* (14%) i *FANCG* (10%) [67].

Na poziomie komórkowym u pacjentów z FA obserwuje się zwiększoną wrażliwość na środki sieciujące DNA, np. mitomycynę C (MMC) lub diepoksybutan (DEB), objawiającą się łamliwością chromosomów oraz obecnością charakterystycznych struktur powstałych w wyniku łączenia się niehomologicznych chromosomów, tzw. figur radialnych (promienistych). Niestabilność chromosomowa wywołana jest defektem białek FA, które uczestniczą w procesach naprawy DNA, takich jak: naprawa przez wycięcie nukleotydu (NER – nucleotide excision repair), synteza DNA z ominięciem miejsca uszkodzenia (TLS – translesion synthesis), naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR – mismatch repair) oraz rekombinacja homologiczna (HR – homologous recombination) [20, 37, 38, 65].

SZLAK ANEMII FANCONIEGO

Uszkodzenia DNA wywołane związkami sieciującymi są najbardziej niebezpieczne dla komórki, ponieważ powodują zatrzymanie widełek replikacyjnych oraz zaburzają integralność DNA. Szlak anemii Fanconiego zaczyna działać w odpowiedzi na uszkodzenia genomu i jest ściśle związany z procesami naprawy DNA [11, 21, 79]. Główną jego funkcją jest usuwanie z DNA międzyciociowych wiązań krzyżowych (ICLs – DNA interstrand crosslinks), wprowadzanych przez czynniki sieciujące [67].

Spośród zidentyfikowanych dotychczas 22 białek FA, dziewięć (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCL*, *FANCM* i *FANCT*) tworzy tzw. kompleks jądrowy, niezbędny do monoubikwitynacji podstawowego białka niedokrwiistości Fanconiego, *FANCD2*, tworzącego heterodimer z *FANCI* (kompleks ID2) podczas fazy S cyklu komórkowego, a także w odpowiedzi na uszkodzenia DNA indukowane związkami sieciującymi, promieniowaniem UV czy jonizującym [10].

Tabela 1. Lokalizacja i tryb dziedziczenia genów FANC [15, 57, 80]

Nazwa genu	Częstotliwość chorych	Locus	Tryb dziedziczenia	Funkcja białka
<i>FANCA</i>	60–70%	16q24	AR	białko kompleksu jądrowego, partner FANCG
<i>FANCB</i>	~2%	Xp22.31	XLR	białko kompleksu jądrowego, partner FANCL
<i>FANCC</i>	~14%	9q22.3	AR	białko kompleksu jądrowego, partner FANCE
<i>FANCD1 (BRCA2)</i>	~3%	13q12.3	AR	udział w HR, wiązanie i transport RAD51
<i>FANCD2</i>	~3%	3p25.3	AR	centralne białko szlaku FA, podlegające monoubikwitynacji z udziałem białek kompleksu jądrowego, niezbędne w procesie HR
<i>FANCE</i>	~3%	6p21.3	AR	białko kompleksu jądrowego
<i>FANCF</i>	~2%	11p15	AR	białko kompleksu jądrowego, wymagające do aktywacji między innymi FANCA, FANCC i FANCE
<i>FANCG (XRCC9)</i>	~10%	9p13	AR	białko kompleksu jądrowego, partner FANCA
<i>FANCI (KIAA1794)</i>	~1%	15q25-26	AR	partner FANCD2 w kompleksie ID2 ulegającym procesowi monoubikwitynacji w odpowiedzi na uszkodzenie DNA
<i>FANCI (BRIP1)</i>	~2%	17q22.3	AR	5'-3' helikaza współdziałająca z BRCA1 w naprawie podwójnych pęknięć DNA (DSBs)
<i>FANCL (PHF9)</i>	~0.2%	2p16.1	AR	ligaza E3 ubikwityny odpowiedzialna za monoubikwitynację białek kompleksu ID2
<i>FANCM (Hef)</i>	~0.2%	14q21.3	AR	translokaza
<i>FANCN (PALB2)</i>	~0.7%	16p12.1	AR	partner BRCA2 biorący udział w tworzeniu RAD51
<i>FANCO (RAD51C)</i>	~0.2%	17q25.1	AR	udział w HR
<i>FANCP (SLX4)</i>	~0.2%	16p13.3	AR	podjednostka endonukleazy, regulacja procesu wycinania ICLs
<i>FANCO (ERCC4)</i>	~0.2%	16p13.12	AR	endonukleaza naprawcza XPF, tnąca DNA
<i>FANCR (RAD51)</i>	~0.1%	15q15.1	AD	udział w HR
<i>FANCS (BRCA1)</i>	~0.1%	17q21.31	AR	udział w HR
<i>FANCT (UBE2T)</i>	~0.1%	1q32.1	AR	białko kompleksu jądrowego, enzym E2 sprzęgający ubikwitynę
<i>FANCU (XRXX2)</i>	~0.1%	7q36	AR	udział w HR
<i>FANCV (MAD2L2/REV7)</i>	~0.1%	1p36	AR	polimeraza translacyjna
<i>FANCW (RFD3)</i>	~0.1%	16q23.1	AR	ligaza E3 ubikwityny, regulująca obrót RPA i RAD51 podczas HR i naprawy IC

AD – dziedziczenie autosomalne dominujące, AR – dziedziczenie autosomalne recesywne, LR – dziedziczenie recesywne sprzężone z chromosomem X, HR – homologiczna rekombinacja, SBS – podwójne pęknięcia DNA, ID2 – heterodimer FANCD2/FANCI, ICLs – międzyciowe wiązania krzyżowe, XPF – synonim FANCO, RPA – białko replikacyjne.

Do prawidłowego przebiegu procesu monoubikwitynacji, aktywującego heterodimer ID2, niezbędna jest także obecność enzymu E2, sprzęgającego ubikwitynę (UBE2T), który bierze udział w usuwaniu ICLs i jest również związany z ochroną komórek przed aberracjami chromosomowymi indukowanymi związkami sieciującymi DNA [16, 30, 35, 55] (ryc. 1).

Aktywny, monoubikwitynowany heterodimer FANCD2/FANCI wiąże się z chromatyną i tworzy tzw. foci, kompleksy białek naprawczych, które po wyznakowaniu przeciwciałami są widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym jako świecące punkty [68]. Utworzenie heterodimeru ID2 jest niezbędne do przebiegu kolejnych etapów szlaku FA, takich jak cięcie nukleolityczne czy synteza uszkodzonej nici.

