

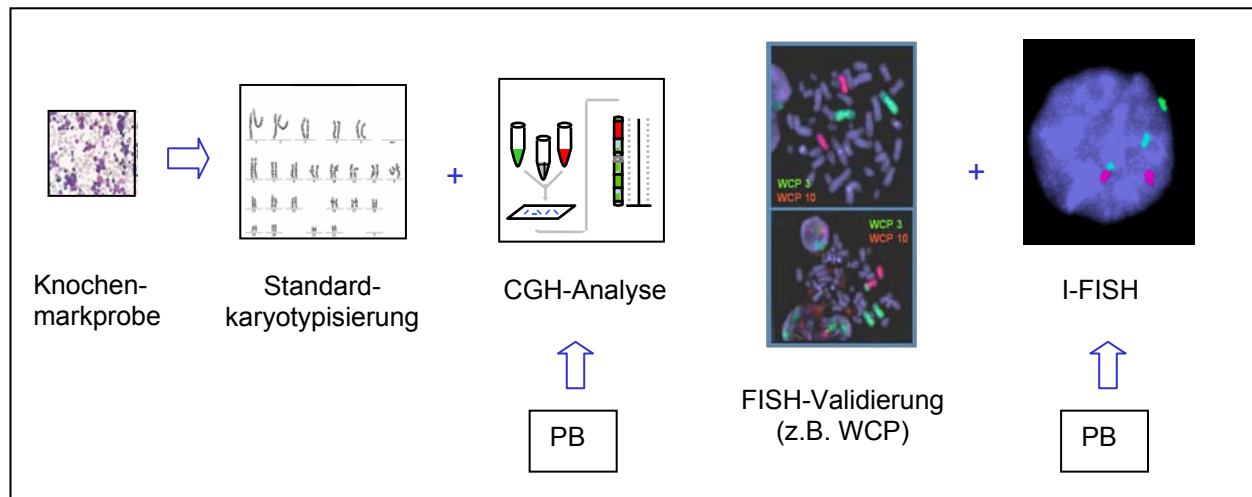
### 3 Ergebnisse

Aberrante Karyotypen sind durch veränderte Chromosomenzahlen und/oder durch Strukturumbauten (Translokationen, Deletionen, Duplikationen und Inversionen) charakterisiert. Dabei können numerische und strukturelle Veränderungen sowohl jeweils einzeln als auch gemeinsam vorkommen. Als „unauffällig“ werden alle Karyotypen ohne chromosomale Veränderungen (46, XX und 46, XY) bezeichnet. Bei der Fanconi Anämie kommt es unter anderem aufgrund der für diese Erkrankung typischen erhöhten Chromosomeninstabilität gehäuft zum Auftreten von klonalen Aberrationen und somit zum Vorliegen von Zellmosaiken, d.h. Zellen mit unterschiedlichen Karyotypen, die von einer Ausgangszelllinie abgeleitet sind, existieren nebeneinander.

Bei den 43 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fanconi Anämie Patienten war die Diagnose anhand der typischen erhöhten Chromosomenbrüchigkeit gegenüber Mitomycin C gesichert.

Zusätzlich zur konventionell-zytogenetischen Analyse, mittels derer die Aberrationen in Knochenmarkmetaphasen nur in wenigen Fällen anhand des Bandenmusters eindeutig nachgewiesen werden konnten, wurde die Comparative Genomic Hybridization (CGH) zum systematischen Nachweis chromosomaler Imbalancen bei FA-Patienten eingesetzt. Hierdurch kann sowohl die Größe als auch die Lokalisation der chromosomalen Imbalance bestimmt werden.

Um eine schnellere und sensitivere Detektion bestimmter, häufiger Chromosomenaberrationen zu gewährleisten, wurde ein Interphase-FISH-Assay (I-FISH) etabliert, der die häufig bei Fanconi Anämie Patienten gefundenen Aberrationen erfasst, welche mit einer schlechten Prognose einhergehen. Unter Verwendung der Interphase-FISH ist es möglich, spezifische chromosomale Imbalancen schnell und zuverlässig ohne aufwendige Chromosomenpräparation an unkultivierten Zellen zu erfassen.



**Abbildung 3.1:** Ablaufschritte der Bearbeitung von Knochenmarkszellen (KM) und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PB) zur Detektion von prognostisch relevanten klonalen Chromosomenaberrationen bei FA-Patienten.

Proliferierende Zellen des Knochenmarks werden sowohl zur Standardkaryotypisierung als auch für Fluoreszenz in situ Hybridisierungs (FISH) - Analysen herangezogen. Comparative Genomic Hybridization (CGH) - Analysen erfolgen unter Verwendung von DNA aus peripherem Blut und Knochenmarkproben. Die Interphase-FISH-Analysen werden an unkultivierten PB- und KM-Direktpräparationen durchgeführt und geben somit Hinweise auf das Vorliegen von chromosomalen Imbalancen auch in nicht-proliferierenden Zellen.

### 3.1 Berechnungen der Cut-Off-Level

Um eine Grenze bezüglich der falsch positiv zu den richtig positiv ausgewerteten Signalen in der I-FISH Analyse zu erhalten, wurden Kontrollauswertungen durchgeführt. Dabei wurden Knochenmarkszellen aus Kultur (KMK) und Direktpräparation (KMD) und mononukleäre Blutzellen aus Kultur (PBK) und Direktpräparation (PBD) untersucht. Die Proben stammen von non-FA Personen. Insgesamt erfolgten 78 Kontrolluntersuchungen an 45 Personen mit einem Durchschnittsalter von 217 Monaten. 44281 Interphasekerne wurden ausgewertet mit durchschnittlich 568 Kernen pro Analyse. Es wurden jeweils die falsch positiv ausgewerteten Signale entsprechend der eingesetzten Sonden zur Berechnung des Cut-Off-Levels herangezogen. Für Chromosom 3 wurden somit die Prozentwerte für die Signalkombination qqq/pp und qqqq/pp verwendet, für Chromosom 7 die der Signalkombination q/p und q/pp. Aus diesen wurde die ermittelte Standardabweichung mit 3 multipliziert und zu dem Mittelwert addiert (Ward et al., 1993; Wilkens et al., 1999, Wieser et al., 2001). Der Cut-Off wurde für das jeweilige

Untersuchungsmaterial und das jeweilig untersuchte Chromosom einzeln berechnet. Die genaue Aufteilung dieser ist aus untenstehender Tabelle zu ersehen.

Nicht durchgeführt wurden Untersuchungen mit Knochenmarkausstrichen als Kontrolle für Chromosom 3 und 7, sowie Kontrollanalysen für Kultur von peripherem Blut (PBK) und Knochenmarkkultur (KMK) bezüglich Chromosoms 7.

Über dem Cut-Off liegende Werte für das jeweilige Untersuchungsmaterial und Chromosom bei den I-FISH Analysen der Fanconi Patienten werden somit als richtig positiv gewertet.

Von den 78 durchgeführten Kontrolluntersuchungen konnten alle analysiert werden, somit liegt eine Hybridisierungseffizienz von 100% vor.

**Tabelle 3.1:** Auflistung der Analysen der Kontrollpersonen und des Cut-Off für verschiedene Chromosomen und Untersuchungsmaterialien.

Untersuchtes Material	Signale	Anzahl der Untersuchungen	Zahl der durchschnittlich ausgewerteten Zellkerne	MW der als positiv ausgewerteten Kerne	Stdabw. der als positiv ausgewerteten Kerne	3 x Stdabw. + MW = Cut-Off
#7, PBD	q/p	32	541	0,04	0,14	0,46
	q/pp	32	541	0,23	0,26	1,01
#7, KMD	q/p	8	553	0,62	0,99	3,59
	q/pp	8	553	0,48	0,67	2,49
#3, PBD	qqq/pp	24	494	0,82	0,69	2,89
	qqqq/pp	24	494	0,02	0,08	0,26
#3, KMD	qqq/pp	6	500	0,27	0,25	1,02
	qqqq/pp	6	500	0,17	0,27	0,98
#3, PBK	qqq/pp	5	910	0,7	0,26	1,48
	qqqq/pp	5	910	0	0	0
#3, KMK	qqq/pp	3	1043	0,96	0,59	2,73
	qqqq/pp	3	1043	0,13	0,22	0,79

#7: Chromosom 7; #3: Chromosom 3.

PBD: Direktpräparation peripheres Blut; PBK: Kultur peripheres Blut.

KMD: Direktpräparation Knochenmark; KMK: Kultur Knochenmark.

q: gezähltes Signal am q-Arm des Chromosoms; p: gezähltes Signal am p-Arm des Chromosoms.

MW: Mittelwert; Stdabw.: Standardabweichung.

## **3.2 Ergebnisse und Vergleich der Analysemethoden**

### **3.2.1 Konventionelle Zytogenetik**

Die konventionell-zytogenetische Untersuchung peripherer T-Lymphozyten (konstitutionelle Chromosomenkonstellation) erbrachte bei allen 43 Patienten einen unauffälligen Karyotyp. Nach Analyse von Knochenmark, bei der oft mehr als 50 Knochenmarkmetaphasen nach Synchronisation und GTG-Bänderung analysiert wurden, konnte in der konventionellen Zytogenetik bei 22 der 43 Patienten ein auffälliger Karyotyp diagnostiziert werden (Nr. 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 31, 34). Dabei wurde bei zehn dieser 22 Patienten eine Aberration von Chromosom 3 gefunden (Nr. 1, 3, 6, 10, 13, 14, 20, 24, 31, 34). Eine genauere Karyotypisierung war bei acht dieser zwölf Patienten möglich (Nr. 3, 6, 10, 13, 19, 24, 31, 34) (Tabelle 3.2).

Acht von 43 Patienten zeigten eine Monosomie 7 (Nr. 1, 2, 4, 9, 10, 13, 14, 20), vier Patienten eine Deletion 7q (Nr. 23, 25, 26, 28) und ein Patient ein Derivatchromosom 7 (Nr. 30) (Tabelle 3.3).

### **3.2.2 Comparative Genomic Hybridization**

Von 43 Patienten wurden 42 der CGH Untersuchung unterzogen. Es konnte gezeigt werden, dass 19 Patienten klonale Veränderungen im Knochenmark aufweisen. Bei 17 von diesen (89%) lag ein Zugewinn von chromosomalem Material des langen Arms von Chromosom 3 vor (Tabelle 3.2).

Sieben Patienten hatten laut CGH eine Monosomie 7 (Nr. 1, 2, 4, 9, 10, 14, 20), zwei hatten eine Deletion 7q (Nr. 25, 30) (Tabelle 3.3).

Erstmals erfolgten auch Analysen an peripherem Blut. Die Ergebnisse aus den Knochenmarkanalysen konnten dabei bestätigt werden.

### **3.2.3 Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung**

Bei 42 der 43 FA Patienten wurden I-FISH Analysen aus Knochenmark und peripherem Blut für Chromosom 3 durchgeführt, für Chromosom 7 war dies bei 27 Patienten möglich.

Bei allen Patienten, bei denen eine Aberration von Chromosom 3 oder 7 in der CGH gefunden wurde, konnte diese auch mit Hilfe der I-FISH diagnostiziert werden. Es

konnten sowohl quantitative wie auch qualitative Aussagen der klonalen Aberrationen gemacht werden. So liegt bei sechs der 17 Patienten mit Aberration von Chromosom 3 zusätzlich zu einer partiellen Trisomie 3q eine partielle Tetrasomie 3q vor, bei zweien eine alleinige partielle Tetrasomie 3q.

Die genauen Ergebnisse der einzelnen Analysen der CC, der CGH und der I-FISH aller 43 untersuchten Patienten sind in den Tabellen 1 bis 43 im Anhang zusammengefasst.

**Tabelle 3.2:** Detektion der Aberration von Chromosom 3q in den verschiedenen Analysen.

Patient	CC	CGH	I-FISH
1	-	+	+
2	-	+	Nach KMT
3	+	+	+
4	-	-	failed
5	-	-	-
6	+	+	+
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	+	Nach KMT
10	+	+	+
11	-	-	-
12	-	+	+
13	+	n.d.	n.d.
14	-	+	failed
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	+	+	+
20	-	+	+
21	-	+	+
22	-	-	-
23	-	+	+
24	+	+	Nach KMT
25	-	+	Nach KMT
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	+	+
31	+	+	+
32	-	-	-
33	-	-	-
34	+	+	+
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	-	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	n.d.

**Tabelle 3.3:** Detektion der Monosomie 7/Deletion 7q in den verschiedenen Analysen.

Patient	CC	CGH	I-FISH
1	+ (-7)	+ (-7)	+
2	+ (-7)	+ (-7)	n.d.
3	-	-	n.d.
4	+ (-7)	+ (-7)	+
5	-	-	n.d.
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	+ (-7)	+ (-7)	n.d.
10	+ (-7)	+ (-7)	+
11	-	-	-
12	-	-	-
13	+ (-7)	-	n.d.
14	+ (-7)	+ (-7)	n.d.
15	-	-	-
16	-	-	n.d.
17	-	-	-
18	-	-	n.d.
19	-	-	-
20	+ (-7)	+ (-7)	+
21	-	-	n.d.
22	-	-	n.d.
23	+ (del 7q)	-	n.d.
24	-	-	n.d.
25	+ (del 7q)	+ (del 7q)	n.d.
26	+ (del 7q)	-	-
27	-	-	-
28	+ (del 7q)	-	-
29	-	-	-
30	+ (der 7)	+ (del 7q)	+
31	-	-	-
32	-	-	n.d.
33	-	-	n.d.
34	-	-	-
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	-	-
38	-	-	-
39	-	-	n.d.
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-

+: Aberration detektiert; -: Aberration nicht detektiert; n.a.: nicht analysierbar; n.d.: nicht durchgeführt.  
nach KMT: nach Knochenmarkstransplantation. CC: Konventionelle Zytogenetik.  
CGH: Comparative Genomic Hybridization. I-FISH: Interphase-Fluoreszenz in situ Hybridisierung.

### 3.3 Analyse von Chromosom 3

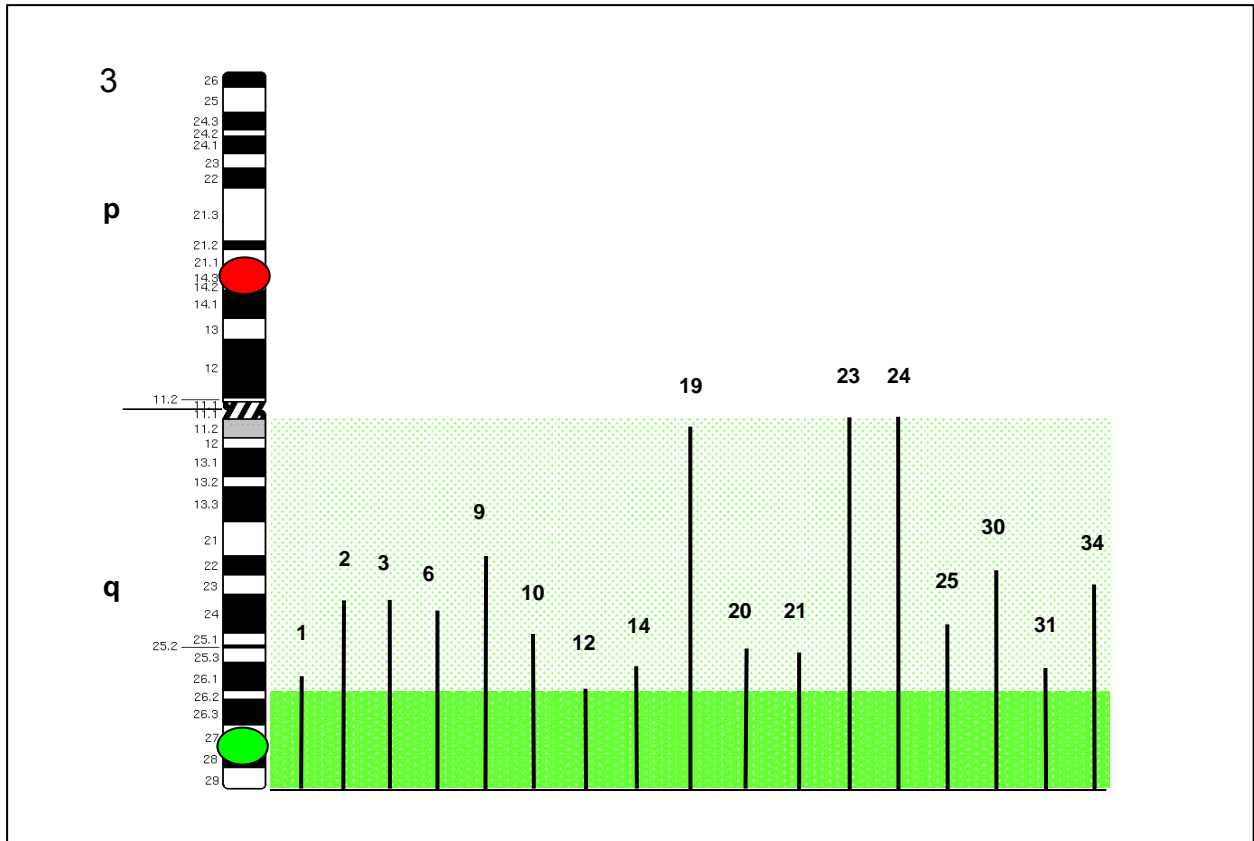
22 der 43 untersuchten Patienten mit Fanconi Anämie zeigten einen auffälligen Befund in der konventionellen Zytogenetik an Analysen des Knochenmarks. Bei zehn der Patienten konnte eine Aberration von Chromosom 3 detektiert werden.

Zur genaueren Analyse der Aberrationen wurden 42 Patienten der CGH-Analyse unterzogen. Hier zeigte sich, dass von den 22 Patienten mit auffälligem Befund in der CC 17 Patienten (77%) eine klonale Aberration von Chromosom 3 mit einer Vermehrung des Ratioprofils für den langen Arm von Chromosom 3 haben. Ihnen gemeinsam ist die Region 3q26q29 (Abb. 3.3).

Um nun diese Ergebnisse genauer zu untersuchen und quantitativ zu erfassen, sowie einen Verlauf der Aberrationen über die Zeit zu erlangen, wurde die Interphase-FISH eingesetzt. Es wurde ein Yeast Artificial Chromosome (YAC) mit der Hybridisierungsregion 3q27-q29 gewählt. Dies entspricht der allen Patienten gemeinsamen Region von Zugewinnen in 3q.

Alle Patienten mit nachgewiesener Aberration 3q in der CC und/oder CGH wurden auch mit Hilfe der I-FISH detektiert. Die Sensitivität der Interphase-FISH, das heißt, FA Personen mit einer Aberration von Chromosom 3 als solche zu detektieren, berechnet sich im Rahmen dieser Arbeit auf 100%.

In Abbildung 3.2 sind die Patienten mit den entsprechenden Zugewinnen von Chromosom 3 entsprechend den CGH Daten dargestellt.



**Abbildung 3.2:** CGH für Chromosom 3 von 17 FA Patienten.

Chromosom 3 mit den verwendeten YACs 3p14-21 (rot) und 3q27-28 (grün) und chromosomale Zuordnung und Größe der Zugewinne von Material von Chromosom 3 (vertikale Linien) in Knochenmarkszellen von 17 FA Patienten nach Detektion mittels CGH. Durch die FISH mit WCP Sonden wurden diese Ergebnisse validiert. Die kritische tri- oder tetrasome chromosomale Region 3q26q29 ist dunkelgrün schraffiert.



