

Kapitel 13

Bestimmung von klonalen Chromosomenveränderungen im Knochenmark von Fanconi-Anämie-Patienten

Prof. Dr. rer. nat. Heidemarie Neitzel

Dr. rer. nat. Holger Tönnies

Institut für Humangenetik, Genetische Beratungsstelle

Chromosomendiagnostik, Molekulare Zytogenetik

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Hintergrund

Bei Betroffenen mit Fanconi-Anämie (FA) kann es im Verlauf der Erkrankung zu Chromosomenveränderungen im Knochenmark kommen, die sehr wahrscheinlich durch die fehlerhafte Reparatur der DNA (Erbsubstanz) bedingt sind.

Durch die Identifikation von nunmehr 9 FA-Genen wird zunehmend klarer, dass die FA-Gene in die Reparaturprozesse der DNA (Erbsubstanz) einbezogen sind. In jeder normalen Zelle kommt es ständig zu DNA-Schäden, die aber durch zelleigene Reparaturmechanismen erkannt und wieder repariert werden.

Bei FA-Patienten können diese DNA-Schäden nicht präzise repariert werden, und es kommt dadurch zu offenen DNA-Brüchen oder zu falsch reparierten Brüchen, die zu Chromosomenveränderungen in den betroffenen Zellen führen.

Wenn eine Zelle, die eine solche Chromosomenveränderung trägt, einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellen im Knochenmark hat, so kann sie sich schneller vermehren und es entstehen sogenannte klonale Chromosomenveränderungen im Knochenmark. Das heißt, ausgehend von der Einzelzelle mit der Chromosomenveränderung entstehen viele Zellen mit derselben

Chromosomenveränderung. Die prognostische Bedeutung vieler dieser klonalen Veränderungen ist bis heute unklar. Es muss aber grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass derartig genetisch veränderte Zellen das Potential für eine Leukämie in sich tragen.

Am Virchow-Klinikum der Charité führen wir deshalb seit 1996 für FA-Betroffene Chromosomenanalysen aus dem Knochenmark durch, um die Bedeutung dieser Chromosomenveränderungen zu verstehen.

Dabei stellte sich heraus, dass bei einer Reihe von FA-Patienten zusätzliches Material von Chromosom 3 in den Knochenmarkzellen vorlag, und dass das Vorliegen von zusätzlichem Material aus dem langen Arm von Chromosom 3 eine deutlich schlechtere Prognose für die Betroffenen hat. Diese Chromosomenveränderung geht mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) oder einer akuten myeloischen Leukämie (AML) einher. Außerdem scheint eine vermehrte Neigung zu lebensbedrohlichen Infektionen zu bestehen.

Die Ergebnisse dieser Studie, die im Mai 2003 in der wissenschaftlichen Zeitschrift der Amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie (Blood) publiziert wurden¹, sind in der auf Seite 133 abgebildeten Tabelle zusammengefasst (Abb. 1).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Patienten mit Veränderungen in Chromosom 3 im Durchschnitt etwas älter sind und dass FA-Patienten aller Komplementationsgruppen betroffen sind. Die Patienten mit Veränderungen für Chromosom 3 entwickeln deutlich häufiger ein MDS oder eine AML. Und bei ihnen waren deutlich häufiger Knochenmarktransplantationen nötig, weil die Blutwerte sehr schlecht wurden und/oder gehäuft Infektionen auftraten.

Wir wissen heute, dass diese klonalen Chromosomenveränderungen nur in Granulozyten auftreten. Granulozyten spielen eine besonders wichtige Rolle bei der Abwehr von Infektionen (Immunabwehr). Dies erklärt möglicherweise, warum ein Teil

der FA-Patienten mit Veränderungen von Chromosom 3 an schweren Infektionen verstarb.

Ein weiteres Beispiel für eine prognostisch ungünstige Veränderung ist die Monosomie 7 (es liegt nur ein Chromosom 7 vor, das zweite ist verloren gegangen; oder es fehlt ein Stück aus dem langen Arm von einem Chromosom 7 = partielle Monosomie). Die Monosomie 7 geht ebenfalls mit einer schlechteren Prognose und einem höheren AML-Risiko einher.

	<u>Total</u>	<u>mit Veränd. auf Chrom. 3</u>	<u>ohne Veränd. auf Chrom. 3</u>
<u>Anzahl Patienten</u>	53	18	35
<u>Alter</u>			
Mittelwert (Monate)	141	149	125
von - bis (Monate)	34 - 463	95 - 463	34 - 442
<u>Geschlecht</u>			
männlich	28	11	17
weiblich	25	7	18
<u>Komplementationsgruppe:</u>			
FANCA	28	10	18
FANCC	4	4	0
FANCG	8	3	5
unbekannt	13	1	12
<u>Spontanreversion</u>	3	1	2
<u>Klinische Daten:</u>			
MDS	9	9	0
AML	5	4	1
MDS+AML	14	13	1
am Leben	44	11	33
Knochenmarktransplant.	20	12	8

Abb. 1: Tabelle aus der „Blood“-Publikation von Mai 2003: Gegenüberstellung von Patienten mit und ohne Veränderungen von Chromosom 3.

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

Durch unsere Untersuchungen konnten wir außerdem zeigen, dass der Nachweis der Chromosomenveränderungen bei FA-Patienten auch an Zellen des peripheren Blutes (aus Blutproben) möglich ist, da die veränderten Knochenmarkszellen aus dem Knochenmark ins Blut gelangen.