Tabela 2. Rodzaj i częstotliwość występowania wad wrodzonych różnych układów w anemii Fanconiego (według częstotliwości występowania)

Narząd/układ/cecha	Nieprawidłowości	Częstotliwość występowania u chorych z FA [%]
Wzrost	niskorosłość, niedobór hormonu wzrostu, IUGR (wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu)	60
Skóra	hiperpigmentacja, plamy café-au-lait	55
Kończyny górne	brak lub hipoplazja kciuka i kości promieniowej, dodatkowy kciuk, braki kości śródreżca	43
Inne wady układu kostnego	małogłowie, skolioza	43
Gonady męskie	niedorozwój narządów płciowych zewnętrznych, wnetrostwo, spodziectwo, mikropenis, obniżona płodność	32
Narząd wzroku	małocze, hipoteloryzm, fałd nakątny, zaćma, astygmatyzm	23
Układ moczowy	ektopowe, podkowiaste, hypoplastyczne lub dysplastyczne nerki, podwójne moczowody	21
Układ krążenia	wrodzone wady serca	11
Układ pokarmowy	niedrożność jelit, przetoka tchawiczo-przełykowa	11
Narząd słuchu	nieprawidłowy kształt małżowiny usznej, głuchota	9
Gonady żeńskie	zaburzenia miesiączkowania, obniżona płodność	3

Dwa białka FA, FANCP (SLX4) i FANCO (ERCC4/XPF), tworzą kompleks, w którym endonukleaza XPF (FANCO) wykonuje nacięcia w celu „odczepienia” ICLs. Usunięcie ICLs pozwala polimerazie translacyjnej FANCV (REV7) na naprawę jednej nici, którą można następnie wykorzystać do naprawy drugiej nici z użyciem rekombinacji homologicznej. Na końcu szlaku FA włączają się białka homologicznej rekombinacji, takie jak: FANCD1(BRCA2), FANCR(RAD51), FANCS(BRCA1), FANCF(BRIP1), FANCN(PALB2), FANCO (RAD51C) i FANCU (XRCC2), kończąc naprawę. Ten ostatni etap jest regulowany przez ligazę ubikwityny E3, czyli FANCW (RFWD3) [80].

CECHY KLINICZNE FA

Pacjenci z FA prezentują szerokie spektrum fenotypów; od pełnej do minimalnej ekspresji fenotypowej (tabela 2). Do objawów fenotypowych anemii Fanconiego należą: niski wzrost, dysmorfia twarzy, wady w budowie kciuka i strony promieniowej kończyn górnych, zaburzenia pigmentacji skóry, opóźnienie rozwoju psychoruchowego i intelektualnego. Jednak u niektórych chorych poszczególne wady czy cechy dysmorficzne mogą być nieobecne, a rozwój intelektualny może przebiegać prawidłowo. Nie wiadomo, co jest przyczyną tak dużej zmienności ekspresji. Może nią być typ i lokalizacja mutacji w obrębie któregoś z genów FANCO, epigenetyczne hamowanie /pobudzanie ekspresji genów, oddziaływanie wariantów polimorficznych innych genów, i in. [23, 27, 40, 54, 72, 88].

Pierwszym objawem hematologicznym u chorych na FA jest małopłytkowość lub leukopenia ujawniające się między 8. a 10. rokiem życia. Niewydolność szpiku kostnego

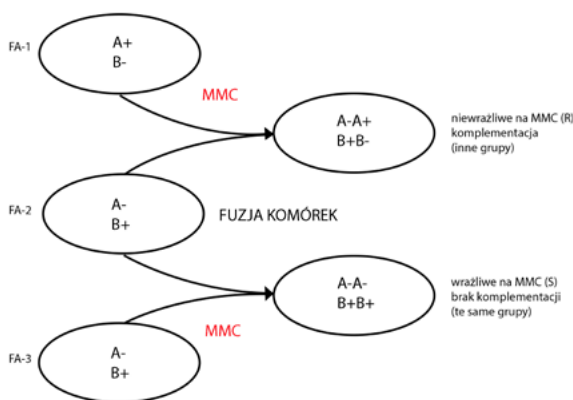
ostatecznie pojawia się u około 90% osób dotkniętych tą chorobą, niezależnie od postępu choroby i wieku rozpoznania. U 75% chorych na FA aplazja szpiku jest stwierdzana w pierwszej dekadzie życia [32, 68, 87].

Do tej pory nie opisano pacjentów z mutacją w genach *FANCO/RAD51C* i *FANCS/BRCA1* skojarzoną z niewydolnością szpiku, dlatego te podtypy choroby zaliczane są do zespołów podobnych do niedokrwistości Fanconiego (Fanconi anemia-like) [11].

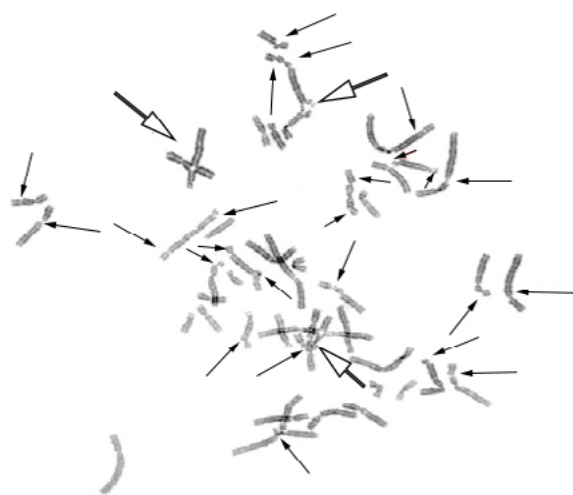
Pacjenci z FA wykazują zwiększoną podatność na nowotwory. Chorzy z bialleliczną mutacją w genach *FANCD1(BRCA2)* lub *FANCN(PALB2)* mają wysokie ryzyko (około 500-krotnie wyższe niż w ogólnej populacji) zachorowania na ostrą białaczkę szpikową (AML) i nowotwory germinalne (medulloblastoma, neuroblastoma i guz Wilmsa), zazwyczaj w pierwszych latach życia [33, 71, 81, 83].

U pacjentów z pozostałymi podtypami choroby występują: AML, nowotwory płaskonabłonkowe, szczególnie głowy i szyi, przełyku i narządów rozrodczych oraz nowotwory wątroby. Przy czym, w porównaniu ze zdrową populacją, ryzyko zachorowania na wszystkie guzy lite jest 50-krotnie wyższe, a na ww. nowotwory 100–1000-krotnie wyższe [2, 3, 22, 39, 52, 68].

W diagnostyce cytogenetycznej nowotworów złośliwych pojawienie się niektórych aberracji klonalnych może być związane z szybszym postępowaniem choroby lub cięższym jej przebiegiem. Do najczęściej występujących klonalnych aberracji chromosomowych w komórkach szpiku u chorych z AML lub MDS (zespół mielodysplastyczny) na podłożu FA należą: duplikacje



Ryc. 2. Schemat analizy komplementacyjnej komórek chorych na anemię Fanconiego, nadwrażliwych na mitomycynę C (MMC). W wyniku połączenia komórek chorych pochodzących z dwóch różnych grup komplementacyjnych (FA-1 i FA-2) powstaje hybryda wykazująca prawidłowy fenotyp. W wyniku fuzji komórek chorych należących do tej samej grupy komplementacyjnej (FA-2 i FA-3) powstaje hybryda, która zachowuje nadwrażliwość na MMC [38]



Ryc. 3. Aberracje chromosomowe wyindukowane przez MMC w hodowli limfocytów pacjenta z FA. Duże strzałki – figury tetradialne, małe strzałki – pęknięcia i złamania chromosomów

- (VIII) Nowotwory typowe dla FA w nietypowym wieku;
- (IX) Historia rodziny obciążona występowaniem FA lub nowotworów (np. rak piersi).

