

Aus dem Institut für Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Charité  
– Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum

Inauguraldissertation

**Molekularzytogenetische Untersuchungen von klonalen  
Chromosomenveränderungen im Knochenmark und  
in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von  
Fanconi Anämie Patienten:  
Nachweis und klinische Relevanz**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité  
– Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Teresa Huber  
aus Rotthalmünster

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. H. Neitzel
2. Prof. Dr. med. R. Rossi
3. Prof. Dr. rer. nat. B. Royer-Pokora

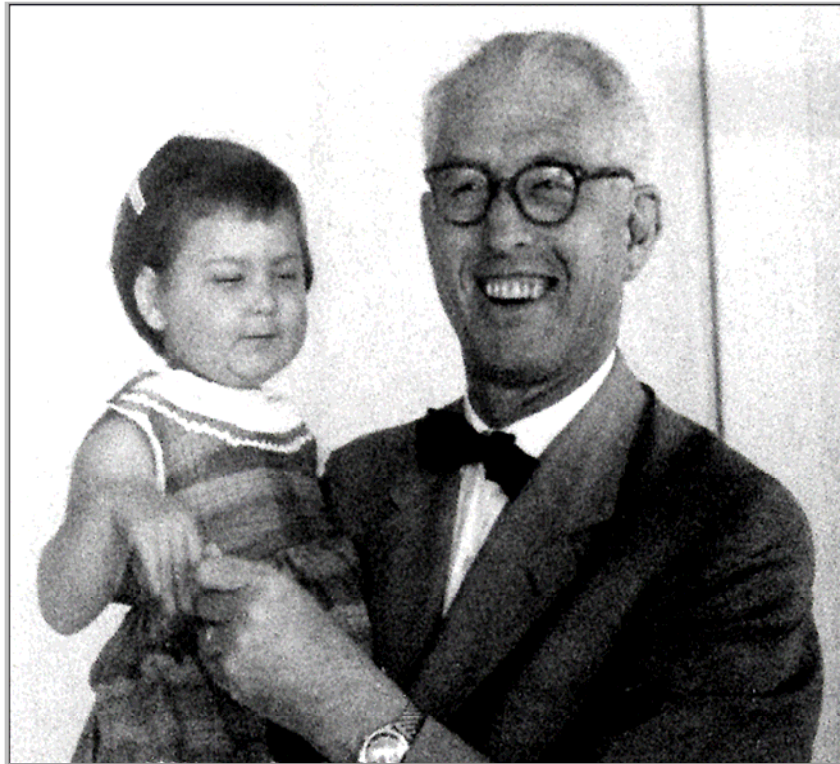
Datum der Promotion: 15.12.2006

## **Vorbemerkung**

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht. Nachfolgend ist der Artikel aufgeführt, in dem Ergebnisse publiziert wurden, die in dieser Arbeit beschrieben werden.

Tönnies H, Huber S, Kuhl JS, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood*, 2003;101(10):3872-3874.

In Liebe, meinen Eltern



Prof. Dr. med. Guido Fanconi im Jahre 1959 mit der kleinen Patientin Andrea Lee Kuritzky. Das Foto entstand im Children's Hospital in Los Angeles (aus Fanconi Anemia, A Handbook for Families and Their Physicians, Third Edition, 2000).

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN UND GLOSSAR .....</b>	<b>11</b>
Abkürzungen und wichtige Begriffe.....	11
Nomenklatur Karyotyp und Chromosomenanomalien (nach ISCN, 1995) .....	14
Nomenklatur der CGH.....	14
<b>1  <b>EINLEITUNG</b>.....</b>	<b>15</b>
1.1  Fanconi Anämie.....	15
1.1.1  Behandlung der Fanconi Anämie .....	19
1.1.2  FA-Komplementationsgruppen und Interaktion der FA-Proteine mit BRCA- Proteinen.....	19
1.2  Aplastische Anämie .....	22
1.3  Myelodysplastisches Syndrom .....	22
1.4  Akute myeloische Leukämie .....	24
1.5  Übersicht zytogenetischer Befunde bei Fanconi Anämie Patienten .....	25
1.6  Zielstellung der Arbeit.....	26
<b>2  <b>MATERIAL UND METHODEN</b>.....</b>	<b>28</b>
2.1  Material.....	28
2.1.1  Medien .....	28
2.1.2  Standardpuffer und Lösungen.....	28
2.1.3  Reagenzien.....	30
2.1.3.1  Chemikalien .....	30
2.1.3.2  Enzyme .....	32
2.1.3.3  Kits .....	32
2.1.3.4  Weitere Materialien und Geräte .....	32
<b>ZYTOGENETISCHE METHODEN .....</b>	<b>34</b>
2.2  Zellverarbeitung.....	34
2.2.1  Verwendete Zellen .....	34
2.2.2  Kulturmethoden.....	34
2.2.2.1  Lymphozytenkultur (Vollblut) .....	34

