

Aus dem Institut für Humangenetik

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. T. Haaf

**Der zeitliche Verlauf von Parametern des Zellzyklus bei  
Patienten mit Fanconi Anämie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Yvonne Kochler

aus Ehingen

Würzburg, Februar 2011

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Eyrich Matthias

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2011

Die Promovendin ist Ärztin

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Fanconi Anämie: klinischer Phänotyp und Symptomatik	1
1.2 Gene	2
1.3 Diagnostik (Zytogenetik, Flowzytometrie, Komplementationsanalyse)	3
1.4 Therapieansätze	4
1.5 Fragestellung	6
<b>2. Methoden</b>	<b>7</b>
2.1 Zellzyklusanalyse	7
2.2 Parameter der Zellzyklusanalyse und ihre Beeinflussung	10
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>13</b>
3.1 Beispiele für Standardverläufe	14
3.2 Beispiele für variable Verläufe	19
3.3 Beispiele für die Entwicklung eines somatischen Mosaiks	27
3.4 Änderungen des Verlaufs durch Knochenmarkstransplantation	34
3.5 Zusammenfassende Darstellung der Datenlage aller Patienten	52
3.6 Statistische Auswertung	54
<b>4. Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1 Bedeutung der eigenen Ergebnisse	58
4.2 Diskussion der Fehlermöglichkeiten	62
4.3 Möglichkeiten der zukünftigen Verbesserung	62
4.4 Diskussion im Zusammenhang	65
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7. Werteverzeichnis</b>	<b>70</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Fanconi Anämie: klinischer Phänotyp und Symptomatik

Die Fanconi Anämie (FA) wurde 1927 erstmals von dem Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi an drei Brüdern beschrieben (Fanconi 1927). Es handelt sich hierbei um eine Krankheit mit rezessivem Erbgang (Fanconi 1967), deren Krankheitsbild eine große Heterogenität aufweist (de Kerviler et al. 2000), welche eine frühzeitige Diagnostik erschwert und oft verhindert. Das Krankheitsbild umfasst neben Störungen der Hämatopoiese mannigfaltige kongenitale Fehlbildungen und eine Hyperpigmentierung der Haut. Die Hyperpigmentierung ist das häufigste Merkmal bei Patienten mit FA und tritt in Form von Café-au-Lait-Flecken und dunkel pigmentierter Haut an Stamm, Hals, Leiste und Achseln auf. Zu den kongenitalen Fehlbildungen gehören u.a. Mikrozephalie, Minderwuchs, Radialstrahldeformitäten, fehlende oder hypoplastische Daumen, aplastische bis hypoplastische und ektope Nieren, vesico-urethrärer Reflux, testikuläre Hypoplasie und Atresien im Bereich des Gastrointestinaltraktes (de Kerviler et al. 2000). Ein niedriges Geburtsgewicht ( $\leq 2500\text{g}$ ) ist typisch (Alter 1993). Außerdem fallen sowohl äußerlich sichtbare, als auch innere Fehlbildungen des Ohres auf, die mit Taubheit einhergehen können (de Kerviler et al. 2000).

Die Störungen der Hämatopoiese treten aufgrund eines progredienten Knochenmarksversagens auf, das gewöhnlich mit Erreichen des frühen Schulkindalters beginnt (Landmann et al. 2004).

Das Knochenmarksversagen beginnt typischerweise mit einer Thrombopenie, anschließend entwickelt sich innerhalb weniger Jahre eine schwere aplastische Anämie mit Panzytopenie (Frohnmayr und Frohnmayr, 2005). Die Folge der Zytopenien sind Schwäche, Müdigkeit, Kurzatmigkeit sowie wiederholte schwere Infektionen und unkontrollierte Blutungen, die nicht selten tödlich enden (Frohnmayr und Frohnmayr 2005). Nach dem ersten Auftreten der Anämie beträgt die mittlere Überlebenszeit ca. 5 Jahre (de Kerviler et al 2000). Die mittlere Gesamtüberlebenszeit wird vom IFAR (International Fanconi Anemia Registry) mit 25 Jahren angegeben (Blanche et al. 1991).

FA-Patienten haben zudem ein erhöhtes Risiko, Malignome zu entwickeln. Am häufigsten ist hierbei die Akute Myeloische Leukämie (AML) (10 % der Patienten entwickeln diese bis zu einem Alter von 48 Jahren) mit einem Häufigkeitsgipfel um das 20. Lebensjahr (LJ). Nach dem 20. LJ nimmt die Inzidenz von bestimmten soliden Tumoren, wie Ösophageal-, Kopf-, Hals- und Vulvakarzinomen (29 % bis zu einem Alter von 48 Jahren), zu (Rosenberg et al. 2003). Das Auftreten von sogenannten klonalen chromosomalen Veränderungen (Monosomie 7 oder Duplikation 3q) im Knochenmark spricht nach Meinung der meisten Experten für einen Übergang in eine aggressivere Blutbildungsstörung (Frohnmayr und Frohnmayr 2005).

Die Hämatopoiesestörungen und das erhöhte Tumorrisiko sind die Folge einer vermehrten genetischen Instabilität, die in allen Zellen von FA-Patienten zu finden ist. Die Zellen weisen eine erhöhte spontane sowie induzierte Chromosomenbrüchigkeit auf, die sich durch eine vermehrte Empfindlichkeit gegenüber exogenen und endogenen

Schädigungsfaktoren erklären lässt. Zu diesen Faktoren gehören verschiedene Chemikalien, insbesondere bifunktionelle alkylierende Substanzen (Mitomycin C, Diepoxybutan) sowie reaktive Sauerstoffmoleküle (Kalb und Höhn 2003). Letztere spielen offenbar bei der Fanconi Anämie eine besondere Rolle, da FA-Zellen empfindlicher als Kontrollzellen gegenüber Luftsauerstoff sind (Schindler und Hoehn, 1988).

## 1.2 Gene

Durch die endogenen oder exogenen Schädigungsfaktoren entstehen in der DNA Quervernetzungen und Doppelstrangbrüche, die normalerweise durch ein spezielles Reparatursystem mittels Rekombinationsreparatur behoben werden. Dieses Reparatursystem ist derzeit noch nicht vollständig erforscht, aber es gibt Hinweise darauf, dass Genprodukte der FA-Gene beim Reparaturprozess eine wichtige Rolle spielen und somit eine Mutation in diesen Genen zu einer defekten Reparatur und damit zu einer Anhäufung von DNA-Schäden in der Zelle führt (Demuth et al. 2003; Thompson et al. 2005).

Bisher sind 14 FA-Komplementationsgruppen bekannt, denen jeweils ein bestimmter Gendefekt zugrunde liegt. Sie sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet: FA-A, FA-B, FA-C, FA-D1, FA-D2, FA-E, FA-F, FA-G, FA-I, FA-J, FA-L, FA-M, FA-N, FA-O. Den Komplementationsgruppen konnte jeweils ein Gen zugewiesen werden (Kalb R et al. 2007a; Vaz et al. 2010). Mit Ausnahme der Komplementationsgruppen FA-D1 (BRCA2) und FA-N (PALB2) gibt es keinen Gen-spezifischen Phänotyp. Vielmehr scheint die Art der jeweiligen Mutation, bzw. das Vorhandensein von Restprotein auf die Ausprägung und den Verlauf der Krankheit Einfluss zu nehmen (Nevelin et al. 2009). Einige Beobachtungen legen allerdings nahe, dass Patienten der Komplementationsgruppe FA-G früher an AML erkranken und dass Patienten der Komplementationsgruppe FA-D2 im Durchschnitt schwerer betroffen sind (Kalb et al. 2007b). Zudem scheinen bestimmte Mutationen in der Gruppe FA-C mit weniger somatischen Auffälligkeiten verbunden zu sein (Demuth et al. 2003). In Deutschland ist die Komplementationsgruppe FA-A mit etwa 60 % am häufigsten (Gross, 2003).

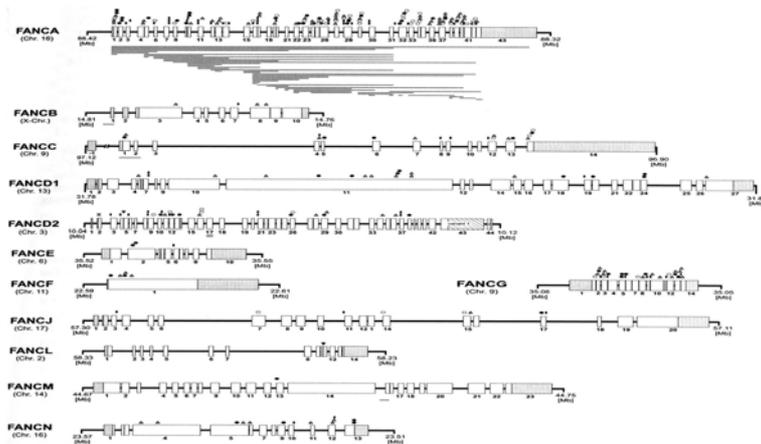


Abbildung 1.1: Relative Größe, Exon / Intron Struktur und Mutationsspektren der bekannten Fanconi Anämie Gene. Durch Mutation bedingte Veränderungen sind durch verschiedene Symbole oberhalb des Gens markiert. Symbolschlüssel: ■ aberrantes Spleißen, ▼ große Insertion, ● nonsense Mutation, ◻ missense Mutation, Δ kleine Deletion/Insertion oder Duplikation (Kalb et al. 2007a).