Die Tatsache, dass man die Chromosomenveränderungen auch im peripheren Blut nachweisen kann, bedeutet beim gegenwärtigen Stand des Wissens aber nicht, dass die jährliche Knochenmarkentnahme, die für alle FA-Patienten empfohlen wird (Standards for Clinical Care, Second Edition 2003, FARF), unterbleiben sollte, da bei der Knochenmarkentnahme auch die Zellmorphologie beurteilt wird, die nach wie vor das wichtigste Kriterium für die Beurteilung eines MDS oder einer Leukämie ist.

Hinzu kommt, dass wir bislang noch zu wenig gesicherte Daten haben, bei denen die Chromosomenbefunde aus dem Knochenmark mit dem peripheren Blut verglichen wurden. Die vorliegenden Daten für Chromosom 3 und für Chromosom 7 zeigen aber, dass wir die Chromosomenveränderung - mit nur einer Ausnahme - bei allen anderen Patienten auch im peripheren Blut nachweisen konnten. Dies entspricht einer Erfassungsrate von ca. 94%. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um diesen Wert zu bestätigen. Sollte sich dabei herausstellen, dass der Nachweis im peripheren Blut tatsächlich zuverlässig ist, könnten für die Zukunft sehr viel engmaschigere Verlaufskontrollen durch regelmäßige Blutuntersuchungen für alle FA-Betroffenen angeboten werden.

Bis dahin wird allen FA-Patienten empfohlen, die stabile Blutwerte bei normaler oder leicht verminderter Knochenmarkfunktion haben und keine klonalen Chromosomenveränderungen im Knochenmark aufweisen, ihr Knochenmark in jährlichen Abständen zytologisch und zytogenetisch untersuchen zu lassen.

Für FA-Patienten mit klonalen Chromosomenveränderungen und/oder bei Veränderung des Blutbildes wird empfohlen, die Knochenmarkentnahmen alle 3-6 Monate durchführen zu lassen (Standards for Clinical Care, Second Edition 2003, FARF). In allen Fällen ist es grundsätzlich sinnvoll, neben dem Knochen-

mark auch zeitgleich entnommenes peripheres Blut der FA-Patienten mitzusenden, um die o. g. Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus Knochenmark und Blut zu gewährleisten.

Im Virchow-Klinikum der Charité erfolgt bei allen FA-Patienten eine Untersuchung auf das Vorliegen möglicher Chromosomenveränderungen im Knochenmark. Diese Möglichkeit besteht aber selbstverständlich auch für alle FA-Patienten, die in anderen Kliniken betreut werden. In diesen Fällen ist es wichtig, uns frühzeitig vor der geplanten Knochenmarkentnahme zu informieren, um den Versand des Materials (Knochenmark und Blut) zu besprechen.

Neben den erwähnten Chromosomenveränderungen für Chromosom 3 und Chromosom 7 können Veränderungen auftreten, die andere Chromosomen betreffen. Deren prognostische Bedeutung für FA-Patienten ist heute noch unbekannt. Deshalb ist es von besonderer Wichtigkeit, die im Knochenmark gefundenen Chromosomenveränderungen so genau wie möglich zytogenetisch zu charakterisieren und in ihrem weiteren Verlauf zu beobachten. Im Folgenden soll deshalb eine Übersicht über die wichtigsten Methoden gegeben werden, mit denen die Chromosomenveränderungen untersucht werden.

Chromosomen und Chromosomenveränderungen

Normalerweise liegt in den Knochenmarkszellen ein diploider (zweifacher) Chromosomensatz vor, d. h., von jedem der Chromosomen 1 bis 22 gibt es eine doppelte Ausführung. Die beiden Kopien eines Paares werden als homologe Chromosomen bezeichnet. Die Geschlechts-Chromosomen weisen im weiblichen Geschlecht zwei X-Chromosomen auf, im männlichen Geschlecht ein X-Chromosom und ein Y-Chromosom.

Ein normaler Chromosomensatz hat somit 46 Chromosomen (weiblich: 46,XX; männlich: 46,XY). Die Chromosomenveränderungen, die bei einem Teil der FA-Patienten im Knochenmark auftreten, betreffen in der Regel unterschiedliche Chromosomen. Es kann zum Verlust von einzelnen Chromosomen kommen, so

dass nur noch eines der beiden homologen Chromosomen vorliegt (= Monosomie). Es können auch ganze Chromosomen in drei Kopien vorliegen (drei homologe Chromosomen = Trisomie). Oder es können zusätzlich sogenannte Marker-Chromosomen entstehen, die aus Anteilen unterschiedlicher Chromosomen zusammengesetzt sind. Nicht selten treten auch Veränderungen in der Chromosomenstruktur auf.

Komplexe Chromosomenveränderungen, die mehrere unterschiedliche Chromosomen einbeziehen, sind durch eine konventionelle Chromosomenanalyse nur sehr schwer oder gar nicht abzuklären. Aus diesem Grunde wenden wir verschiedene molekularzytogenetische Methoden an, um auch diese Veränderungen so genau wie möglich zu charakterisieren.

Wie werden die Chromosomenanalysen durchgeführt?

