

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 43 Patienten mit Fanconi Anämie untersucht, deren Diagnose anhand der erhöhten Chromosomenbrüchigkeit gegenüber Mitomycin C gesichert war.

Bei allen Patienten wurde eine konventionell-zytogenetische Untersuchung des Knochenmarks durchgeführt, wobei oft mehr als 50 Metaphasen nach Synchronisation und GTG-Bänderung ausgewertet werden konnten. Die dabei am häufigsten gefundenen Aberrationen waren die von Chromosom 3 und 7. 22 der Patienten zeigten in der konventionellen Zytogenetik (CC) einen auffälligen Karyotyp. Bei 10 der FA-Patienten konnte allein anhand der CC eine Aberration von Chromosom 3 detektiert werden, bei 13 eine Imbalance von Chromosom 7. Um Imbalancen, welche mit der CC nicht eindeutig detektiert werden konnten, zu identifizieren, erfolgte die Comparative Genomic Hybridization (CGH) bei 42 der FA Patienten. Durch Einsatz der CGH ist es möglich, innerhalb eines Experimentes das gesamte Genom zu analysieren und Informationen nicht nur über die chromosomale Zugehörigkeit, sondern auch über die Größe von Aberrationen zu gewinnen (Tönnies et al., 2001). Chromosomale Zugewinne oder Verluste, wie sie unsere Patienten zeigten, können damit sicher nachgewiesen werden. Neben der Bestätigung der Aberrationen von Chromosom 3 und 7 aus der konventionellen Zytogenetik zeigte sich zudem mit Hilfe der CGH, dass insgesamt 17 Patienten, also 40% der 43 Patienten, Aberrationen im Sinne eines chromosomalen Zugewinns von Chromosom 3 hatten mit einer allen gemeinsamen Region von 3q26q29, was eine Überrepräsentation der Aberration von 3q darstellt. 7 der 43 Patienten zeigten in der CGH eine Monosomie 7, 2 Patienten eine Deletion 7q. Alle Patienten, welche in der CGH Aberrationen von Chromosom 3 oder 7 hatten, zeigten auch einen auffälligen Karyotyp in der CC, sofern Metaphasen auswertbar waren. Die Aberrationen konnten zwar alle in der CC gesehen werden, jedoch ist es sehr schwer, diese Aberrationen genauer zu differenzieren. Imbalancen von Chromosom 7, die in der CGH gesehen wurden, konnten auch alle in der CC leicht identifiziert werden, da es sich um einen Verlust eines größeren chromosomalen Segments handelte (Monosomie 7/Deletion 7q). Im Gegensatz dazu war dies bei Imbalancen von Chromosom 3q schwer möglich, da das betroffene chromosomale Segment meist zu klein war, mit Ausnahme der Isochromosomen von 3q bei den Patienten 19 (CC: i(3)(q10); CGH:

(enh(3)(q10qter)) und 24 (CC: i(3)(q10); CGH: enh(3)(q11q29)). Bei einem Patienten (Nr. 23) bestand ein Zugewinn eines größeren chromosomalen Segments von 3q, jedoch lag zum Zeitpunkt der Detektion durch die CGH kein Knochenmark für eine CC vor (CC: kein KM; CGH: enh(3)(q11q29)).

Zur näheren Beschreibung des Karyotyps wurden oft Bezeichnungen wie „add“ verwendet, da die Herkunft und Größe des chromosomalen Materials anhand der CC nicht eindeutig analysiert werden konnte (ISCN, 1995). Chromosomale Veränderungen können in der CC nur bis zu einer ungefähren Größe von etwa 10 Megabasenpaaren nachgewiesen werden, was einer Auflösung von ca. einer Chromosomenbande bei einem Karyotyp mit 450 Banden haploidem Genom entspricht.

Aufgrund der Ergebnisse aus der CC und der CGH wurde erstmals ein Interphase-FISH Assay für Chromosom 3 und 7 entwickelt. Allgemein gilt, dass es unter Verwendung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung möglich ist, ein großes Spektrum an Aberrationen zuverlässig und schnell zu erfassen (Tönnies, 2002). Daneben konnte durch die quantitative Analyse der prozentuale Anteil klonaler Aberrationen von Chromosom 3 und 7 über die Zeit verfolgt und partielle Tri- oder Tetrasomien von 3q detektiert werden. Keine der bisher veröffentlichten Studien hat sich die verschiedenen molekularzytogenetischen Methoden, wie die CGH in Kombination mit der I-FISH, zum Nachweis chromosomaler Imbalancen bei FA Patienten zunutze gemacht.

Es gibt mehrere Studien die zeigen, dass bei non-FA Patienten mit MDS oder AML eine Monosomie 7 durch den Einsatz von I-FISH-Analysen an Knochenmark früher detektiert werden kann als es durch die konventionelle Zytogenetik der Fall ist (Kadam et al., 1993; Kadam et al., 1994; Flactif et al., 1994). Deswegen stellten Kadam et al. die Hypothese auf, dass der Klon mit der Monosomie 7 in vitro nicht die Mitose erreiche und somit anhand der CC nicht detektiert werden könne (Kadam et al., 1993). Diese Daten können von unseren nicht gestützt werden, da alle Fälle einer Monosomie 7 auch durch die CC detektiert wurden, in der teilweise bis zu 50 Metaphasen ausgewertet wurden, etwa doppelt soviel wie in anderen Studien. Auch Thurston et al. berichten über eine Monosomie 7 eines FA Patienten, welche durch eine I-FISH-Analyse 19 Monate vor Detektion durch die CC analysiert werden konnte (Thurston et al., 1999). Ob es tatsächlich möglich ist, eine Monosomie 7 mit der I-FISH vor der CC zu detektieren, kann mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht geklärt werden, da I-FISH Analysen von Chromosom 7 oft aufgrund von Materialmangel nicht durchgeführt werden konnten.