Kryteria pomocnicze:

- (I) Cytopenia;
- (II) Makrocytoza niezależna od niedoboru witaminy B12 i kwasu foliowego;
- (III) Nowotwory wątroby;

- (IV) Przedwczesne wygasanie czynności jajników <30. r.ż.;
- (V) Zmniejszona rezerwa jajnikowa;
- (VI) Guzy mózgu <5. r.ż.;
- (VII) Guz Wilmsa <4. r.ż.;
- (VIII) Niewyjaśniona obecność hemoglobiny płodowej HbF;
- (IX) Niepłodność męska lub żeńska;
- (X) Gruczolaki wątroby i wątrobiaki.

Wczesne wykrycie FA pozwala na odróżnienie jej od innych chorób układu krwiotwórczego, takich jak: ciężka anemia aplastyczna innego typu, zespoły mielodysplastyczne czy ostra białaczka szpikowa, a także na zastosowanie spersonalizowanej terapii oraz objęcie chorych i ich rodzin opieką specjalistów m.in. z zakresu: pediatrii, hematologii, onkologii i genetyki [1].

Potrzeba poznania pełnego spektrum cech klinicznych, komórkowych i molekularnych pacjentów z FA, stanowiła podstawę do utworzenia w 1982 r. rejestru IFAR (International Fanconi Anemia Registry), który do dzisiaj funkcjonuje jako centralne repozytorium informacji klinicznych i genetycznych, a także jako bank materiału genetycznego osób z FA [6].

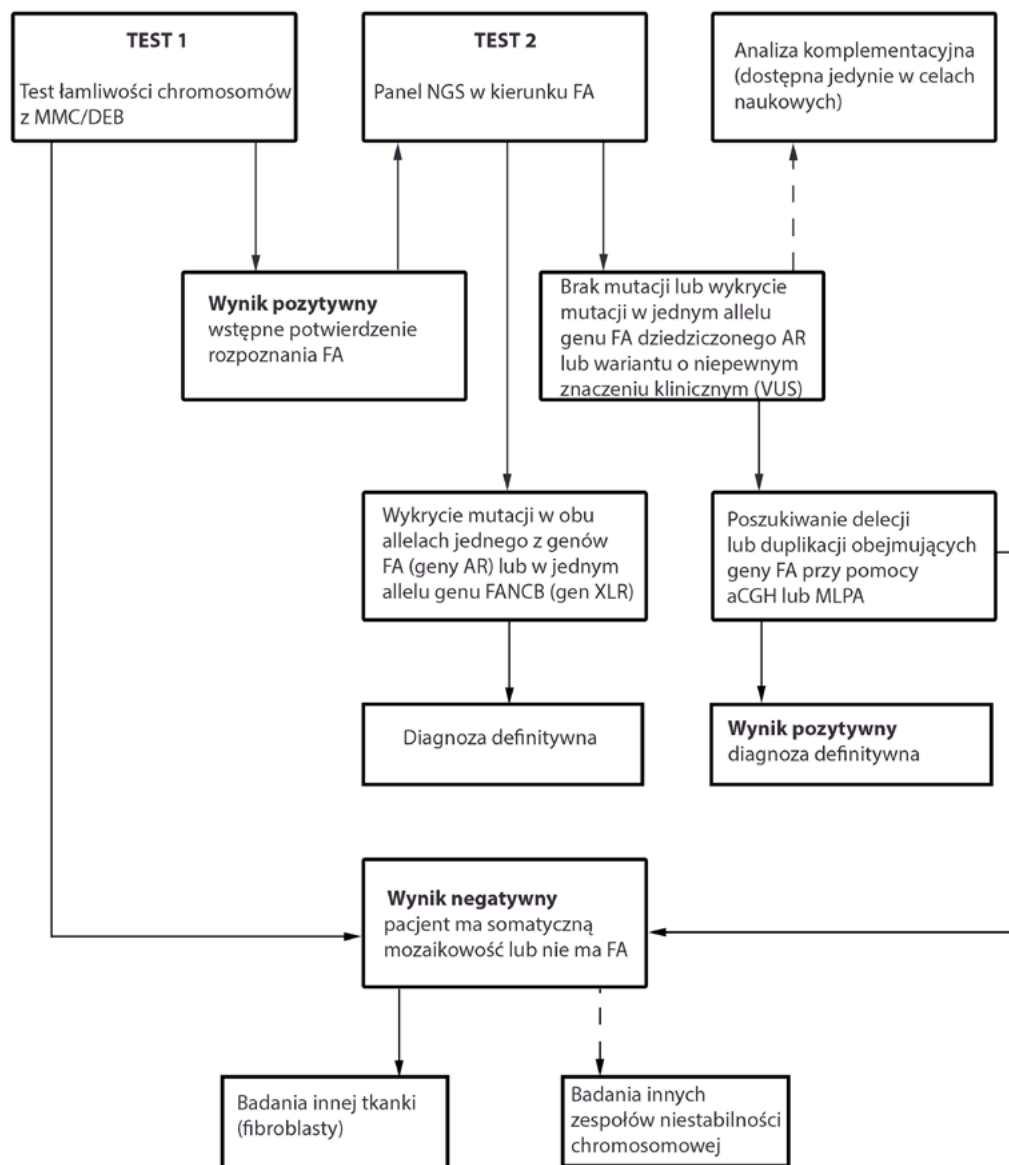
ANALIZA KOMPLEMENTACYJNA

Bardzo rzadkie występowanie anemii Fanconiego połączone z dużym zróżnicowaniem fenotypowym pacjentów, utrudniało zbadanie jej podłoża genetycznego. Pierwszym podejściem do klasyfikacji pacjentów z anemią Fanconiego była analiza komplementacyjna.

Metoda polega na fuzji komórek pacjenta z referencyjną linią komórkową (wyprowadzoną w laboratorium od pacjenta z określonym już genotypem) i obserwacji, czy powstałe w ten sposób hybrydy odzyskują na drodze komplementacji oporność na MMC. W przypadku fuzji dwóch komórek, w których uszkodzony jest ten sam gen, hybryda nadal wykazuje wrażliwość na MMC, wskazując, że obie tworzące ją komórki należą do tej samej grupy komplementacyjnej (ryc. 2) [14, 77].