---

2.2.2.2 Knochenmarkkultur mit 5-Fluordesoxyuridin .....	35
2.2.2.3 Knochenmarkkultur mit Thymidin .....	35
2.2.3 Zellansatz für die Direktpräparationen .....	36
2.2.3.1 Direktpräparation von Blut.....	36
2.2.3.2 Direktpräparation von Knochenmark.....	36
2.2.3.3 Granulozytenpräparation.....	36
2.2.4 Blut- und Knochenmarkausstriche .....	37
2.3 Aufarbeitung der Kulturen und Direktpräparationen aus Blut und Knochenmark - Präparation von Metaphasechromosomen .....	37
2.4 Chromsomenfärbungen.....	38
2.4.1 Giemsa-Standardfärbung.....	38
2.4.2 Giemsa-Trypsin Banden (GTG) .....	38
<b>MOLEKULARGENETISCHE METHODEN .....</b>	<b>40</b>
2.5 Polymerase Kettenreaktion.....	40
2.5.1 PCR-Markierung von Sonden-DNA (YACs) .....	40
2.5.1.1 Erste Amplifikation .....	41
2.5.1.2 Zweite Amplifikation (Markierungs-PCR).....	42
2.5.2 Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung .....	43
<b>MOLEKULARZYTOGENETISCHE METHODEN .....</b>	<b>45</b>
2.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) .....	45
2.6.1 Yeast artificial chromosome (YAC) .....	47
2.6.2 Chromosomen-Painting .....	48
2.6.3 FISH mit YAC-Sonden .....	48
2.6.3.1 Fällung und Denaturierung der DNA-Sonde zur Hybridisierung.....	48
2.6.3.2 RNase-Verdau der Chromosomenpräparationen.....	49
2.6.3.3 Denaturierung der chromosomalen Ziel-DNA .....	49
2.6.3.4 Hybridisierung .....	50
2.6.3.5 Waschschritte nach der Hybridisierung .....	50
2.6.4 FISH mit WCP-Sonden .....	51
2.6.4.1 Denaturierung der WCP-Sonden zur Hybridisierung.....	51
2.6.4.2 RNase-Verdau der Chromosomenpräparationen.....	51
2.6.4.3 Probenvorbereitung und Hybridisierung.....	51