Initial erfolgten I-FISH Analysen an Proben aus Blut- und Knochenmarkkulturen. Die Analysen von Blutkulturen waren wie zu erwarten unauffällig, da es sich hierbei um die Analyse von T-Lymphozytenzellen handelt, welche die Aberrationen nicht tragen. Die Analysen von Knochenmarkkulturen bestätigten die Ergebnisse der CGH. Bei allen Patienten, bei denen eine Aberration von Chromosom 3 oder 7 in der CGH festgestellt wurde, zeigten auch die I-FISH Analysen positive Befunde für diese Aberrationen. Sowohl die CGH- als auch die I-FISH Methode zeigen somit eine Sensitivität von 100%. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden zudem Analysen an Blut- und Knochenmarkausstrichen und an Direktpräparationen des peripheren Bluts und des Knochenmarks durchgeführt. Erste Hinweise für das Vorliegen der Aberrationen in den Zellen des peripheren Bluts ergaben sich zuvor aus CGH Analysen.

Da die Aberrationen in der CC des Knochenmarks und in der CGH des Knochenmarks und des peripheren Blutes nachweisbar waren, wurden in dieser Arbeit neue Präparationsmethoden, die der Direktpräparationen des peripheren Blutes wie auch des Knochenmarks, sowie Blut- und Knochenmarkausstriche angewandt, um die Aberrationen auch in den I-FISH Analysen nachweisen zu können, was bislang von anderen Studien bei FA-Patienten nicht durchgeführt wurde. So zeigte sich dann auch in den I-FISH Analysen an Direktpräparationen von peripherem Blut (PBD) ein hoher Anteil an aberranten Zellen im Vergleich zu Analysen von kultiviertem peripherem Blut (PBK) des gleichen Entnahmedatums (siehe Patient Nummer 20, 130. Lebensmonat). Um nun festzustellen, welche Zellen speziell die Aberrationen tragen, wurden Granulozytenpräparationen durchgeführt. Betrachtet man Analysen von Granulozytenpräparationen, in denen sich ausschließlich Granulozyten befinden, so zeigte sich, dass die Aberrationen in diesen Zellen vorliegen. Dass man diese wiederum nicht in der Blutkultur nachweisen kann, liegt daran, dass die Granulozyten nicht proliferieren. T-Zellen, welche nahezu ausschließlich in diesem Probenmaterial (PBK) vorliegen, sind nach PHA-Stimulation proliferierende Zellen und überwachsen somit alle nicht-proliferierenden Zellen. Hierdurch wird der prozentuale Anteil der aberranten Zellen, also der Granulozyten, in der Kultur des peripheren Blutes zusätzlich vermindert. Ergeben sich trotzdem positive Werte in den kultivierten Blutproben, muss man davon ausgehen, dass es sich um noch vorhandene Granulozyten im Probenmaterial handelt. So lassen sich in den Analysen von PBA und PBD, wenn ein Patient Aberrationen von Chromosom 3 oder 7 hat, diese in annähernd gleich hoher Zahl nachweisen, da die

Granulozyten mit 70% den größten Anteil der mononukleären Zellen des Bluts ausmachen.

Durch diese Ergebnisse war es erstmals möglich, bei 5 der 17 Patienten mit Aberrationen von 3q mit Hilfe der I-FISH diese Aberrationen allein durch Analyse von Direktpräparationen des peripheren Blutes zu detektieren (Kapitel 3.3.3). Die Ergebnisse der I-FISH an Blut deckten sich mit denen der CGH aus Blut und Knochenmark, welche jeweils in denselben Lebensmonaten durchgeführt wurde. Eine partielle Trisomie 3q wurde mit Hilfe der I-FISH an PBD bei zwei der 5 Patienten detektiert, eine partielle Tri- und Tetrasomie 3q bei einem, eine partielle Tetrasomie 3q bei bereits zuvor bestehender Trisomie 3q bei zwei dieser Patienten.

Im Knochenmark werden alle Zellen des peripheren Bluts gebildet und entstammen einer pluripotenten Stammzelle. Aus dieser geht die lymphatische Stammzelle hervor, ebenso wie die myeloische Stammzelle und aus ihr alle weiteren Zellen des Blutes bis auf die Lymphozyten, welche der lymphatischen Stammzelle entstammen. Von den lymphatischen Stammzellen aus findet eine Besiedlung des Thymus und der peripheren lymphatischen Organe statt, in der auch die Differenzierung der T-Zellen erfolgt. Die B-Zell-Differenzierung erfolgt zu einem kleinen Teil im Knochenmark sowie in den Lymphknoten, den Tonsillen und den Peyer-Plaques. Da wie oben dargelegt die Aberrationen nicht in den T-Lymphozyten vorliegen, müssen die in dieser Arbeit gefundenen Aberrationen in den myeloischen Stammzellen entstehen. In der Knochenmarkkultur kommt es zur Proliferation von myeloischen Zellen, wonach der Anteil aberranter Zellen in den Analysen an KMK höher sein müsste als in den Analysen an KMD und KMA. Die Analysen von KMA, KMD und KMK zeigen jedoch kaum Unterschiede in den Auswertungen bezüglich der Aberrationen von Chromosom 3 und 7. Möglicherweise ist die Proliferation der von der Aberration 3 und 7 betroffenen Zellen *in vitro* reduziert. Da es sich aber um wenige Analysen handelt, welche diesbezüglich verglichen werden können, ist diese Aussage sehr eingeschränkt.