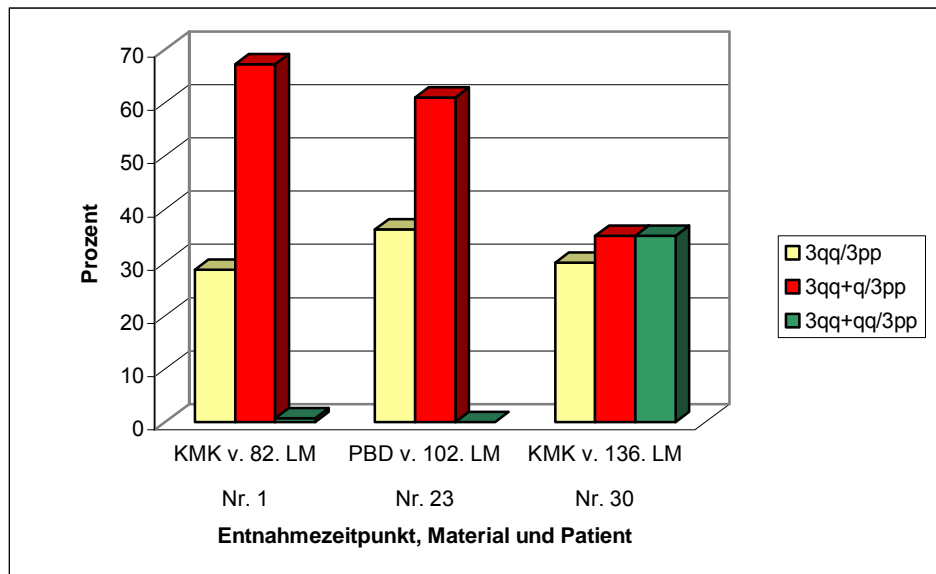
### **3.3.1 Qualitative und quantitative Analyse chromosomaler Aberrationen von 3q mit der Interphase-FISH anhand einer Untersuchung**

Von drei der Patienten (Nr. 1, 23, 30) lag nur Untersuchungsmaterial eines Zeitpunktes vor, es konnten leider keine Verlaufsanalysen erhoben werden. Eindeutig ist bei den Interphase-FISH Analysen dieser drei Patienten eine partielle Trisomie 3q (Nr. 1, 23, 30) und zusätzlich eine partielle Tetrasomie 3q bei Patient Nr. 30 analysiert worden (Diagramm 3.1).

Bei Patient Nr. 1 zeigte die konventionelle Zytogenetik (CC) des Knochenmarks einen auffälligen Befund mit zusätzlichem Material an verschiedenen Chromosomen, das nicht näher zugeordnet werden konnte. Mit Hilfe der CGH konnte vermehrt vorliegendes Material von 3q26.1qter nachgewiesen werden. Der Nachweis der partiellen Trisomie und die quantitative Analyse wurden durch die Interphase-FISH an Knochenmarkkultur (KMK) erhoben. Über 60% der ausgewerteten Interphasekerne zeigten eine partielle Trisomie 3q.

Von Patient Nr. 23 lag nur peripheres Blut zur Untersuchung vor, das Ergebnis der CC war somit unauffällig. Die CGH zeigte ein „enhancement“ für den chromosomalen Bereich 3q11q29. In der Interphase-FISH wurde das Vorhandensein der partiellen Trisomie 3q in etwa 60% der Kerne bestätigt.

Patient Nr. 30 zeigte in der CC des Knochenmarks einen auffälligen Karyotyp mit nicht näher einzuordnendem zusätzlichem chromosomalen Material. Hier wurde durch die CGH ein enhancement von 3q22qter detektiert. Durch die Interphase-FISH konnte sowohl eine partielle Tri- als auch Tetrasomie von 3q nachgewiesen und der prozentuale Anteil dieser mit jeweils 35% angegeben werden.



**Diagramm 3.1:** I-FISH Analysen der Patienten Nr. 1, 23 und 30 mit nur einer Untersuchung.

Bei allen drei ist die Detektion der Aberrationen von Chromosom 3 eindeutig.

*KMK: Knochenmarkkultur; PBD: Direktpräparation peripheres Blut; LM: Alter in Lebensmonaten.*

*3qq/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q; 3qq+qq/3pp: partielle Tetrasomie 3q.*

### 3.3.2 Qualitative und quantitative Analyse chromosomaler Aberrationen von 3q im Verlauf

Bei neun der Patienten mit Aberration von 3q konnte die Interphase-FISH im Verlauf durchgeführt und klonale Evolution beobachtet werden (Nr. 3, 6, 10, 12, 19, 20, 21, 31, 34). Daten dieser Patienten werden in den folgenden Kapiteln ausführlich geschildert.

Anhand der erhobenen Daten kann gezeigt werden, dass Aberrationen von Chromosom 3 kein transientes Ereignis darstellen. Bei acht Patienten lag in allen Untersuchungen nach Erstdetektion der Aberration von 3q diese sowohl nach CGH als auch nach I-FISH vor, welche im Verlauf nicht verschwunden ist. Die Analysen der CC zeigten zu den jeweils gleichen Untersuchungszeitpunkten ebenso einen veränderten Karyotyp.

### 3.3.3 Erstdetektion klonaler Aberrationen von 3q im peripheren Blut

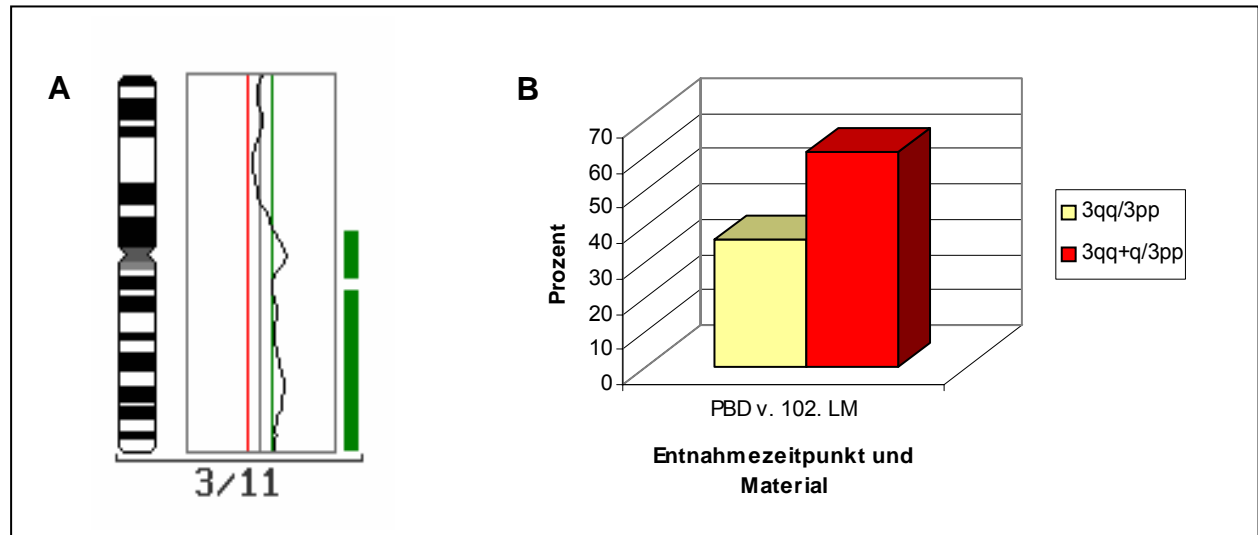
Anhand der erhobenen Daten kann gezeigt werden, dass bei fünf der Patienten frühzeitig die Entstehung aberranter Klone von Chromosom 3 mit Hilfe der I-FISH mittels Analyse von direkt präpariertem peripherem Blut detektiert werden konnte. Die

klonalen Aberrationen waren zuvor in der konventionellen Zytogenetik des Knochenmarks und der CGH diagnostiziert worden.

Bei drei der fünf Patienten wurden erstmalig aufgetretene klonale Aberrationen von Chromosom 3 durch die Interphase-FISH an Analysen aus peripherem Blut detektiert (Patienten Nr. 6, 23, 31). Bei den anderen beiden wurde das zusätzliche Auftreten einer partiellen Tetrasomie 3q bei vorbestehender partieller Trisomie 3q initial durch die Interphase-FISH an Blutuntersuchungen erfasst (Patienten Nr. 10, 12).

### 3.3.3.1 Patient Nr. 23

Bei diesem Patienten wurden im 72. Lebensmonat sowohl in der CC und der CGH als auch in der I-FISH keine klonalen Aberrationen von Chromosom 3 gefunden (Tabelle 23, Anhang). Erst im 102. Lebensmonat wurde der Patient erneut untersucht. Es lag kein Knochenmark vor, es erfolgte die Analyse von peripherem Blut. Die konventionelle Zytogenetik war wie zu erwarten unauffällig, in der CGH wurde ein „enhancement“ für 3q11q29 gefunden. Mit Hilfe der I-FISH Analyse konnte der Klon der partiellen Trisomie für 3q in 61% der untersuchten Zellen aus PBD detektiert werden (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3:** Patient Nr. 23.

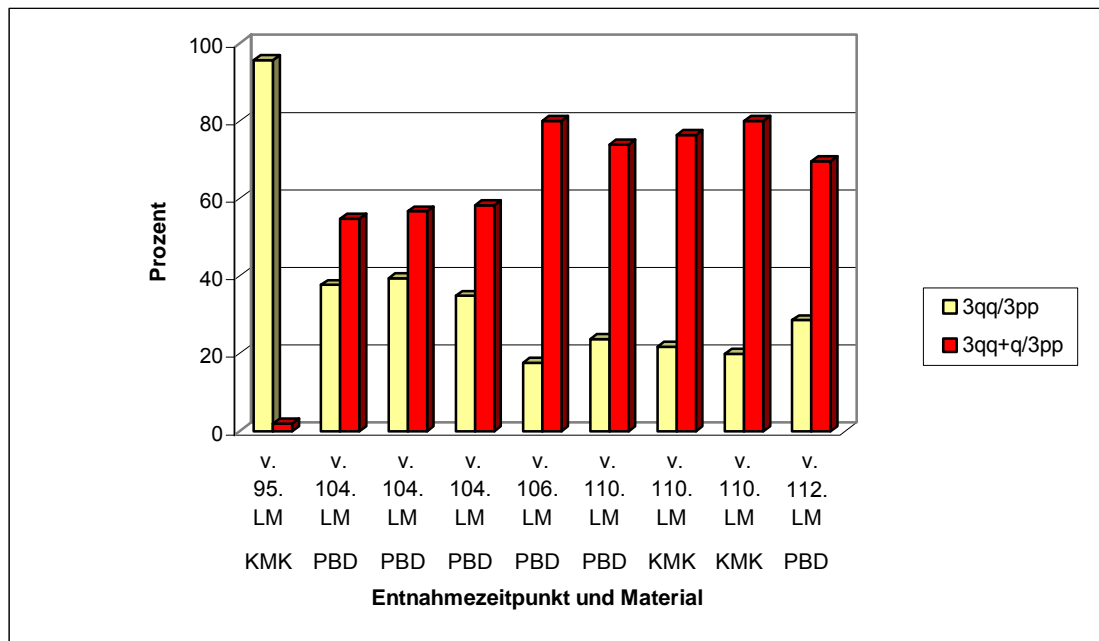
**A:** Comparative Genomic Hybridization (CGH) von Chromosom 3 vom 102. Lebensmonat. Deutlich ist eine Verschiebung des Ratioprofils zu Gunsten des langen Arms von Chromosom 3 erkennbar.

**B:** Ergebnis der I-FISH Analyse aus Direktpräparation von peripherem Blut (PBD) vom 102. Lebensmonat für Chromosom 3. Der prozentuale Anteil der partiellen Trisomie 3q beträgt 61%.

*3qq/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q.*

### 3.3.3.2 Patient Nr. 6

Die CC und die CGH vom 95. Lebensmonat zeigte wie die I-FISH an Knochenmarkkultur dieses Lebensmonats keine Aberration von Chromosom 3q. Im 104. Lebensmonat wurde bei diesem Patienten in der CC des Knochenmarks und der CGH eine Aberration von Chromosom 3 detektiert (Tabelle 6, Anhang). Die CGH zeigte ein „enhancement“ für 3q13qter. Diese Daten sind übereinstimmend mit denen der Interphase-FISH, in der die partielle Trisomie 3q initial in Direktpräparation von peripherem Blut nachgewiesen und das Verhalten des Klon im Verlauf anhand von Blutuntersuchungen beobachtet werden konnte. Eine Untersuchung des Knochenmarks erfolgte 6 Monate nach Erstdiagnose und stimmte mit den Vorergebnissen überein (Diagramm 3.2).



**Diagramm 3.2:** Erstdetektion und Verlauf des trisomen Klon im peripheren Blut von Patient Nr. 15. Der Prozentwert für die partielle Trisomie 3q im 95. Lebensmonat von KMK beträgt 2% und liegt somit unter dem berechneten Cut-Off von 2,73%.

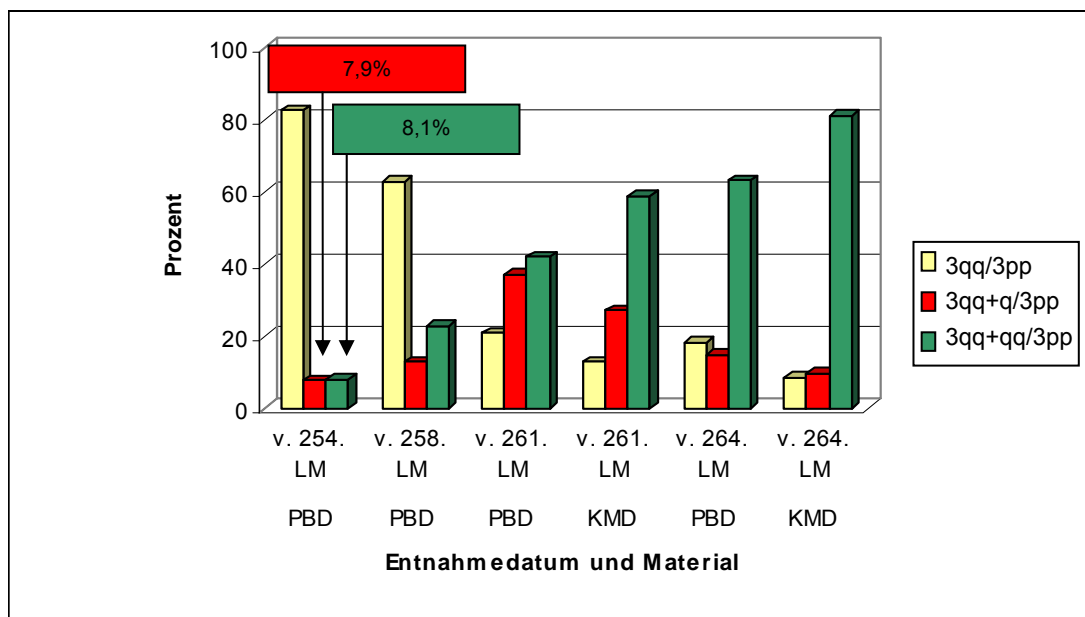
*KMK: Knochenmarkkultur; PBD: Direktpräparation peripheres Blut, LM: Lebensmonat. 3q/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3q+q/3pp: partielle Trisomie 3q.*

### 3.3.3.3 Patient Nr. 31

Bei diesem Patienten erfolgten erste Analysen im 254. Lebensmonat. In der CC aus Knochenmark und der CGH war bei allen Folgeuntersuchungen eine Aberration von Chromosom 3 detektiert worden (Anhang, Tabelle 31). In der CGH handelte es sich hierbei um ein „enhancement“ von 3q26.2qter. Das Auftreten dieser Veränderungen ist kongruent mit den Analysen der I-FISH, welche initial nur an Direktpräparationen des peripheren Bluts durchgeführt wurden.

Man erkennt, dass in den I-FISH Analysen von Blut bereits im 254. Lebensmonat klonale Aberrationen von Chromosom 3 im Sinne einer partiellen Tri- und Tetrasomie anhand signifikant erhöhter Werte (Diagramm 3.3) analysiert wurden, welche in den Folgemonaten an Quantität zunahmten.

Allein anhand der Untersuchung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut durch die Interphase-FISH konnte die partielle Tri- und Tetrasomie diagnostiziert werden.



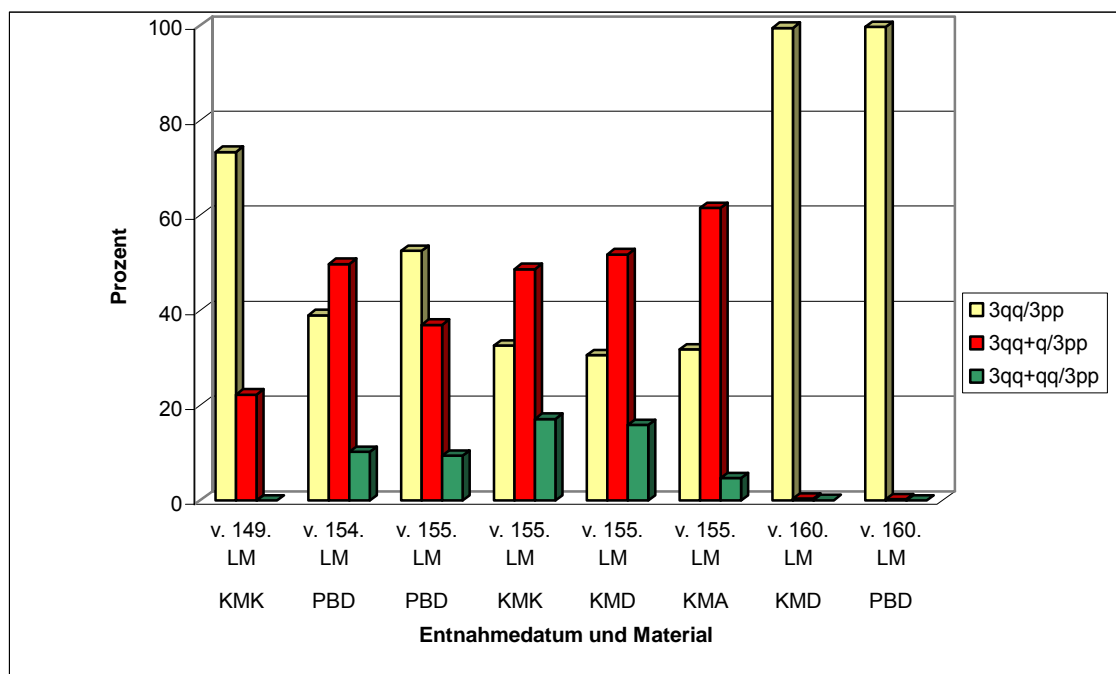
**Diagramm 3.3:** Analyse der partiellen Tri- und Tetrasomie 3q mittels I-FISH an Proben aus Blut und Knochenmark im Verlauf bei Patient Nr. 31.

Bereits vor Detektion im Knochenmark im 261. Lebensmonat waren die Klone in PBD nachweisbar. In der Analyse vom 254. Lebensmonat sind 7,9% der Zellen als partielle Trisomie, 8,1% als partielle Tetrasomie 3q detektiert worden. Diese Werte liegen deutlich über den Cut-Off Werten von PBD (3q+q) mit 2,89% und PBD (3q+qq) mit 0,26%.

*PBD: Direktpräparation peripheres Blut; KMD: Direktpräparation Knochenmark; LM: Alter in Lebensmonaten. 3q/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3q+q/3pp: partielle Trisomie 3q; 3q+qq/3pp: partielle Tetrasomie 3q.*

### 3.3.3.4 Patient Nr. 10

Bei diesem Patienten war die konventionelle Zytogenetik des Knochenmarks bereits im 137. Lebensmonat auffällig mit zusätzlichem chromosomalem Material an Chromosom 20. In der CGH zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein „enhancement“ von 3q24qter (Tabelle 10, Anhang). Interphase-FISH Analysen erfolgten erst ab dem 149. Lebensmonat. Der Klon mit der partiellen Trisomie 3q wurde in den I-FISH Analysen erstmals im Knochenmark detektiert. Anhand dieses Falles soll eine weitere Erstdetektion eines neuen Klons mit partieller Tetrasomie durch Untersuchungen an Blut gezeigt werden (Diagramm 3.4). Sie war erstmals im 154. Lebensmonat in der Direktpräparation des peripheren Blutes analysiert worden mit 10,23% (Cut-Off 0,26%).