Konventionelle Chromosomenanalyse aus dem Knochenmark

Für die konventionelle Chromosomenanalyse wird das Knochenmark über Nacht in einem Nährmedium bei 37° C gezüchtet. Dem Medium werden Substanzen (Fluorodeoxyuridine oder Thymidin) zugesetzt, die bewirken, dass die Zellen 5 Stunden vor dem Eintritt in die Zellteilung arretiert werden. Am nächsten Morgen werden diese Substanzen entfernt. Danach bekommen die Zellen neues Nährmedium und treten 5 Stunden später in die Zellteilung ein, in der die Chromosomen sichtbar werden und präpariert werden können.

Bei der Chromosomenpräparation werden die Zellen zuerst durch hypotone Lösung zum Schwellen gebracht und anschließend mit Methanol/Essigsäure fixiert und auf Objektträger aufgebracht. Am nächsten Tag erfolgt dann eine Bandenfärbung der Chromosomen (GTG-Banden), die es erlaubt, jedes einzelne Chromosomenpaar der insgesamt 23 Paare des Menschen zu unterscheiden. Die Chromosomen werden dann mit einer Kamera, die auf einem

Mikroskop installiert ist, aufgenommen. Danach werden die Bilder im Computer digitalisiert. Im Anschluss können die einzelnen Paare am Bildschirm einander zugeordnet werden. Dabei entsteht ein sogenanntes Karyogramm, auch als Karyotyp bezeichnet (Abb. 2). Die Befundung der Chromosomen erfolgt im Anschluss durch erfahrene Zytogenetiker.

Für die Knochenmarkanalysen ist angestrebt, möglichst 50 Zellen auf diese Weise auszuwerten, da nur dann sogenannte Mosaikere erfasst werden können (nicht zu verwechseln mit den Mosaiken, die in Bezug auf die MMC-Sensitivität der weißen Blutkörperchen bei FA-Patienten vorkommen können). Bei den hier gemeinten

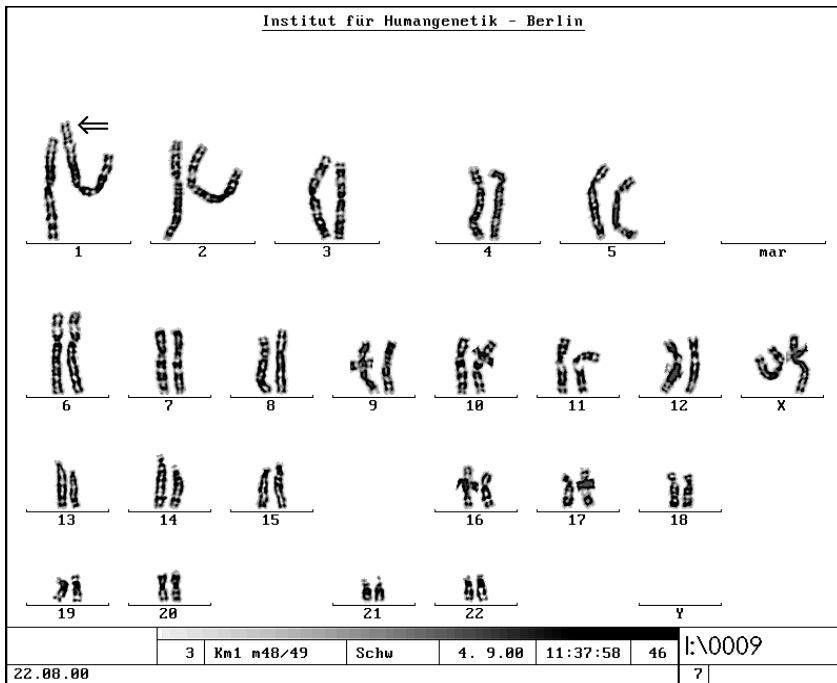


Abb. 2: Karyotyp aus dem Knochenmark einer FA-Patientin nach GTG-Bänderung. Anhand des Bandenmusters wurden die homologen Chromosomen eines jeden Paares zugeordnet. Die Chromosomenpaare 2 bis 22 und die beiden X-Chromosomen zeigen einen Normalbefund. Am kurzen Arm von Chromosom 1 fällt eine Verlängerung auf, die auf eine Verdopplung des oberen Bereichs von Chromosom 1 zurückgeht (Pfeil).

Mosaiken im Knochenmark liegen Chromosomenveränderungen nur in einem Teil der Zellen vor, während andere Zellen einen normalen Karyotyp aufweisen oder aber andere Veränderungen zeigen.

Bei allen FA-Patienten erfolgt parallel zur konventionellen Chromosomenanalyse die Durchführung einer CGH (siehe unten). Besonders wichtig ist die CGH bei Patienten mit fortgeschrittenem Knochenmarkversagen, weil bei ihnen häufig nur wenige Metaphasen konventionell zytogenetisch analysiert werden können.

Außerdem wird eine Interphase-FISH für Chromosom 3 und Chromosom 7 durchgeführt, weil diese Veränderungen mit einer schlechteren Prognose einhergehen und es deshalb wichtig ist, sie so sicher wie möglich zu erfassen. Aus dem Knochenmark, das nicht verbraucht wurde, wird DNA präpariert und aufgehoben, um grundsätzlich die Möglichkeit zu haben, spätere Nachuntersuchungen durchzuführen.