ANALIZA CYTOGENETYCZNA – TEST ŁAMLIWOŚCI CHROMOSOMÓW

Test łamliwości chromosomów polega na analizie częstotliwości i występowania spontanicznych oraz indukowanych złamań chromosomów w hodowli z MMC lub DEB. Test jest uważany za „złoty standard” w diagnostyce FA, opiera się na zjawisku nadwrażliwości komórek FA na związki sieciujące DNA, pod wpływem których dochodzi do powstania licznych pęknięć chromosomów (gap), złamań chromatyd (chtb), złamań chromosomów (chrb), fragmentów acentrycznych (ace) oraz typowych dla FA figur tri-, tetra-



Ryc. 4. Algorytm diagnostyki genetycznej FA (na podstawie dostępnej literatury i badań własnych); FA – anemia Fanconiego, AR – dziedziczenie autosomalne recesywne, AD – dziedziczenie autosomalne dominujące, aCGH – array Comparative Genome Hybridization, MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

i multiradialnych, spowodowanych niehomologicznym łączeniem się chromosomów (ryc. 3) [32, 59, 62].

Materiałem do badań jest krew obwodowa pobrana na heparynę litową od pacjenta i od osoby kontrolnej. Informacją niezbędną do rozpoczęcia analizy jest czas, jaki upłynął od ostatniego przetoczenia krwi, badania radiologicznego lub radioterapii u pacjenta. Wymienione działania terapeutyczne i diagnostyczne mogą mieć wpływ na stopień łamliwości chromosomów i powodować niemierną różnicę wyniku [59].

W celu analizy łamliwości chromosomów przeprowadzane są hodowle limfocytów krwi obwodowej bez MMC/DEB

(kontrola) oraz przy wzrastającym stężeniu MMC (50 nM, 150 nM i 300 nM) lub przy stałym stężeniu DEB, 0,1 µg/ml. Opracowanie hodowli i przygotowanie preparatów cytogenetycznych przeprowadzane jest według standardowych procedur. Analiza polega na ocenie ogólnej liczby metafaz ze złamaniami chromosomów oraz liczby złamań na metafazę u pacjenta i u osoby kontrolnej. U każdego badanego, dla każdego rodzaju hodowli analizowanych jest 50-100 płytek metafazalnych [5, 59].

U chorych z FA stwierdza się występowanie aberracji chromosomowych w 30-100% analizowanych komórek, otrzymanych po hodowli ze środkiem sieciującym DNA, np. MMC lub DEB [59, 70].

Test łamliwości chromosomów nie jest w 100% swoisty i inne zespoły niestabilności chromosomowych, np. zespół Nijmegen, ataksja-teleangiektazja, zespoły Seckela, Blooma, Corneli de Lange, ligazy 4 (LIG4), Roberta oraz zespół warszawski (Warsaw Breakage syndrome) mogą również objawiać się zwiększoną łamliwością chromosomów [59, 64].

ANALIZA MOLEKULARNA

Międzynarodowe rekomendacje dotyczące diagnostyki anemii Fanconiego zalecają rozpoczęcie analizy molekularnej od poszukiwania znanych mutacji lub też dużych delecji w genie FANCA, ze względu na ich najczęstsze występowanie wśród chorych na FA [32].

Do potwierdzenia rozpoznania FA konieczne jest wykonanie badań molekularnych za pomocą techniki NGS (next-generation sequencing), charakteryzującej się dużą swoistością i przepustowością, pozwalającą w krótkim czasie dokładnie przeanalizować regiony obejmujące geny związane z anemią Fanconiego i wykrywającą wszystkie znane i nieznanne mutacje punktowe w regionach objętych panelem NGS dla FA. Jeśli zastosowanie paneli nie pozwoli na postawienie rozpoznania, należałoby zastosować badanie całej części kodującej genomu (WES = Whole Exome Sequencing). Dodatkowymi technikami, jeśli za pomocą NGS nie wykryje się mutacji w układzie homozygotycznym lub heterozygoty złożonej, są badania cytogenetyczno-molekularne, wykrywające duże delecje obejmujące geny FANCC, np. technika MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) lub aCGH (array Comparative Genome Hybridization) (ryc. 4) [26, 32, 51, 76].

Obecność „efektu założyciela”, związanego z migracją części populacji macierzystej *Homo sapiens* na nowe, niezamieszkałe dotąd tereny i założenie tam odrębnej populacji, która często stawała się populacją izolowaną, przyczyniła się do ograniczenia liczby swoistych dla tych populacji mutacji i w związku z tym – do możliwości zastosowania celowanej diagnostyki genetycznej. Dotyczy to np. populacji Żydów aszkenazyjskich, u których występują określone mutacje założycielskie (founder mutations) w genach FANCC [c.456+4A>T (IVS4)] i FANCD1 (c.6174delT), czy Japończyków, z mutacjami założycielskimi w genach FANCA (c.2546delC lub c.3720_3724del), FANCC (c.456+4A>T) i FANCG (c.307+1G>C lub c.1066C>T). Do tej pory nie opublikowano danych na temat częstotliwości występowania poszczególnych mutacji w genach FANCC w populacji polskiej [6, 12, 13, 61, 85]. Nie wiadomo więc czy w naszej populacji istnieją mutacje założycielskie w odniesieniu do FA.

ANALIZA MONOUBIKWITYNACJI FANCD2 METODĄ WESTERN BLOT

Uzupełniającym badaniem molekularnym w diagnostyce FA jest test monoubikwitynacji podstawowego białka FANCD2, opierający się na rozróżnieniu jego krótkiej i długiej formy (ubikwitynowanej). Badanie jest przeprowadzane w celu potwierdzenia rozpoznania anemii Fanconiego. Opiera się na technice

Western-blot z wykorzystaniem przeciwciał swoistych dla białka FANCD2.

Dużą zaletą metody jest niski koszt i krótki czas analizy, jednak metoda nie pozwala na ustalenie przynależności pacjenta do grupy komplementacyjnej, nie ma również zastosowania w diagnostyce mozaikowości somatycznej występującej w FA [58, 69].

CYTOMETRIA PRZEPŁYWOWA

W analizie cyklu komórkowego limfocytów za pomocą cytometrii przepływowej u chorych z FA obserwuje się zwiększoną liczbę komórek zatrzymanych w fazie G2/M po hodowli ze związkiem sieciującym DNA, np. MMC lub DEB. Test cyklu komórkowego pozwala na diagnostykę różnicową chorych z FA i z innymi zespołami niestabilności chromosomowej, np. z zespołem Nijmegen lub Roberta, u których nie wykrywa się podwyższonej frakcji komórek fazy G2. Analiza cyklu komórkowego nie znalazła szerokiego zastosowania w diagnostyce zespołów łamliwości chromosomów, ponieważ może dawać fałszywie ujemne wyniki u pacjentów z FA, u których rozwinęły się MDS lub AML oraz nie wykrywa postaci mozaikowej FA [50].