Alle I-FISH Analysen, welche an direkt präpariertem Blut gemacht wurden, zeigten einen hohen Zusammenhang mit den Analysen des Knochenmarks des jeweils gleichen Lebensmonats (Diagramm 3.7). Diese Korrelation zeigen auch Le Gouill et al. in ihrer Studie, in der I-FISH Analysen an Knochenmarkproben und Direktpräparationen des peripheren Blutes an non-FA Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie

durchgeführt wurden (Le Gouill et al., 2000). In den von uns durchgeführten I-FISH Analysen des Knochenmarks war der Anteil aberranter Zellen stets höher als in den Analysen der mononukleären Zellen des peripheren Bluts. In der Direktpräparation des Knochenmarks konnten bis zu über 90% aberrante Zellen ausgewertet werden im Gegensatz zu Analysen an PBD, bei denen es knapp 80% im gleichen Lebensmonat bei Patient Nummer 31 waren. Das liegt daran, dass der Anteil der myeloischen Zellen, welche die Aberrationen tragen, im Knochenmark größer ist als deren Anteil an den mononukleären Zellen des Bluts.

Es ist außerdem möglich, anhand von I-FISH Analysen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes den Verlauf der Klone über die Zeit zu verfolgen. Dies lässt sich anhand der Daten von Patient 31 darstellen, bei dem im Verlauf von drei Monaten die prozentuale Zu- und Abnahme der Klone in Analysen an PBD der prozentualen Zu- und Abnahme der Klone in Analysen an KMD entsprach. Der Anteil der Zellen mit partieller Trisomie 3q ist im Verlauf von 3 Monaten in den PBD-Analysen um 22% gefallen, in den KMD-Analysen um 17%. Der Klon mit der partiellen Tetrasomie 3q stieg in den PBD-Analysen um 21% an, in den KMD-Analysen um 22%.

Damit die Auswertungen der I-FISH Analysen richtig interpretiert werden konnten, wurden Kontrollanalysen an gesunden non-FA Personen, bei denen keine Aberrationen gefunden wurden, durchgeführt und damit die Cut-Off Level berechnet. Wie auch Ward et al. und Wilkens et al. (Ward et al., 1993; Wilkens et al., 1999), multiplizierten wir zur Berechnung der Cut-Off Level die ermittelte Standardabweichung mit 3 und addierten sie zum Mittelwert. Im Vergleich zu anderen Studien fällt auf, dass die in dieser Arbeit errechneten Cut-Off Level insgesamt sehr niedrig sind. So erhielten beispielsweise Wilkens et al. ein Cut-Off Level von 10,5% für eine Monosomie 7 bei Verwendung von Zentromerproben auf Knochenmarkszellen von 10 gesunden Personen (Wilkens et al., 1999), im Vergleich zu einem Cut-Off Level von 3,59 bei Verwendung von YACs für die Regionen 7p13 und 7q36 bei 8 Kontrollpersonen in der vorliegenden Arbeit. Beide Patienten, bei denen in der Studie von Wilkens et al. eine Monosomie 7 anhand der CGH festgestellt wurde, wurden anhand der I-FISH ebenso detektiert. Ursachen für die Unterschiede der Cut-Off Level sind möglicherweise der Einsatz unterschiedlicher Sonden sowie die Definitionen für die Auswertung der Signale in der I-FISH. Durch die von uns errechneten Cut-Off Level ist es möglich, Patienten mit einem geringen prozentualen Anteil aberranter Zellen in der I-FISH als richtig positive und somit als von

der Aberration Betroffene zu detektieren (siehe Patient Nummer 31 mit 7,9% bei einer PBD-Auswertung für eine partielle Trisomie (Cut-Off 2,89) und 8,1% für eine partielle Tetrasomie (Cut-Off 0,26)). Da die Cut-Off Level niedrig liegen, gibt es FA Patienten, welche laut I-FISH Analyse Aberrationen tragen, diese jedoch nicht durch die CGH bestätigt werden. So zeigten 10 FA Patienten in den I-FISH Analysen über dem berechneten Cut-Off liegende Werte für eine partielle Trisomie 3q, 1 Patient für eine Monosomie 7. Es ist möglich, dass es sich um falsch positive Befunde handelt. Mit der CGH lassen sich keine Mosaik nachweisen, deren Anteil weniger als 20% ausmacht, weswegen es möglich ist, dass es dadurch nicht zur Detektion der Aberrationen durch die CGH kam. Entscheidend jedoch ist, dass die Sensitivität der I-FISH 100% ist und es somit möglich war, alle von den Aberrationen betroffenen Patienten zu detektieren.

Nachdem I-FISH Analysen mit Auswertungen von bis zu 1000 Interphasekernen pro Analyse durchgeführt wurden, erfolgten Vergleichsanalysen derselben Objektträger mit Auswertung von 200 Interphasekernen. Die Zahl der ausgewerteten Kerne pro Analyse differiert in einzelnen Studien und beläuft sich bei Thurston et al. auf 200 Kerne, bei Weber et al. auf durchschnittlich 500 Kerne pro Analyse (Thurston et al., 1999; Weber et al., 2000).

Die klonalen Aberrationen bei Patienten mit partieller Trisomie 3q wurden in jeweils beiden Analysen detektiert und zeigten, ebenso wie die Patienten ohne klonale Aberrationen, keine relevanten Unterschiede in der prozentualen Auswertung. Somit ist es möglich, eine ebenso genaue Analyse der I-FISH mit Auswertung von 200 anstatt 1000 Interphasekernen zu erhalten und somit wertvolle Untersuchungszeit einsparen zu können.