Molekularzytogenetische Analysen aus dem Knochenmark

1. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Alle sogenannten molekularzytogenetischen Techniken basieren auf dem sehr einfachen Prinzip der Paarung von DNA-Einzelsträngen. Die DNA, die in den Chromosomen vorliegt, besteht stets aus einem Doppelstrang, in dem die vier Basen der Erbsubstanz (Adenin = A; Thymin = T; Cytosin = C; Guanin = G) vorliegen. Ein bestimmter Abschnitt der DNA kann zum Beispiel folgendermaßen aussehen:

```
A - T - C - G - G - T - A - C - C - G - A - T - T - A - A - C - G - A - T - C
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
T - A - G - C - C - A - T - G - G - C - T - A - A - T - T - G - C - T - A - G
```

Abb. 3: DNA-Wasserstoffbrücken - im DNA-Doppelstrang kann stets nur A mit T und C mit G paaren.

Die beiden Stränge der DNA sind über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Diese Wasserstoffbrücken werden bei molekularzytogenetischen Analysen künstlich durch Hitzeeinwirkung aufgebrochen, so dass die DNA anschließend als Einzelstrang vorliegt.

Bringt man diese Einzelstränge in einer Lösung zusammen, so finden sich die beiden DNA-Stränge wieder (die sog. komplementären Stränge), die zueinander passen und sich wieder zu einem Doppelstrang zusammenlagern. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet.

Es ist möglich, DNA eines bestimmten Chromosoms oder eines Teils eines Chromosoms durch einen Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Anschließend wird diese DNA in den einsträngigen Zustand versetzt, man bezeichnet sie dann als Sonde.

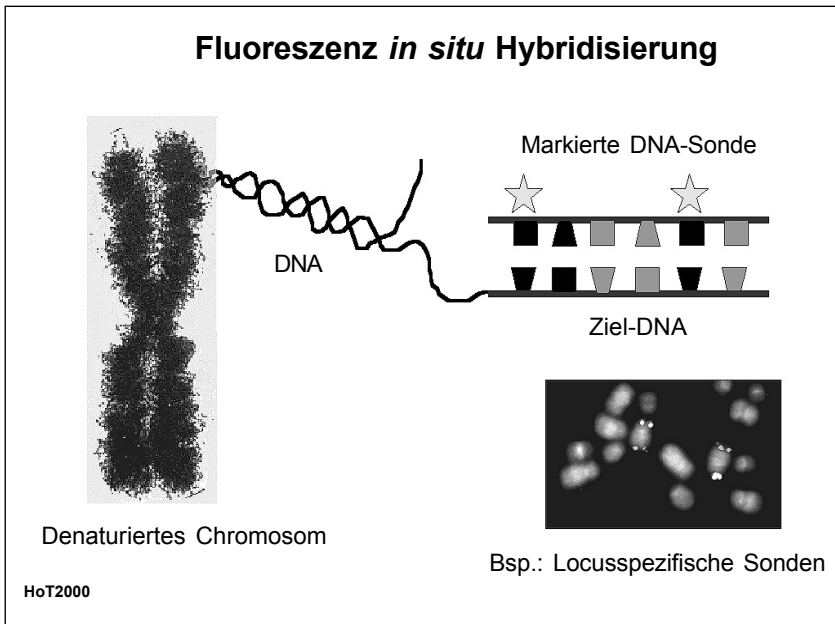


Abb. 4: Schema der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH): Die Fluoreszenz-markierte DNA der Sonde bindet auf dem Chromosom, das den passenden DNA-Strang aufweist (Ziel-DNA) und kann dann an einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Parallel dazu werden die Chromosomen des Patienten, die sich auf einem Objektträger befinden (siehe konventionelle Chromosomenpräparation), ebenfalls in den einzelsträngigen Zustand gebracht. Dann gibt man die Fluoreszenz-markierte DNA in einer Lösung auf die Chromosomen des Patienten und inkubiert die Objektträger über Nacht bei 37°C. In dieser Zeit finden die Fluoreszenz-markierten DNA-Moleküle die „passenden“ (komplementären) Bereiche auf den Chromosomen und binden dort (Abb. 4). Durch ein Fluoreszenzmikroskop kann man dann am nächsten Tag die Chromosomen und die Fluoreszenz-markierten Bereiche farbig sichtbar machen.

Eine FISH ist auf der vorderen Umschlagseite des Fanconi-Anämie-Handbuchs dargestellt: Die Chromosomen des Patienten sind darauf in Blau angefärbt, die Kontrollregion, die eine Identifikation des Chromosoms 7 erlaubt, ist durch rote Fluoreszenz markiert. Der untere Bereich des Chromosoms 7, der bei der akuten myeloischen Leukämie häufig auf einem der beiden Chromosomen 7 fehlt, wurde durch grüne Fluoreszenz sichtbar gemacht. Da bei diesem Patienten die grüne Fluoreszenz auf beiden Chromosomen nachweisbar ist, kann dem behandelnden Arzt und dem Patienten bzw. seinen Eltern die beruhigende Mitteilung gemacht werden, dass keine Monosomie 7 sondern ein Normalbefund vorliegt.

Die FISH-Technik kann auch an *Zellkernen* durchgeführt werden. Dies ist für solche Patienten wichtig, bei denen das Knochenmarkversagen so weit fortgeschritten ist, dass nicht mehr ausreichend teilungsfähige Zellen vorliegen, die für eine Chromosomenpräparation benötigt werden. Das Gleiche trifft auch auf Patienten kurz nach einer Knochenmarktransplantation zu.