SOMATYCZNA MOZAIKOWOŚĆ W ANEMII FANCONIEGO

Mianem somatycznej mozaikowości określa się występowanie dwóch lub więcej odrębnych genetycznie populacji komórek somatycznych w danym organizmie. U około 10–30% chorych z FA obserwuje się mozaikowość somatyczną, która charakteryzuje się pojawieniem komórek, które straciły wrażliwość na związki sieciujące DNA w wyniku odwrócenia oddziedziczonej mutacji lub pojawienia się mutacji *de novo* mającej wpływ na zmniejszenie lub wyeliminowanie wrodzonego patogennego wariantu mutacji [4].

W diagnostyce somatycznej mozaikowości można zastosować test łamliwości chromosomów limfocytów krwi obwodowej, w którym obserwowany odsetek prawidłowych komórek u niektórych pacjentów może wynosić nawet 100%. Obserwuje się także chorych z niskim procentem prawidłowych komórek, u których w wyniku leczenia poprawiają się parametry krwi, a w kolejnym badaniu cytogenetycznym wykrywa się u nich większą liczbę prawidłowych komórek [32].

Jeśli liczba komórek, które utraciły wrażliwość na MMC, jest tak wysoka, że wynik testu z MMC z krwi obwodowej jest fałszywie ujemny, wskazane jest badanie komórek innego listka zarodkowego, np. fibroblastów skóry, w których nie ma mozaikowości obecnej w układzie krwiotwórczym [4, 31, 43].

Poziom mozaikowości badany we krwi obwodowej nie odzwierciedla poziomu mozaikowości w szpiku kostnym pacjenta. Oznacza to, że chory, który ma wysoki procent prawidłowych komórek we krwi, może mieć bardzo niski procent lub w ogóle nie mieć prawidłowych komórek

w szpiku kostnym [32]. Mozaikowość obserwowana zarówno we krwi obwodowej chorych na FA, jak i w szpiku kostnym, nie chroni ich przed rozwojem nieprawidłowych klonów komórkowych, które zachowały mutacje w genach FANCC, a także przed rozwojem nowotworów układu krwiotwórczego i guzów litych [32].

Pozostaje jednak niewyjaśnione, czy chory z FA, z ujemnym wynikiem testu łamliwości chromosomów komórek krwi obwodowej, będzie miał ten sam przebieg kliniczny choroby, co pacjent z wynikiem dodatnim.

DIAGNOSTYKA PRENATALNA

Badania prenatalne w kierunku anemii Fanconiego można wykonać na różnym etapie ciąży. Obejmują badania ultrasonograficzne nastawione na wykrywanie wad typowych dla FA, test łamliwości chromosomów oraz analizę molekularną. Testy prenatalne można również zastosować w celu ustalenia zgodności w układzie HLA (układ zgodności tkanekowej) i uzyskania informacji czy dziecko będzie odpowiednim dawcą krwi pępowinowej dla rodzeństwa z FA.

Materiał do badań diagnostycznych może być uzyskany metodą biopsji kosmówki lub amniopunkcji przeprowadzanych według standardowych procedur. Celem obu procedur jest uzyskanie komórek płodu w liczbie wystarczającej do przeprowadzenia testów genetycznych, obejmujących m.in. test łamliwości chromosomów, gdy podejrzenie FA u płodu jest pierwszym takim podejrzeniem w rodzinie lub gdy nie została jeszcze przeprowadzona analiza mutacji. Gdy płód ma cechy FA, a mutacja występująca w rodzinie jest już zdiagnozowana, należy przeprowadzić ukierunkowaną analizę molekularną [7, 32].

PORADNICTWO GENETYCZNE W FA

Porada genetyczna powinna być udzielana w chwili rozpoznania choroby oraz na poszczególnych etapach życia pacjenta. Wizyta w poradni genetycznej powinna obejmować:

- wywiad rodzinny,
- wywiad prenatalny,
- badanie fizykalne dziecka, postawienie wstępnej diagnozy klinicznej,
- omówienie dostępnych testów genetycznych,
- zlecenie testu genetycznego, a następnie omówienie jego wyników,
- udzielenie porady obejmującej rokowanie co do rozwoju dziecka, informację o niezbędnych konsultacjach medycznych i ewentualnej rehabilitacji,
- wyjaśnienie sposobu dziedziczenia choroby,
- przedstawienie pacjentowi i jego rodzinie możliwości posiadania zdrowego potomstwa,

- udzielenie informacji o fundacjach i grupach wsparcia dla chorych z FA i ich rodzin [32].

Ponadto genetyk kliniczny powinien przeprowadzić szczegółowy wywiad rodzinny w kierunku występowania nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem białaczki i raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, jak również raka szyjki macicy, sromu oraz odbytu i innych nowotworów przewodu pokarmowego, a także raka: piersi, jajnika i prostaty [39, 45, 46, 63].

Nosiciele mutacji w genach *FANCC*, *FANCD1*, *FANCF* i *FANCN* powinni zostać poinformowani o zwiększonym ryzyku zachorowania na raka piersi i jajnika i uzyskać zalecenia profilaktyczne i diagnostyczne w tym kierunku [63, 74, 78].

LECZENIE

Rekomendacje dotyczące diagnostyki oraz leczenia pacjentów z anemią Fanconiego zostały opracowane na międzynarodowej konferencji zorganizowanej przez Fundację na rzecz Anemii Fanconiego (FARF) w dniach 5–6 kwietnia 2013 r. w Herndon, USA [32].

Jednym ze sposobów leczenia, najczęściej okresowym, jest zastosowanie androgenów. Androgeny poprawiają liczbę krwinek czerwonych i płytek krwi u około 50% pacjentów z FA. Terapia androgenowa jest stosowana, gdy stężenie hemoglobiny spada, ponieważ 4,9 mmol/l lub liczba płytek spada poniżej 30 G/l [28].

Granulocytarny czynnik wzrostu (G-CSF) zwiększa liczbę neutrofilów u niektórych chorych. Bardzo ważne jest odpowiednie ustalenie jego dawki oraz biopsja szpiku kostnego przed rozpoczęciem leczenia i w trakcie, ze względu na ryzyko stymulowania przez G-CSF rozrostu klonu białaczkowego [75].

Allogeniczna transplantacja hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCT) jest u chorych z FA jedyną terapią pozwalającą na wyleczenie niedokrwistości aplastycznej, zespołu mielodysplastycznego i ostrej białaczki szpikowej. HSCT najlepiej wykonać u pacjenta jeszcze przed wystąpieniem MDS/AML oraz przed koniecznością wielokrotnych transfuzji. Ze względu na niestabilność materiału genetycznego chorzy z FA są znacznie bardziej wrażliwi na chemioterapię i radioterapię niż inni pacjenci hematologiczni i wymagają specjalnych protokołów transplantacyjnych, dlatego powinni być leczeni w ośrodkach o największym doświadczeniu w HSCT w FA [42, 44, 49, 75].

Bardzo obiecujące są próby zastosowania terapii genowej w FA. Badania polegające na pobraniu stymulowanych G-CSF i plerixaforem hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC) CD34+ od chorych z FA typu A, a następnie transdukcji prawidłowym genem *FANCA* wprowadzanym za pomocą wektora lentiwirusowego, wykazały korekcję fenotypu tych komórek. Może to być w przyszłości skuteczna i bezpieczna alternatywa standardowego leczenia w FA [66].