40% der hier untersuchten Patienten mit Fanconi Anämie zeigten eine Aberration von 3q im Sinne einer partiellen Tri- und/oder Tetrasomie 3q, was bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Die Aberrationen lagen als Mosaik vor aufgrund klonaler Evolution. Tetrasome Klone entwickelten sich dabei wahrscheinlich aus einem trisomen Klon durch eine nachfolgende Duplikation.

Die häufigsten, bisher in der Literatur beschriebenen klonalen Aberrationen bei der Fanconi Anämie sind Aberrationen von Chromosom 1 und die Monosomie 7 (Auerbach et al., 1991; Alter et al., 1993; Alter 1996; Ferti et al., 1996; Maarek et al., 1996; Thurston et al., 1999; Alter et al., 2000; Oliveira et al., 2002). Lediglich über 8 Fälle von

FA Patienten mit zusätzlichem Material von 3q in Knochenmarkszellen wurde bis heute berichtet (Berger et al., 1977; Berger et al., 1980; de Vroede, 1982; Alter, 1996; Maarek et al., 1996; Ferro et al., 2001), welche Trisomien oder Tetrasomien des langen Arms von Chromosom 3q12 bis 3qter hatten, was eine Identifizierung allein anhand der konventionellen Zytogenetik möglich macht. Einen Fall mit einer partiellen Tetrasomie 3, bei dem neben der CC die FISH eingesetzt wurde, beschreibt Ferro et al. (Ferro et al., 2001). Nachdem die CC des Knochenmarks bei einem FA Patienten mit MDS einen auffälligen Befund erbrachte (46,XY, trp(1)(q12-21q31-q32), add(11)(p15), add(21)(q22)), wurde ein „whole chromosome paint“ für Chromosom 3 durchgeführt, wodurch zusätzliches Material von Chromosom 3 an zwei weiteren Chromosomen (Chromosom 11 und 21) identifiziert werden konnte. Weitergehende Untersuchungen, die den chromosomalen Abschnitt näher definieren hätten können, wie die CGH, erfolgten leider nicht.

Tabelle 4.1: Übersicht der bisher veröffentlichten Fälle mit zusätzlichem Material von 3q in Knochenmarkszellen bei FA Patienten.

Publikation	CC (KM)	Hämatol. Status
Berger et al., 1977	46,XX,-3,-12,dup(3q)(q12->qter),ins12q13 oder dup12q12-12q13	AML
Berger et al., 1980	46,XY,dup(1p)(p32p34),trp(3q)(q12q27),del(7)(p11pter)	Erythroleukämie
De Vroede et al., 1982	46,XY,3q+	AML
Alter, 1996	der(X)t(X;3)(p22.2;q13)+3	MDS
Maarek et al., 1996	46,XY,dup(1)(p32p34),trp(3)(q12q27),del(7)(q11)	Erythroleukämie
	46,XX,dup(3)(q12q27),add(12)(q24)	RAEB-t
	46,XX,add(1)(p36),dup(3)(q12q27),add(7)(p22),add(12)(q24)	AML
Ferro et al., 2001	46,XY, trp(1)(q12-21q31-q32), add(11)(p15), add(21)(q22)	MDS

CC: Konventionelle Zytogenetik; KM: Knochenmark; Hämatol. Status: Hämatologischer Status.

Vergleicht man das Vorkommen der klonalen Aberration von 3q der hier untersuchten Patientengruppe mit der Anzahl von publizierten Fällen, so ist zu vermuten, dass es anderen Studien bisher nicht gelungen ist, diese Aberration zu detektieren, da lediglich die konventionelle Zytogenetik allein zum Einsatz kam. Oft ist in den Beschreibungen der zytogenetischen Analysen „add“ angeführt, wenn nicht genau gesagt werden kann, von wo das chromosomale Segment abstammt und welche Größe es hat (ISCN, 1995). Hier ist es jedoch mit Hilfe der CGH möglich, genaue Aussagen zum Karyotyp zu erhalten, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Durch die Kombination der hier eingesetzten Analysemethoden (CC, CGH, I-FISH) sind unsere Untersuchungen sensibler als die der bisher veröffentlichten Studien.

Mit Hilfe der I-FISH konnte neben einer partiellen Trisomie von 3q bei sechs der Patienten eine partielle Tetrasomie 3q detektiert werden, welche sich häufig aufgrund klonaler Evolution aus einer partiellen Trisomie 3q durch eine nachfolgende Duplikation entwickelt. Bei allen sechs Patienten kam es zu einer starken Zunahme des Anteils aberranter Zellen insgesamt mit bis zu über 90% aberranter Zellen in der I-FISH von KMD (Diagramm 3.11), was auf einen erheblichen Proliferations- oder Überlebensvorteil der Zellen mit Aberration von 3q rückschließen lässt. Insbesondere der Klon der partiellen Tetrasomie 3q zeigte eine bedeutende Zunahme bei allen sechs Patienten, teils mit Verringerung des Klons mit partieller Trisomie 3q.

Generell zeigte sich bei allen FA Patienten, bei denen wiederholte Blut- oder Knochenmarkanalysen mit der I-FISH erfolgten, dass der prozentuale Anteil aberranter Klone von Chromosom 3 als auch von Chromosom 7 über die Zeit zumindest annähernd konstant oder zunehmend war.

Bei keinem der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten FA Patienten mit Aberrationen von Chromosom 3 oder 7 konnte ein transientes Auftreten dieser Klone beobachtet werden, wie es für andere klonale Aberrationen bei FA Patienten, wie der Duplikation von 1q von Alter et al. beschrieben wurde (Alter et al., 1993). Auch an den hier vorliegenden Daten kann das transiente Auftreten eines Klons mit einer Duplikation von 1q bei Patient Nummer 3 dargestellt werden. Nach seiner Erstdetektion in der CC im 205. Lebensmonat war dieser Klon nach 39 Monaten nicht mehr nachweisbar. Diese Aberration verhält sich also grundlegend anders als die Aberration von Chromosom 3.