### 1.3 Diagnostik (Zytogenetik, Flowzytometrie, Komplementationsanalyse)

Der traditionelle Weg der Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose besteht in dem Nachweis einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit in Anwesenheit von Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB) mittels Chromosomenbruchanalyse. Hierzu werden in der Regel mononukleäre Zellen des peripheren Blutes nach 72-stündiger Kurzzeitkultur verwendet. Eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit lässt sich auch an fetalen Zellen (z.B. mittels Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese gewonnen), zur Pränataldiagnostik verwenden (Auerbach 1995).

Ein alternatives Verfahren ist die Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie an Lymphozyten (Kubbies et al. 1985; Rabinovitch et al, 1988; Seyschab et al, 1995). Dieses Verfahren macht sich die Tatsache zunutze, dass bei FA-Patienten Zellen am Übergang von der S- in die G2-Phase akkumulieren. Geschädigte bzw. nicht reparierte Zellen, die phasenspezifisch einen verdoppelten Chromosomensatz besitzen (4cDNA-Gehalt), häufen sich in der frühen G2-Phase an und können aufgrund ihres 4cDNA-Gehaltes mithilfe der Durchflusszytometrie erfasst werden. Im Gegensatz zu Gesunden haben FA-Patienten einen erhöhten G2-Phasen-Wert. Ein klinisch verwertbarer Zusammenhang zwischen der Höhe des G2-Phasen-Wertes und dem Stadium der Krankheit wird bisher nicht postuliert, jedoch ist diese Frage nicht abschließend geklärt (Schindler et al. 2003; 2007).

Bei einigen FA-Patienten wurden bimodale Verteilungen der Chromosomenbruchraten bzw. G2-Phasen-Werte ermittelt, die zwischen den Werten von Gesunden und den Werten von Personen mit FA liegen. Diese intermediären Befunde reflektieren das Auftreten einer somatischen Reversion („Selbstkorrektur“) in einem der mutierten

Allele in einer hämatopoietischen Vorläuferzelle. Die von dieser somatisch revertierten Zelle derivierten Blutzellen weisen keine erhöhte Sensitivität gegen MMC und DEB mehr auf und sie besitzen offensichtlich einen Selektionsvorteil gegenüber Zellen mit zwei defekten Allelen. Im Laufe der Zeit werden alle Zellen des peripheren Blutes durch diese neue Zelllinie ersetzt, wodurch sich in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes vollständig normale G2-Phasen-Werte ergeben und die Blutzellen somit nicht mehr zur FA-Diagnostik geeignet sind. Bei Verdacht auf Mosaikbildung wird die Chromosomenbruch- bzw. Zellzyklusanalyse deshalb an Fibroblastenkulturen durchgeführt. Eine Mosaikbildung in einer gemeinsamen hämatopoietischen Vorläuferzelle führt häufig zu einer Besserung der hämatologischen Situation eines FA-Patienten (Gross 2003). Bisher haben sich bei FA-Patienten mit den Komplementationsgruppen FA-A, FA-C, FA-D1, FA-D2 und FA-L Mosaikkonstellationen entwickelt, wobei die Komplementationsgruppen FA-A und FA-D2 am häufigsten betroffen sind (Hoehn H et al. 2007).

Die Zuordnung eines Patienten zu einer bestimmten Komplementationsgruppe erfolgt durch aufeinander folgendes Einbringen von retroviralen Vektoren, die jeweils eines der FA-Gene enthalten, in eine Zelle des Patienten. Wird beispielsweise ein Vektor mit dem „intakten“ FANCA-Gen in eine Zelle eines FA-A Patienten geschleust, so normalisieren sich die FA-typischen Eigenschaften im Bezug auf MMC und DEB. Der Patient kann deshalb der Komplementationsgruppe A zugeordnet werden. Würde in die gleiche Zelle das FANCC-Gen eingeschleust, blieben diese FA-typischen Eigenschaften (d.h. die erhöhte Sensitivität gegenüber MMC) erhalten (Schindler und Hanenberg 2005).

## 1.4 Therapieansätze

Die Therapieansätze bei der FA haben vor allem die Behandlung des Knochenmarksversagens zum Ziel, da eine komplette Heilung bisher nicht möglich ist. Bei Beginn des Knochenmarksversagens ist es wünschenswert, weitgehend stabile Blutwerte zu erhalten. Ab einem Hb  $\leq$  8 g/dl oder Thrombozytenwerten  $\leq$  30.000/ml ist es daher sinnvoll, mit einer Androgentherapie zu beginnen. Androgene bewirken v.a. eine Steigerung der Erythrozyten- und Thrombozyten-, selten auch der Granulozytenzahlen. Allerdings erzielen sie nur bei ca. 50 % der FA-Patienten eine Wirkung, zudem haben sie zahlreiche Nebenwirkungen wie Vermännlichung, frühzeitiger Epiphysenschluss und Bildung von Leberadenomen, welche in seltenen Fällen in bösartige Tumoren übergehen können (Shimamura 2005). Eine Steigerung der Granulozyten erreicht man zusätzlich durch die Gabe des Wachstumsfaktors G-CSF (Rackoff et al. 1996).

Spricht ein Patient nicht auf eine Androgentherapie an, und treten bei ihm typische Zeichen eines Erythrozytenmangels wie Tachypnoe oder Tachykardie auf, ist es sinnvoll, Erythrozyten-Transfusionen zu verabreichen. Thrombozyten-Transfusionen sind indiziert, wenn die Thrombozytenzahl unter 10.000/ml fällt, wenn Blutungen auftreten oder wenn operative Eingriffe geplant sind (Shimamura 2005). Die einzige dauerhafte Lösung zur Beseitigung der hämatologischen Probleme ist die hämatologische Stammzelltransplantation, in der Regel eine Knochenmarkstransplantation (HSCT). Das erhöhte Tumorrisiko bleibt nach KMT

allerdings erhalten, da nur die defekten Zellen des Knochenmarks ersetzt werden. Für den Zeitpunkt einer KMT gibt es keine festen Regeln. Üblicherweise transplantiert man beim Auftreten von klonalen chromosomalen Veränderungen sowie beim Übergang in regelmäßige Transfusionsbedürftigkeit. Das Auftreten von chromosomalen Veränderungen, insbesondere Duplikationen der Chromosomen 1q und 3q, sowie die Monosomie 7, kann als prädiktiver Risikofaktor im Bezug auf die Entwicklung eines MDS bzw. einer AML interpretiert werden, und somit als Entscheidungshilfe für eine baldige KMT herangezogen werden (Neitzel et al. 2007). Steht ein Geschwisterspender (Spender 1. Wahl) zur Verfügung, kann die KMT auch schon bei mittelgradigem Knochenmarksversagen erfolgen. Steht nur ein Fremdspender (Spender 2. Wahl) zur Verfügung, ist man eher geneigt, noch länger zu warten.

Die zur KMT benötigten Stammzellen können dem Spender an unterschiedlichen Stellen entnommen werden: Aus dem Beckenkamm, dem peripheren Blut oder aus Nabelschnurblut. Aus Nabelschnurblut kann nur eine relativ geringe Stammzell-Menge gewonnen werden, die in etwa für ein kleines Kind ausreichend ist (Ebell 2005). Präparate aus dem peripheren Blut enthalten viele Lymphozyten, daraus ergibt sich ein höheres Risiko für eine Graft-versus-Host-Reaktion, welche durch eine Entfernung der T-Zellen aus dem Präparat verringert werden kann (Boyer et al. 2003; Eyrich et al. 2007). Aus peripherem Blut erwachsener Spender können große Stammzell-Mengen entnommen werden, was ein schnelleres Anwachsen des Transplantates begünstigt (Ebell 2005).

Um eine erfolgreiche KMT durchzuführen ist es notwendig, das Knochenmark des Patienten zu zerstören und eine adäquate Immunsuppression durchzuführen. Um dies zu gewährleisten, erhalten Patienten, die auf eine KMT vorbereitet werden, hohe Dosen Cyclophosphamid und eine Ganzkörperbestrahlung. Bei FA-Patienten wirkte sich diese Vorbereitung, wegen der erhöhten Sensitivität gegen Strahlung und alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid, fatal aus. Massive Organschäden und eine hohe Sterblichkeitsrate in der frühen Post-Transplantationsphase sowie ein stark erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Malignomen in der späten Post-Transplantationsphase waren die Folge (Maschan et al. 2004). Ziel vieler Studien ist es derzeit, ein optimales Konditionierungsprogramm für eine KMT bei FA-Patienten zu entwickeln, welches ein sicheres Anwachsen des Transplantates, eine niedrige Organtoxizität, eine niedrige GvHR-Rate sowie ein geringes Risiko für eine spätere Malignomentstehung garantiert.

Ein vielversprechendes Verfahren zur Konditionierung, welches die oben genannten Kriterien erfüllt, verwendet Fludarabin, niedrig dosiertes Busulfan und Antithymozytenglobulin, verzichtet also vollkommen auf eine Ganzkörperbestrahlung und auf den Einsatz von Cyclophosphamid. Zur Immunsuppression wird eine Kombination aus Cyclosporin A, Methotrexat und Daclizumab verwendet (Maschan 2004; Eyrich et al. 2007). Allerdings ist dies nur eines von vielen Protokollen und FA-Patienten sollten sich vor einer geplanten KMT genau über die neuesten Verfahren informieren.