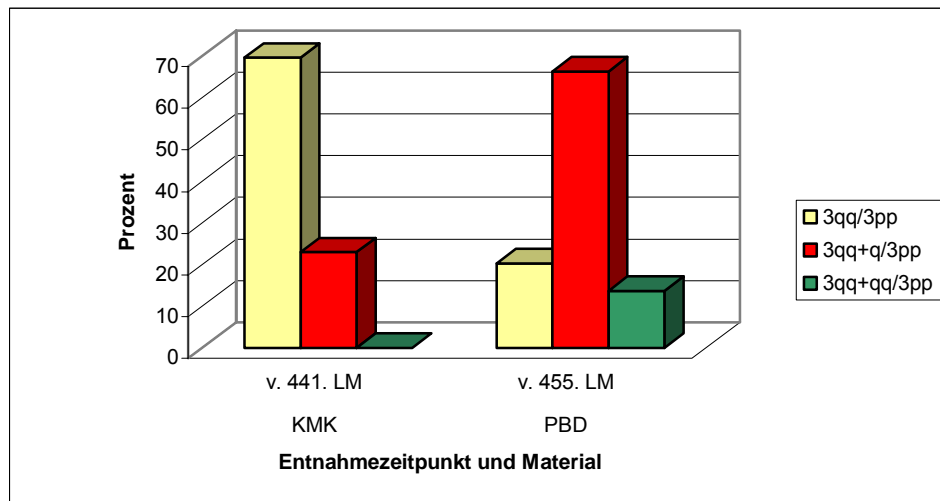
**Diagramm 3.4:** Analyse der partiellen Tri- und Tetrasomie 3q mittels I-FISH an Proben aus Knochenmark und Blut im Verlauf von Patient Nr. 10.

Die Trisomie 3q wird im 149. Lebensmonat erstmals im Knochenmark, die sich neu entwickelte Tetrasomie 3q erstmals im Blut im 154. Lebensmonat diagnostiziert. Die Untersuchungen vom 160. Lebensmonat erfolgten nach Knochenmarkstransplantation im 156. Lebensmonat.

*KMA: Knochenmarkausstrich; KMD: Direktpräparation Knochenmark; KMK: Knochenmarkkultur; PBD: Direktpräparation peripheres Blut; LM: Alter in Lebensmonaten. 3q/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3q+q/3pp: partielle Trisomie 3q; 3q+qq/3pp: partielle Tetrasomie 3q.*

### 3.3.3.5 Patient Nr. 12

Bei diesem Patienten wurde im 441. Lebensmonat in der konventionellen Zytogenetik (CC) des Knochenmarks zusätzliches Material am langen Arm von Chromosom 1 analysiert, im 455. Lebensmonat lag kein Knochenmark zur CC vor. Die CGH zeigte ein „enhancement“ für 3q26qter zu beiden Untersuchungszeitpunkten (Tabelle 12, Anhang). In der Interphase-FISH aus Knochenmarkkultur (KMK) im 441. Lebensmonat und Direktpräparation von peripherem Blut (PBD) im 455. Lebensmonat wurden die Ergebnisse der CGH bestätigt. Es zeigte sich ein trisomer Klon in den ausgewerteten Zellen des Knochenmarks mit über 20%. Im 455. Lebensmonat konnte anhand der Analyse von PBD, vor Analyse des Knochenmarks, ein neuer, tetrasomer Klon detektiert werden (Diagramm 3.5).



**Diagramm 3.5:** Analyse der partiellen Tri- und Tetrasomie 3q mittels I-FISH an Proben aus Knochenmark und Blut im Verlauf von Patient Nr. 12.

Im Knochenmark wird die partielle Trisomie im 441. Lebensmonat detektiert, die Werte für die partielle Tetrasomie sind Null. Eine neu aufgetretene partielle Tetrasomie im 455. Lebensmonat wird allein anhand der PBD Untersuchung sicher analysiert.

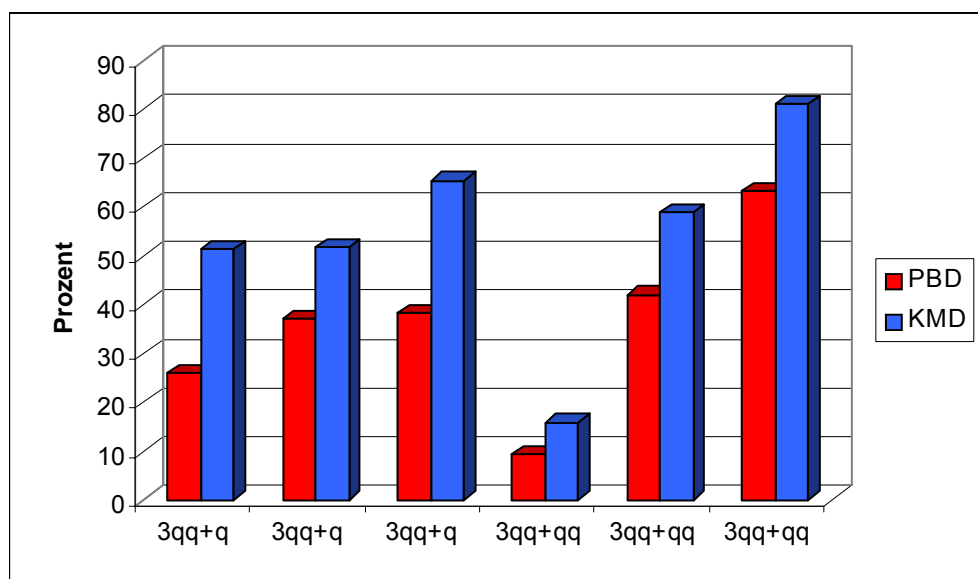
*KMK: Knochenmarkkultur; PBD: Direktpräparation peripheres Blut; LM: Alter in Lebensmonaten. 3qq/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q; 3qq+qq/3pp: partielle Tetrasomie 3q.*

### 3.3.4 Vergleich der Auswertungen von Blut und Knochenmark

Zellen mit klonalen Aberrationen wurden primär in Knochenmarkpräparationen der Interphase-FISH nachgewiesen. Erste Hinweise auf das Vorhandensein der Aberrationen in Zellen des peripheren Blutes ergaben sich zuvor aus CGH-Analysen an DNA aus peripherem Blut.

Bei den Auswertungen der I-FISH Analysen lässt sich feststellen, dass ein wesentlich höherer Anteil aberranter Zellen in den Untersuchungen des Knochenmarks im Vergleich zu den Blutuntersuchungen aus Direktpräparation gleichen Datums detektiert wurde und diese Daten bezüglich der Detektion aberranter und normaler Zellen einen hohen Zusammenhang zeigen (Diagramm 3.6).

Betrachtet man den Verlauf der I-FISH Analysen von PBD mit I-FISH Analysen des Knochenmarks des jeweils gleichen Datums eines Patienten, so geht die Entwicklung der Klone bei beiden Untersuchungsmaterialien jeweils in die gleiche Richtung, wobei ein höherer Anteil aberranter Klone in den Knochenmarkanalysen zu finden ist (Diagramm 3.7).

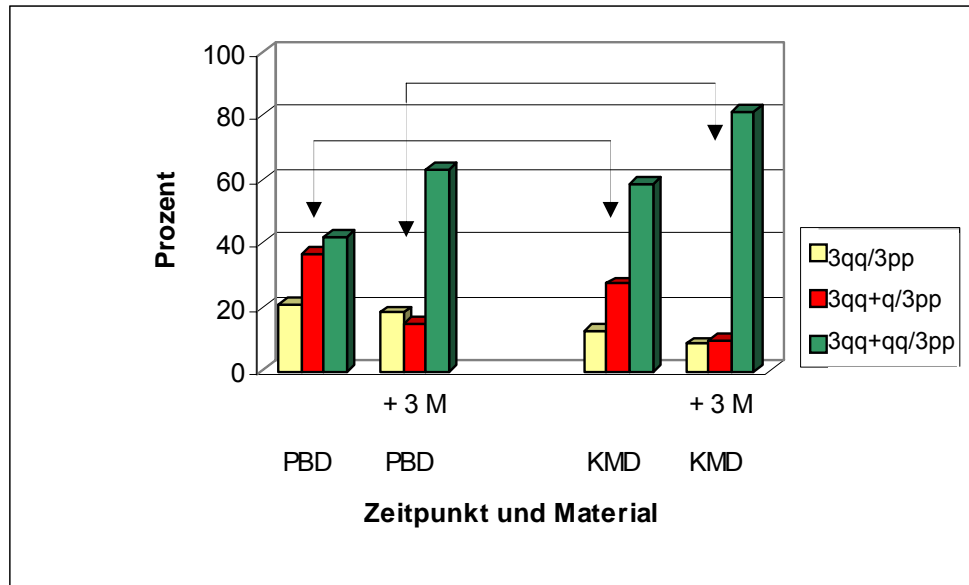


**Diagramm 3.6:** Korrelation der I-FISH Auswertungen von KMD und PBD gleichen Datums von sechs verschiedenen Patienten. Dargestellt sind sowohl Klone mit partieller Trisomie 3q als auch mit partieller Tetrasomie 3q.

*KMD: Direktpräparation Knochenmark; PBD: Direktpräparation peripheres Blut.*

*3qq+q: partielle Trisomie 3q; 3qq+qq: partielle Tetrasomie 3q.*





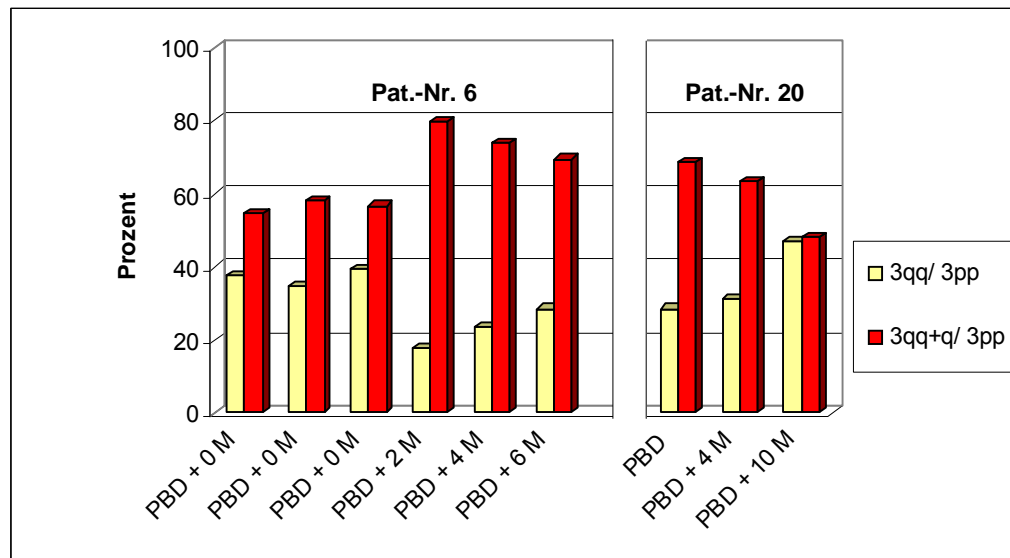
**Diagramm 3.7:** Zusammenhang der I-FISH Analysen von PBD und KMD des jeweils gleichen Untersuchungszeitpunkts von Patient Nr. 31.

*KMD: Direktpräparation Knochenmark; PBD: Direktpräparation peripheres Blut; M: Monate.*

*3qq/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q; 3qq+qq/3pp: partielle Tetrasomie 3q.*

### 3.3.5 Monitoring der klonalen Aberration 3q im peripheren Blut

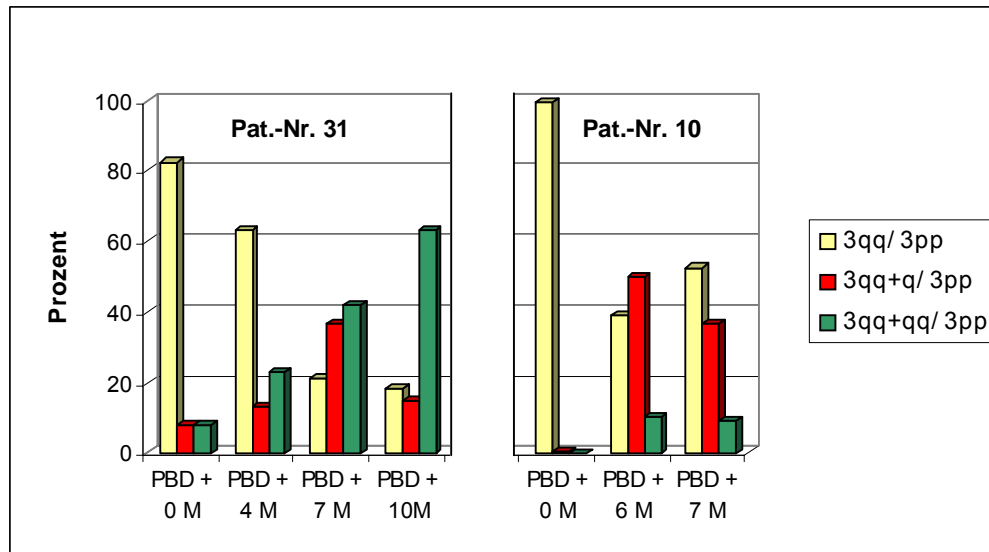
Die erhobenen Daten zeigen, wie oben dargestellt, dass ein großer Zusammenhang zwischen den I-FISH Analysen aus Blut und Knochenmark besteht und die Detektion aberranter Klone von Chromosom 3 im Blut noch vor Untersuchungen an Knochenmark möglich war. Der Verlauf der partiellen Tri- oder Tetrasomie 3q im peripheren Blut einiger Patienten ist in den Diagrammen 3.8 und 3.9 dargestellt.



**Diagramm 3.8:** Verlauf des trisomen Klons im peripheren Blut in den I-FISH Analysen bei den Patienten Nr. 6 und 20.

*PBD: Direktpräparation peripheres Blut; M: Monat.*

*3q/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3q+q/3pp: partielle Trisomie 3q*



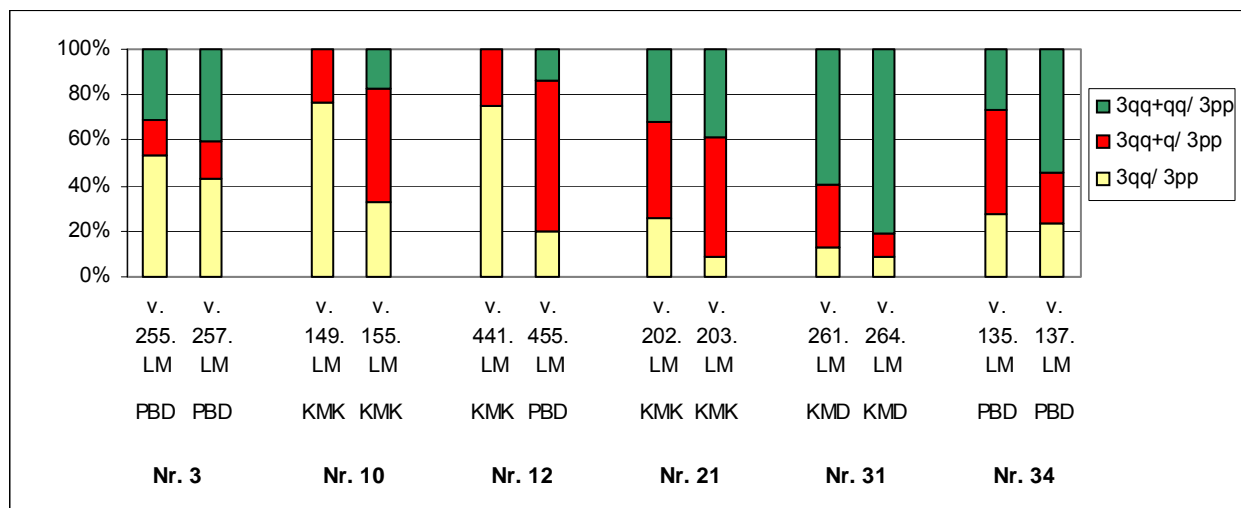
**Diagramm 3.9:** Verlauf der tri- und tetrasomen Klone im peripheren Blut in den I-FISH Analysen bei den Patienten Nr. 31 und 10.

*PBD: Direktpräparation peripheres Blut; M: Monate.*

*3qq/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q; 3qq+qq/3pp: partielle Tetrasomie 3q.*

### 3.3.6 Partielle Tetrasomie 3q

Eine partielle Tetrasomie 3q war bei acht der Patienten mit Aberration von Chromosom 3 durch die I-FISH analysiert worden (Nr. 3, 10, 12, 19, 21, 24, 31, 34). Zwei der Patienten (Nr. 19 und 24) hatten ein Isochromosom 3 und zeigten eine alleinige partielle Tetrasomie 3q. Bei Patient Nr. 24 erfolgten I-FISH Analysen erst nach KMT, bei Patient Nr. 19 wurden I-FISH Analysen durchgeführt, als der Klon durch CGH und I-FISH noch nicht nachgewiesen werden konnte. Sechs der Patienten (Nr. 3, 10, 12, 21, 31, 34) mit partieller Trisomie 3q entwickelten die partielle Tetrasomie 3q zusätzlich zur partiellen Trisomie 3q und zeigten in den I-FISH Analysen eine starke Zunahme dieses Klons im Verlauf (Diagramm 3.10), teils mit Verringerung des trisomen Klons bei zwei der Patienten (Nr. 31 und 34). Dabei nahm bei allen Patienten der Anteil aller aberranten Zellen im Verlauf zu. Drei der Patienten erhielten nach Auftreten des zusätzlichen tetrasomen Klons eine Knochenmarktransplantation (Nr. 10, 21, 34), ebenso beide Patienten mit dem Isochromosom 3. Mittlerweile sind leider von diesen acht Patienten sieben verstorben (alle mit partieller Tri- und Tetrasomie sowie einer mit Isochromosom 3).



**Diagramm 3.10:** Auftreten und Verlauf der partiellen Tetrasomie 3q bei bestehender Trisomie 3q in I-FISH Analysen von den Patienten Nr. 3, 10, 12, 21, 31 und 34.

*KMD: Direktpräparation Knochenmark; KMK: Knochenmarkkultur; PBD: Direktpräparation peripheres Blut; LM: Alter in Lebensmonaten.*

*3qq/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q; 3qq+qq/3pp: partielle Tetrasomie 3q.*

### 3.3.7 Patienten ohne klonale Aberration von Chromosom 3

Von 43 untersuchten Patienten zeigten 26 keine klonale Aberration von Chromosom 3 in der CC und CGH. Sie wurden ebenso der I-FISH Analyse unterzogen. Es wurden insgesamt 60 Analysen von diesen 26 Patienten durchgeführt, wovon 11 Analysen nicht auswertbar waren. Bei 19 der 49 auswertbaren Analysen lagen die Werte für eine partielle Trisomie 3q über dem berechneten Cut-Off. Diese 19 Analysen wurden von Proben aus Direktpräparation von peripherem Blut (PBD), Kultur von peripherem Blut (PBK) und Direktpräparation von Knochenmark (KMD) von 10 verschiedenen Patienten erhoben (Tabelle 3.47). Einer der 10 Patienten (Nr. 26) zeigte eine Aberration eines anderen Chromosoms in der CGH ( $\text{dim}(22)(q12qter)$ ), bei den übrigen 9 Patienten konnten keine klonalen Aberrationen gefunden werden. Insgesamt sind von den 10 Patienten, deren Werte für eine partielle Trisomie 3q über dem berechneten Cut-Off lagen, 5 verstorben (Nr. 5, 8, 16, 22, 29).

Bei den Patienten Nr. 5, 17, 26 und 29 fanden jeweils mehrere Analysen des gleichen Entnahmezeitpunktes statt, teilweise mit Proben des gleichen Materials.

Die Spezifität, das heißt, nicht von der Aberration betroffene Personen als nicht Betroffene mit Hilfe der I-FISH zu detektieren, liegt anhand der vorliegenden Daten bei 60%.

**Tabelle 3.4:** Patienten ohne klonale Abberation 3q in der CC und CGH, die bei der I-FISH Analyse über den Cut-Off-Levels liegen.