Monosomien oder Deletionen von Chromosom 7 bei FA Patienten wurden im Gegensatz zu der partiellen Tri- und Tetrasomie 3q in der Literatur bisher häufig beschrieben (Auerbach et al., 1982; Berger et al., 1977; Berger und Le Coniat, 1989; Auerbach und Allen, 1991; Butturini et al., 1994; Alter, 1996; Maarek et al., 1996; Thurston et al., 1999; Yilmaz et al., 2005). Von den 43 in dieser Arbeit untersuchten Patienten hatten 7 eine Monosomie 7 und zwei eine Deletion 7q mit einer Größe von 7q21qter und 7q22qter. Interessant ist, dass 8 der Patienten mit klonaler Veränderung von Chromosom 7 auch eine Aberration von Chromosom 3q aufwiesen. Ein gemeinsames Vorkommen der Aberrationen von Chromosom 3 und 7 bei FA Patienten wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die Monosomie 7 trat bei zwei der Patienten sekundär zur Aberration von 3q auf (Patienten Nr. 10 und Nr. 20). Bei den übrigen 6 Patienten wurden in der CGH die Aberrationen von Chromosom 3 und 7 zeitgleich detektiert. Bei Patient 20 handelte es sich zudem um ein polyklonales Auftreten der Monosomie 7. Innerhalb eines Monats stieg bei diesem Patienten der Anteil aberranter Zellen mit einer Monosomie 7 von 0% auf knapp 40% an. Der Anteil aller aberranter Zellen (partielle Trisomie 3q und Monosomie 7) bei diesem Patienten stieg innerhalb von 3 Monaten nach Erstdetektion der Monosomie 7 stark an, wobei die Kombination beider Aberrationen (partielle Trisomie 3q und Monosomie 7) innerhalb eines Interphasekerns den größten Anteil ausmachte.

Aus oben gesagtem lässt sich vermuten, dass einerseits die partielle Trisomie 3q das Risiko erhöht, eine Monosomie 7 zu entwickeln und andererseits das Vorhandensein beider Aberrationen einen wesentlichen Proliferations- oder Überlebensvorteil für die von der Aberration betroffenen Zellen zu bringen scheint.

Was aber sind die Ursachen für die Persistenz und Zunahme der Klone von Chromosom 3 und 7?

In dem chromosomalen Abschnitt 3q26-27, welcher allen unseren Patienten mit Aberration von 3q gemeinsam ist, findet sich das „cytokine thrombopoietin“-Gen (THPO). THPO wird in der Leber und den Nieren und zu einem geringen Maß in der Milz und dem Knochenmark gebildet. Es reguliert nicht nur die megakaryozytäre Zellreihe, sondern auch die hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen (Jacobsen et al., 1996; Sungaran et al., 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA von THPO bei Mäusen und Menschen mit Thrombozytopenie hochreguliert ist (McCarty et al., 1995; Hirayama et al., 1998).

Zwischen THPO und der Zahl der Thrombozyten besteht ein negativer Rückkopplungsmechanismus (McCarty et al., 1995). Eine Studie von Majka et al. zeigt, dass CD34(+) Zellen des menschlichen Knochenmarks, Myeloblasten, Erythroblasten und Megakaryoblasten THPO mRNA produzieren, welche die Zellproliferation anregen und die Apoptose verhindern (Majka et al., 2001). Zusätzliche Kopien des THPO Gens führen also möglicherweise zu einer verstärkten Synthese von THPO mRNA, was zu einem Proliferationsvorteil der betroffenen Zellen führt, wie auch bei den untersuchten FA Patienten zu sehen ist. Die Verhinderung der Apoptose durch THPO stellt für Patienten, die Chromosomenaberrationen aufgrund von erhöhter Chromosomeninstabilität tragen, einen zusätzlichen Risikofaktor dar.

Ein weiteres Gen, das EVI1 Gen, welches sich in der chromosomalen Region 3q26.2 befindet (Morishita et al., 1988), kann als Kandidatengen betrachtet werden. EVI1 hat einen starken Einfluss auf die Zellproliferation, und es konnte gezeigt werden, dass es den Zellzyklus beschleunigt (Chi et al., 2003). Kommt es zur Beschleunigung des Zellzyklus durch eine mehrfach vorliegende chromosomale Region 3q26.2 bei FA Patienten, ist das Risiko des Auftretens neuer Aberrationen, die zum Beispiel durch Non-disjunction zustandekommen, wie die Monosomie 7, dadurch vermutlich erhöht.

Ein Proliferationsvorteil für Klone mit einer Monosomie 7 wurde auch von Chen et al. beschrieben. In ihren Untersuchungen von non-FA Patienten mit MDS zeigten sie, dass Gene in Zellen mit einer Monosomie 7 deren Zellproliferation fördern, wie etwa das Zellzyklusregulationsgen SPHAR, das DNA Replikationsgen Rad 17 und das Signaltransduktionsgen THPO. Das Genexpressionsmuster der Vorläuferzellen der Monosomie 7 geht mit den funktionellen Charakteristika wie einer hohen Proliferationsrate als auch einem malignen Potential einher (Chen et al., 2004).

Eine weitere Ursache für die erhöhte Proliferation der Zellen mit einer Monosomie 7 ist das Acetylcholinesterasegen (AChE), welches auf der chromosomalen Region 7q22 lokalisiert ist. Eine Studie von Stephenson et al. zeigte, dass die Inhibition dieses Gens eine Zellexpansion der Vorläuferzellen bewirkt und die hämatopoietische Apoptose unterdrückt (Stephenson et al., 1996).