---

2.6.4.4	Hybridisierung .....	52
2.6.4.5	Waschschritte nach der Hybridisierung .....	52
2.6.5	Auswertung und Dokumentation der FISH-Ergebnisse .....	52
2.7	Comparative Genomic Hybridization (CGH) .....	55
2.7.1	Nick-Translation .....	56
2.7.2	DNA-Fällung und Denaturierung der Sonden-DNA .....	58
2.7.3	RNase-Verdau der Chromosomenpräparationen .....	59
2.7.4	Denaturierung der chromosomalen Ziel-DNA .....	59
2.7.5	Hybridisierung .....	60
2.7.6	Waschschritte nach der Hybridisierung .....	60
2.7.7	Auswertung .....	61
2.8	Statistische Methoden .....	61
2.8.1	Berechnung der Cut-Off-Level für Interphase-FISH .....	61
2.8.2	Berechnung der Hybridisierungseffizienz .....	61
2.8.3	Sensitivität und Spezifität .....	62
2.8.4	$\chi^2$ -Test nach Pearson .....	62
2.8.5	Relatives Risiko .....	62
2.8.6	Kaplan-Meier-Methode .....	62
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>63</b>
3.1	Berechnungen der Cut-Off-Level .....	64
3.2	Ergebnisse und Vergleich der Analysemethoden .....	66
3.2.1	Konventionelle Zytogenetik .....	66
3.2.2	Comparative Genomic Hybridization .....	66
3.2.3	Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung .....	66
3.3	Analyse von Chromosom 3 .....	69
3.3.1	Qualitative und quantitative Analyse chromosomaler Aberrationen von 3q mit der Interphase-FISH anhand einer Untersuchung .....	71
3.3.2	Qualitative und quantitative Analyse chromosomaler Aberrationen von 3q im Verlauf .....	72
3.3.3	Erstdetektion klonaler Aberrationen von 3q im peripheren Blut .....	72
3.3.3.1	Patient Nr. 23 .....	73
3.3.3.2	Patient Nr. 6 .....	74
3.3.3.3	Patient Nr. 31 .....	75



---

3.3.3.4 Patient Nr. 10 .....	76
3.3.3.5 Patient Nr. 12 .....	77
3.3.4 Vergleich der Auswertungen von Blut und Knochenmark .....	78
3.3.5 Monitoring der klonalen Aberration 3q im peripheren Blut .....	80
3.3.6 Partielle Tetrasomie 3q .....	82
3.3.7 Patienten ohne klonale Aberration von Chromosom 3 .....	83
3.4 Analyse von Chromosom 7 .....	85
3.4.1 Qualitative und quantitative Analyse chromosomaler Aberrationen von Chromosom 7 .....	86
3.4.2 Patienten ohne klonale Aberrationen von Chromosom 7 .....	87
3.5 Kombinierte Aberrationen von Chromosom 3 und 7 .....	87
3.6 Beispielhafte Verlaufsbeobachtung aberranter Klone bei den Patienten Nummer 3 und 20 .....	89
3.6.1 Patient Nummer 3 - Entwicklung einer partiellen Trisomie 3q und Detektion einer partiellen Tetrasomie 3q .....	89
3.6.2 Patient Nummer 20 - Klonale Evolution der chromosomalen Aberration von 3q und Nachweis einer Monosomie 7 .....	92
3.6.2.1 Partielle Trisomie 3q .....	92
3.6.2.1.1 Vergleich der Analysen verschiedener Materialien .....	95
3.6.2.1.2 Verlauf des Klons im peripheren Blut und im Knochenmark .....	96
3.6.2.2 Monosomie 7 .....	98
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 .....	99
3.6.2.3.1 Whole Chromosome Paint .....	99
3.6.2.3.2 Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung .....	100
3.6.2.3.3 Vergleich von konventioneller Zytogenetik, FISH mit WCP und YACs .....	102
3.6.3 Übersicht der I-FISH Analysen von Fanconi Patienten .....	103
3.7 Vergleich der Auswertung von 200 und 1000 Interphasekernen bei der Interphase-FISH .....	103
3.8 Klinische Verläufe der Patienten .....	105
3.9 Statistische Auswertung .....	106
3.9.1 Chromosom 3 .....	106

---

3.9.2 Chromosom 7.....	110
3.9.3 Chromosom 3 und 7.....	114
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>118</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>134</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>135</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>153</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>179</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>180</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>182</b>

## Abkürzungen und Glossar

### Abkürzungen und wichtige Begriffe

AGC-Mix	Nukleotidgemisch aus dATP, dGTP und dCTP
AML	Akute myeloische Leukämie
Annealing	Zusammenlagerung komplementärer DNA- oder RNA-Stränge zu einem Doppelstrang
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AT	Ataxia Telangiectasia
bp	Basenpaare
BS	Bloom Syndrom
BSA	Rinderserumalbumin
CC	Konventionelle Zytogenetik
cDNA	Komplementäre DNA, die das Enzym Reverse Transkriptase anhand einer mRNA-Matrize synthetisiert. Dabei entsteht zuerst eine einzelsträngige DNA, deren Sequenz komplementär zur mRNA ist.
Chr.	Chromosom
CGH	Comparative Genomic Hybridization
Cot-1	Produkt aus Anfangskonzentration einzelsträngiger DNA ( $C_0$ ) und der Hybridisierungszeit (t)
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
Denaturierung	Trennung komplementärer Stränge in DNA-beziehungsweise RNA Einzelstränge
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
dim	diminished (engl. vermindertes Vorliegen von chromosomalem Material nach CGH-Analyse)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease

---

dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOP	Degenerate oligonucleotide primed
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
enh	enhanced (engl. vermehrtes Vorliegen von chromosomalem Material nach CGH-Analyse)
EtOH	Ethanol
FA	Fanconi Anämie
FAB	French American British Group
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
5-FdU	5-Fluordesoxyuridin
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierenden Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierenden Faktor
GTG	G-Banden durch Trypsinbehandlung und Giemsa-Färbung
GRA	Granulozyten
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leucocyte Antigen
I-FISH	Interphase-Fuoreszenz-in-situ-Hybridisierung
KCl	Kaliumchlorid
KM	Knochenmark
KMA	Knochenmarkausstrich
KMD	Knochenmark Direktpräparation
KMK	Knochenmarkzellen nach Kultur
KMT	Knochenmarktransplantation
LM	Lebensmonat
LYM	Lymphozyten
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MTX	Methotrexat
n	Anzahl

---

Na-Ac	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
Nr.	Nummer
NT	Nick-Translation
p	p-Arm der Chromosomen
PB	Peripheres Blut
PBA	Ausstrich von peripherem Blut
PBD	Direktpräparation aus peripherem Blut
PBD	Phosphat gepuffertes Detergenz
PBK	Periphere Blutzellen nach Kultur
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
q	q-Arm der Chromosomen
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
Sonde	DNA- oder RNA-Sequenz, die markiert ist und spezifisch an eine gesuchte Nukleinsäuresequenz bindet.
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TdR	Thymidin reagent
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
WBS	Williams-Beuren-Syndrom
WCP	Whole Chromosome Painting
YAC	Yeast Artificial Chromosome

## Nomenklatur Karyotyp und Chromosomenanomalien (nach ISCN, 1995)

<u>Beispiel</u>	<u>Beschreibung</u>
+5mar	Zusätzliches Marker-Chromosom 5
+i(7q)	Zusätzliches Isochromosom 7q
-7	Verlust des Chromosoms 7
10q-	Verkürzung des langen Arms von Chromosom 10
2p	Kurzer Arm Chromosom 2
2q	Langer Arm Chromosom 2
11p+	Verlängerung des kurzen Arms von Chromosom 11
add(3)(q11)	Zusätzliches genetisches Material unbekannter Herkunft am kurzen Arm von Chromosom 3 Bande q11
del(7q)	Deletion des langen Arms von Chromosom 7
der(7)t(7;11)(q35;q13)	Von Chromosom 7 abgeleitetes Chromosom
dup(1)(q24qter)	Duplikation der Bande q24qter des Chromosoms 1
ins	Insertion
inv(1)(p12p31)	Inversion der Bande p12p31 auf Chromosom 1
iso(3)(q10)	Isochromosom. Chromosom 3 mit nur gleichen Chromosomenarmen der Bande q11 bis qter
t(3;19)(q24q26)(p13.3)	Reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 3 und 19, Bruchstelle am langen Arm von Chromosom 3 in der Bande q24q26 und am kurzen Arm von Chromosom 19 in der Bande p13.3

## Nomenklatur der CGH

<u>Beispiel</u>	<u>Beschreibung</u>
rev ish dim(5)(q21q31)	Vermindert vorliegendes Material der Banden q21 bis q31 des Chromosoms 5
rev ish enh (3)(q13qter)	Zusätzlich vorliegendes Material der Banden q13 bis qter von Chromosom 3