Auch eine solche an Zellkernen durchgeführte FISH-Technik veranschaulicht das Foto auf der vorderen Umschlagseite: Links oben liegt neben den Chromosomen ein blauer runder Zellkern, in dem deutlich zwei rote und zwei grüne Fluoreszenzsignale sichtbar sind, die den entsprechenden Bereichen auf dem Chromosom 7 entsprechen. Man kann also auch durch die Analyse von Zellkernen, die als Interphase-FISH bezeichnet wird, die

Diagnose stellen, dass bei diesem Patienten keine Monosomie 7 vorliegt. Als Sonden, also als Fluoreszenz-markierte DNA, kann man unterschiedlich große Stücke eines Chromosoms verwenden: einzelne komplette Chromosomen oder kleinere Stücke aus einem Chromosom. Welche Sonden für die weitere Abklärung eingesetzt werden, muss in jedem Einzelfall entschieden werden.

Bei dem in Abb. 2 dargestellten Fall kann ein Zytogenetiker bereits aus dem Bandenmuster des zusätzlichen Chromosomenstückes schließen, dass es sich um den oberen Bereich von Chromosom 1 handelt. Hier würde man den weiteren Nachweis durch eine molekularzytogenetische Analyse mit einer Sonde aus dem kurzen Arm von Chromosom 1 führen.

Bei vielen anderen klonalen Chromosomenveränderungen im Knochenmark ist eine solche Zuordnung des zusätzlichen Chromosomenstückes oder z. B. eines zusätzlichen kleinen Marker-Chromosoms nicht so einfach möglich. In diesen Fällen wird zur diagnostischen Abklärung die CGH eingesetzt.

2. Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

Auch die CGH (vergleichende genomische Hybridisierung) basiert auf dem Prinzip, dass sich passende (komplementäre) DNAs finden und eine Bindung eingehen. Für die CGH wird aus dem Knochenmark die DNA isoliert.

Dazu muss man die äußere Hülle der Zellen sprengen und alle übrigen Zellbestandteile, die überwiegend Eiweiße (Proteine) sind, von der DNA entfernen. Dies ist mit verschiedenen Methoden möglich, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Anschließend wird die DNA in Alkohol gefällt. Sie wird dadurch als weißer Faden sichtbar, den man isolieren kann. Gibt man diesen DNA-Faden, der die Erbsubstanz aller Knochenmarkzellen enthält, wieder in Wasser, so löst er sich und kann im Anschluss für die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt werden.

Die gesamte DNA aus den Knochenmarkszellen wird anschließend mit einem grünen Farbstoff Fluoreszenz-markiert (bezeichnet als Test-DNA). Parallel dazu wird die DNA einer Person isoliert, die einen normalen Chromosomensatz hat (bezeichnet als Kontroll-DNA). Diese wird rot markiert. Anschließend werden beide DNAs in die Einzelstränge aufgespalten. Außerdem benötigt man Chromosomenpräparate von einer männlichen Person mit einem normalen Chromosomensatz 46,XY (Kontrollmetaphasen). Die Chromosomen werden auf den Objektträgern ebenfalls in den einzelsträngigen Zustand versetzt.

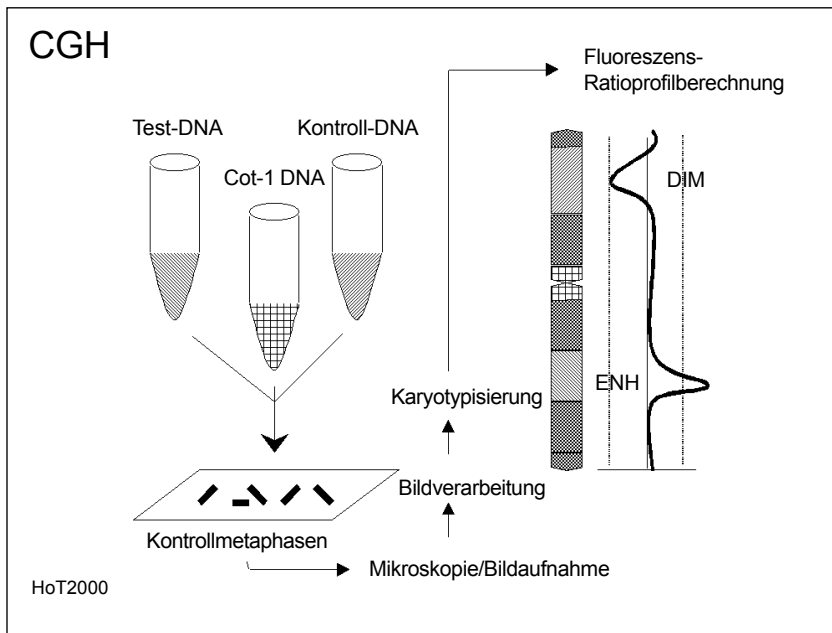


Abb. 5: Schematische Übersichtsdarstellung des Prinzips der Comparative Genomic Hybridization (CGH). Die grün markierten (Test-) und rot markierten (Kontroll-) DNAs werden unter Zusatz von unmarkierter Cot-1 DNA auf normale Chromosomen (Metaphasespreitungen) hybridisiert. Nach Bildaufnahme und Karyotypisierung erfolgt die digitale Quantifizierung der Grün-zu-Rot-Signalverhältnisse für jedes homologe Chromosom. Das Ergebnis der Einzelpunktmessungen über die Längsachsen der Chromosomen wird in Form eines Ratioprofils dargestellt (ENH = engl. vermehrt; DIM = engl. vermindert).