Aus obigem lässt sich folgern, dass wenn bei einem FA Patienten sowohl eine partielle Tri- oder Tetrasomie 3q als auch eine Monosomie 7 / Deletion 7q innerhalb eines Zellkerns bestehen, der Proliferationsvorteil dieses Klons größer ist als bei Klonen mit nur einer der Aberrationen, wie auch bei Patient Nummer 20 gezeigt werden kann.

Alter et al. stellten die These auf, dass Klone mit zytogenetischen Aberrationen bei FA-Patienten einen erheblichen Proliferationsvorteil besitzen, wenn sie maligne Auswirkungen haben (Alter et al., 1993). Wir können anhand unserer Studie zeigen, dass Klone mit Aberrationen von Chromosom 3 oder 7 aufgrund von auf diesen Chromosomen vorhandenen Genen, wie oben beschrieben, einen Proliferationsvorteil haben, aber auch maligne Auswirkungen wegen ebenso dort lokalisierter weiterer Gene, welche durch die Aberrationen in ihrer Anzahl vermindert oder vermehrt vorliegen, entstehen.

Vor allem haben FA Patienten ein erhöhtes Risiko ein MDS oder eine AML zu entwickeln (Ortega et al., 2000; Rosenberg et al., 2003). Ursache für das Auftreten des MDS und der AML bei FA Patienten bei Vorhandensein einer partiellen Tri- oder Tetrasomie 3q und einer Monosomie 7/dDeletion 7q sind vermutlich Gene in der Region der Aberration. Es sind drei Gene bekannt, welche in der chromosomalen Region 3q26q29 liegen und bei der Entwicklung eines MDS und/oder einer AML involviert sind. In 3q26 liegt das „myelodysplasia syndrome-associated sequence 1“-Gen (MDS1), das „murine myeloid leukemia associated gene“ (EVI1) und das Epstein-Barr assoziierte Protein (EAP) (Morishita et al., 1992; Nucifora und Rowley, 1995; Ogawa et al., 1996; Yoneda-Kato et al., 1996; Testoni et al., 1999).

EVI1 in der chromosomalen Region 3q26.2 (Morishita et al., 1988) wird mit der Entwicklung myeloider Leukämien, die eine Aberration des chromosomalen Bereichs 3q26 tragen, in Zusammenhang gebracht (Buonamici et al., 2003). Die häufigsten chromosomalen Aberrationen, die zu einer Störung der EVI1 Expression führen, sind die Translokation $t(3;3)(q21q26)$ und die Inversion $inv(3)(q21q26)$, welche überwiegend beim MDS auftreten (Alessandrino et al., 2001; Martinelli et al., 2003). Dabei tritt die Aktivierung von EVI1 jedoch auch bei Patienten mit MDS und/oder AML ohne Aberrationen von Chromosom 3 auf (Russell et al., 1994; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2003). Da es sich bei unseren Patienten um partielle Tri- oder Tetrasomien von 3q handelt, ist dieser chromosomale Bereich überrepräsentiert und es kommt somit möglicherweise zu einer größeren Expression der dort vorhandenen Gene und folglich zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines MDS oder einer AML.

Translokationen zwischen 3q26 und 21q22.3 sind beteiligt an der Fusion des „acute myeloid leukemia 1“-Gen (AML1) der chromosomalen Region 21q22.3 und des MDS1, EVI1 oder EAP (Nucifora und Rowley, 1995; Testoni et al., 1999). Balancierte strukturelle Aberrationen, die zwischen diesen Genen bei non-FA Patienten mit MDS

oder AML erfolgen, fördern die Bildung von Fusionsproteinen, die einen Zusammenhang mit der Entwicklung eines MDS und/oder einer AML haben (Nucifora und Rowley, 1995; Testoni et al., 1999). Jedoch handelt es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten um unbalancierte Translokationen mit zusätzlichem Material von 3q. Keiner der Patienten hatte eine Translokation von 3q auf Chromosom 5 oder Chromosom 21, auf welchen das NPM- beziehungsweise das AML1 Gen lokalisiert ist.

Je öfter der chromosomale Abschnitt von 3q vorhanden ist, umso schlechter ist das Überleben. Sieben von acht Patienten mit partieller Tetrasomie 3q verstarben, während es bei den neun Patienten mit isolierter partieller Trisomie 3q fünf Patienten waren.

In bisherigen Studien wurden bei non-FA Patienten mit MDS oder AML am häufigsten Deletionen von 7q22, 7q31.1 und 7q31.3 gefunden (Liang et al. 1998; Le Beau et al., 1996). Liang et al. zeigten, dass drei verschiedene kritische Genorte auf 7q22-q31 existieren, welche zur Entwicklung eines MDS oder einer AML bei non-FA Patienten beitragen (Liang et al., 1998).

Koike et al. führten Untersuchungen durch, welche zeigten, dass bei non-FA Patienten mit Leukämie und Monosomie 7 oder Deletion 7q die chromosomalen Regionen 7q31.1 und 7q33-q34 Tumorsuppressorgene beinhalten müssen (Koike et al., 1999). Mehrere Tumorsuppressorgene auf Chromosom 7 konnten bisher identifiziert werden, jedoch konnten bisher keine Gene gefunden werden, welche in Zusammenhang mit der Entwicklung eines MDS und/oder einer AML stehen (Liang et al., 2005; Curtiss et al., 2005).