Pat.-Nr.	Material und Entnahmezeitpunkt	Prozentwerte für 3qq+q
5	KMD v. 105. LM	10,0 (Cut-Off 1,02)
	KMD v. 105. LM	5,6 (Cut-Off 1,02)
	KMD v. 105. LM	5,8 (Cut-Off 1,02)
	KMD v. 111. LM	1,8 (Cut-Off 1,02)
7	KMD v. 89. LM	3,3 (Cut-Off 1,02)
	PBD v. 90. LM	7,0 (Cut-Off 2,89)
8	PBD v. 99. LM	7,4 (Cut-Off 2,89)
16	KMD v. 144. LM	6,2 (Cut-Off 1,02)
17	PBD v. 88. LM	6,5 (Cut-Off 2,89)
	PBD v. 88. LM	3,7 (Cut-Off 2,89)
18	KMD v. 159. LM	2,6 (Cut-Off 1,02)
22	KMD v. 163. LM	1,8 (Cut-Off 1,02)
26	KMD v. 175. LM	4,0 (Cut-Off 1,02)
	PBD v. 175. LM	7,0 (Cut-Off 1,02)
	KMD v. 175. LM	6,2 (Cut-Off 1,02)
	KMD v. 178. LM	3,5 (Cut-Off 1,02)
29	PBD v. 116. LM	8,5 (Cut-Off 2,89)
	KMD v. 116. LM	6,7 (Cut-Off 1,02)
33	PBK v. 89. LM	5,9 (Cut-Off 1,48)

*KMD: Direktpräparation Knochenmark; LM: Alter in Lebensmonaten; Pat.-Nr.: Patientennummer; PBD: Direktpräparation peripheres Blut; PBK: Kultur peripheres Blut; 3qq+q: partielle Trisomie 3q.*

### 3.4 Analyse von Chromosom 7

Bei elf der 43 Patienten lagen chromosomale Veränderungen von Chromosom 7 in der konventionellen Zytogenetik (CC) oder der Comparative Genomic Hybridization (CGH) vor (Nr. 1, 2, 4, 9, 10, 13, 14, 20, 23, 25, 30). Dabei handelte es sich bei acht der Patienten um eine Monosomie laut der konventionellen Zytogenetik (Nr. 1, 2, 4, 9, 10, 13, 14, 20). Bei sechs dieser Patienten bestätigte die CGH des jeweils gleichen Datums diese Ergebnisse (Nr. 1, 2, 4, 9, 10, 14, 20), bei einem der Patienten wurde keine CGH durchgeführt (Nr. 13). 7 der 17 Patienten mit klonaler Aberration von 3q hatten zusätzlich eine klonale Aberration von Chromosom 7 (Nr. 1, 9, 10, 14, 20, 25, 30) laut den Ergebnissen der CGH Analyse, ein Patient (Nr. 4) hatte eine Monosomie 7 ohne eine zusätzliche Aberration von 3q.

Zwei der elf Patienten hatten in der CC des Knochenmarks eine Deletion von 7q (Nr. 23 und 25), welche anhand der CGH bei Patient Nr. 25 bestätigt wurde, bei Patient Nr. 23 wurde dies in der CGH nicht bestätigt.

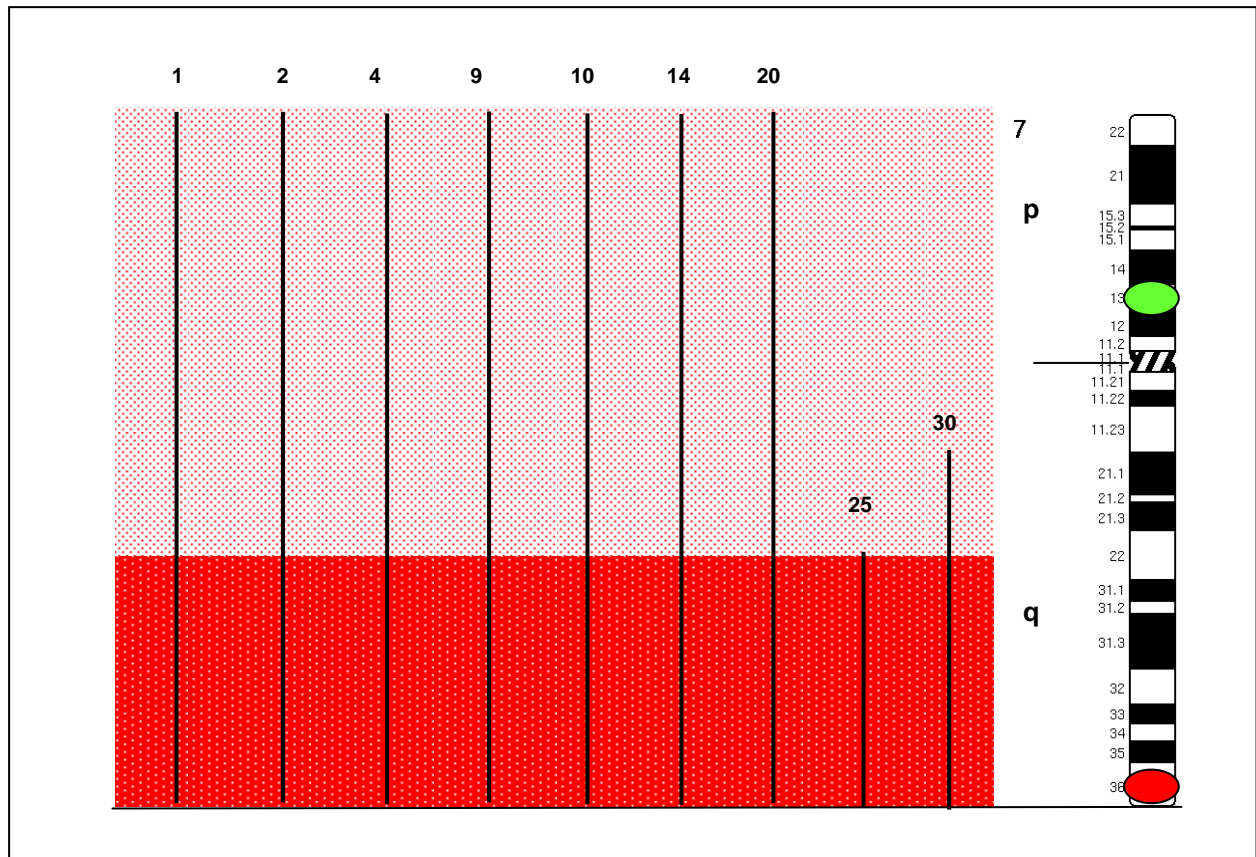
Patient Nr. 30 zeigte in der CC keine Aberration von Chromosom 7, diese wurde in der CGH mit einer Verringerung des Ratioprofils für 7q21qter detektiert. Nach Knochenmarktransplantation war der Karyotyp unauffällig.

Um nun eine quantitative Aussage bezüglich dieser Aberrationen erheben zu können und einen Verlauf der Klone über die Zeit zu haben, wurde auch hier die Interphase-FISH eingesetzt.

Von 27 untersuchten FA Patienten zeigten vier in den Interphase-FISH Analysen für Chromosom 7 eine Monosomie 7 (Pat. Nr. 1, 4, 10, 20), einer eine Deletion 7q (Pat. Nr. 30). Diese Ergebnisse decken sich mit denen der CC und CGH vom jeweils gleichen Entnahmezeitpunkt. Mit den verwendeten Yeast Artificial Chromosomes (YACs) für Chromosom 7 für die Regionen 7q36 (942g09, rot) und 7p13 (956e01, grün) konnten bei den Patienten also sowohl die Monosomie als auch der Verlust von chromosomalem Material distal 7q nachgewiesen werden.

Die Sensitivität der I-FISH Analyse zur Detektion einer Aberration von Chromosom 7 beträgt im Rahmen dieser Analysen 100%.

Wie auch bei der klonalen Aberration von Chromosom 3 handelt es sich bei dem Auftreten von Aberrationen von Chromosom 7 nicht um ein transientes Ereignis. Bei allen Patienten konnten die Veränderungen nach Erstdetektion auch im Verlauf nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.4:** Chromosom 7 mit den verwendeten YACs 7p13 (956e01, grün) und 7q36 (942g09, rot) und chromosomale Zuordnung der Größe und Verluste von Material von Chromosom 7 (vertikale Linien) in Knochenmarkszellen von 9 FA Patienten nach Detektion mittels CGH. Die alle fehlende Region 7q22qter ist dunkelrot schraffiert.

### 3.4.1 Qualitative und quantitative Analyse chromosomaler Aberrationen von Chromosom 7

Es war nur bei Patient Nr. 20 möglich, mehrere Untersuchungen von Chromosom 7 über einen größeren Zeitraum durchzuführen und einerseits die Entwicklung der Monosomie 7 im Verlauf sowie den Zusammenhang dieser mit der partiellen Trisomie 3q zu analysieren. In Kapitel 3.6.2.2 wird hierauf ausführlich eingegangen.

Bei allen anderen Patienten (Nr. 1, 4, 10, 30) war jeweils nur eine Untersuchung möglich.

Eine Monosomie 7 war bei Patient Nr. 1 von Beginn der Untersuchungen sowohl in der CC des Knochenmarks als auch in der CGH zu finden. Über 70% der ausgewerteten Kerne der Interphase-FISH für Chromosom 7 zeigten entsprechend einer Monosomie 7 jeweils nur ein fluoreszierendes Signal pro Chromosomenarm (Anhang, Tabelle 1).



Bei Patient Nr. 4 wurde im 93. Lebensmonat in der konventionellen Zytogenetik in 2 von 28 ausgewerteten Zellen eine Monosomie 7 analysiert, eine CGH wurde erst im 108. Lebensmonat durchgeführt, welche die Monosomie 7 bestätigte (Anhang, Tabelle 4). Die einzige bei diesem Patienten durchgeführte Interphase-FISH Analyse von Knochenmark zeigte im 108. Lebensmonat einen Klon für eine Monosomie 7 zu 26,5%. Patient Nr. 10 zeigte im 155. Lebensmonat in der CGH eine Monosomie 7, welche auch in der konventionellen Zytogenetik detektiert werden konnte. I-FISH Analysen zum gleichen Zeitpunkt erfolgten leider nicht (Anhang, Tabelle 10).

Die Deletion 7q21qter von Patient 30 wurde im 136. Lebensmonat in der CGH detektiert. Ein auffälliger Karyotyp fand sich seit dem 134. Lebensmonat in der CC des Knochenmarks, zu diesem Zeitpunkt wurde keine CGH durchgeführt. In der Interphase-FISH vom 136. Lebensmonat war die Deletion mit 23,5% ausgewertet worden (Anhang, Tabelle 30).

### **3.4.2 Patienten ohne klonale Aberrationen von Chromosom 7**

Bei 27 Patienten ohne klonale Aberrationen von Chromosom 7 in der CC und CGH wurden insgesamt 50 I-FISH Analysen durchgeführt. Davon war eine nicht auswertbar. Von den 27 untersuchten Patienten ohne Aberration von Chromosom 7 lagen bei einem Patienten (Patient Nr. 37) die Prozentwerte für eine Monosomie 7 bei der Untersuchung von PBD mit 0,96% knapp über dem berechneten Cut-Off von 0,46%.

### **3.5 Kombinierte Aberrationen von Chromosom 3 und 7**

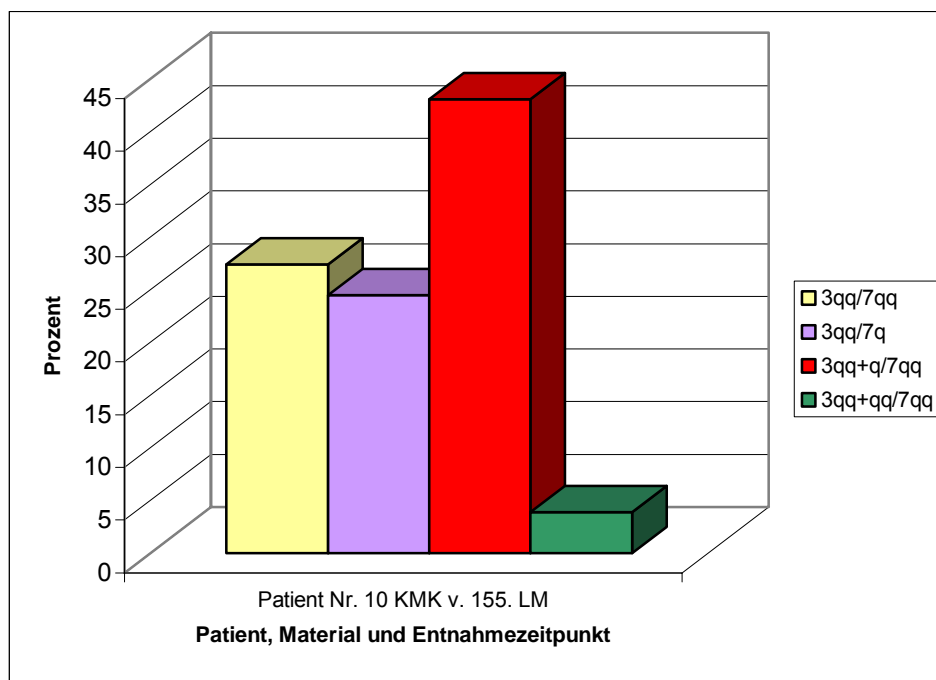
Von den 17 Patienten mit klonaler Aberration von 3q hatten 7 zusätzlich eine klonale Aberration von Chromosom 7 (Nr. 1, 9, 10, 14, 20, 25, 30) laut den Ergebnissen der CGH Analyse. Ein Patient (Nr. 4) hatte eine Monosomie 7 ohne eine zusätzliche Aberration von 3q. Bei fünf der Patienten (Nr. 1, 4, 9, 20, 30) wurden I-FISH Analysen durchgeführt. Vier dieser Patienten hatten zum Zeitpunkt der I-FISH Untersuchung laut CGH Analyse eine Aberration von Chromosom 7 und wurden entsprechend mit der I-FISH detektiert.

Hierbei handelte es sich bei sechs der Patienten um eine Monosomie 7 (Nr. 1, 4, 9, 10, 14, 20), bei einem um eine Deletion 7q31qter (Nr. 25), sowie bei einem Patienten um eine Deletion 7q21qter (Nr. 30). Bei fünf der Patienten (Nr. 1, 9, 14, 25, 30) mit klonaler

Aberration von Chromosom 3 und 7 wurden die Aberrationen zeitgleich detektiert. Bei zweien (Nr. 10 und 20) wurde die Monosomie 7 erst nach dem Auftreten der Aberration von 3q gefunden. Bei keinem dieser Patienten war eine Aberration von Chromosom 7 vor einer Aberration von Chromosom 3 detektiert worden.

Ein Patient (Nr. 10) hatte bei einer Monosomie 7 zusätzlich zur partiellen Trisomie 3q eine partielle Tetrasomie 3q (Diagramm 3.11). Eine Monosomie 7 war in den Interphasekernen in den durchgeführten Analysen nie zusammen mit einer Aberration von 3q innerhalb eines Kerns zu finden.

Nur bei Patient Nr. 20 wurden I-FISH Analysen von Chromosom 7 im Verlauf und von Chromosom 3 und 7 gleichzeitig innerhalb einer Untersuchung durchgeführt. Dies wird in Kapitel 3.6.2 beschrieben.



**Diagramm 3.11:** I-FISH von Chromosom 3 und 7 von Patient Nr. 10 an KMK. Hybridisiert wurde bei beiden Chromosomen am q-Arm (Chromosom 3: YAC 909d10 auf q27-28, grün; Chromosom 7: YAC 942g09 auf q36, rot).

*KMK: Knochenmarkkultur; LM: Alter in Lebensmonaten.*

*3qq/7qq: Interphasekern ohne Aberration von Chromosom 3 oder 7;*

*3qq/7q: Interphasekern mit Monosomie 7, Disomie 3q;*

*3qq+q/7qq: Interphasekern mit partieller Trisomie 3q und Disomie 7q;*

*3qq+qq/7qq: Interphasekern mit partieller Tetrasomie 3q und Disomie 7q.*

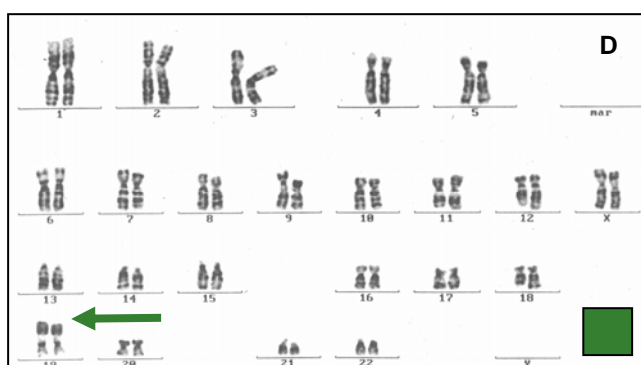
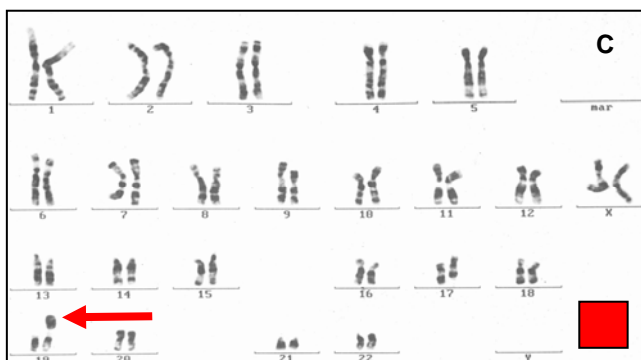
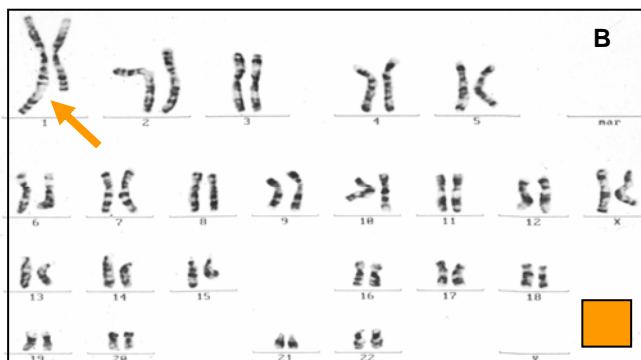
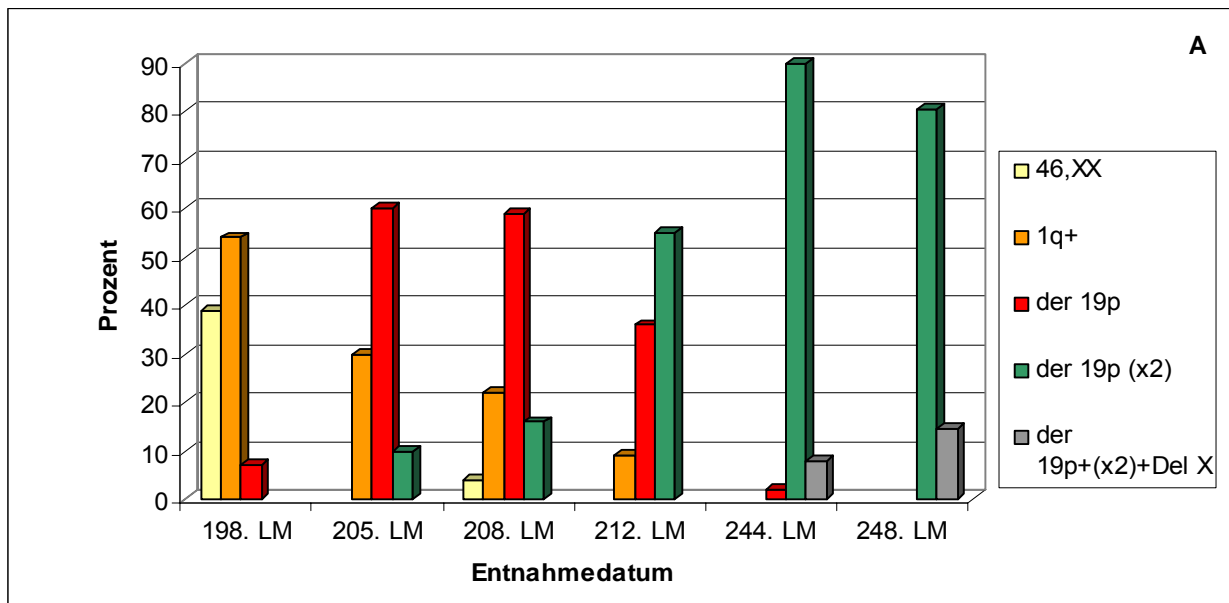
### **3.6 Beispielhafte Verlaufsbeobachtung aberranter Klone bei den Patienten Nummer 3 und 20**

#### **3.6.1 Patient Nummer 3 - Entwicklung einer partiellen Trisomie 3q und Detektion einer partiellen Tetrasomie 3q**

Anhand dieses Patienten soll die Entwicklung eines tri- und tetrasomen Klons im Verlauf dargestellt werden.