## 1.5 Fragestellung

Am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg wird seit mehr als 10 Jahren die klinische Verdachtsdiagnose „Fanconi Anämie“ durch eine hochauflösende Zellzyklusanalyse bestätigt bzw. ausgeschlossen. Dieses Verfahren ist der konventionellen Chromosomenbruch-Analyse hinsichtlich Zeitaufwand und statistischer Aussagekraft überlegen. Allerdings stellt sich seit der Erkenntnis der Möglichkeit einer somatischen Reversion im Jahre 1997 (Lo ten Foe et al, 1997) die Problematik der Erkennung von Mosaikkonstellationen des hämatopoietischen Systems (Gross et al, 2002; Hoehn et al. 2007). Weiterhin ist die Frage ungeklärt, ob zwischen der Höhe der G2-Phasen-Akkumulation und dem Krankheitsverlauf eine Korrelation besteht. Im Rahmen dieser retrospektiven Arbeit sollen daher die Zellzyklusdaten von FA-Patienten zur Auswertung kommen, bei denen mehrfache Zellzyklusanalysen in variablen zeitlichen Abständen durchgeführt wurden. Mit dieser Auswertung soll die Frage beantwortet werden, inwieweit die erhobenen Zellzyklusdaten konstante, für jeden Patienten charakteristische Parameter darstellen, oder ob diese Werte im Krankheitsverlauf erheblichen Schwankungen unterliegen. Falls solche Schwankungen gefunden werden, sollen deren Ursachen im Bezug auf technische Faktoren, einen eventuellen Mosaikstatus und den allgemeinen Krankheitsverlauf untersucht und aufgeklärt werden. Auf dem Wege der Auswertung sequentieller Zellzyklusanalysen wird eine Verbesserung der Interpretation der individuellen Zellzyklusdaten angestrebt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellzyklusanalyse

Als Ausgangsmaterial für die Zellzyklusanalyse wird heparinisieretes Vollblut verwendet. Es wird auf dem Postweg bzw. durch Kurierdienste an das humangenetische Labor geschickt und sollte spätestens innerhalb von 24h-48h nach Blutentnahme bearbeitet werden. Deshalb ist es sinnvoll, das Blut möglichst am Anfang der Woche zu entnehmen, damit es nicht zu unnötigen Verzögerungen kommt. Die Isolation der Lymphozyten aus der Blutprobe wird im Labor unter sterilen Bedingungen mit der Ficoll-Paque-Technik durchgeführt. Zuerst wird das autologe Serum durch Zentrifugation vom Plasma getrennt und durch ein entsprechendes Volumen HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ersetzt. Die entstandene Suspension wird anschließend mit HBSS 1:2 verdünnt. 4-10 ml dieser verdünnten Suspension werden jeweils mit 3 ml Ficoll-Paque überschichtet, sowie zentrifugiert (2100 rpm, 30 min, 4°C). Der HBSS-Überstand wird verworfen, die an der Phasengrenze angereicherten Lymphozyten werden mit der Pipette abgezogen und erneut mit HBSS suspendiert. Nach Waschung und Zentrifugation (900 rpm, 15 min) erhält man ein Zellpellet, welches in RPMI 1640 Kulturflaschen suspendiert wird. Diese Suspension wird auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellzählung erfolgt nach Verdünnung mit 1%iger Essigsäure im Verhältnis 1:2 in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

Zur Kultivierung der Zellen werden folgende Medien verwendet:

RPMI 1640	3.65 ml
AS (autologes Serum; 1%)	0.05 ml
FCS (fetales Kälberserum; 15%)	0.75 ml
BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin; $10^{-4}$ M)	0.05 ml
DC (2'-Desoxycytidin; $10^{-4}$ M)	0.05 ml
$\alpha$ TG ( $\alpha$ -Monothioglycerol; $2 \times 10^{-5}$ M)	0.01 ml
PHA (Phytohämagglutinin; 1,2 $\mu$ g/ml)	0.0225 ml

Es werden 2 Ansätze für die Kultivierung der Zellen hergestellt, mit und ohne BrdU. Das RPMI-Medium wird in 50 ml-Kulturflaschen vorbereitet. Phytohämagglutinin (PHA) ist ein Mitogen, die Zugabe von 2'-Desoxycytidin verhindert unerwünschte Wirkungen von BrdU, indem es mit diesem reversible Bindungen eingeht. Es werden jeweils 0,5 ml Zellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) in die Kulturflaschen gegeben und es wird MMC in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben (0, 5, 10 und 50 ng/ml). Um lichtinduzierte Chromosomenbrüche in Anwesenheit von BrdU zu vermeiden, werden die Flaschen mit Silberfolie umwickelt und werden aufrecht für 72h bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Ernte erfolgt unter Abdunkelung. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (900 rpm, 15 min), der Überstand anschließend verworfen und das gewonnene Zellpellet in 1,5 ml Einfriermedium (RPMI 1640 80 %, FCS 10 %, DMSO 10 %) gelöst. Bis zur Messung werden die Proben bei -20°C gelagert. Vor der Durchführung der Durchflusszytometrie werden die Proben im Wasserbad aufgetaut und gefärbt. Dazu zentrifugiert man die Proben erst und suspendiert das erhaltene Zellpellet anschließend bei 4°C in Hoechst 33258-Färbepuffer (1.2  $\mu$ g/ml).

Die Suspension wird dann 15 min inkubiert. Nach Zugabe von Ethidiumbromid-Färbepuffer wird erneut 15 min inkubiert. Die Färbeschritte finden ebenfalls im Dunkeln bzw. bei indirektem Licht statt. Der verwendete Färbepuffer setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Tris-HCL (0.1 M, pH 7.4)	10 ml
NaCL (0.154 M)	10 ml
MgCL <sub>2</sub> (0.5 M)	1 ml
CaCL <sub>2</sub> (1 mM)	1 ml
Nonidet P40 (0.1 %)	1 ml
BSA (bovines Serumalbumin 0.2 %)	0.2 g
Ampuwa (demineralisiertes Wasser)	ad 100 ml

Die verwendeten Farbstoffe Hoechst 33258 und Ethidiumbromid sind Fluoreszenzfarbstoffe. Hoechst 33258 ist ein nicht-interkalierendes Fluorochrom, es bindet bevorzugt an AT-reiche Sequenzen der DNA. Ethidiumbromid hingegen ist ein interkalierendes Molekül, welches sich in DNA-Doppelstränge einlagert und einen fluoreszierenden Komplex bildet. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für den DNA-Gehalt einer Zelle und ist für den jeweiligen Farbstoff, bei seinem charakteristischen Frequenzbereich, proportional zum DNA-Gehalt (Hoechst 33258: 450-500 nm; Ethidiumbromid > 600 nm). Die Gesamt-DNA-Menge einer Zelle gibt Auskunft darüber, in welcher Phase des Zellzyklus sich die jeweilige Zelle befindet. In der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase hat sie einen 2cDNA-Gehalt, der in der S-/G<sub>2</sub>-Phase auf einen 4cDNA-Gehalt verdoppelt ist. Da die Ethidiumbromid-Fluoreszenz ein Maß für den Gesamt-DNA-Gehalt einer Zelle ist, lassen sich Zellen über die Intensität dieses Fluoreszenzwertes der jeweiligen Phase des Zellzyklus zuordnen. Ist der DNA-Gehalt verdoppelt, so verdoppelt sich auch die Fluoreszenzintensität.

Die Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen wird mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst 33258 und BrdU ermittelt. BrdU wird während der semikonservativen DNA-Replikation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Die AT-abhängige Hoechst 33258-Fluoreszenz verringert sich somit bei jeder Zellteilung (sogenannter „Quench-Effekt“). Im zweiparametrischen Zellzyklusdiagramm äußert sich dies durch eine Linksverschiebung jedes weiteren Zellzyklus auf der Abszisse. Trägt man also die BrdU/Hoechst 33258- und die Ethidiumbromid-vermittelte Fluoreszenzintensität zweidimensional auf, so erhält man ein zweiparametrisches Zellzyklusdiagramm, welches sowohl die Zuordnung zu einem der aufeinander folgenden Zellzyklen, als auch die Zuordnung zur entsprechenden Zellzyklusphase (G<sub>0</sub>; G<sub>1</sub>; S; G<sub>2</sub>) erlaubt.

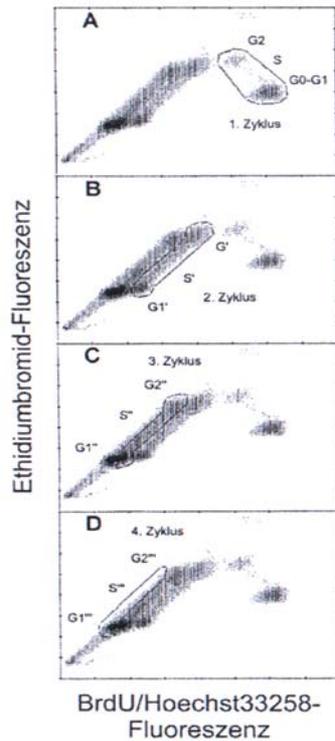


Abbildung 2.1 nach: Schindler und Höhn, 1999

Die Tafeln A-D zeigen 4 Zyklen eines zweiparametrischen zweidimensionalen Zytogramms von Blutlymphozyten. Auf der Abszisse ist die BrdU/Hoechst 33258-Fluoreszenz aufgetragen. Die Ordinate repräsentiert die Ethidiumbromid-Fluoreszenz. Zur Illustration wurden die einzelnen Zellzyklen (1-4) und ihre Kompartimente eingerahmt.