W diagnostyce i leczeniu pacjentów z FA, u których występują guzy lite, najważniejsze jest wczesne rozpoznanie oraz chirurgiczne usunięcie guza. Leczenie tych chorych jest dużym wyzwaniem, ze względu na zwiększoną toksyczność chemioterapii i promieniowania w FA. Istnieją doniesienia o ciężkiej i śmiertelnej toksyczności oraz o niepowodzeniach w leczeniu cytostatykiem u chorych z FA.

PODSUMOWANIE

Anemia Fanconiego była początkowo opisywana jako choroba objawiająca się pancytopenią i występowaniem wad wrodzonych. Wykrycie mozaiki somatycznej u niektórych chorych pozwoliło na rozszerzenie zakresu fenotypów FA o przypadki bez objawów hematologicznych. Dopiero dokładniejsze poznanie mechanizmów komórkowych

leżących u podstaw FA uświadomiło, że zwiększone ryzyko nowotworzenia istnieje u wszystkich pacjentów.

Ważnym odkryciem było wyodrębnienie grup komplementacyjnych oraz identyfikacja genów leżących u ich podstaw. Oprócz licznych wrodzonych zmian genetycznych dla rozwoju FA istotny jest także wpływ na DNA innych czynników, np. genów modulujących, czy czynników zewnętrznych, taki jak związki chemiczne uszkadzające DNA czy promieniowanie jonizujące.

Pomimo ogromnego rozwoju medycyny i technik molekularnych wciąż nie jest dokładnie poznana przyczyna tak znacznej heterogenności, zarówno genetycznej, jak i fenotypowej wśród pacjentów z FA, zwłaszcza, że – jak dotąd – nie znaleziono ścisłych powiązań między genotypem a fenotypem tej choroby.

PIŚMIENICTWO

- [1] Alter B.P.: Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2007; 1: 29–39
- [2] Alter B.P., Caruso J.P., Drachtman R.A., Uchida T., Velagaleti G.V., Elghetany M.T.: Fanconi anemia: Myelodysplasia as a predictor of outcome. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2000; 117: 125–131
- [3] Alter B.P., Giri N., Savage S.A., Peters J.A., Loud J.T., Leathwood L., Carr A.G., Greene M.H., Rosenberg P.S.: Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br. J. Haematol.*, 2010; 150: 179–188
- [4] Asur R.S., Kimble D.C., Lach F.P., Jung M., Donovan F.X., Kamat A., Thomas J.W., Park M., Chines P., Vlachost A., Auerbach A.D., Smogorzewska A., Chandrasekharappa S.C.: Somatic mosaicism of an intragenic FANCB duplication in both fibroblast and peripheral blood cells observed in a Fanconi anemia patient leads to milder phenotype. *Mol. Genet. Genomic Med.*, 2018; 6: 77–91
- [5] Auerbach A.: Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, 2016; 85: 1–23
- [6] Auerbach A.D.: Fanconi anemia and its diagnosis. *Mut. Res.*, 2009; 668: 4–10
- [7] Auerbach A.D., Min Z., Ghosh R., Pergament E., Verlinsky Y., Nicolas H., Boué J.: Clastogen-induced chromosomal breakage as a marker for first trimester prenatal diagnosis of Fanconi anemia. *Hum. Genet.*, 1986; 73: 86–88
- [8] Berger R., Jonveaux P.: Clonal chromosome abnormalities in Fanconi anemia. *Hematol. Cell Ther.*, 1996; 38: 291–296
- [9] Berliner J.L., Fay A.M.: Practice issues subcommittee of the National Society of Genetic Counselors' Familial Cancer Risk Counseling Special Interest Group: Risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J. Genet. Couns.*, 2007; 16: 241–260
- [10] Bogliolo M., Lyakhovich A., Callén E., Castellà M., Cappelli E., Ramírez M., Creus A., Marcos R., Kalb R., Neveling K., Schindler D., Surrallés J.: Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO*, 2007; 26: 1340–1351
- [11] Bogliolo M., Surrallés J.: Fanconi anemia: A model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2015; 33: 32–40
- [12] Callén E., Casado J.A., Tischkowitz M.D., Bueren J.A., Creus A., Marcos R., Dasí A., Estella J.M., Muñoz A., Ortega J.J., de Winter J., Joenje H., Schindler D., Hanenberg H., Hodgson S.V., Mathew C.G., Surrallés J.: A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood*, 2005; 105: 1946–1949
- [13] Castella M., Pujol R., Callén E., Trujillo J., Casado J., Gille H., Lach F., Auerbach A., Schindler D., Benítez J., Porto B., Ferro T., Muñoz A., Sevilla J., Madero L. i wsp.: Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood*, 2011; 117: 3759–3769
- [14] Chandra S., Levran O., Jurickova I., Maas C., Kapur R., Schindler D., Henry R., Milton K., Batish S.D., Cancelas J.A., Hanenberg H., Auerbach A.D., Williams D.A.: A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. *Mol. Ther.*, 2005; 12: 976–984
- [15] Che R., Zhang J., Nepal M., Han B., Fei P.: Multifaceted Fanconi anemia signaling. *Trends Genet.*, 2018; 34: 171–183
- [16] Cheung R.S., Taniguchi T.: Recent insights into the molecular basis of Fanconi anemia: genes, modifiers, and drivers. *Int. J. Hematol.*, 2017; 106: 335–344
- [17] Chrzanowska K., Gregorek H., Dembowska-Bagińska B., Kalina M.A., Digweed M.: Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J. Rare Dis.*, 2012; 7: 7: 13
- [18] Cioc A.M., Wagner J.E., MacMillan M.L., DeFor T., Hirsch B.: Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with Fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2010; 133: 92–100
- [19] Digweed M., Hoehn H., Sperling K.: Milestones in Fanconi anemia research. *Monogr. Hum. Genet.*, 2007; 15: 23–38
- [20] Dokal I.: Inherited bone marrow failure syndromes. *J. Hematopathol.*, 2011, 4, 53–60
- [21] Duxin J.P., Walter J.C.: What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2015; 37: 49–60
- [22] Esai Selvan M., Klein K.J., Gümüş Z.H.: Rare, pathogenic germline variants in Fanconi anemia genes increase risk for squamous lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2019; 25: 1517–1525
- [23] Faivre L., Guardiola P., Lewis C., Dokal I., Ebell W., Zatterale A., Altay C., Poole J., Stones D., Kwee M.L., van Weel-Sipman M., Havenga