Die erste Untersuchung von Patient Nr. 3 erfolgte im 198. Lebensmonat. In der konventionellen Zytogenetik zeigten von 56 analysierten Metaphasen aus dem Knochenmark 30 Metaphasen ein Derivatvchromosom 1, 20 der Metaphasen hatten einen normalen Karyotyp. Außerdem konnte in einigen wenigen Zellen das Auftreten eines Derivatvchromosoms 19 detektiert werden. Dieser Klon ist nach 7 Monaten stark angestiegen. Zusätzlich entwickelte sich ein Klon mit zwei Derivatvchromosomen 19. Hierbei handelte es sich um eine uniparentale Isodisomie 19. Die Zellen mit dem Derivatvchromosom 1 zeigten nicht die Aberration von Chromosom 19, es lag somit eine Polyklonalität vor (Abbildung 3.5).

Im 244. Lebensmonat war der Klon mit dem Derivatvchromosom 1 nicht mehr vorhanden, somit zeigt der Klon mit dem Derivatvchromosom 1 ein transientes Auftreten. Ein neuer Klon trat auf mit einer Deletion des X-Chromosoms inklusive zwei Derivatvchromosomen 19.



**Abbildung 3.5:**

Klonale Abberationen und Entwicklung des Karyotyps in der konventionellen Zytogenetik in Knochenmarkszellen des Patienten Nr. 3 im Verlauf.

**A:** Klonale Evolution und prozentuale Verteilung der Klone aus den Daten der konventionellen Zytogenetik.

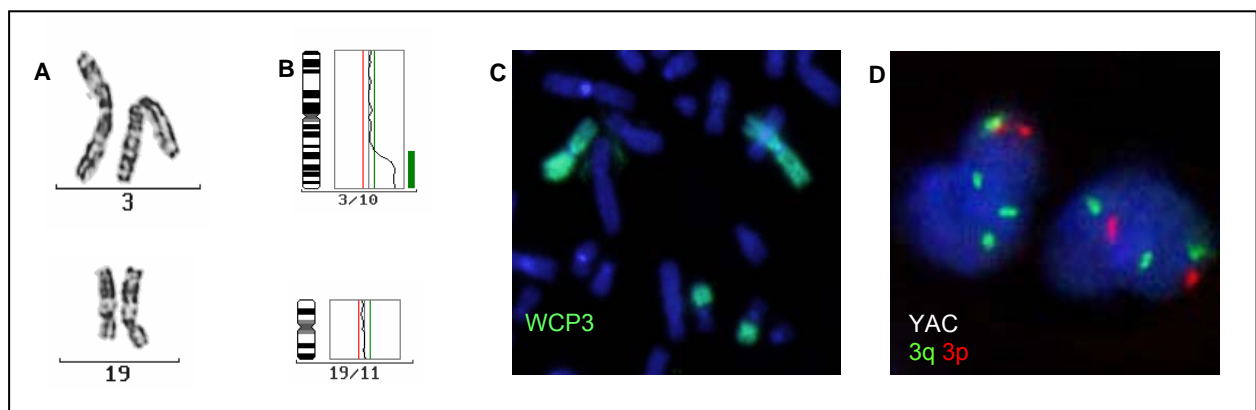
**B:** Karyogramm aus Knochenmarkszellen mit dem Derivatvchromosom 1.

**C:** Nach sieben Monaten (205. LM) ist der zweite Klon mit einem Derivatvchromosom 19 (mit zusätzlichem Material von 3q) im Knochenmark von 7% im 198. Lebensmonat auf knapp 60% angestiegen. Die Zellen mit dem Derivatvchromosom 1 zeigten nicht die Aberration von Chromosom 19.

**D:** Der Klon, der zwei Derivatvchromosomen 19 zeigte, machte im 205. Lebensmonat 10% der Zellen des Knochenmarks aus, im 244. Lebensmonat betrug der Anteil dieser knapp 90%.

*LM: Alter in Lebensmonaten.*

Beim Derivatvchromosom 1 handelt es sich um eine Duplikation von (1)(q23q43). Die durchgeführten CGH Untersuchungen konnten das Zusatzmaterial auf Chromosom 19 eindeutig dem langen Arm von Chromosom 3 zuordnen. Somit lag nicht nur eine partielle Trisomie 3q in den Zellen mit einem Derivatvchromosom 19 vor, sondern zusätzlich in einem Anteil der Zellen mit zwei Derivatvchromosomen 19 eine partielle Tetrasomie 3q. Eine I-FISH Analyse mit „whole chromosome paint“ (WCP) - Sonden bestätigte dieses Ergebnis und zeigte zusätzliches Material von Chromosom 3 an Chromosom 19 (Abbildung 3.6). Die partielle Tri- und Tetrasomie 3q zeigte sich auch in den I-FISH Analysen.



**Abbildung 3.6:** Patient Nr. 3.

**A:** Chromosom 3 und 19 in der CC. Man erkennt zusätzliches Material am kurzen Arm von Chromosom 19.

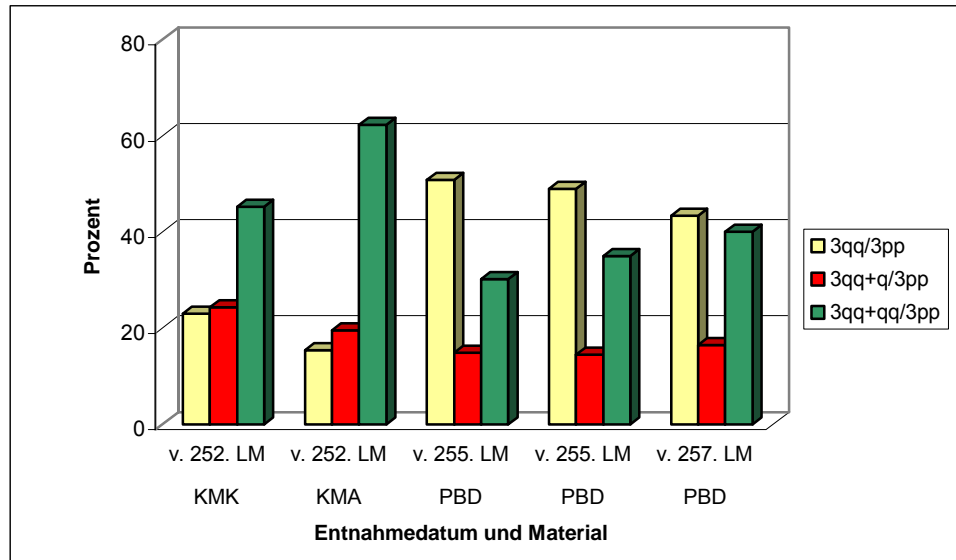
**B:** Ergebnisse der CGH von Chromosom 3 und 19. Deutlich erkennbar die Verschiebung des Ratioprofils bei Chromosom 3 im Sinne eines „enhancement“. Chromosom 19 stellt sich in der CGH unauffällig dar.

**C:** I-FISH Analyse mit WCP Sonde (grün) für Chromosom 3. Zusätzliches Material von Chromosom 3 an zwei weiteren Chromosomen (Chromosom 19).

**D:** Interphase-FISH mit YACs für Chromosom 3. Interphasekerne mit partieller Tetrasomie 3q kommen gemeinsam mit Interphasekernen mit partieller Trisomie 3q vor. Man erkennt im linken Kern vier grüne Signale und zwei rote (3qq+qq/3pp), im rechten Kern drei grüne und zwei rote (3qq+q/3pp). Grünes Signal = Spectrum Green, YAC 909d10 für 3q27-28; rotes Signal = Spectrum Orange, YAC 808b10 für 3p14-21.

Erste Interphase-FISH Analysen erfolgten im 252. Lebensmonat. Es ist deutlich bereits in diesem Lebensmonat das Überwiegen der partiellen Tetrasomie 3q in den KM Analysen, insbesondere in Analysen von Knochenmarkausstrichen, zu erkennen. Im peripheren Blut ist der Großteil der ausgewerteten Zellen noch unauffällig, im Verlauf

von 2 Monaten geht dieser immer mehr zu Gunsten der partiellen Tetrasomie 3q verloren, die Werte für die partielle Trisomie 3q bleiben annähernd gleich (Diagramm 3.12). Im 260. Lebensmonat verstarb der Patient an myelodysplastischem Syndrom.



**Diagramm 3.12:** I-FISH Analysen verschiedener Materialien von Patient Nr. 3 im Verlauf.

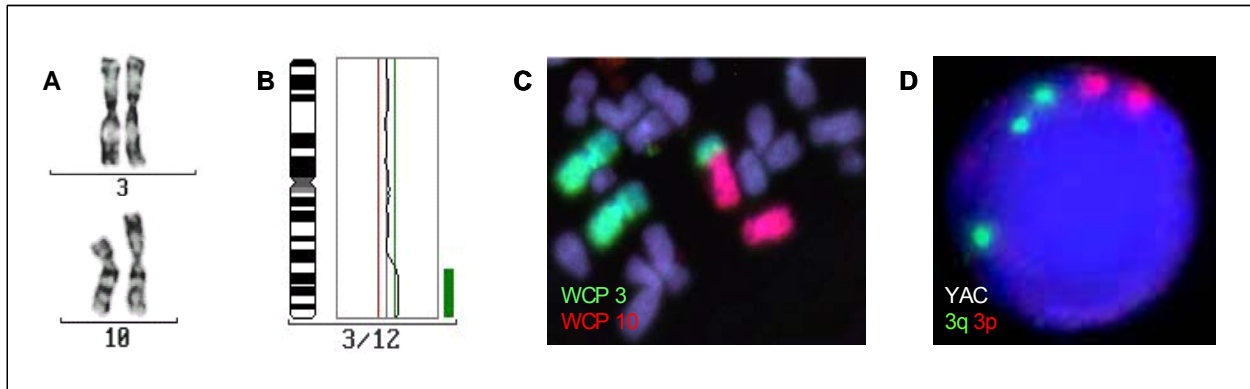
*KMA: Knochenmarkausstrich; KMK: Knochenmarkkultur; PBD: Direktpräparation peripheres Blut. 3q/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3q+q/3pp: partielle Trisomie 3q; 3q+qq/3pp: partielle Tetrasomie 3q.*

## 3.6.2 Patient Nummer 20 - Klonale Evolution der chromosomalen Aberration von 3q und Nachweis einer Monosomie 7

### 3.6.2.1 Partielle Trisomie 3q

Der männliche Patient mit der Nummer 20 soll hier exemplarisch geschildert werden. Im Alter von 123 Monaten wurden erstmals zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen bei gesicherter Fanconi Anämie an Knochenmarkzellen in unserem Labor durchgeführt. Zusätzliches Material am kurzen Arm des Chromosoms 10 wurde in 26 von 44 Zellen durch die konventionelle Zytogenetik nach Synchronisation des Knochenmarks für 24h, Chromosomenpräparation und GTG-Bänderung detektiert. Mittels CGH konnte das zusätzliche Material der Chromosomenregion 3q25qter zugeordnet werden. Außerdem konnte ein vermindertes Ratioprofil am distalen Ende des kurzen Arms von Chromosom 10 festgestellt werden, was auf den Verlust von

10pter, rückführend auf eine unbalancierte Translokation, hindeutet. Mit Hilfe eines „Whole Chromosome Paint“ (WCP) konnte dieser Befund bestätigt werden (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7:** Patient Nr. 20.

**A:** Abbildung der Chromosomen 3 und 10 aus der CC. Deutlich erkennt man zusätzliches Material an Chromosom 10.

**B:** Ergebnis der CGH von Chromosom 3 mit Verschiebung des Ratioprofils zugunsten 3(q25qter).

**C:** Chromosom 3 und 10 mit entsprechenden WCP Sonden (WCP 3 und WCP 10) hybridisiert.

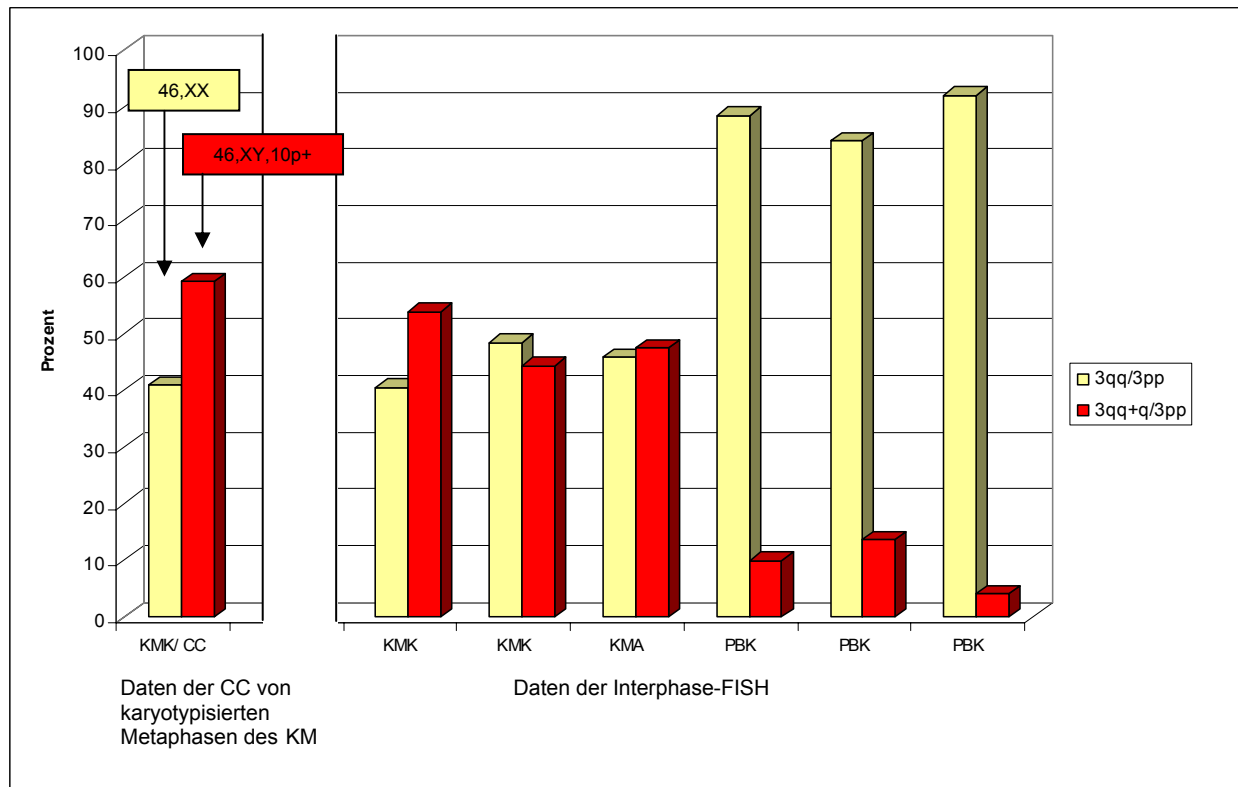
**D:** I-FISH von Chromosom 3. Wie auch bei der WCP-Analyse liegt hier Material vom langen Arm von Chromosom 3 insgesamt dreimal vor. Drei Signale grün entsprechen einer partiellen Trisomie 3q. Hybridisiert wurde mit YACs für 3q27-28 (909d10) in grün und 3p14-21 (808b10) in rot.

Es erfolgten mehrere I-FISH Analysen mit verschiedenen Probenmaterialien wie Knochenmarkausstrich, Knochenmark- und Blutkulturen sowie Direktpräparationen aus Knochenmark und Blut in einem Zeitraum von 23 Monaten. Der beschriebene Klon war in allen I-FISH Analysen im Sinne einer partiellen Trisomie 3q zu finden. Dies war übereinstimmend mit den Ergebnissen der konventionellen Zytogenetik und der CGH. Es zeigten sich im untersuchten Zeitraum keine weiteren Veränderungen des bestehenden Karyotyps bis zum 143. Lebensmonat. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei diesem Patienten zusätzlich eine Monosomie 7 in Zellen des Knochenmarks nachgewiesen werden.

Im Folgenden soll die Entwicklung der partiellen Trisomie anhand der I-FISH Analyse dargestellt werden und die Ergebnisse an verschiedenen untersuchten Materialien miteinander verglichen werden.

Die erste Untersuchung bei Patient Nummer 20 erfolgte im 123. Lebensmonat mit Proben aus Blut- und Knochenmarkkulturen sowie Knochenmarkausstrich. Es zeigt

sich, dass eine signifikant höhere Zahl an aberranten Zellen mit partieller Trisomie von 3q in allen untersuchten Knochenmarkproben im Gegensatz zu den Blutproben aus PBK vorlag und mit der Auswertung der konventionellen Zytogenetik annähernd kongruent war (Diagramm 3.13). Analysen von mononukleären Zellen des Blutes erfolgten zu diesem Zeitpunkt nicht.



**Diagramm 3.13:** Vergleich der Ergebnisse der CC und I-FISH anhand untersuchter Proben von Knochenmark und Blut vom 123. Lebensmonat von Patient Nr. 20.

*KMA: Knochenmarkausstrich; KMK: Knochenmarkkultur; PBK: Kultur peripheres Blut.*

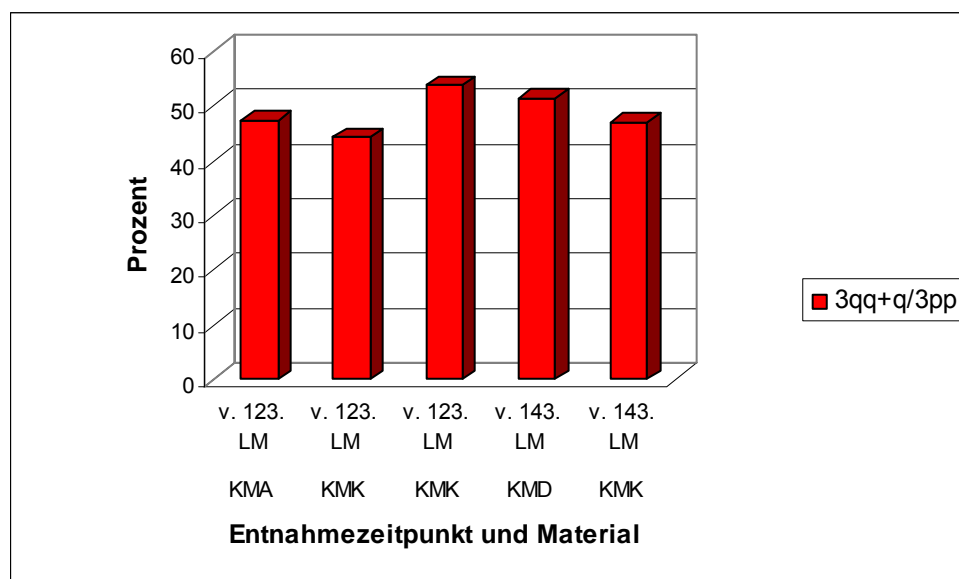
*3qq/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q.*



### 3.6.2.1.1 Vergleich der Analysen verschiedener Materialien

Die Auswertung der I-FISH Analyse aus Direktpräparation des peripheren Blutes vom 130. Lebensmonat des Patienten Nr. 20 zeigt mit 63,6% wie zu erwarten eine wesentlich höhere Zahl an aberranten Zellen im Vergleich zur Blutkultur mit 11,4%.

Vergleicht man die Werte der I-FISH Analysen aus Knochenmark verschiedener Ansätze (Knochenmarkausstrich, Direktpräparation des Knochenmarks und Knochenmarkkultur) des jeweils gleichen Entnahmedatums, so besteht hier eine sehr geringe Schwankungsbreite (Diagramm 3.14).



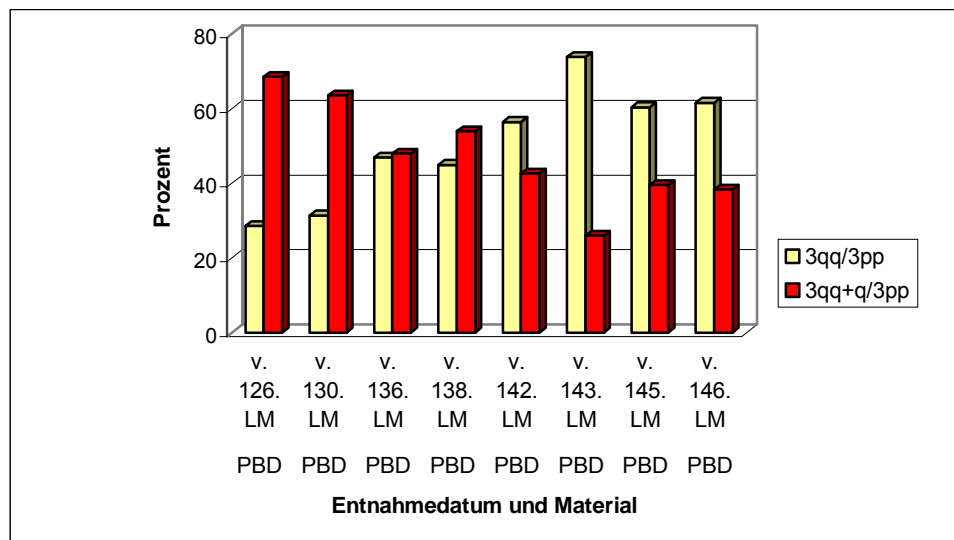
**Diagramm 3.14:** Direkter Vergleich von KMA, KMD und KMK von I-FISH Analysen von Chromosom 3 von zwei verschiedenen Entnahmedaten von Patient Nr. 20.