Anschließend gibt man die grüne einsträngige Test-DNA und die rote einsträngige Kontroll-DNA in einer Lösung auf die einsträngigen Chromosomen. Wie bei der FISH beschrieben, finden die beiden DNAs in der Lösung die passenden DNA-Stränge auf den Chromosomen und binden dort (Abb. 5).

Da die DNA für alle Chromosomen (d. h. die gesamte Erbsubstanz) vorhanden ist, dauert die Hybridisierung zwei bis drei Tage, bis die DNA die passenden Bereiche auf den Chromosomen gefunden hat und dort binden konnte.

Es wurde bereits weiter oben das Beispiel einer Chromosomenveränderung angesprochen, bei der sich in Zellen des Knochenmarks der obere Bereich des Chromosoms 1 auf einem der beiden Chromosomen 1 verdoppelt hat, während er auf dem anderen Chromosom 1 unverändert einmal vorkommt. Für diesen Bereich sind somit drei Kopien statt normalerweise zwei Kopien in der DNA vorhanden und sie sind grün markiert.

Die Kontroll-DNA stammt aus normalen Zellen und hat demzufolge zwei Kopien, die rot markiert sind. Diese beiden DNAs konkurrieren um die Bindungsstellen auf dem Chromosom 1. Da die grüne DNA dreifach vorliegt, kann sie auf dem oberen Bereich des Chromosoms 1 häufiger binden als die rote DNA, die nur zwei Kopien aufweist. Das hat zur Folge, dass nach der Hybridisierung in diesem Bereich mehr Grün als Rot vorhanden ist.

Nach der Hybridisierung werden die Chromosomen wie bei der konventionellen Chromosomenanalyse durch ein Mikroskop, das in diesem Fall mit einer sehr sensitiven Kamera ausgerüstet ist, aufgenommen. Nach Erstellung des Karyogramms wird mittels eines Computerprogrammes der Anteil von grüner zu roter Fluoreszenz für jedes Chromosom bestimmt (Ratioprofilbestimmung).

Anschließend erfolgt eine graphische Darstellung der Anteile grüner DNA zu roter DNA (Abb. 6). Wenn der Anteil von grüner zu roter DNA gleich ist, verläuft das Ratioprofil für alle Chromosomen auf der Mittellinie, so wie bei den Knochenmarkzellen des FA-Patienten in Abb. 6.

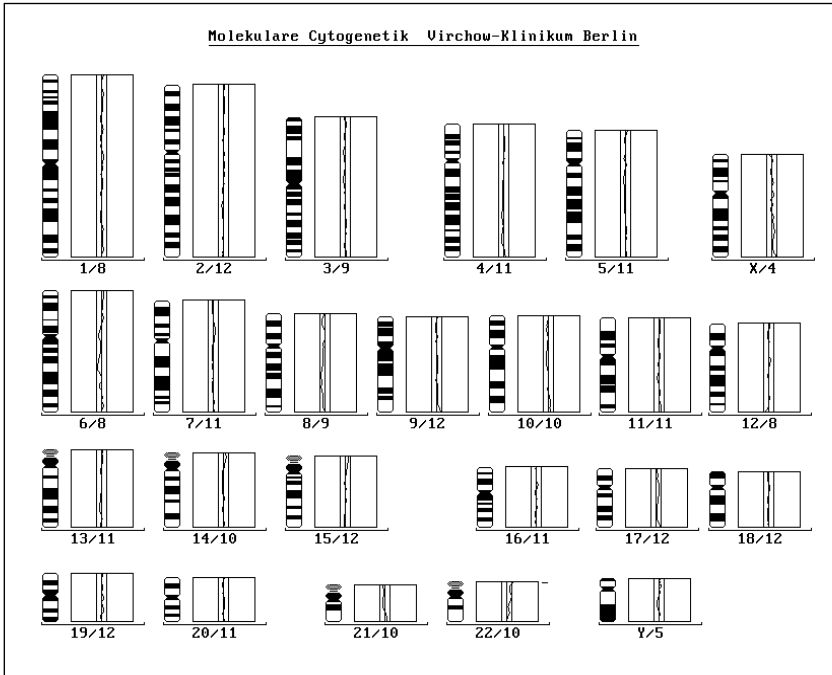


Abb. 6: CGH Summenprofile an DNA aus Knochenmarkszellen eines männlichen FA-Patienten nach Hybridisierung mit männlicher Kontroll-DNA auf männliche Metaphasen. Die Auswertung erfolgte nach Karyotypisierung. Die Chromosomen sind schematisch dargestellt. Rechts daneben ist jeweils das Ratioprofil angegeben. Man erkennt, dass die Profile für alle Chromosomen auf der Mittellinie verlaufen, d. h., dass gleiche Anteile von grüner Test-DNA des Patienten und roter Referenz-DNA vorliegen. Es liegen somit keine chromosomalen Veränderungen in der DNA aus Knochenmarkszellen des Patienten vor.