Bei FA Patienten sind diese malignen Erkrankungen (MDS, AML) häufig mit der Entstehung klonaler Chromosomenaberrationen in Zellen des Knochenmarks assoziiert, die sich zum Teil hinsichtlich des Aberrationstyps deutlich von denen anderer Patienten mit MDS und AML unterscheiden (Tönnies et al., 2003). Bei der AML von non-FA Patienten sind die häufigsten bekannten Aberrationen in Zellen des Knochenmarks balancierte Translokationen unter Bildung chimärischer Genprodukte (z.B. t(15;17) PML/RARA; inv (16)(p13;q22) CBFb/MYH11) (Mrozek et al., 2004). Bei FA Patienten mit AML hingegen wurden diese balancierten Translokationen bisher nicht nachgewiesen.

Die häufigsten von uns gefundenen Aberration bei den hier untersuchten FA Patienten waren Aberrationen von Chromosom 3 und 7. Keiner der Patienten mit Aberration von Chromosom 3 oder 7 in unserer Studie hatte vor der Detektion der Aberrationen ein MDS oder eine AML, sondern zeigte erst maligne hämatologische Erkrankungen mit dem Auftreten der Aberrationen oder später.

Über einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Aberration von 3q und der Entwicklung eines MDS oder einer AML sowie über einen Zusammenhang mit dem Überleben bei FA Patienten wurde jedoch bisher in der Literatur nicht berichtet. Wir können nun anhand der von uns erhobenen Daten erstmals eine Aussage bezüglich der Prognose für FA Patienten bei Auftreten einer Aberration von Chromosom 3 und 7 machen. Insgesamt wurde dabei im Verhältnis zu dem geringen Vorkommen der Fanconi Anämie eine relativ große Gruppe von FA Patienten (n=43) über einen Beobachtungszeitraum von über 2 Jahren untersucht.

Von 17 Patienten mit Aberration von Chromosom 3 in der vorliegenden Arbeit hatten 9 Patienten ein MDS und 6 weitere Patienten eine AML nach einem Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 27,4 Monaten (Spanne von 2-51 Monaten). Vor Detektion der Aberration von Chromosom 3 konnten diese Erkrankungen nicht nachgewiesen werden. Nur 2 Patienten ohne Aberration von 3q (n=26) hatten am Ende des Beobachtungszeitraums ein MDS, sowie 1 Patient eine AML. Anhand dieser Daten lässt sich sowohl ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der Aberration 3q und dem Auftreten eines MDS als auch zwischen der Aberration 3q und dem Auftreten einer AML darstellen. Auch bei den bisher in der Literatur beschriebenen 8 Fanconi Anämie Patienten mit Aberration von Chromosom 3 konnte jeweils ein MDS oder eine AML diagnostiziert werden (Tabelle 4.1), was die Aussage unserer Daten stützt. In einigen anderen Studien wurde bereits beschrieben, dass das Auftreten klonaler chromosomaler Aberrationen bei FA Patienten der Entstehung eines MDS oder einer AML vorausgehen kann (Berger, 1977; Alter, 1993; Butturini et al. 1994; Alter et al. 2000). Alter et al. zeigten 1993 Daten, nach denen FA Patienten mit klonalen zytogenetischen Veränderungen nicht zwingend eine Leukämie entwickeln müssen (Alter et al., 1993). Patienten mit Aberrationen von Chromosom 3q waren in dieser Studie jedoch nicht vorhanden. Butturini et al. untersuchten bei FA Patienten ein Jahr später den Zusammenhang zwischen der Detektion klonaler zytogenetischer Anomalien während des Knochenmarkversagens und dem anschließenden Risiko ein MDS oder

eine AML zu entwickeln, und fanden eine Zunahme des Risikos bei Patienten mit klonalen Aberrationen im Vergleich zu solchen mit unauffälligen Metaphasen. Auffallend war auch der enge zeitliche Zusammenhang zwischen der Entwicklung eines MDS oder einer AML und der Detektion klonaler zytogenetischer Aberrationen (Butturini et al., 1994). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen eindeutig den Zusammenhang zwischen klonalen Aberrationen und dem Entstehen eines MDS und einer AML und stützen somit die Ergebnisse von Butturini et al. von 1994, wobei jedoch in der Studie von Butturini et al. nicht auf einen Zusammenhang mit der Aberration von Chromosom 3 eingegangen wurde.

71% der FA Patienten unserer Studie mit Aberration von 3q verstarben, während es in der Gruppe ohne Aberration von 3q nur 23% waren. Dabei ist das mittlere krankheitsfreie (MDS, AML) Überleben der Patienten ohne eine Aberration von Chromosom 3q (215 Monate) auch hoch signifikant gegenüber den Patienten mit Aberration (172 Monate) verlängert. Wird die mittlere Überlebenszeit betrachtet, so ist kein signifikanter Unterschied vorhanden, allerdings scheinen die Patienten mit Aberration von Chromosom 3q eine längere Überlebenszeit zu haben (225 vs. 199 Monate). Dies erklärt sich aus der Beobachtungszeit der Patienten ohne Aberration des Chromosoms 3q. Bei diesen Patienten treten nur sehr wenige Ereignisse im Verlauf des Beobachtungszeitraumes auf, bei den meisten Fällen endet die Beobachtung vor dem Eintreten eines Ereignisses und der Patient geht als zensierter Fall in die Kaplan-Meier-Analyse ein (Diagramm 3.24). Zudem ist insgesamt das Alter der Patienten ohne Aberration von 3q signifikant jünger als der Patienten mit Aberration von Chromosom 3q (149 vs. 192 Lebensmonate). Es ist zu vermuten, dass bei einer längeren Beobachtungszeit der Patienten ohne Aberration von Chromosom 3 auch ein längeres Überleben zu beobachten wäre, da schon in der kurzen Zeit im Diagramm 3.24 ein Auseinandergehen der Überlebenskurven zu beobachten ist.