Die Messung oben beschriebener Fluoreszenzeigenschaften erfolgt mit dem Durchflusszytometer (ICP 2; Phywe bzw. LSR 1; Becton-Dickinson). Grundlage der Messung ist, dass die Anregung von Fluorochromen in fluoreszenzmarkierten Zellen zur Emission von energieärmerem Licht führt. Die Intensität des emittierten Lichtes ist dabei zur Menge des vorhandenen Farbstoffes proportional. Werden mehrere Fluorochrome gemessen, erfolgt die Auftrennung der einzelnen Fluoreszenzen durch Filter- und Spiegelsysteme, welche das nach Wellenlängen aufgetrennte Licht zu Detektoren (Photomultiplier) weiterleiten. Die Lichtimpulse werden am Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt.

Die Auswertung der Programme erfolgt computergestützt mit den Programmen MULTI2D/MCYCLE sowie MPLUS. Der einzelne Zellzyklus wird interaktiv manuell eingerahmt und auf eine parallele Achse projiziert. Dabei entstehen eindimensionale Kurven (DNA-Histogramme), welche nach G1-, G2- und G2-Phasenanteilen beurteilt werden. So erhält man die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzykluskompartimenten und andere diagnostisch wichtige Parameter, wie den Anteil proliferierender Zellen (growth fraction, GF).

Mit dem GF-Wert lässt sich als weiterer wichtiger Parameter, der  $\sum G2/GF$ -Wert berechnen. Bei Gesunden ist dieser  $< 0.3$ , am Anfang einer Mosaikbildung zwischen  $0.3$  und  $0.4$  und bei Patienten mit Fanconi Anämie  $> 0.4$ . Bei vollständiger Ausbildung eines Mosaiks liegt der  $\sum G2/GF$ -Wert trotz Erkrankung im Bereich unter  $0.3$ .

Proben von Patienten mit FA weisen bei der Zellzyklusanalyse charakteristische Merkmale auf:

- Die PHA-Stimulierbarkeit ist herabgesetzt, d.h. die nicht-proliferierende Zellfraktion ist erhöht. Als Folge dessen ist der G0/G1-Quotient erhöht.
- Die Zellen erreichen selten den 3. bzw. 4. Zellzyklus
- Die Behandlung mit chemischen oder physikalischen Noxen führt zum Arrest der Zellen in der G2-Phase der Zyklen
- $\sum G2/GF$ -Werte liegen bei Patienten ohne Mosaik  $> 0.4$

Die Zellzyklusdiagramme in Abbildung 2.2 zeigen den Vergleich einer zweiparametrischen zweidimensionalen Messung von einem Patienten mit Fanconi Anämie (FA) und einer Negativkontrolle (CONTROL). Der charakteristische Arrest der Zellen in den G2-Phasen der Zyklen sowie der fehlende 4. Zyklus des FA-Patienten sind dabei deutlich sichtbar.

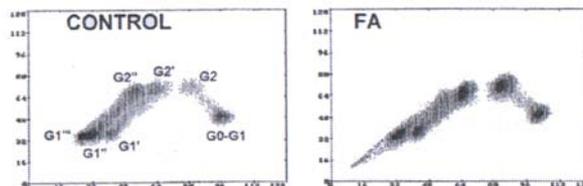


Abbildung 2.2 aus: Schindler und Höhn, 1999.

## 2.2 Parameter der Zellzyklusanalyse und ihre Beeinflussung

Ziel dieser Arbeit ist es, die bei der Zellzyklusanalyse erhobenen Daten hinsichtlich ihrer Schwankungen zu untersuchen. Nachfolgend werden deshalb die Faktoren erläutert, welche Einfluss auf die Werte  $\sum G2/GF$  und  $G0/G1$  nehmen könnten.

### 2.2.1 Blutprobenalter

Die Blutprobe des Patienten sollte innerhalb von 24h-48h nach Blutentnahme bearbeitet werden. Nach Ablauf dieser Zeitspanne kommt es zu vermehrtem Zerfall und verminderter Stimulierbarkeit der Lymphozyten in der Probe. Die Stimulierbarkeit bzw. das Wachstum der Lymphozyten nimmt direkten Einfluss auf die Werte  $\sum G2/GF$  und  $G0/G1$ . Sinkt die Stimulierbarkeit, werden die Werte größer.

### 2.2.2 Mosaikbildung

Bildet sich bei einem Patienten ein Mosaik, revertieren die Fanconi-Anämie-Zellen wieder zu gesunden Zellen und verlieren die typischen Eigenschaften der erkrankten Zelle. Die Mosaikzellen akkumulieren nicht mehr in der G2-Phase und ihre Stimulierbarkeit erhöht sich deutlich. Die Werte  $\sum G2/GF$  und  $G0/G1$  werden als Folge dessen kleiner.

### 2.2.3 Komplementationsgruppe

Den unterschiedlichen Komplementationsgruppen liegen unterschiedliche Gendefekte zugrunde. Es wäre denkbar, dass Zellen mit unterschiedlichen Gendefekten auch Unterschiede in der Ausprägung der FA-typischen Zellmerkmale wie Arrest in der G2-Phase und Einschränkung der Stimulierbarkeit aufweisen, was zu einer Schwankung der Werte  $\sum G2/GF$  und  $G0/G1$  führen könnte.

### 2.2.4 Krankheitsverlauf

Die Frage, ob zwischen der Höhe der G2-Phasen-Akkumulation und dem Krankheitsverlauf eine Korrelation besteht, ist noch nicht geklärt. Nimmt man an, dass eine Verschlechterung/Verbesserung im Verlauf der Erkrankung eine Erhöhung/Erniedrigung der G2-Phasen-Akkumulation bewirkt, würde als Folge dessen der Wert  $\sum G2/GF$  steigen/sinken. Als Maß für eine Verschlechterung im Krankheitsverlauf könnten aktuelle Erythro-, Thrombo- und Lymphozytenwerte dienen. Leider liegen diese dem Institut für Humangenetik nicht vor, sodass eine diesbezügliche Untersuchung derzeit nicht möglich ist.

Das Auftreten von chromosomalen Aberrationen im Knochenmark eines FA-Patienten kann ebenfalls als Krankheitsverschlechterung gewertet werden (Neitzel et al. 2007). Ob es dadurch zu einer Veränderung der  $\sum G2/GF$  und  $G0/G1$ -Werte kommt, und wie diese sich darstellt, wurde bisher noch nicht untersucht. Eine Erhöhung beider Werte wäre denkbar.

Ein weiteres Ereignis im Krankheitsverlauf ist das mögliche Auftreten einer Leukämieerkrankung und es stellt sich die Frage, ob diese Einfluss auf das Wertenniveau des  $\sum G2/GF$  oder  $G0/G1$ -Wertes nimmt. Der Zellzyklus der leukämisch transformierten Zellen (leukämische Blasten) scheint keine S- und G2-Phasen-Störungen zu haben (Seyschab et al. 1995; Schindler D. et al. 2003). Ein fehlender G2-Phasen-Arrest eines Teiles der Zellen (leukämische Blasten) in der Probe führt zu einer Erniedrigung des  $\sum G2/GF$ -Wertes und zur Verfälschung der Aussage der Zellzyklusanalyse. Zellen, die durch G2-Phasen-Arrest im Zellzyklus ausscheiden, werden zur G0 – Phase gerechnet, da sie nicht mehr proliferieren. Für den  $G0/G1$ -Wert bedeutet ein geringerer G2-Phasen-Arrest also ein Absinken des  $G0/G1$ -Wertes, da weniger Zellen in die G0-Phase eintreten. Allerdings kann eine Leukämieerkrankung auch einen Anstieg des  $G0/G1$ -Wertes hervorrufen. Grundlage dessen ist eine Funktionseinschränkung von Rezeptoren leukämischer Blasten, die bei der Zellproliferation eine Rolle spielen. Ausdruck der dadurch verminderten Stimulierbarkeit leukämischer Blasten ist ein Anstieg des  $G0/G1$ -Wertes.

### 2.2.5 Knochenmarkstransplantation

Die KMT ersetzt die kranken Knochenmarkszellen des FA-Patienten durch gesunde Zellen eines geeigneten Spenders. Damit normalisiert sich die Hämatopoiese und die Lymphozyten des Patienten weisen keine FA-typischen Merkmale mehr auf. Der  $\sum G2/GF$ -Wert sinkt unter 0,3 auf das Wertenniveau von Gesunden. Der  $G0/G1$ -Wert ist direkt nach einer KMT medikamentös bedingt stark erhöht, da die immunsuppressive Therapie nach KMT die Stimulierbarkeit der Lymphozyten herabsetzt. Eine Ausnahme besteht, wenn nach der KMT kein vollständiger Spenderchimärismus existiert, was

bedeutet, dass neben den Knochenmarkszellen des Spenders noch Knochenmarkszellen des FA-Patienten vorhanden sind. Das milde Konditionierungsprotokoll von FA-Patienten vor KMT führt manchmal zu diesem Überleben von Knochenmarkszellen des FA-Patienten. Für den  $\sum$  G2/GF-Wert ergeben sich bei unvollständigem Chimärismus höhere Werte als nach KMT erwartet, die im Bereich intermediärer Werte zwischen 0,3 und 0,4 liegen können.

Die eben erläuterten beeinflussenden Faktoren sollen als Interpretationsgrundlage für die Werte der einzelnen Patienten gelten.

### 3. Ergebnisse

Die Population, die in dieser Arbeit untersucht wird, hat einen Umfang von 32 Patienten. Davon sind 16 weiblich und 16 männlich. Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der 1. Messung beträgt 9,6 Jahre.