*KMA: Knochenmarkausstrich; KMD: Direktpräparation Knochenmark; KMK: Knochenmarkkultur; LM: Alter in Lebensmonaten.*

*3q+q/3pp: partielle Trisomie 3q.*

### 3.6.2.1.2 Verlauf des Klons im peripheren Blut und im Knochenmark

Insgesamt wurden bei Patient Nr. 20 8 I-FISH Analysen mit Direktpräparation von peripherem Blut in einem Zeitraum von 20 Monaten durchgeführt. Es zeigt sich, dass der Klon mit der partiellen Trisomie für 3q in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes innerhalb von 17 Monaten tendenziell abnimmt, von initial 68,6% (126. LM) auf 26% (143. LM), um dann innerhalb von drei Monaten wieder auf 38,4% (146. LM) anzusteigen (Diagramm 3.15).



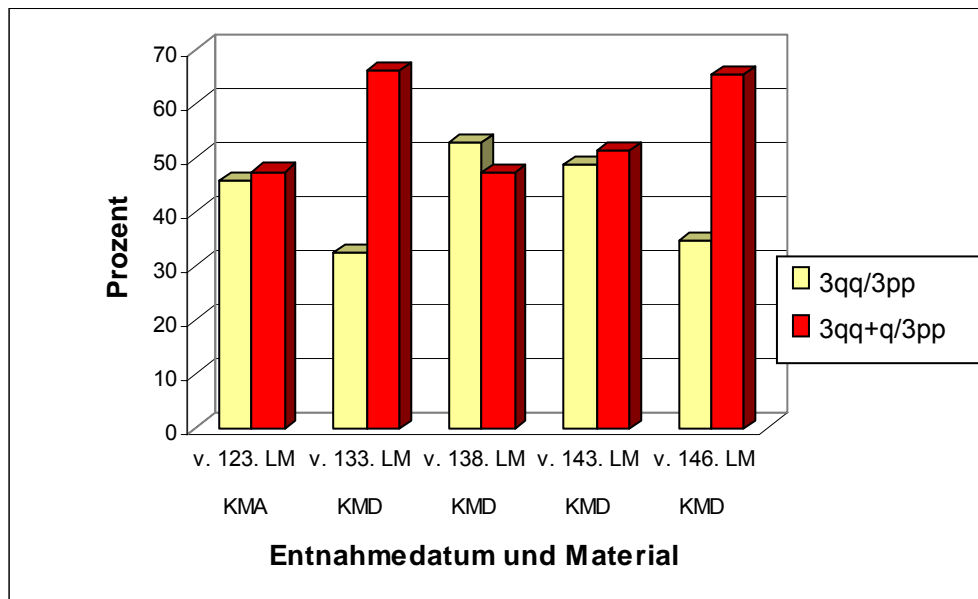
**Diagramm 3.15:** I-FISH an Chromosom 3 mit Proben aus PBD im Verlauf von Patient Nr. 20.

*PBD: Direktpräparation peripheres Blut; LM: Alter in Lebensmonaten.*

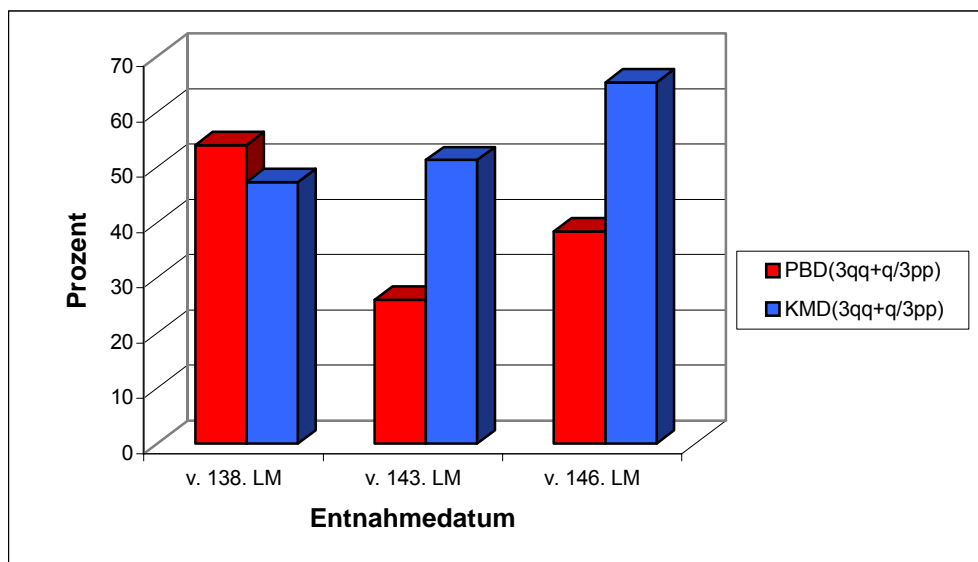
*3qq/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q.*

Vergleicht man diese Werte mit den untersuchten Knochenmarkproben aus Knochenmarkausstrich und Direktpräparation von Knochenmark, so ist hier die Schwankungsbreite wesentlich geringer, es lässt sich keine signifikante Abnahme des Klons innerhalb von 23 Monaten beschreiben. Eindeutig ist jedoch auch hier der zeitgleiche Anstieg des Klons von 51,3% (143. LM) auf 65,4% (146. LM) (Diagramm 3.16).

Ein direkter Vergleich von Direktpräparation des Knochenmarks und Direktpräparation des peripheren Blutes mit zur gleichen Zeit entnommenen Proben mit Verdeutlichung des eben beschriebenen Verhaltens ist in Diagramm 3.17 dargestellt.



**Diagramm 3.16:** I-FISH an Chromosom 3 mit Proben aus KMA und KMD im Verlauf von Patient Nr. 20. *KMA: Knochenmarkausstrich; KMD: Direktpräparation Knochenmark; LM: Alter in Lebensmonaten. 3qq/3pp: unauffälliges Chromosom 3; 3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q.*



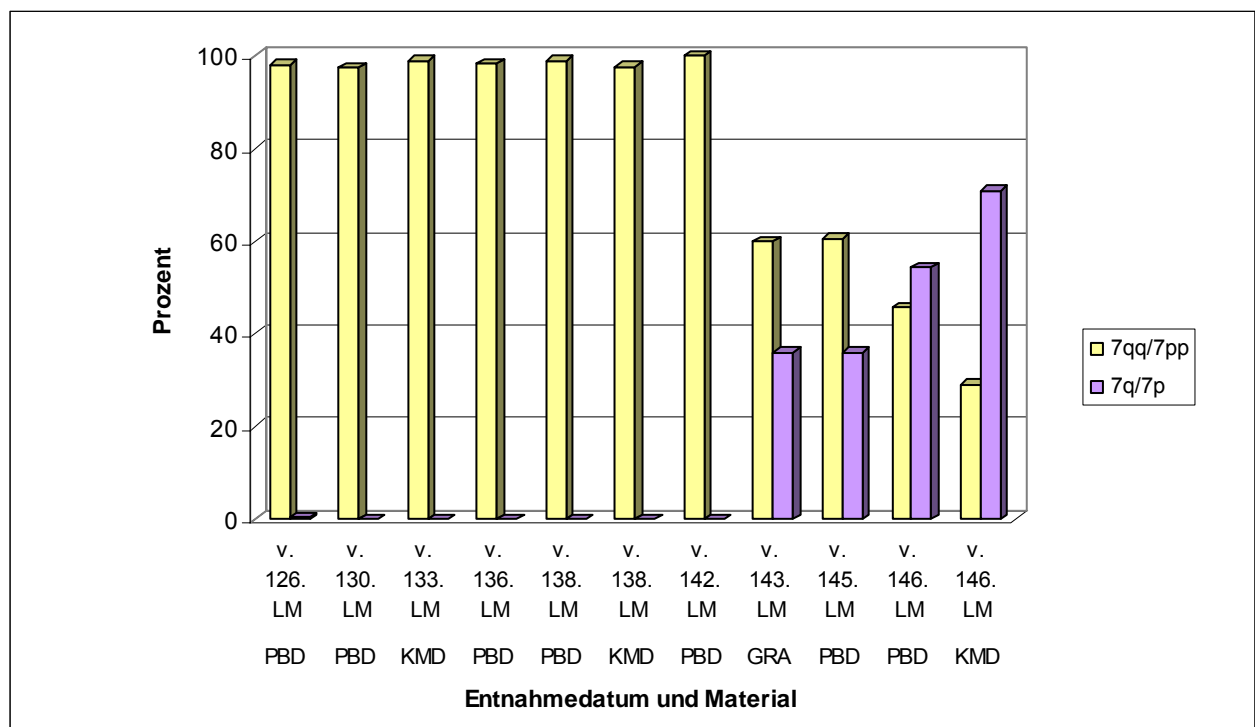
**Diagramm 3.17:** Vergleich der I-FISH Analysen von KMD und PBD mit Chromosom 3 im Verlauf von Patient Nr. 20.

*KMD: Direktpräparation Knochenmark; PBD: Direktpräparation peripheres Blut; LM: Alter in Lebensmonaten.*

*3qq+q/3pp: partielle Trisomie 3q.*

### 3.6.2.2 Monosomie 7

Zusätzlich zu der partiellen Trisomie 3q entwickelte sich in Knochenmarkszellen von Patient Nr. 20 im 143. Lebensmonat eine Monosomie 7, welche sich in der konventionellen Zytogenetik in 43 von 96 Metaphasen im Knochenmark zeigte. Dabei lag in 40 Metaphasen eine Kombination der partiellen Trisomie 3 und der Monosomie 7 vor. Die CGH mit DNA aus Knochenmark zeigte eine Verminderung des Ratioprofils für das gesamte Chromosom 7. Die Monosomie 7 zeigte nach dem ersten Auftreten in der I-FISH Analyse eine stetige Zunahme innerhalb von drei Monaten (Diagramm 3.18). Aus dem Diagramm ersichtlich sind die Entwicklung und der Verlauf dieses Klon sowie der große Zusammenhang zwischen Blut- und Knochenmarkanalysen.



**Diagramm 3.18:** I-FISH an Chromosom 7 bei Patient Nr. 20 mit Proben aus Knochenmark und peripherem Blut im Verlauf.

*GRA.: Granulozyten; KMD: Direktpräparation Knochenmark; PBD: Direktpräparation peripheres Blut. LM: Alter in Lebensmonaten.*

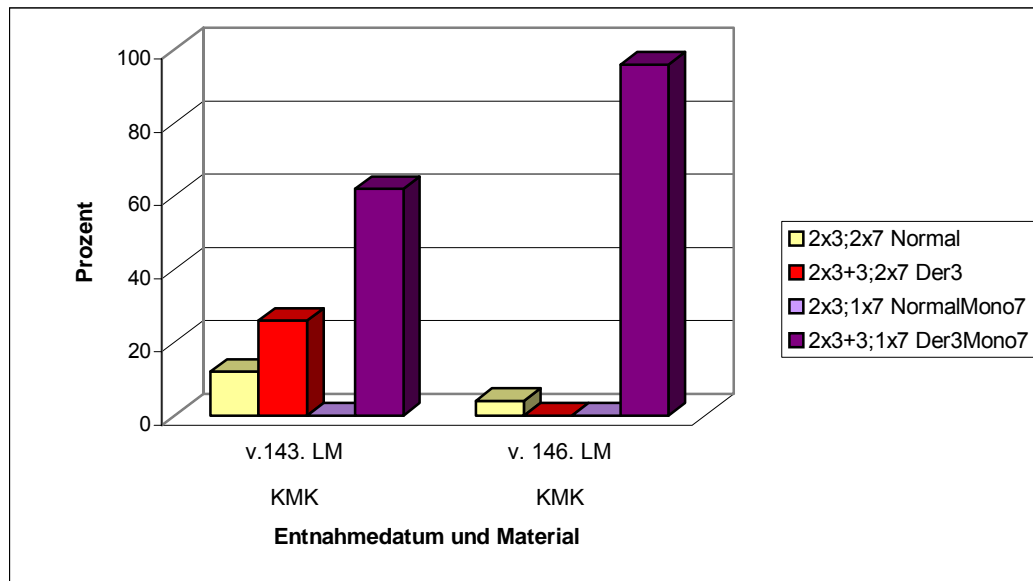
*7q/7pp: unauffälliges Chromosom 7; 7q/7p: Monosomie 7.*

### **3.6.2.3 Analyse der klonalen Evolution der partiellen Trisomie 3q und der Monosomie 7 mittels Whole Chromosome Paint an Metaphasen und I-FISH**

Bei Patient Nr. 20 wurde die Monosomie 7 und die partielle Trisomie 3q durch Einsatz je zweier YACs für Chromosom 7 und Chromosom 3 in der I-FISH analysiert. Um nun eine Aussage darüber machen zu können, ob es eine Kombination der chromosomalen Veränderungen innerhalb einzelner Kerne gibt, wurden beide Chromosomen in einer Analyse markiert und ausgewertet. Dies erfolgte sowohl mit der „whole chromosome paint“ (WCP) - Analyse als auch mit der I-FISH.

#### **3.6.2.3.1 Whole Chromosome Paint**

Die Ergebnisse der konventionellen Zytogenetik und CGH wurden durch Untersuchungen mit „whole chromosome paint“ (WCP) - Sonden für Chromosom 3 und 7 bestätigt. Dabei zeigte sich auch, dass in den Zellen verschiedene Kombinationen der beschriebenen Aberrationen vorkommen, vorherrschend jeweils die partielle Trisomie 3q kombiniert mit der Monosomie 7 innerhalb einer Metaphase, welche nach 6 Monaten mit der WCP Analyse eine starke Zunahme zeigte und mit über 90% der vorherrschende Klon war (Diagramm 3.19).



**Diagramm 3.19:** Analyse von Knochenmarkkultur mit WCP 3 und WCP 7 im Verlauf von 3 Monaten. Es ist eine starke Zunahme des Klons mit der Kombination aus partieller Trisomie 3q und Monosomie 7 zu erkennen.

*KMK: Knochenmarkkultur; LM: Lebensmonat;*

*2x3; 2x7 Normal: Chromosom 3 und 7 ohne Aberration innerhalb eines Metaphasekerns;*

*2x3+3, 2x7 der3: Trisomie 3q und Chromosom7 ohne Aberration innerhalb eines Metaphasekerns;*

*2x3; 1x7 Normal Mono7: Chromosom 3 ohne Aberration und Monosomie 7 innerhalb eines Metaphasekerns;*

*2x3+3, 1x7 der3 Mono7: Trisomie 3q und Monosomie 7 innerhalb eines Metaphasekerns.*

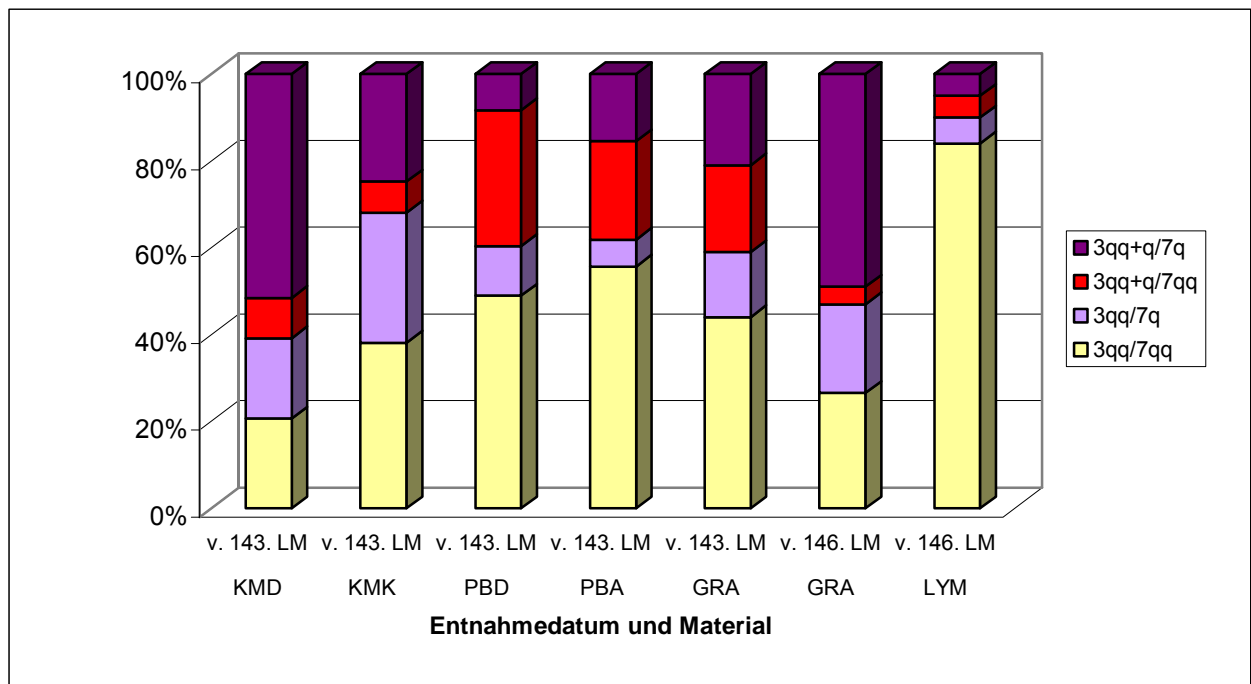
### 3.6.2.3.2 Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Um eine Einschätzung mittels I-FISH darüber zu erhalten, wie die Verteilung und Kombination der Aberrationen in den Zellen ist und in welchem Gewebe sie am effizientesten detektiert werden, wurden an verschiedenen Untersuchungsmaterialien sowohl Chromosom 7 als auch Chromosom 3 gleichzeitig mit verschieden farbigen markierten YACs hybridisiert und in einer I-FISH Analyse ausgewertet. Sowohl Chromosom 7 als auch Chromosom 3 wurden jeweils am langen Arm und ohne Kontrollregion in einem Ansatz hybridisiert. Für Chromosom 3 der YAC mit der Hybridisierungsregion 3q27-28 (909d10) in Spectrum Green und für Chromosom 7 der YAC mit der Hybridisierungsregion 7q36 (942g09) in Spectrum Orange.

Von einem Entnahmedatum, dem 143. Lebensmonat, konnten 5 verschiedene Probenmaterialien miteinander verglichen werden (Knochenmarkdirektpräparation, Knochenmark aus Kultur, Direktpräparation von peripherem Blut, Ausstrich von

peripherem Blut, Granulozyten- und Lymphozytenpräparation). In diesen Proben zeigten sich sowohl Zellen mit unauffälligem Karyotyp, mit partieller Trisomie 3q oder Monosomie 7, als auch mit partieller Trisomie 3q und Monosomie 7 innerhalb eines Interphasezellkerns. Das Diagramm 3.20 zeigt, dass durch das Auftreten der Monosomie 7 die Aberration von Chromosom 3 nicht verdrängt wird, sondern die Schnittmenge, das heißt, das Auftreten beider in einem Zellkern, die singuläre partielle Trisomie 3q verdrängt. In Zellen des Knochenmarks ist der Anteil aberranter Zellen in der Analyse der Direktpräparation mit fast 80% am größten.

Man erkennt im 143. Lebensmonat einen wesentlich höheren Prozentsatz an aberranten Zellen des Knochenmarks im Vergleich zur Analyse von Zellen des peripheren Blutes.