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 43 Patienten mit Fanconi Anämie (FA) untersucht, deren Diagnose anhand der typischen erhöhten Chromosomenbrüchigkeit gegenüber Mitomycin C gesichert war. Die vorhandenen Daten der konventionellen Zytogenetik und der CGH zeigten bei 17 dieser Patienten einen Zugewinn von chromosomalem Material für die allen gemeinsame chromosomale Region 3q26q29 und bei 9 Patienten den Verlust chromosomalen Materials für die diesen Patienten gemeinsame chromosomale Region 7q21qter. Zuvor wurde in der Literatur nie von einer derart großen Anzahl von Fanconi Anämie Patienten mit Aberration von Chromosom 3q berichtet. Um diese Aberrationen schnell detektieren zu können und eine quantitative Aussage bezüglich dieser klonalen chromosomalen Aberrationen treffen sowie deren zeitlichen Verlauf beurteilen zu können, wurde ein Interphase-FISH Panel für Chromosom 3 und 7 etabliert und angewendet. Hierdurch konnten sowohl die Aberration von Chromosom 7 und die partielle Trisomie 3q als auch die durch die CGH nicht analysierte partielle Tetrasomie 3q sicher detektiert werden. Dabei wurden I-FISH Untersuchungen an Blut- und Knochenmarkproben durchgeführt und es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die klonalen chromosomalen Aberrationen der FA Patienten in den mononukleären Zellen des peripheren Bluts vorliegen und ein großer Zusammenhang zwischen den I-FISH Analysen von Knochenmark und peripherem Blut besteht. Die Aberrationen von Chromosom 3 und 7, welche zumeist als kombinierte Aberrationen auftraten, waren im Gegensatz zu anderen Aberrationen, welche bisher für FA Patienten in der Literatur beschrieben sind, nicht transient und zeigten darüber hinaus einen erheblichen Proliferationsvorteil.

Durch unsere Untersuchungen konnten erstmals zwei spezifische Aberrationen bei FA Patienten detektiert werden, welche einen direkten Zusammenhang mit dem Auftreten eines MDS oder einer AML aufweisen und einen negativen Risikofaktor bezüglich des Überlebens der FA Patienten darstellen. Deswegen sollten alle FA Patienten molekularzytogenetisch untersucht werden, um diese Aberrationen frühzeitig zu detektieren und im Falle der Detektion dieser Aberrationen eine baldige Stammzelltransplantation erwogen werden.

## Danksagung

Für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die freundliche Überlassung des Themas möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Heidemarie Neitzel bedanken. Durch ihre umfassende Kenntnis der wissenschaftlichen Literatur, die zu jeder Zeit bestehende Diskussionsbereitschaft sowie die großzügigen Arbeitsbedingungen in ihrem Labor wurde das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht.

Herrn Dr. Holger Tönnies danke ich ganz herzlich für seine tatkräftige Unterstützung und seine Geduld während dieser Arbeit. Sein Ideenreichtum und sein Wissen gaben mir in zahlreichen Diskussionen Anregung sowie Hilfestellung und ermöglichten das Wachsen dieser Arbeit. Unter seiner Leitung wurde dieses Projekt durchgeführt.

Für die hervorragende Anleitung und technische Unterstützung bei der Einarbeitung in die molekularzytogenetischen Methoden danke ich Frau Antje Gerlach und Frau Britta Teubner.

In der fast täglichen Zusammenarbeit mit allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik möchte ich die gegenseitige Hilfsbereitschaft und den persönlichen Kontakt hervorheben, die den Laboralltag wesentlich erleichtert und erheitert haben.

Herrn Dr. Wolfram Ebell danke ich für die Überlassung klinischer Daten für diese Arbeit und die tatkräftige Unterstützung bei deren Recherche.

Für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Daten möchte ich mich bei Herrn Dr. Tobias Willich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Sieglinde und Ernst Huber, die mir mein Studium und diese Promotion ermöglicht haben. Durch viel Geduld und Aufmunterung haben Sie dazu beigetragen, diese Arbeit zu vollenden.



## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Stefanie Teresa Huber, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Molekularzytogenetische Untersuchungen von klonalen Chromosomenveränderungen im Knochenmark und in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Fanconi Anämie Patienten: Nachweis und klinische Relevanz“, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin,

Stefanie Huber