Das relative Risiko für die Entwicklung eines MDS oder einer AML von FA Patienten mit Aberration von Chromosom 3 ist im Vergleich zu FA Patienten ohne diese erhöht. Dabei ist das relative Risiko mit 9,2 (Konfidenzintervall 1,2 – 69,6) für die Entwicklung einer AML am höchsten. Die Sicherheit dieser Aussage ist auf der einen Seite eingeschränkt, da es sich um eine kleine heterogene Gruppe handelt, wodurch das Konfidenzintervall sehr breit ist. In Anbetracht des seltenen Vorkommens der Fanconi Anämie und dem daraus folgendem geringem Patientengut ist jedoch auf der anderen Seite das von uns

gefundene approximative Risiko für die Entwicklung eines MDS oder einer AML bei einer Aberration von Chromosom 3q bei FA Patienten das bisher sicherste, da es sich bei unseren FA Patienten um die bisher größte untersuchte Gruppe bezüglich einer Aberration von Chromosom 3 handelt.

Bei den 9 FA Patienten mit Aberration von Chromosom 7 zeigten nach durchschnittlich 23,7 Monaten (Spanne von 2 – 51 Monaten) 4 FA Patienten ein MDS, 4 weitere eine AML. Vor Beginn des Beobachtungszeitraums konnte bei keinem Patienten eine Aberration von Chromosom 7 detektiert werden. Aus den Auswertungen für Chromosom 7 ergab sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der Monosomie 7 oder der Deletion 7q und dem Auftreten eines MDS oder einer AML.

56% der Patienten mit Aberration von Chromosom 7 verstarben, während es in der Gruppe ohne Aberration von Chromosom 7 38% waren. Dabei lag hier das mittlere ereignisfreie Überleben bei Patienten mit Aberration von Chromosom 7 bei nur 126 Monaten, bei Patienten ohne diese bei 225 Monaten. Hier ist ebenso das mittlere Überleben der Patienten mit Aberration von Chromosom 7 schlechter (180 Monate) als bei Patienten ohne diese (225 Monaten), aber nicht signifikant unterschiedlich. Bereits 1984 beschrieben Stivrins et al. einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Monosomie 7 und der Entwicklung einer AML am Beispiel von zwei FA Patienten, welche nach Auftreten einer Monosomie 7 oder fraglich mit Auftreten einer Monosomie 7 eine AML entwickelten (Stivrins et al., 1984). Auch Yunis et al postulierten 1986, dass die Monosomie 7 mit einer schlechten Prognose assoziiert ist und eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung in eine AML besitzt (Yunis et al., 1986; Yunis und Brunning, 1986). Thurston et al. bewerteten die Monosomie 7 bei FA Patienten ebenso mit einer schlechten Prognose, konnten aber ihre Aussage nicht mit statistischen Daten stützen, da es sich lediglich um die Untersuchung eines FA Patienten mit Monosomie 7 handelte (Thurston et al., 1999). Nach unserer Untersuchung von insgesamt 9 FA Patienten mit Aberration von Chromosom 7 ist das relative Risiko für die Entwicklung einer AML 5,0-fach erhöht im Vergleich zu FA Patienten ohne diese Aberration bei einem Konfidenzintervall von 1,4 – 18,6. Ebenso ist hier die Sicherheit dieser Aussage aufgrund der kleinen heterogenen Gruppe eingeschränkt, wobei auch hier gesagt werden muss, dass es sich um die bisher größte derartig untersuchte Gruppe handelt.

Betrachtet man das Auftreten eines MDS und einer AML bei Vorkommen beider Aberrationen gleichzeitig, so ist auch hier der Zusammenhang signifikant. Das mittlere ereignisfreie Überleben für Patienten mit Aberration von Chromosom 3 kombiniert mit dem gleichzeitigen Vorhandensein von Aberration 7 war mit 128 Monaten hoch signifikant schlechter als ohne Aberration von Chromosom 3 und 7 mit 245 Monaten. Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit kombinierter Aberration war mit 188 Monaten im Gegensatz zu 248 Monaten schlechter aber nicht signifikant unterschiedlich zu den Patienten ohne kombinierte Aberration. Das relative Risiko eine AML oder ein MDS zu entwickeln, ist bei diesen FA Patienten mit kombinierter Aberrationen im Vergleich zu FA Patienten ohne diese erhöht (Tabelle 3.8), vor allem für die Entwicklung einer AML (3,3-fach bei einem Konfidenzintervall von 0,9 – 11,9).

Unsere Daten zeigen also, dass sich das Auftreten einer partiellen Tri- oder Tetrasomie 3q und einer Monosomie 7 auf das Überleben negativ auswirkt. 71% der Patienten mit partieller Tri- und Tetrasomie 3q verstarben, 56% der Patienten mit Aberration von Chromosom 7 und 50% der Patienten mit kombinierter Aberration von Chromosom 3 und 7. Von den Patienten mit Aberration von Chromosom 3 oder 7 sind alle verstorben, welche keine Stammzelltransplantation erhielten (5 Patienten). Insgesamt erhielten 13 Patienten eine Stammzelltransplantation, wonach noch 5 Patienten am Leben sind.

Da sich zeigt, dass ein MDS oder eine AML bei FA Patienten mit Aberrationen von Chromosom 3 oder 7 früher auftritt als bei FA Patienten ohne diese und die untersuchten Aberrationen einen negativen Risikofaktor bezüglich des Überlebens der Patienten darstellen, sollten alle FA Patienten systematisch molekularzytogenetisch untersucht werden, um diese Aberrationen so früh wie möglich zu detektieren. Im Falle des Nachweises dieser Aberrationen sollten engmaschige hämatologische Kontrollen erfolgen und frühzeitig eine Stammzelltransplantation erwogen werden.