- C., Morgan N., de Winter J., Digweed M. i wsp.: Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood*, 2000; 96: 4064–4070
- [24] Favre L., Portnoi M.F., Pals G., Stoppa-Lyonnet D., Le Merrer M., Thauvin-Robinet C., Huet F., Mathew C.G., Joenje H., Verloes A., Baumann C.: Should chromosome breakage studies be performed in patients with VACTERL association? *Am. J. Med. Genet. A*, 2005; 137: 55–58
- [25] Fanconi G.: Familiäre infantile perniziösartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konsitution). *Jahrb. f. Kinderheilk.*, 1927; 117: 257–280
- [26] Gille J.J., Foor K., Kerkhoven L., Ameziane N., Joenje H., Winter J.P.: Diagnosis of Fanconi anemia: mutation analysis by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and PCR-based Sanger sequencing. *Anemia*, 2012; 2012: 603253
- [27] Glanz A., Fraser C.: Spectrum of anomalies in Fanconi anaemia. *J. Med. Genet.*, 1982; 19: 412–416
- [28] Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D., Friedman H.S., Douglas G.W., Devergie A., Esperou H., Thierry D., Socie G., Lehn P., M.D., Cooper S., English D., Kurtzberg J., Bard J., Boyse E.: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.*, 1989; 321: 1174–1178
- [29] Göhring G., Karow A., Steinemann D., Wilkens L., Lichter P., Zeidler C., Niemeyer C., Welte K., Schlegelberger B.: Chromosomal aberrations in congenital bone marrow failure disorders – an early indicator for leukemogenesis? *Ann. Hematol.*, 2007; 86: 733–739
- [30] Grompe M., D'Andrea A.: Fanconi anemia and DNA repair. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 2253–2259
- [31] Gross M., Hanenberg H., Lobitz S., Friedl R., Herterich S., Dietrich R., Gruhn B., Schindler D., Hoehn H.: Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet. Genome Res.*, 2002; 98: 126–135
- [32] Hays, L.: *Laboratory Diagnostics in Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management (4th ed.)*. 2014; Fanconi Anemia Research Fund
- [33] Howlett N.G., Taniguchi T., Olson S., Cox B., Waisfisz Q., De Die-Smulders C., Persky N., Grompe M., Joenje H., Pals G., Ikeda H., Fox E.A., D'Andrea A.D.: Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, 2002; 297: 606–609
- [34] Huret J.L., Ahmad M., Arsaban M., Bernheim A., Cigna J., Desangles F., Guignard J.C., Jacquemot-Perbal M.C., Labarussias M., Leberre V., Malo A., Morel-Pair C., Mossafa H., Potier J.C., Texier G., i wsp.: Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res.*, 2013; 41: 920–924
- [35] Jones M.J., Huang T.T.: The Fanconi anemia pathway in replication stress and DNA crosslink repair. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2012; 69: 3963–3974
- [36] Kimble D.C., Lach F.P., Gregg S.Q., Donovan F.X., Flynn E.K., Kamat A., Young A., Vemulapalli M., Thomas J.W., Mullikin J.C., Auerbach A.D., Smogorzewska A., Chandrasekharappa S.C.: A comprehensive approach to identification of pathogenic FANCA variants in Fanconi anemia patients and their families. *Hum. Mutat.* 2018; 39: 237–254
- [37] Kitao H., Takata M.: Fanconi anemia: a disorder in the DNA damage response. *Int. J. Hematol.*, 2011; 93: 417–424
- [38] Koczorowska A.M., Białkowska A., Kluzek K., Zdzienicka M.Z.: Rola białek niedokrwiistości Fanconiego w naprawie DNA i utrzymaniu stabilności genomu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 459–472
- [39] Kutler D.I., Auerbach A.D., Satagopan J., Giampietro P.F., Batish S.D., Huvos A.G., Goberdhan A., Shah J.P., Singh B.: High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2003; 129: 106–112
- [40] Kutler D.I., Singh B., Satagopan J., Batish S.D., Berwick M., Giampietro P.F., Hanenberg H., Auerbach A.D.: A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*, 2003; 101: 1249–1256
- [41] Lelij P., Oostra A., Rooimans M., Joenje H., Winter J.: Diagnostic overlap between Fanconi anemia and the cohesinopathies: Roberts syndrome and Warsaw Breakage Syndrome. *Anemia*, 2010; 2010: 565268
- [42] Liu J.M., Buchwald M., Walsh C.E., Young N.S.: Fanconi anemia and novel strategies for therapy. *Blood*, 1994; 84: 3995–4007
- [43] Lo Ten Foe J.R., Kwee M.L., Rooimans M.A., Oostra A.B., Veerman A.J., van Weel M., Pauli R.M., Shahidi N.T., Dokal I., Roberts I., Altay C., Gluckman E., Gibson R.A., Mathew C.G., Arwert F., Joenje H.: Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1997; 5: 137–148
- [44] MacMillan M.L., Wagner J.E.: Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia – when and how? *Br. J. Haematol.*, 2010; 149: 14–21
- [45] Mahon S.M.: Breast cancer risk associated with CHEK2 mutations. *Oncol. Nurs. Forum.*, 2014; 41: 692–694
- [46] Mathew C.G.: Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer. *Oncogene*, 2006; 25: 5875–5884
- [47] Meyer S., Bristow C., Wappett M., Pepper S., Whetton A.D., Hanenberg H., Neitzel H., Wlodarski M.W., Ebell W., Tönnies H.: Fanconi anemia (FA)-associated 3q gains in leukemic transformation consistently target EVI1, but do not affect low TERC expression in FA. *Blood*, 2011; 117: 6047–6050
- [48] Meyer S., Neitzel H., Tönnies H.: Chromosomal aberrations associated with clonal evolution and leukemic transformation in Fanconi anemia: Clinical and biological implications. *Anemia*, 2012; 2012: 349837
- [49] Mitchell R., Wagner J.E., Hirsch B., DeFor T.E., Zierhut H., MacMillan M.L.: Haematopoietic cell transplantation for acute leukaemia and advanced myelodysplastic syndrome in Fanconi Anaemia. *Br. J. Haematol.*, 2014; 164: 384–395
- [50] Moreira C.F., Brito L.C.Jr., Lemos J.A.: Flow cytometry for diepoxybutane test analysis. *Genet. Mol. Res.*, 2008; 7: 1353–1359
- [51] Morgan N.V., Tipping A.J., Joenje H., Mathew G.: High frequency of large deletions in Fanconi anemia group A gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1999; 65: 1330–1341
- [52] Nepal M., Che R., Zhang J., Ma C., Fei P.: Fanconi anemia signaling and cancer. *Trends Cancer*, 2017; 3: 840–856
- [53] Neveling K., Bechtold A., Hoehn H.: Genetic instability syndromes with progeroid features. *Z. Gerontol. Geriatr.*, 2007; 40: 339–348
- [54] Neveling K., Endt D., Hoehn H., Schindler D.: Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat. Res.*, 2009; 668: 73–91
- [55] Niedernhofer L.J., Lalai A.S., Hoelijmakers J.H.J.: Fanconi anemia (Cross)linked to DNA repair. *Cell*, 2005; 123: 1191–1198
- [56] Nik-Zainal S., Alexandrov L.B., Wedge D.C., Loo P.V., Greenman C.D., Raine K., Jones D., Hinton J., Marshall J., Stebbings L.A., Menzies A., Martin S., Leung K., Chen L. i wsp.: Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*, 2012; 149: 979–993
- [57] Niraj J., Färkkilä A., D'Andrea A.D.: The Fanconi anemia pathway in cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.*, 2019; 3: 457–478
- [58] Oestergaard V.H., Langevin F., Kuiken H.J., Pace P., Niedzwiedz W., Simpson L.J., Ohzeki M., Takata M., Sale J.E., Patel K.J.: Deubiquitination of FANCD2 is required for DNA crosslink repair. *Mol. Cell.*, 2007; 28: 798–809
- [59] Oostra A., Nieuwint A., Joenje H., Winter J.: Diagnosis of Fanconi anemia: Chromosomal breakage analysis. *Anemia*, 2012; 2012: 238731
- [60] Perikh S., Bessler M.: Recent insights into inherited bone marrow failure syndromes. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2012; 24: 23–32
- [61] Pinto F.O., Leblanc T., Chamoussat D., Le Roux G., Brethon B., Cassinat B., Larghero J., de Villartay J.P., Stoppa-Lyonnet D., Baruchel