Einschlusskriterien für die Patienten in die Population sind mindestens 2 erfolgte Messungen mit dem Durchflusszytometer und die definitive Bestätigung der Diagnose FA.

Die Einteilung der Patienten erfolgt in 3 Gruppen:

1. FA-Patienten ohne gesichertes Mosaik, ohne KMT
2. FA-Patienten mit gesicherter Mosaikkonstellation
3. FA-Patienten mit KMT

Die klinischen Daten der einzelnen Patienten sind sehr unvollständig, sodass eine statistische Auswertung einiger Zusammenhänge bzw. Merkmale wegen einer zu geringen Datenmenge nicht möglich war.

In den nachfolgenden 4 Abschnitten soll mithilfe von Diagrammen die Lage der Daten und ihre Veränderung dargestellt werden. Weiterhin soll untersucht werden, wie bestimmte Faktoren Einfluss auf das Wertenniveau nehmen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Werte in den Diagrammen nicht einzeln beschriftet, im Werteverzeichnis sind jedoch sämtliche  $\Sigma G2/GF$ - und  $G0/G1$ - Werte aufgelistet.

Je nach Datenlage werden Patienten der 3 Gruppen in einem der nachfolgenden Abschnitte besprochen:

1. Beispiele für Standardverläufe
2. Beispiele für variable Verläufe
3. Beispiele für die Entwicklung eines somatischen Mosaiks
4. Änderungen des Verlaufs durch Knochenmarkstransplantation

### 3.1 Beispiele für Standardverläufe

#### Patient 1

#### Komplementationsgruppe

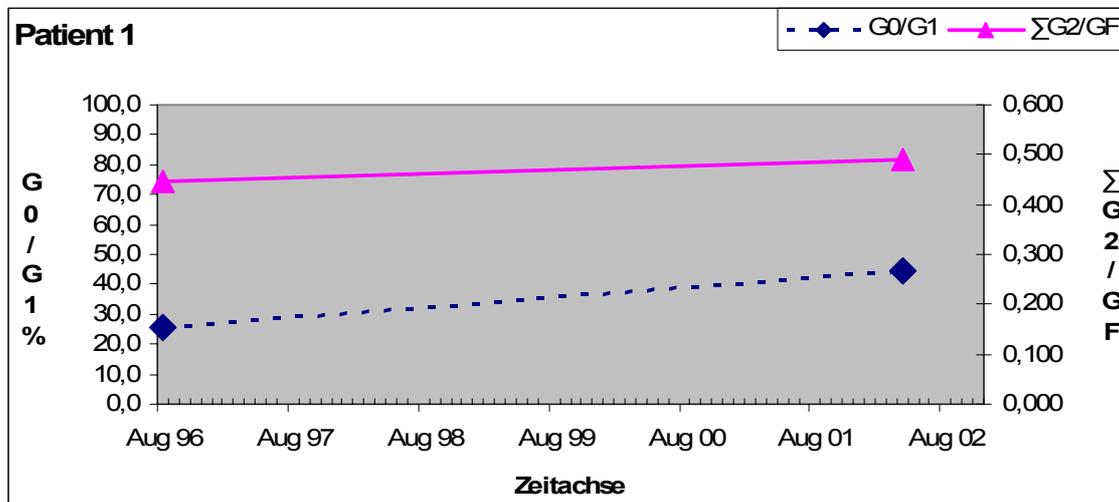
Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-A.

#### Klinik

Als FA-typische Merkmale fallen auf: Minderwuchs, dysplastischer Daumen rechts (aktiv nicht beweglich), Mikrozephalie, Syndaktylie 2/3 an beiden Füßen, typische Facies, Pankreas anulare, membranöse Duodenalstenose.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	seit 1999 Erythrozyten, seit 1994 sporadisch Thrombozyten
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	03/05/02
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1988

#### Flowzytometrie



#### Interpretation

Leicht erhöhte G0/G1-Werte von 25,8 und 44,3 sind Ausdruck einer verminderten Lymphozytenstimulierbarkeit und typische Merkmale einer FA-Erkrankung.  $\Sigma$  G2/GF-Werte dieses Patienten liegen bei 0,445 und 0,490 passen zu einem typischen Verlauf eines Patienten mit FA ohne Mosaiktendenz.

## Patient 2

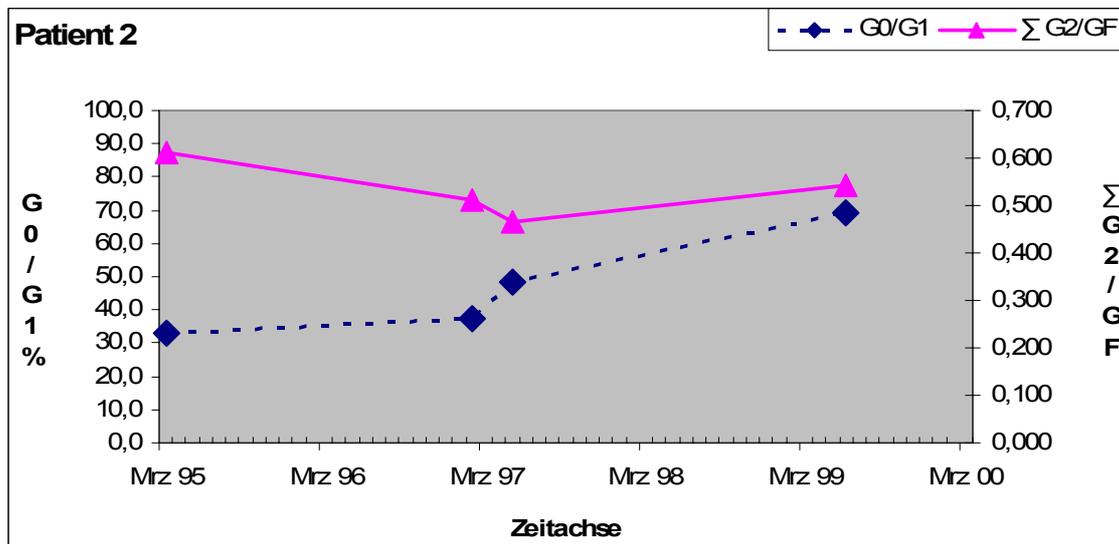
### Komplementationsgruppe

Unbekannt

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	Erythrozyten
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1980

### Flowzytometrie



### Interpretation

Der Patient liegt mit  $\Sigma$  G2/GF-Werten zwischen 0,466 und 0,610 deutlich im Referenzbereich der an FA erkrankten Patienten. Obwohl eine minimale Erniedrigung des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes auftritt, bewegt der Wert sich doch auf sehr hohem Niveau.

Weiterhin ist die Stimulierbarkeit der Lymphozyten herabgesetzt (hoher G0/G1-Wert) und nimmt im Gegensatz zum  $\Sigma$  G2/GF-Wert im Krankheitsverlauf kontinuierlich zu. Diese Entwicklungen der Werte stehen im Widerspruch zu einer Mosaikentwicklung, welche typischerweise durch das Sinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes und des G0/G1-Wertes gekennzeichnet ist.

Faktoren, die einen Anhaltspunkt für die Schwankung der Werte geben könnten, sind in diesem Fall nicht bekannt.

### Patient 3

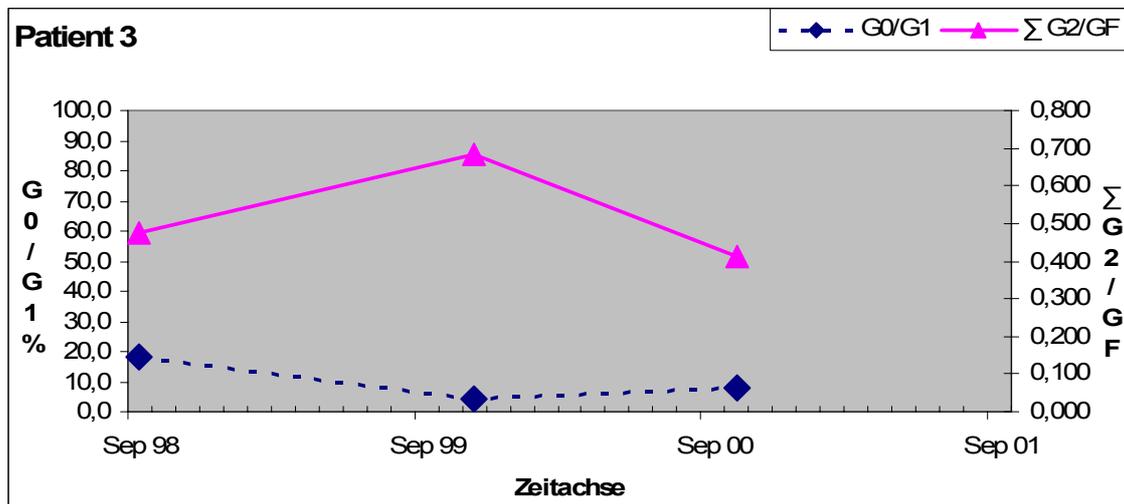
#### Komplementationsgruppe

Unbekannt

#### Klinik

Transfusionspflichtigkeit: unbekannt  
Knochenmarkstransplantation: nein  
Zytogenetische Aberrationen: nein  
Leukämieerkrankung: nein  
Blutprobenbesonderheiten: nein  
Geburtsjahr: 1990

#### Flowzytometrie



#### Interpretation

Auch bei diesem Patienten lassen sich im Zeitverlauf Werteschwankungen erkennen, die ebenfalls auf hohem Niveau bleiben. Eine Erklärung für die Schwankungen gibt es durch die uns bekannten Informationen nicht. Es ist bisher keine eindeutig Tendenz zur Mosaikentwicklung erkennbar. Bei einem weiteren Absinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes könnte dieser eventuell den intermediären Bereich zwischen 0,3-0,4 erreichen. In diesem Bereich befinden sich sowohl FA-Erkrankte ohne, als auch mit beginnender Mosaikentwicklung. Jährliche Verlaufskontrollen wären bei diesem Patienten deshalb empfehlenswert.