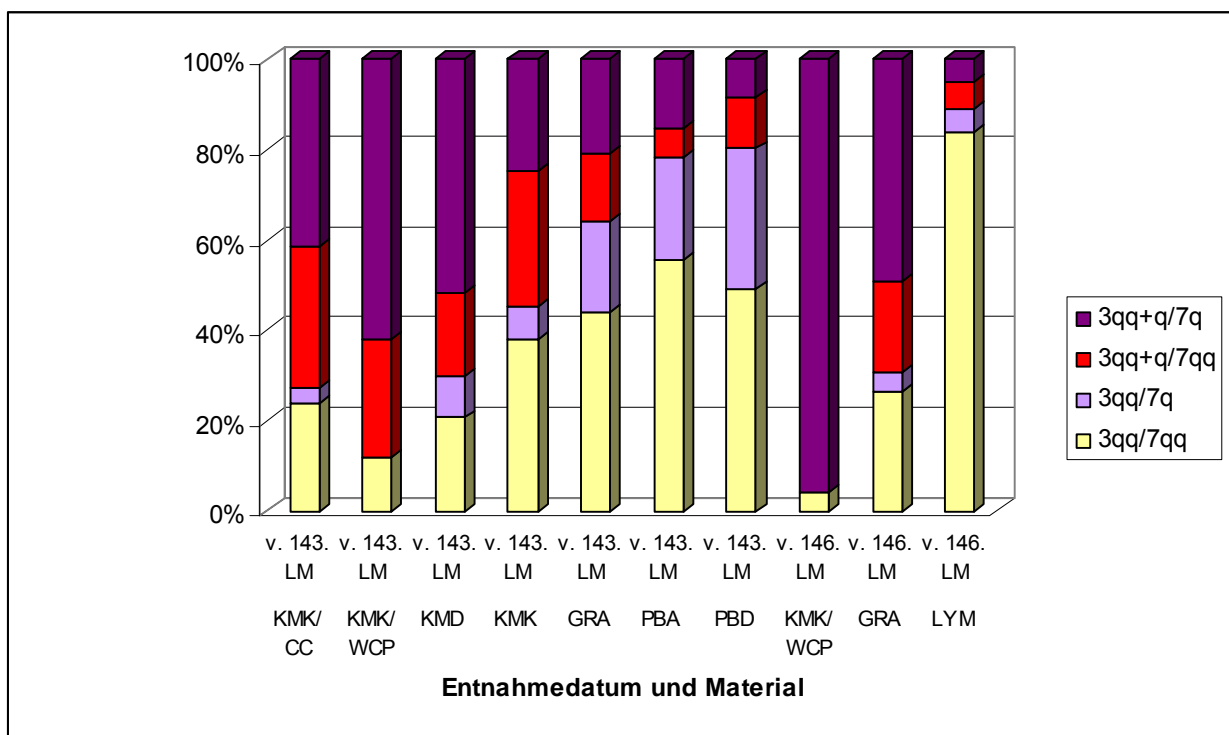
**Diagramm 3.20:** Analyse von Knochenmark und Blut mittels I-FISH an Chromosom 3q und 7q im Verlauf von 3 Monaten von Patient Nr. 20. Im 146. Lebensmonat ist in der Auswertung der Granulozyten die partielle Trisomie 3q fast ausschließlich in Kombination mit der Monosomie 7 vorzufinden. Im Gegensatz dazu die Auswertung der Lymphozyten.

*GRA: Granulozyten; LYM: Lymphozytenkultur; KMD: Direktpräparation Knochenmark; KMK: Knochenmarkkultur; PBA: Ausstrich peripheres Blut; PBD: Direktpräparation peripheres Blut.; LM: Alter in Lebensmonaten.*

*3qq/7qq: Disomie 3q, Disomie 7q; 3qq/7q: Disomie 3q, Monosomie 7q; 3qq+q/7qq: partielle Trisomie 3q, Disomie 7q; 3qq+q/7q: partielle Trisomie 3q, Monosomie 7q.*

### 3.6.2.3.3 Vergleich von konventioneller Zytogenetik, FISH mit WCP und YACs

Vergleicht man nun die Ergebnisse der konventionellen Zytogenetik, der FISH mit WCP und der I-FISH mit YACs (Diagramm 3.21), so fällt auf, dass wiederum im Knochenmark der höchste Anteil an Abberationen vorliegt. In der konventionellen Zytogenetik des Knochenmarks konnte im 143. Lebensmonat nur eine Metaphase von 29 mit einer singulären Monosomie 7 analysiert werden, im Verlauf von 3 Monaten konnten in der konventionellen Zytogenetik des Knochenmarks ausschließlich Zellen mit partieller Trisomie 3q und Monosomie 7 innerhalb einer Zelle nachgewiesen werden. Ähnlich ist dieses Erscheinungsbild bei der WCP Analyse. Eine alleinige Monosomie 7 konnte bei diesen Untersuchungen nie detektiert werden. Auch hier war nach 3 Monaten der Klon mit Kombination der chromosomalen Veränderungen innerhalb einer Zelle auf über 90% angestiegen.



**Diagramm 3.21:** Vergleich CC/WCP-FISH/YAC-FISH von Chromosom 3 und 7 an KM und Blut im Verlauf .

GRA = Granulozyten; KMD: Direktpräparation Knochenmark; KMK: Knochenmarkkultur; KMK/CC = Konventionelle Zytogenetik an Metaphasen des Knochenmarks; KMK/WCP = Whole Chromosome Paint an Metaphasen des Knochenmarks; LYM = Lymphozytenkultur; PBA: Ausstrich peripheres Blut; PBD: Direktpräparation peripheres Blut.

3qq/7qq: Disomie 3q, Disomie 7q; 3qq/7q: Disomie 3q, Monosomie 7q; 3qq+q/7qq: partielle Trisomie 3q, Disomie 7q; 3qq+q/7q: partielle Trisomie 3q, Monosomie 7q.



Die Monosomie 7 tritt bei allen I-FISH Analysen stets auch als Kombination mit der partiellen Trisomie 3q auf. Es kann gezeigt werden, dass mit Detektion der Monosomie 7 im 143. Lebensmonat nicht nur diese im KM und Blut kontinuierlich zunimmt, sondern auch die partielle Trisomie 3q. Die Aberration beider Chromosomen innerhalb eines Zellkerns ist im Verlauf der vorherrschende Klon.

Der Patient wurde im 147. Lebensmonat erfolgreich knochenmarktransplantiert.

### **3.6.3 Übersicht der I-FISH Analysen von Fanconi Patienten**

Insgesamt wurden von 43 Fanconi Patienten 196 I-FISH Analysen durchgeführt, d.h. 4,5 Analysen pro Patient. 92266 Interphasekerne wurden dabei ausgewertet, pro Analyse durchschnittlich 470 Kerne.

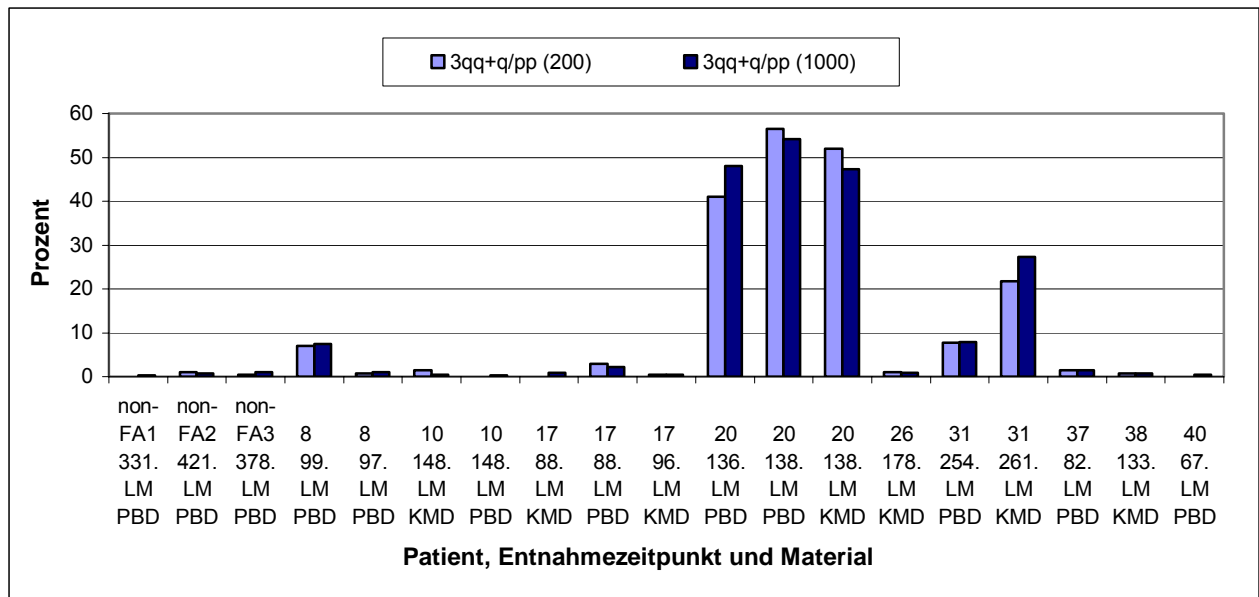
Lediglich 12 der 196 Analysen waren nicht auswertbar. Davon waren ausschließlich I-FISH Analysen von Chromosom 3 betroffen mit 6 Analysen von Knochenmarkausstrichen (KMA), einer Analyse von Direktpräparation von Knochenmark (KMD), 3 Analysen von Knochenmarkkulturen (KMK) und je einer Analyse von Kultur aus peripherem Blut (PBK) und Direktpräparation von peripherem Blut (PBD).

Die Hybridisierungseffizienz, d.h. wie viele der durchgeführten Versuche ausgewertet werden konnten, beträgt demnach 94%.

## **3.7 Vergleich der Auswertung von 200 und 1000 Interphasekernen bei der Interphase-FISH**

Die Auswertung von 1000 Interphasekernen pro I-FISH Analyse ist mit circa einer Stunde Dauer recht zeitaufwendig. Deswegen wurden bei 3 I-FISH Analysen von non-FA Patienten und 16 I-FISH Analysen von non-FA Patienten jeweils 200 und 1000 Interphasekerne für Chromosom 3 ausgewertet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Es handelte sich dabei sowohl um Patienten mit partieller Trisomie von 3q als auch um Patienten ohne diese. In Diagramm 3.22 sind diese Analysen im Vergleich dargestellt.

Drei Patienten hatten eine partielle Trisomie 3q, welche jeweils in beiden Auswertungen detektiert wurde, jedoch war die Differenz der Auswertung von 200 und 1000 Kernen höher als bei den Patienten ohne Aberration von Chromosom 3.



**Diagramm 3.22:** Auswertung von I-FISH Analysen von 3 non-FA und 16 FA Patienten mit und ohne partielle Trisomie 3q. Dargestellt sind die Patientennummern mit Angabe des Entnahmezeitpunkts und des untersuchten Materials. Die hellblauen Balken stellen die Prozentwerte der Auswertung von 200 Kernen dar, die dunkelblauen Balken die Auswertung mit 1000 Kernen der gleichen Analyse. Bei drei Patienten liegt eine partielle Trisomie 3q vor (Patienten Nr. 8, 20 und 31).

*KMD: Direktpräparation Knochenmark; PBD: Direktpräparation peripheres Blut; LM: Alter in Lebensmonaten; non-FA: Patient ohne Fanconi Anämie.*

*3qq+q/pp (200): partielle Trisomie 3q, Auswertung von 200 Interphasekernen.*

*3qq+q/pp (1000): partielle Trisomie 3q, Auswertung von 1000 Interphasekernen.*

### 3.8 Klinische Verläufe der Patienten

**Tabelle 3.5:** Auflistung der genauen Aberrationen von Chromosom 3 und 7 und Gegenüberstellung mit dem hämatologischen Status und klinischen Verlauf.

Pat.-Nr.	Hämatol. Status zum Zeitpunkt der KM-Analyse (LM) *	Aberration Chromosom 3	Aberration Chromosom 7	Aberrationen	Outcome §	KMT (LM)	† (LM)
1	MDS (82)	rev ish enh (3q26.1q29)	rev ish dim(7)	Trisomie 3q Monosomie 7	MDS	82	101
2	MDS (84)	rev ish enh (3q24q29)	rev ish dim(7)	Trisomie 3q Monosomie 7	MDS	85	-
3	MDS (244)	rev ish enh (3q24q29)	-	Tri- und Tetrasomie 3q	MDS	-	260
4	AML (111)	-	rev ish dim(7)	Monosomie 7	AML	-	111
6	MDS (104)	rev ish enh (3q24q29)	-	Trisomie 3q	MDS	119	126
9	MDS (96)	rev ish enh (3q21q29)	rev ish dim(7)	Trisomie 3q Monosomie 7	AML	121	123
10	AA (137)	rev ish enh (3q25q29)	rev ish dim(7)	Tri- und Tetrasomie 3q Monosomie 7	AA	156	170
12	AA (441)	rev ish enh (3q26.1q29)	-	Tri- und Tetrasomie 3q	AA	-	482
14	MDS (140)	rev ish enh (3q26.1q29)	rev ish dim(7)	Trisomie 3q Monosomie 7	AML	140	154
19	AA (181)	rev ish enh (3q11q29)	-	Tetrasomie 3q	MDS	186	188
20	AA (123)	rev ish enh (3q25q29)	rev ish dim(7)	Trisomie 3q Monosomie 7	MDS	147	-
21	MDS (154)	rev ish enh (3q25q29)	-	Tri- und Tetrasomie 3q	AML	204	206
23	AA (102)	rev ish enh (3q11q29)	-	Trisomie 3q	AML	-	139
24	MDS (61)	rev ish enh (3q11q29)	-	Tetrasomie 3q	MDS	79	-
25	MDS (139)	rev ish enh (3q24q29)	rev ish dim (7)(q22qter)	Trisomie 3q Deletion 7q	AML	174	-
30	MDS (136)	rev ish enh (3q26.1q29)	rev ish dim (7)(q21qter)	Trisomie 3q Deletion 7q	MDS	138	-
31	AA (254)	rev ish enh (3q26.2q29)	-	Tri- und Tetrasomie 3q	MDS	-	264
34	MDS (133)	rev ish enh (3q23q29)	-	Tetrasomie 3q	AML	138	138

Pat.-Nr. = Patientennummer ; \* = Hämatologischer Status zum Zeitpunkt der CGH Analyse des Knochenmarks in Lebensmonaten, in der die Aberration von Chromosom 3 detektiert wurde. Aberrationen von Chromosom 7 wurden entweder zeitgleich oder später detektiert; § zeigt den hämatologischen Verlauf auf; KMT = Zeitpunkt der Knochenmarkstransplantation (Lebensmonat) ; † = Zeitpunkt des Todes (Lebensmonat). AA = Aplastische Anämie; MDS = Myelodysplastisches Syndrom; AML = Akute myeloische Leukämie.

## 3.9 Statistische Auswertung

Um die klinische Relevanz der Untersuchungen einschätzen zu können, werden die zytogenetischen Daten und morphologischen Kennzeichen des Knochenmarks sowie der klinische Verlauf der 17 Patienten mit Aberration von 3q mit denen von 26 FA-Patienten ohne Aberration von 3q und der klinische Verlauf der 9 Patienten mit Monosomie 7/Deletion 7q mit denen von 34 FA-Patienten ohne Monosomie 7/Deletion 7q verglichen.

### 3.9.1 Chromosom 3

Bezüglich der Aberration von Chromosom 3 unterschieden sich beide Gruppen nicht wesentlich in Bezug auf Alter, Geschlecht und Komplementationsgruppe. Es bestand lediglich eine leichte Tendenz in Richtung des männlichen Geschlechts und der FANCC Komplementationsgruppe (Tabelle 3.6).

Von den 17 Patienten mit Aberration von 3q zeigten 11 Patienten zu Beginn der Untersuchungen bei Nachweis einer Aberration von Chromosom 3q ein MDS und 6 Patienten eine Aplastische Anämie (AA). Ein MDS oder eine AML war bei diesen Patienten vor Detektion der Aberration von Chromosom 3 nicht nachweisbar. Am Ende der von uns durchgeführten Untersuchungen hatten 9 Patienten ein MDS und 6 Patienten eine AML. Der Beobachtungszeitraum lag dabei zwischen 2 und 63 Monaten mit einem mittleren Beobachtungszeitraum von 27,4 Monaten. Insgesamt erhielten 13 Patienten eine Knochenmarktransplantation, 12 der Patienten mit partieller Tri- oder Tetrasomie 3q verstarben. Patienten ohne Aberration von 3q zeigten ein wesentlich geringeres Auftreten eines MDS oder einer AML. 11,5% zeigten am Ende des Untersuchungszeitraums ein MDS oder eine AML im Vergleich zu den Patienten mit klonaler Aberration von 3q, bei denen es 88,2% waren.

Es besteht ein hoch signifikanter Zusammenhang im Chi<sup>2</sup>-Test zwischen der Aberration von Chromosom 3 und dem Auftreten eines MDS ( $p < 0,001$ ) (Tabelle 3.6). Für die AML ist der Zusammenhang auch hoch signifikant ( $p < 0,01$ ). Fasst man das Auftreten der Erkrankungen an sich (Entwicklung eines MDS oder einer AML) zusammen, so ist der Zusammenhang ebenfalls hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

**Tabelle 3.6:** Charakteristika von FA-Patienten mit und ohne partielle Tri- und Tetrasomien des chromosomalen Segments 3q26q29.

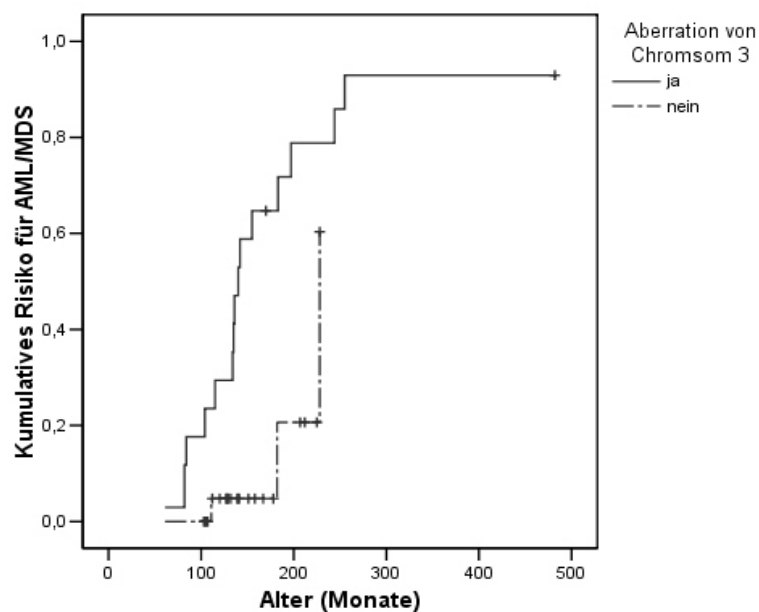
	Gesamt	Mit Aberration von Chromosom 3	Ohne Aberration von Chromosom 3
Patienten	43	17	26
Alter			
Median (Monate)	133	149	117
Spanne (Monate)	56-463	95-463	56-202
Geschlecht			
Männlich	27	11	16
Weiblich	16	6	10
Komplementationsgruppe			
FANCA	24	9	15
FANCC	6	4	2
FANCG	7	3	4
Unbekannt	6	1	5
Hämatologisches Bild			
<b>MDS</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>2</b>
<b>AML</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>1</b>
<b>MDS+AML</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>3</b>
Lebend	25	5	20
HSCT	23	13	10

FANCA = Fanconi Anämie Komplementationsgruppe A; FANCC = Fanconi Anämie Komplementationsgruppe C; FANCG = Fanconi Anämie Komplementationsgruppe G; MDS = Myelodysplastisches Syndrom; AML = akute myeloische Leukämie; HSCT = hämatopoietische Stammzelltransplantation.

‡ MDS wurde nach der FAB Klassifikation definiert.

§ AML = mehr als 30 % Blasten im Knochenmark.