Wenn die grüne Test-DNA aus dem Knochenmark eine Chromosomenveränderung aufweist, bei der zusätzliches Material eines Chromosoms vorliegt, so führt dies zu einem Profilausschlag nach rechts. Liegt dagegen Material vermindert, also nur in einer Kopie vor, so führt dies zu einem Profilausschlag nach links. Die Abb. 7 zeigt den Profilverlauf bei einem FA-Patienten, der eine Chromosomenveränderung im Knochenmark aufweist. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Profilverlauf im langen Arm von Chromosom 3 extrem stark nach rechts verschoben ist, d. h.,

dass Material aus dem langen Arm von Chromosom 3 in den Knochenmarkszellen vermehrt vorliegen muss. Die anschließende FISH-Analyse ergab, dass im Knochenmark dieses Patienten insgesamt vier statt der normalen zwei Kopien vorliegen.

Der enorme Vorteil der CGH ist, dass man mit dieser Technik lediglich die DNA aus dem Knochenmark des Patienten braucht, um zu einer Diagnose zu gelangen. Dies ist besonders wichtig für Patienten, die zunehmendes Knochenmarkversagen zeigen, und deshalb nur noch wenige teilungsfähige Zellen im Knochenmark haben, so dass eine konventionelle Chromosomenanalyse oft schwierig ist. Die CGH in Verbindung mit der Interphase-

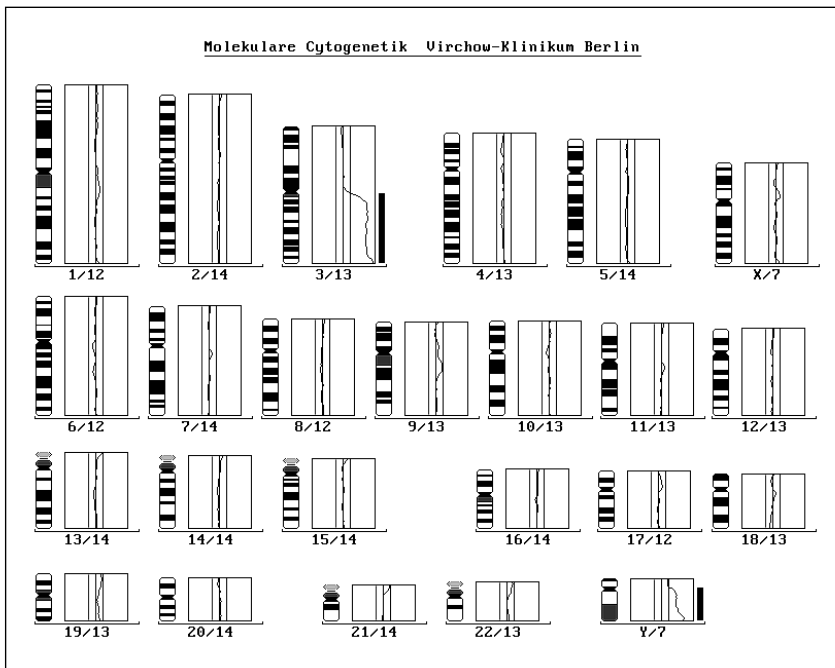


Abb. 7: CGH Summenprofile an DNA aus Knochenmarkszellen eines männlichen FA-Patienten nach Hybridisierung mit männlicher Kontroll-DNA auf männliche Metaphasen. Man erkennt deutlich, dass das Profil im langen Arm von Chromosom 3 extrem nach rechts verschoben ist. In der grünen DNA des Patienten müssen demnach mehr als zwei Kopien dieses Bereichs vorliegen. Alle übrigen Chromosomen zeigen normalen Profilverlauf.

FISH ermöglicht auch bei diesen Patienten eine sichere Diagnosestellung z. B. über das Vorliegen einer Monosomie 7.

3. Mikrodissektion

Einige FA-Patienten weisen, wie bereits beschrieben, sogenannte Mosaik auf. Das bedeutet, dass im Knochenmark Zellen nachweisbar sind, die einen normalen Chromosomensatz haben, und solche, die eine Chromosomenveränderung zeigen. Wenn der Anteil der Zellen mit der Chromosomenveränderung sehr gering ist, ist es auch mit CGH nicht möglich zu bestimmen, um welches Material es sich handelt. In diesen Fällen wird die Methode der Mikrodissektion angewendet (Abb. 8).

Dabei werden die Chromosomen wie bei der konventionellen Chromosomenpräparation vorbereitet. An einem speziellen Mikroskop, das mit einem Mikromanipulator ausgerüstet ist, werden die Chromosomen sichtbar gemacht, um das Chromosom, das die Chromosomenveränderung aufweist, identifizieren zu können. Das veränderte Chromosom wird dann mit einer sehr feinen Glasnadel von der Glasoberfläche des Objektträgers „heruntergekratzt“ (Mikrodissektion) und in ein kleines Reaktionsgefäß überführt. In der Regel sind ca. fünf auf diese Weise gewonnene Chromosomen ausreichend, um die Analyse durchzuführen. Das bedeutet, dass selbst bei Veränderungen im Knochenmark, die nur in wenigen Zellen vorliegen, meistens eine Zuordnung des veränderten Materials möglich ist.