## Patient 4

### Komplementationsgruppe

Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-A.

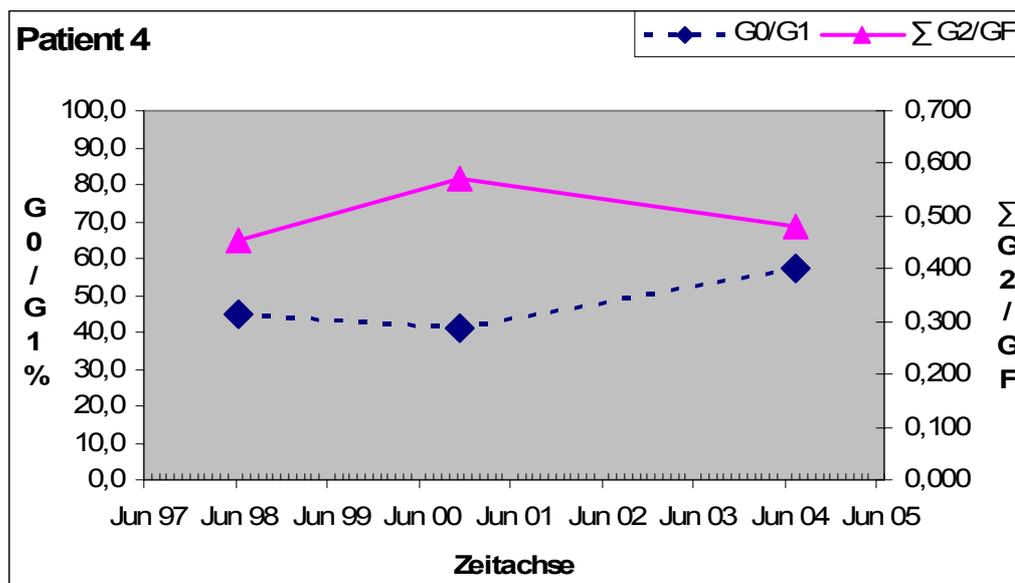
### Klinik

Es besteht eine Daumenhypoplasie als typisches äußeres FA-Zeichen.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	sporadisch ab 1973
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1965

12/1976      Androgentherapie wird eingeleitet.

### Flowzytometrie



### Interpretation

Beim Patienten 4 ergibt sich mit einem  $\Sigma$  G2/GF-Wert von 0,453 ein Wert, der eindeutig im Bereich Erkrankter liegt und die Diagnose FA sichert. Gleichzeitig spricht der G0/G1-Wert mit 44,8 für eine verringerte Stimulierbarkeit der Lymphozyten, die sich innerhalb von 6 Jahren nochmals verschlechtert. Auch der  $\Sigma$  G2/GF-Wert steigt leicht an (0,480).

Trotz leichter Schwankungen der beiden Werte im Verlauf, bleiben sie eindeutig im Bereich Erkrankter Patienten und veranschaulichen den Werteverlauf eines typischen FA-Patienten ohne KMT oder Mosaikentwicklung.

## Patient 5

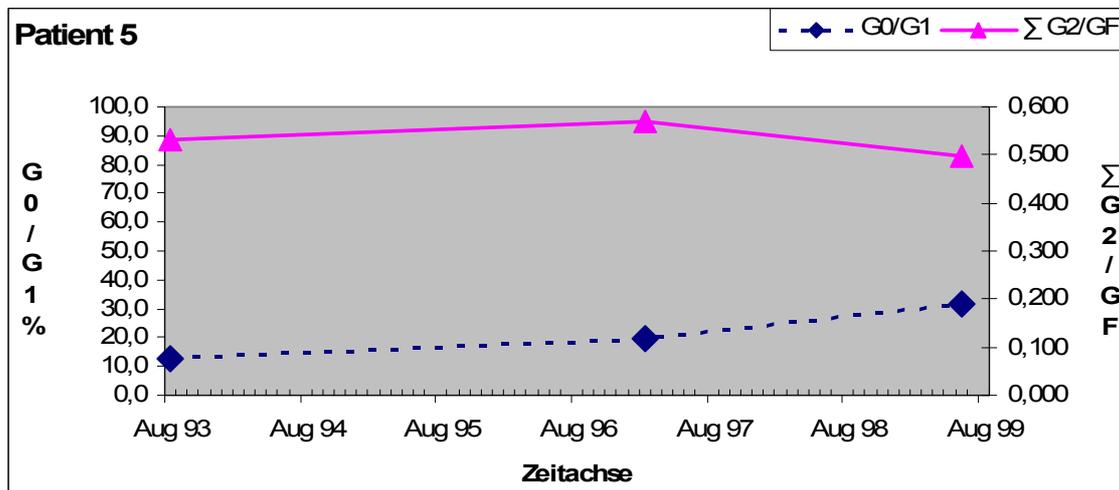
### Komplementationsgruppe

Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-A.

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	unbekannt
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1985

### Flowzytometrie



### Interpretation

Wie bei Patient 4 veranschaulicht die Lage der Werte den Verlauf eines Patienten mit FA ohne Mosaiktendenz oder KMT. Auffällig ist die deutliche Zunahme der G0/G1-Fraktion im zeitlichen Verlauf. Dies spricht für die allmähliche Entwicklung der aplastischen Phase der FA.

## 3.2 Beispiele für variable Verläufe

### Patient 6

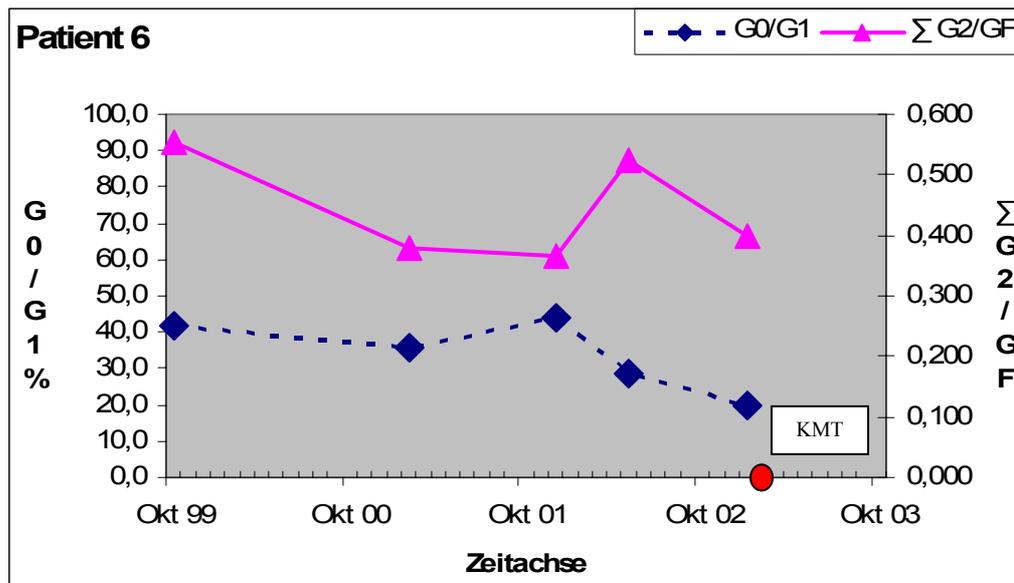
#### Komplementationsgruppe

Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-A.

#### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	unbekannt
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	02/2003
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1990

#### Flowzytometrie



#### Interpretation

Sowohl der  $\Sigma G2/GF$ -Wert, als auch der  $G0/G1$ -Wert zeigen bei diesem Patienten einen variablen Verlauf. Anfangs liegt der  $\Sigma G2/GF$ -Wert mit 0,553 in einem Bereich, der keinen Anhalt für die Bildung eines Mosaiks gibt. Zu Messzeitpunkt 3 und 4 sinkt der Wert deutlich, sodass an ein in Entwicklung befindliches Mosaik gedacht werden könnte. Aufgrund der weiterhin bestehenden ausgeprägten Sensitivität der Zellen gegen Mitomycin C kann ein Mosaikstatus nicht bewiesen werden. Ein erneuter Anstieg des  $\Sigma G2/GF$ -Wertes spricht ebenso gegen den Mosaikverdacht. Falls sich in den Jahren 99 bis 01 ein Mosaik entwickelt hat, war dieser Vorgang instabil und ist wieder rückläufig. Der  $G0/G1$ -Wert ist trotz leichter Schwankungen im Gesamtverlauf deutlich gesunken. Dies weist auf eine verbesserte Mitogen-Antwort der Lymphozyten hin und unterstützt

den Verdacht einer Mosaikentwicklung. Eine flowzytometrische Messung nach KMT war aufgrund fehlenden Zellwachstums infolge Immunsuppression nicht gelungen.