- A., Socié G., Gluckman E., Soulier J.: Diagnosis of Fanconi anemia in patients with bone marrow failure. *Haematologica*, 2009; 94: 487-495
- [62] Prandota J., Haus O.: Aberracje chromosomów w anemii aplastycznej Fanconiego. *Ped. Pol.*, 1985; 60: 87-89
- [63] Rantala J., Platten U., Lindgren G., Nilsson B., Arver B., Lindblom A., Brandberg Y.: Risk perception after genetic counseling in patients with increased risk of cancer. *Hered. Cancer Clin. Pract.*, 2009; 7: 1-14
- [64] Rao V.B., Kerketta L., Korgaonkar S., Ghosh K.: Differentiation of Nijmegen breakage syndrome from Fanconi anemia. *Genet. Mol. Res.*, 2007; 6: 622-626
- [65] Rickman K., Smogorzewska A.: Advances in understanding DNA processing and protection at stalled replication forks. *J. Cell Biol.* 2019; 218: 1096-1107
- [66] Rio P., Navarro S., Bueren J.A.: Advances in the gene therapy for Fanconi anemia. *Hum. Gene Ther.*, 2018; 29: 1114-1123
- [67] Risitano A.M., Marotta S., Calzone R., Grimaldi F., Zatterale A.: Twenty years of the Italian Fanconi Anemia Registry: Where we stand and what remains to be learned. *Hematologica*, 2016; 101: 319-327
- [68] Rosenberg P.S., Greene M.H., Alter B.P.: Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood*, 2003; 101: 822-826
- [69] Sareen A., Chaudhury I., Adams N., Sobek A.: Fanconi anemia proteins FANCD2 and FANCI exhibit different DNA damage responses during S-phase. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40: 8425-8439
- [70] Sasaki M.S., Tonomura A.: A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res.*, 1973; 33: 1829-1836
- [71] Savage S.A., Walsh M.F.: Myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, and cancer surveillance in Fanconi anemia. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.*, 2018; 32: 657-668
- [72] Schimamura A., Alter B.P.: Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev.*, 2010; 24: 101-122
- [73] Schroeder T.M.: Genetically determined chromosome instability syndromes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1982; 33: 119-132
- [74] Shah S., Kim Y., Ostrovskaya I., Murali R., Schrader K.A., Lach F.P., Sarrel K., Rau-Murthy R., Hansen N., Zhang L., Kirchoff T., Stadler Z., Robson M., Vijai J., Offit K., Smogorzewska A.: Assessment of SLX4 mutations in hereditary breast cancers. *PLoS One*, 2013; 8: 1-5
- [75] Shukla P., Ghosh K., Vundinti R.: Current and emerging therapeutic strategies for Fanconi anemia. *HUGO J.*, 2012; 6: 1-8
- [76] Shukla P., Rao A., Ghosh K., Vundinti R.: Identification of a novel large intragenic deletion in a family with Fanconi anemia: First molecular report from India and review of literature. *Gene*, 2013; 518: 470-475
- [77] Strathdee C.A., Gavish H., Shannon W.R., Buchwald M.: Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature*, 1992; 356: 763-767
- [78] Struwing J.P., Brody L.C., Erdos M.R., Kase R.G., Giambresini T.R., Smith S.A., Collins F.S., Tucker M.A.: Detection of eight BRCA1 mutations in 10 breast/ovarian cancer families, including 1 family with male breast cancer. *Am. J. Hum. Genet.*, 1995; 57: 1-7
- [79] Su X., Huang J.: The Fanconi anemia pathway and DNA interstrand cross-link repair. *Protein Cell*, 2011; 2: 704-711
- [80] Taylor A.M., Rothblum-Oviatt C., Ellis N.A., Hickson I.D., Meyer S., Crawford T.O., Smogorzewska A., Pietrucha B., Weemaes C., Stewart G.S.: Chromosome instability syndromes. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2019; 5: 64
- [81] Tischkowitz M., Capanu M., Sabbaghian N., Li L., Liang X., Vallée M.P., Tavtigian S.V., Concannon P., Foulkes W.D., Bernstein L., WECARE Study Collaborative Group, Bernstein J.L., Begg C.B.: Rare germline mutations in PALB2 and breast cancer risk: A population-based study. *Hum. Mutat.*, 2012; 33: 674-680
- [82] Tischkowitz M.D., Hodgson S.V.: Fanconi anemia. *J. Med. Genet.*, 2003, 40, 1-10
- [83] Tischkowitz M., Xia B., Sabbaghian N., Reis-Filho J.S., Hamel N., Li G., van Beers E.H., Li L., Khalil T., Quenneville L.A., Omeroglu A., Poll A., Lepage P., Wong N., Nederlof P.M., Ashworth A. i wsp.: Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 6788-6793
- [84] Tomaszewska A., Srebnik M., Gnyś A.: Chromosome instability syndromes. *Pol. Merkur Lekarski*, 2006; 20: 577-581
- [85] Verlander P.C., Kaporis A., Liu Q., Zhang Q., Seligsohn U., Auerbach A.D.: Carrier frequency of the IVS4 + 4 A→T mutation of the Fanconi anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population. *Blood*, 1995; 86: 4034-4038
- [86] Winter J., Joenje H.: The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat. Res.*, 2009; 668: 11-19
- [87] Wu Z.H.: The concept and practice of Fanconi anemia: From the clinical bedside to the laboratory bench. *Transl. Pediatr.*, 2013; 2: 112-119
- [88] Zen P.R., de Moraes F.N., Rosa R.F., Graziado C., Paskulin G.A.: Clinical characteristics of patients with Fanconi anemia. *Rev. Paul. Pediatr.*, 2011; 29: 392-399

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.