Nach der Mikrodissektion der Chromosomen wird die DNA isoliert und im Reagenzglas vermehrt. Das Verfahren hierzu nennt man DOP-PCR (= Degenerated Oligoprimmer Polymerase Chain Reaction). Auf die näheren Einzelheiten der DOP-PCR soll hier nicht eingegangen werden. Diese DNA-Vermehrung ist nötig, weil die Menge der durch Mikrodissektion gewonnenen DNA extrem gering ist (ca. 0,000 000 000 0005 Gramm). Nach der Vermehrung der DNA wird sie, wie oben beschrieben, mit Fluoreszenzfarbstoff markiert und durch FISH auf normale Chromosomen hybridisiert. Damit ist es möglich zu identifizieren, von welchem Chromosom dieses veränderte Material stammt.

Zusätzlich erfolgt zur Kontrolle die Hybridisierung auf die Chromosomen des Patienten, um sicher zu gehen, dass man das „richtige“ Stückchen des Chromosoms „gekratzt“ hat.

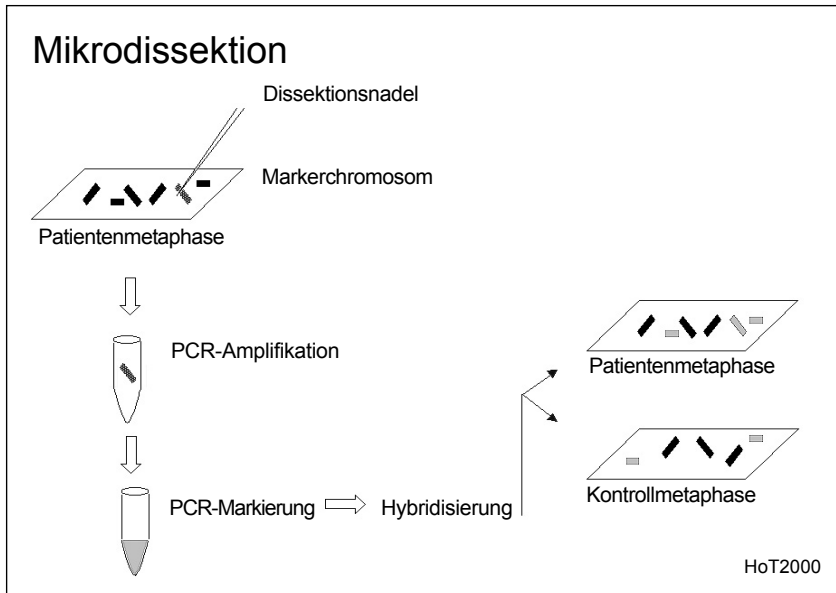


Abb. 8: Schematische Übersichtsdarstellung des Prinzips der Mikrodissektion mit anschließender Hybridisierung der markierten DNA auf Chromosomen des Patienten und einer Kontrolle. Die mit einer feinen Glasnadel dissektierte DNA eines veränderten Chromosoms wird mittels PCR vervielfältigt und anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Diese DNA dient für eine FISH-Hybridisierung als Sonde und markiert somit die homologen Bereiche der Chromosomen, aus denen sie sich zusammensetzt.

Freiwilligkeitsrechte

Die Durchführung der molekularzytogenetischen Untersuchungen, die derzeit zum Teil noch Forschungscharakter haben, erfolgt erst nach dem Abschluss der konventionellen Chromosomenuntersuchung an dem aufbewahrten Material. Da die Knochenmarkpunktionen im Rahmen der Verlaufskontrolle in erster Linie zur Beurteilung der Zytologie vorgenommen werden, ent-

stehen den Patienten somit keine zusätzlichen Risiken oder Belastungen.

Die Menge des Knochenmarks, das für die zytogenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchungen insgesamt benötigt wird, ist mit 5 bis 10 ml (das entspricht einer kleinen Spritze zur Blutentnahme) vergleichsweise gering. Ob ein Patient oder seine Eltern das Einverständnis für molekularzytogenetische Analysen an dem vorliegenden Material geben möchten oder nicht, bleibt ihnen selbstverständlich völlig selbst überlassen.

Auch wenn das Einverständnis einmal zugesagt wurde, kann es jederzeit und ohne Begründung wieder zurückgezogen werden. Es ist gewährleistet, dass alles Material und sämtliche Informationen, die von dem Patienten gesammelt wurden, in einem solchen Fall vernichtet werden.

Die Untersuchungen werden in enger Kooperation mit Herrn Dr. med. Ebell durchgeführt, der an der Klinik für allgemeine Pädiatrie und Knochenmarktransplantation, Charité - Campus Virchow-Klinikum der Universitätsmedizin Berlin für die medizinische Betreuung der FA-Patienten verantwortlich ist. Außerdem besteht eine enge Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Digweed (Institut für Humangenetik, Charité Berlin) und Herrn Prof. Dr. Schindler (Humangenetik der Universität Würzburg), die im Zusammenhang mit der Bestätigung der FA-Diagnose, der Zuordnung von Patienten zu einzelnen Komplementationsgruppen sowie der Frage von Mutationen in den FA-Genen spezielle Untersuchungen durchführen.

[Siehe u. a. auch Kapitel 17, 18, 20 und 22. Die Kontaktadressen der in diesem Handbuch mit eigenen Beiträgen vertretenen Fanconi-Anämie-Diagnose- und Forschungsinstitute finden Sie unter den Namen der jeweiligen Autoren im Anhang I.]