## Patient 7

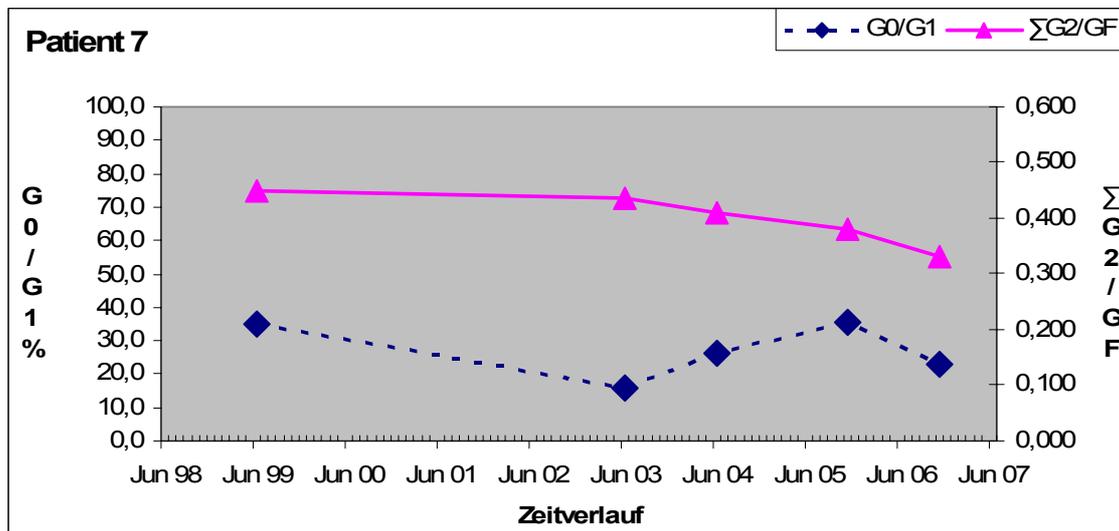
### Komplementationsgruppe

Unbekannt

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	unbekannt
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1993

### Flowzytometrie



### Interpretation

Der  $\Sigma$  G2/GF-Wert sinkt innerhalb von 7,5 Jahren von einem Bereich eindeutig Erkrankter in den intermediären Bereich zwischen 0,3 und 0,4 ab. In diesem können sich sowohl die Werte Erkrankter als auch die Werte von Patienten mit beginnendem Mosaik befinden. Tendenziell sinken die  $\Sigma$  G2/GF-Werte von Messung zu Messung ein wenig. Die anfangs mit einem Wert von 35,0 verringerte Stimulierbarkeit normalisiert sich im Verlauf für kurze Zeit (16,0), steigt dann jedoch wieder an. Die Werte der letzten Messung im Nov. 06 haben sich im Gegensatz zur vorherigen Messung im Nov. 05 verbessert. Es besteht jedoch weiterhin eine leicht verringerte Stimulierbarkeit der Zellen. Obwohl der  $\Sigma$  G2/GF-Wert tendenziell sinkt, kann eine Mosaikbildung weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Empfehlenswert sind jährliche Verlaufskontrollen bei weiterem Absinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes.

## Patient 8

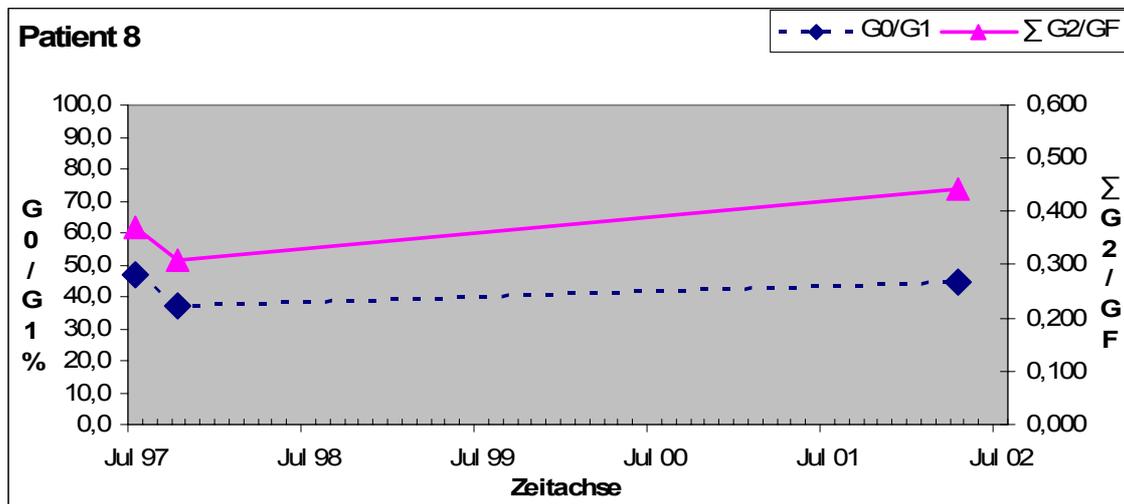
### Komplementationsgruppe

Unbekannt

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	unbekannt
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1997

### Flowzytometrie



### Interpretation

G0/G1-Werte zwischen 37,0 und 47,0 stehen für schlechte Stimulierbarkeit der Lymphozyten des Patienten und mit der Diagnose FA im Einklang. Intermediäre  $\Sigma$  G2/GF-Werte (0,370 und 0,310), die dann in den Bereich Erkrankter ohne Anhaltspunkt für Mosaikbildung steigen, schließen eine derzeit bestehende Mosaikbildung aus.

## Patient 9

### Komplementationsgruppe

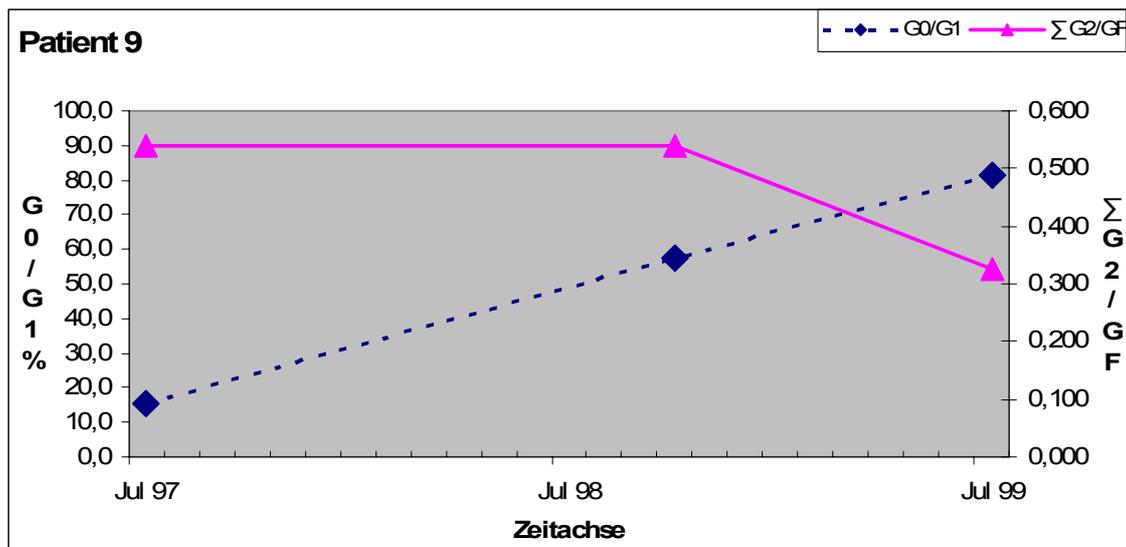
Unbekannt

### Klinik

06/1997 Es besteht eine Daumenhypoplasie bds. sowie eine zunehmende Panmyelopathie

Transfusionspflichtigkeit: seit 1998; zusätzlich Androgentherapie  
Knochenmarkstransplantation: nein  
Zytogenetische Aberrationen: nein  
Leukämieerkrankung: seit 06/1999 AML  
Blutprobenbesonderheiten: nein  
Geburtsjahr: 1990

### Flowzytometrie



### Interpretation

Bei diesem Patienten steigt der G0/G1-Wert von 15,5 (normale Stimulierbarkeit der Lymphozyten) auf 37,4 (verringerte Stimulierbarkeit) und dann nochmals auf 81,5 (stark verringerte Stimulierbarkeit) an. Der  $\Sigma$  G2/GF-Wert sinkt von 0,540 auf 0,327 in den intermediären Bereich ab. Eine Erklärung für die Schwankung der Werte könnte die seit Juni 99 bekannte Leukämieerkrankung des Patienten sein (Seyschab et al., 1995). Die Stimulierbarkeit von Lymphozyten kann während der Erkrankung durch Rezeptorveränderungen auf den leukämischen Zellen (Blasten) beeinträchtigt sein. Durch den fehlenden G2-Phasen-Arrest von leukämischen Blasten kann der  $\Sigma$  G2/GF-Wert absinken.