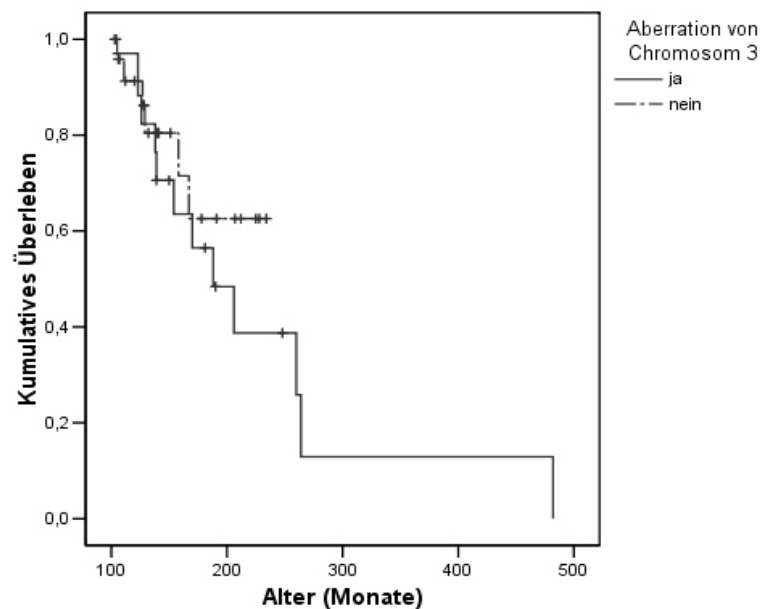
Zur Untersuchung der ereignisfreien Überlebenszeiten der Patienten mit oder ohne Aberration von Chromosom 3 wurde in einer Kaplan-Meier-Analyse das kumulative Risiko für die Entwicklung einer AML oder eines MDS berechnet (15 von 17 Patienten mit Aberration von Chromosom 3, 3 von 26 Patienten ohne Aberration von Chromosom 3). Das mittlere ereignisfreie Überleben lag für Patienten mit Aberration von Chromosom 3 bei  $172 \pm 25$  Monaten (Median  $140 \pm 5$  Monate), ohne Aberration von Chromosom 3 bei  $215 \pm 10$  Monaten (Median  $228 \pm 34$  Monate). Der Unterschied ist mit  $p < 0.005$  hoch signifikant (Diagramm 3.23).



**Diagramm 3.23:** Kumulatives Risiko für die Entwicklung einer AML/eines MDS mit oder ohne Aberration von Chromosom 3.

Mit Aberration von Chromosom 3:  $n = 17$ , MDS/AML 15. Ohne Aberration von Chromosom 3:  $n = 26$ , MDS/AML 3. Log rank:  $p = 0,0022$ . + = zensierte Fälle, d.h. Fälle, bei denen das Ereignis bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eingetreten ist.

Zur Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten mit oder ohne Aberration von Chromosom 3 wurde ebenfalls in einer Kaplan-Meier-Analyse das kumulative Überleben einer AML oder eines MDS berechnet (5 von 17 Patienten mit Aberration von Chromosom 3, 20 von 26 Patienten ohne Aberration von Chromosom 3). Die mittlere Überlebenszeit lag für Patienten mit Aberration von Chromosom 3 bei  $225 \pm 35$  Monaten (Median  $188 \pm 27$  Monate), ohne Aberration von Chromosom 3 bei  $199 \pm 12$  Monaten. Der Unterschied ist nicht signifikant (Diagramm 3.24). Der Beobachtungszeitraum bei den Patienten ohne Aberration ( $149 \pm 43$  Monate) ist hier signifikant ( $p < 0.05$ ) kürzer als bei den Patienten mit Aberration von Chromosom 3 ( $192 \pm 89$  Monate).



**Diagramm 3.24:** Kumulatives Überleben der FA Patienten mit oder ohne Aberration von Chromosom 3. Mit Aberration von Chromosom 3:  $n = 17$ , verstorben: 12. Ohne Aberration von Chromosom 3:  $n = 26$ , verstorben: 6. Log rank:  $p = 0,36$ . + = zensierte Fälle, d.h. Fälle, bei denen das Ereignis bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eingetreten ist.

### 3.9.2 Chromosom 7

Acht der Patienten mit Aberration von Chromosom 3 zeigten auch eine Aberration von Chromosom 7, ein Patient zeigte eine alleinige Monosomie 7.

Bezüglich des Chromosoms 7 unterschieden sich beide Gruppen in Bezug auf Alter und Komplementationsgruppe nicht wesentlich, es bestand eine leichte Tendenz zur Komplementationsgruppe FANCC. In der Gruppe von Patienten mit Monosomie 7/Deletion 7q war mit 78% der Patienten das männliche Geschlecht betroffen. Am Anfang des Beobachtungszeitraums hatten 6 Patienten mit Aberration von Chromosom 7 ein MDS, 1 Patient eine AML und 2 Patienten eine AA. Keiner dieser Patienten zeigte vor Detektion der Aberration von Chromosom 7 ein MDS oder eine AML. 4 Patienten mit Monosomie 7/Deletion zeigten am Ende des Beobachtungszeitraums ein MDS, 4 Patienten eine AML und 1 Patient eine AA. Insgesamt wurde zwischen 2 und 51 Monaten untersucht über einen durchschnittlichen Zeitraum von 23,7 Monaten.

Der Zusammenhang zwischen der Aberration von Chromosom 7 und dem Auftreten eines MDS ist mit  $p = 0,15$  im Chi<sup>2</sup>-Test nicht signifikant, während der Zusammenhang mit einer AML hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) ist. Fasst man das Auftreten der Erkrankungen an sich (Entwicklung eines MDS/einer AML) zusammen, so ist der Zusammenhang ebenfalls hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) (Tabelle 3.7).



**Tabelle 3.7 :** Charakteristika von FA Patienten mit und ohne Monosomie 7/Deletion 7q sowie von FA Patienten mit Monosomie 7/Deletion 7q und Aberration von Chromosom 3.

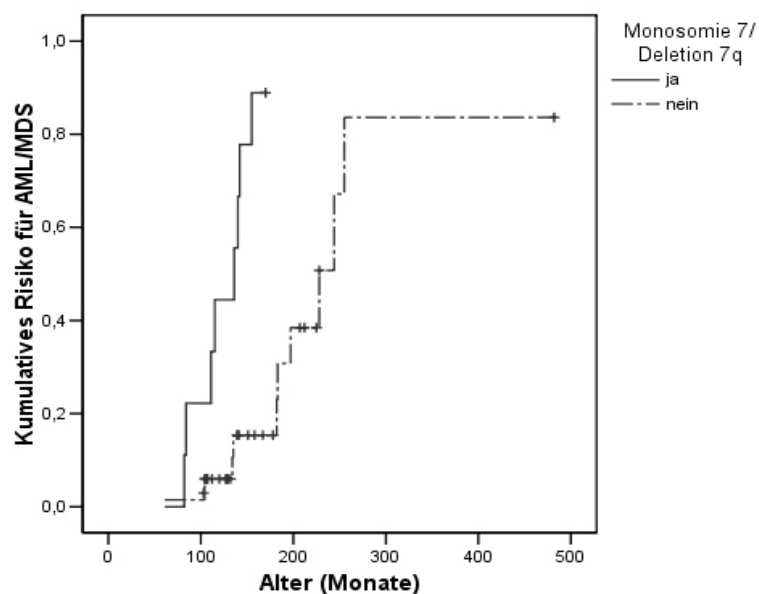
	Gesamt	Mit Aberration 7 (Monosomie 7/ Deletion 7q)	Ohne Monosomie 7/ Deletion 7q	Mit Aberration Chromosom 3 und 7 (Monosomie 7/ Deletion 7q)
Patienten	43	9 (7/2)	34	8 (6/2)
Alter Median (Monate) Spanne (Monate)	125 82-447	121 (116/138) 82-155 (82-155/136-139)	129 56-447	122 (117/138) 82-155 (82-155/136-139)
Geschlecht <i>Männlich</i> <i>Weiblich</i>	28 15	7 (6/1) 2 (1/1)	21 13	6 (5/1) 2 (1/1)
Komplementationsgruppe <i>FANCA</i> <i>FANCC</i> <i>FANCG</i> <i>Unbekannt</i>	25 4 6 8	4 (3/1) 3 (3/0) 2 (1/1) 0	21 1 5 8	3 (2/1) 3 (3/0) 2 (1/1) 0
Hämatologisches Bild <b>MDS</b> <b>AML</b> <b>MDS+AML</b> <i>Lebend</i>	11 7 18 24	4 (3/1) 4 (3/1) 8 (5/2) 4	7 3 10 21	4 (3/1) 3 (2/1) 7 (5/2) 4 (2/2)
HSCT	22	8	14	8 (6/2)

*FANCA* = Fanconi Anämie Komplementationsgruppe A; *FANCC* = Fanconi Anämie Komplementationsgruppe C; *FANCG* = Fanconi Anämie Komplementationsgruppe G; *MDS* = Myelodysplastisches Syndrom; *AML* = akute myeloische Leukämie; *HSCT* = hämatopoietische Stammzelltransplantation.

‡ *MDS* wurde nach der FAB Klassifikation definiert.

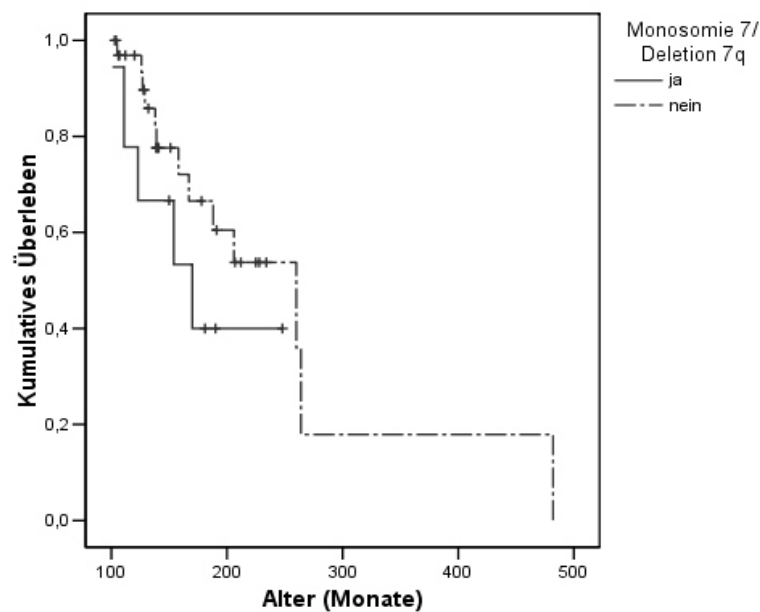
§ *AML* = mehr als 30 % Blasten im Knochenmark.

Auch hier wurde zur Untersuchung der ereignisfreien Überlebenszeiten der Patienten mit oder ohne Monosomie 7/Deletion 7q in einer Kaplan-Meier-Analyse das kumulative Risiko für die Entwicklung einer AML oder eines MDS berechnet (8 von 9 Patienten mit Monosomie 7/Deletion 7q, 10 von 34 Patienten ohne Monosomie 7/Deletion 7q). Das mittlere ereignisfreie Überleben lag hierbei für Patienten mit Monosomie 7/Deletion 7q bei  $126 \pm 10$  Monaten (Median  $136 \pm 31$  Monate), ohne Monosomie 7/Deletion 7q bei  $250 \pm 38$  Monaten (Median  $228 \pm 24$  Monate). Auch hier ist der Unterschied mit  $p < 0,001$  hoch signifikant (Diagramm 3.25).



**Diagramm 3.25:** Kumulatives Risiko für die Entwicklung einer AML/eines MDS mit oder ohne Monosomie 7/Deletion 7q. Mit Monosomie 7/Deletion 7q:  $n = 9$ , AML/MDS 8. Ohne Monosomie 7/Deletion 7q:  $n = 34$ , AML/MDS 10. Log rank:  $p < 0,001$ . + = zensierte Fälle, d.h. Fälle, bei denen das Ereignis bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eingetreten ist.

Bei der Kaplan-Meier- Analyse zur Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten mit oder ohne Monosomie 7/Deletion 7q wurde das kumulative Überleben einer AML oder eines MDS berechnet (4 von 9 Patienten mit Monosomie 7/Deletion 7q, 21 von 34 Patienten ohne Monosomie 7/Deletion 7q). Die mittlere Überlebenszeit lag für Patienten mit Monosomie 7/Deletion 7q bei  $180 \pm 20$  Monaten (Median  $170 \pm 31$  Monate), ohne Monosomie 7/Deletion 7q bei  $252 \pm 40$  Monaten (Median  $260 \pm 48$  Monate). Der Unterschied ist nicht signifikant (Diagramm 3.26).

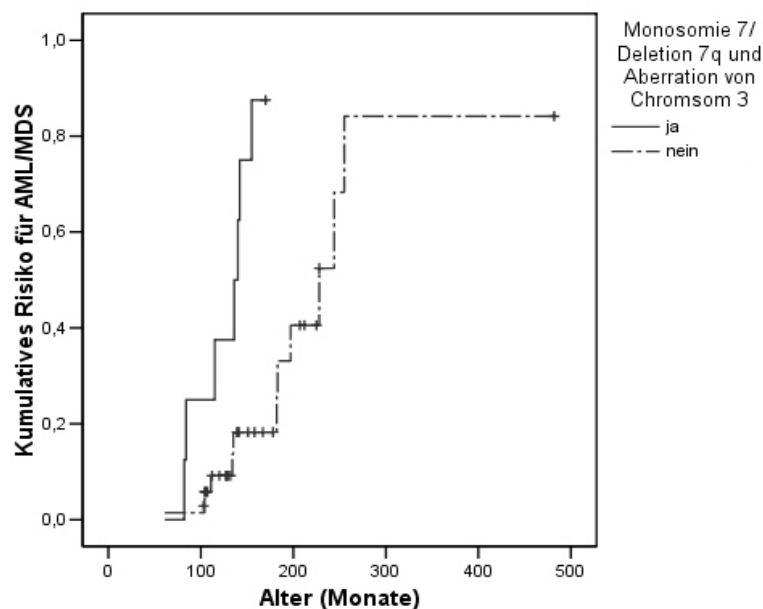


**Diagramm 3.26:** Kumulatives Überleben der FA Patienten mit oder ohne Monosomie /Deletion 7q. Mit Monosomie 7/Deletion 7q: n = 9, verstorben 5. Ohne Monosomie 7/Deletion 7q: n = 34, verstorben 13. Log rank: p = 0,22. + = zensierte Fälle, d.h. Fälle, bei denen das Ereignis bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eingetreten ist.

### **3.9.3 Chromosom 3 und 7**

Der Zusammenhang zwischen dem gleichzeitigen Auftreten der Monosomie 7/Deletion 7q und der Aberration von Chromosom 3 ist im Chi<sup>2</sup>-Test nicht signifikant mit dem Auftreten eines MDS allein ( $p = 0,08$ ), beziehungsweise einer AML allein ( $p = 0,07$ ) verbunden. Der Zusammenhang zwischen der Aberration von Chromosom 3 und der Monosomie 7/Deletion 7q ist aber signifikant ( $p < 0,005$ ) mit dem Auftreten einer AML/ eines MDS verbunden, wenn man diese Erkrankungen zusammenfasst (Tabelle 3.7).

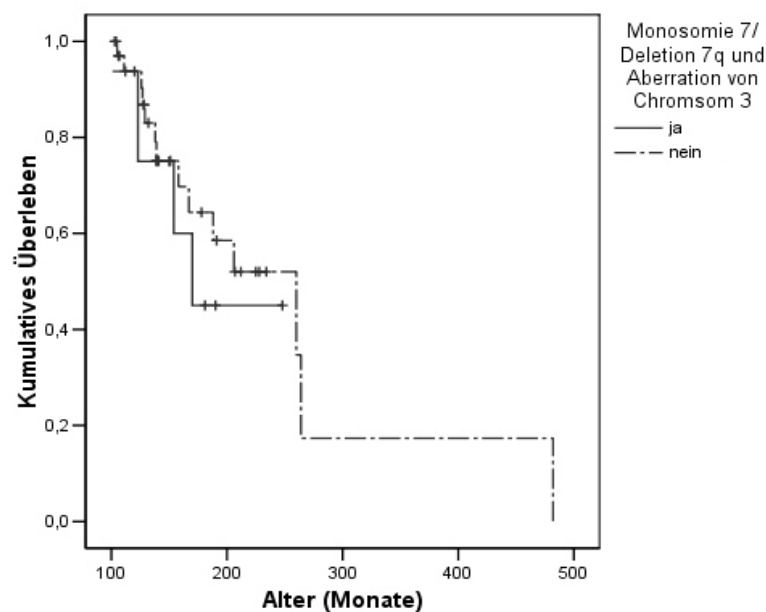
Zur Untersuchung der ereignisfreien Überlebenszeiten der Patienten mit oder ohne kombinierte Aberration von Chromosom 3 und 7 wurde das kumulative Risiko (Kaplan-Meier-Analyse) für die Entwicklung einer AML oder eines MDS berechnet (7 von 8 Patienten mit Aberration von Chromosom 3 und 7, 11 von 35 Patienten ohne Aberration von Chromosom 3 kombiniert mit Aberration 7). Hierbei lag das mittlere ereignisfreie Überleben für Patienten mit Aberration von Chromosom 3 und 7 bei  $128 \pm 11$  Monaten (Median  $136 \pm 18$  Monate), ohne Aberration von Chromosom 3 kombiniert mit dem gleichzeitigen Vorhandensein von Aberration 7 bei  $245 \pm 37$  Monaten (Median  $228 \pm 25$  Monate). Der Unterschied ist auch hier mit  $p < 0.001$  hoch signifikant (Diagramm 3.27).



**Diagramm 3.27:** Kumulatives Risiko für die Entwicklung einer AML/eines MDS mit oder ohne Monosomie 7/Deletion 7q und Aberration von Chromosom 3.

Mit Monosomie 7/Deletion 7q und Aberration von Chromosom 3:  $n = 8$ , AML/MDS 7. Ohne Monosomie 7/Deletion 7q und Aberration von Chromosom 3:  $n = 35$ , AML/MDS 11. Log rank:  $p < 0,001$ . + = zensierte Fälle, d.h. Fälle, bei denen das Ereignis bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eingetreten ist.

Abschließend wurde in einer Kaplan-Meier-Analyse das kumulative Überleben einer AML oder eines MDS der Patienten mit oder ohne Aberration von Chromosom 3 und 7 zur Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeiten berechnet (4 von 8 Patienten mit Aberration von Chromosom 3 und 7, 14 von 35 Patienten ohne Aberration von Chromosom 3 und 7). Die mittlere Überlebenszeit lag für Patienten mit Aberration von Chromosom 3 und 7 bei  $188 \pm 21$  Monaten (Median  $170 \pm 20$  Monate), ohne Aberration von Chromosom 3 und 7 bei  $248 \pm 38$  Monaten (Median  $260 \pm 48$  Monate). Der Unterschied ist nicht signifikant (Diagramm 3.28).



**Diagramm 3.28:** Kumulatives Überleben der FA Patienten mit oder ohne Monosomie /Deletion 7q und Aberration von Chromosom 3. Mit Monosomie 7/Deletion 7q und Aberration von Chromosom 3:  $n = 8$ , verstorben 4. Ohne Monosomie 7/Deletion 7q und Aberration von Chromosom 3:  $n = 35$ , verstorben 14. Log rank:  $p = 0,52$ . + = zensierte Fälle, d.h. Fälle, bei denen das Ereignis bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eingetreten ist.

Aus den durchgeführten Beobachtungen der Patienten mit Monosomie 7/Deletion 7q und Aberration von Chromosom 3 ergeben sich folgende Berechnungen des relativen Risikos zur Entwicklung eines MDS oder AML bei Fanconi Anämie Patienten (Tabelle 3.52).

**Tabelle 3.8:** Relative Risiken zur Entwicklung eines MDS und einer AML von FA Patienten mit Aberrationen von Chromosom 3 oder 7 im Vergleich zu FA Patienten ohne diese Aberrationen.

	Relatives Risiko	95% Konfidenzintervall
<b>Chromosom 3</b>		
MDS	6,9 fach erhöht	1,7 - 28,0
AML	9,2 fach erhöht	1,2 - 69,6
MDS oder AML	7,6 fach erhöht	2,6 - 22,5
<b>Chromosom 7</b>		
MDS	2,2 fach erhöht	0,8 - 5,8
AML	5,0 fach erhöht	1,4 - 18,6
MDS oder AML	3,0 fach erhöht	1,6 - 4,9
<b>Chromosom 3 und 7</b>		
MDS	2,5 fach erhöht	1,0 - 6,5
AML	3,3 fach erhöht	0,9 - 11,9
MDS oder AML	2,8 fach erhöht	1,6 - 4,9