## Patient 10

### Komplementationsgruppe

Unbekannt

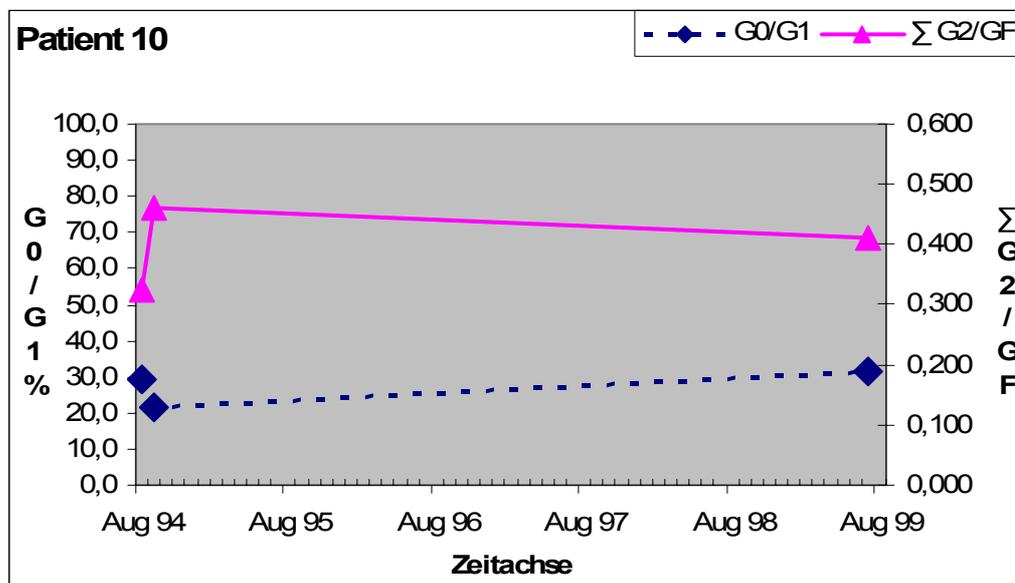
### Klinik

Die Patientin weist keine FA-typischen äußerlichen Merkmale auf.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	unbekannt
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1981

06/1994 Es treten gehäuft Schleimhautblutungen und Hämatome auf, außerdem fällt eine Panzytopenie auf. Die Verdachtsdiagnose FA wird 1994 in Heidelberg bestätigt.

### Flowzytometrie



### Interpretation

G0/G1-Werte zwischen 21,6 und 31,3 stehen für reduzierte Stimulierbarkeit der Lymphozyten des Patienten und mit der Diagnose FA im Einklang. Ein intermediärer  $\Sigma$  G2/GF-Wert (0,325), der dann allerdings in den Bereich definitiv Erkrankter steigt, spricht gegen eine Mosaikbildung.

## Patient 11

### Komplementationsgruppe

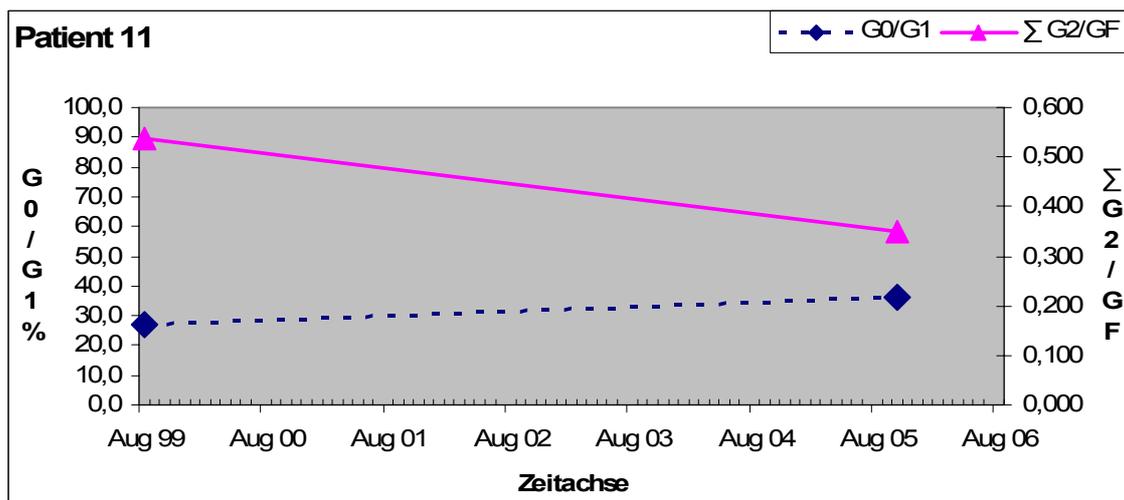
Unbekannt

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1990

Unter Oxymetholontherapie stabilisieren sich die Blutwerte des Patienten.

### Flowzytometrie



### Interpretation

Es zeigt sich ein deutlicher Abfall des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes von 0,536 auf 0,349, bei mäßiger Verschlechterung der Stimulierbarkeit (Anstieg des G0/G1 – Wertes auf 36,3). Der im Verlauf von 7 Jahren deutlich gesunkene  $\Sigma$  G2/GF-Wert könnte auf eine Mosaikentwicklung hinweisen. Weitere Verlaufskontrollen im Bezug auf eine Mosaikentwicklung sind anzuraten.

## Patient 12

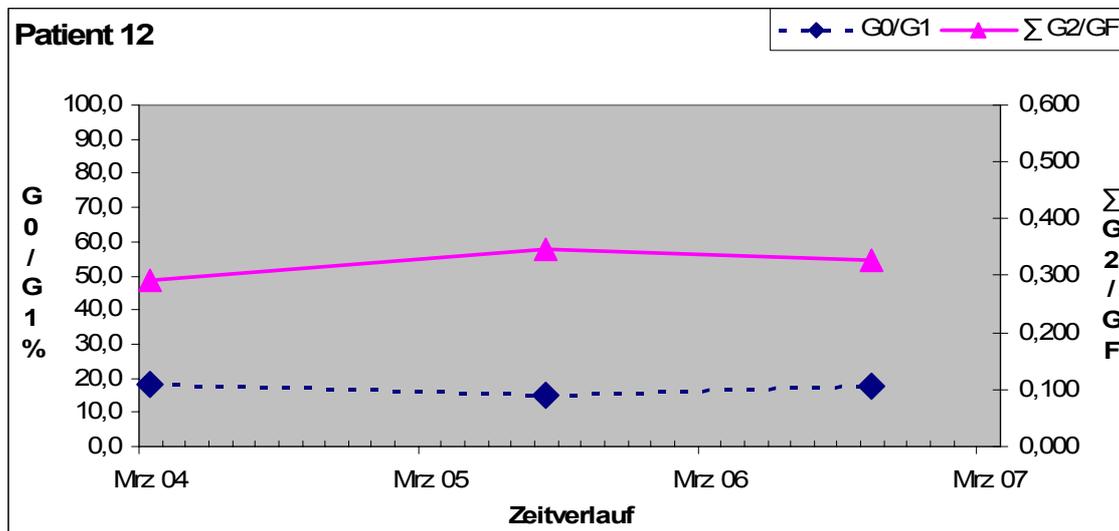
### Komplementationsgruppe

Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-A.

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	unbekannt
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1997

### Flowzytometrie



### Interpretation

Die Stimulierbarkeit der Lymphozyten des Patienten ist mit G0/G1-Werten zwischen 15,1 und 18,2 normal, verglichen mit der Altersgruppe Gesunder und könnte Ausdruck einer Mosaikbildung sein. Die initial niedrigen  $\Sigma$  G2/GF-Werte könnten einzeln betrachtet ebenfalls für ein in Entwicklung befindliches Mosaik sprechen. Im Vergleich mit anderen Patienten sind die Werte zwar niedriger, bleiben aber auf diesem niedrigen Niveau stabil. Bei der Entwicklung eines vollständigen Mosaiks würde man ein kontinuierliches Sinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes erwarten. Möglicherweise ist eine Mosaikentwicklung im Gange. Enge Verlaufskontrollen in jährlichen Abständen sind empfehlenswert.

### 3.3 Beispiele für die Entwicklung eines somatischen Mosaiks

#### Patient 13

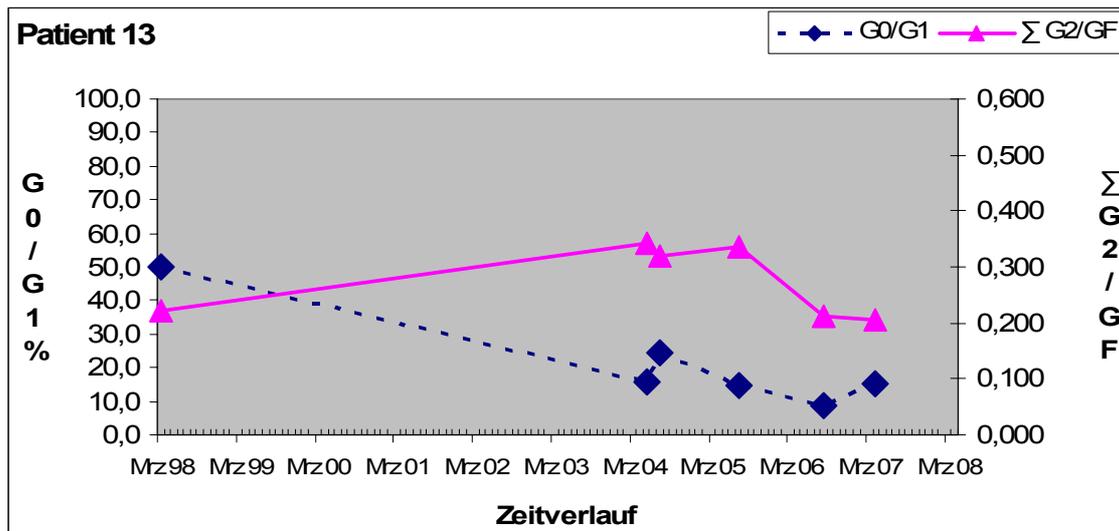
#### Komplementationsgruppe

Unbekannt

#### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1994

#### Flowzytometrie



#### Interpretation

Der G0/G1-Wert des Patienten sinkt innerhalb von 7 Jahren von 49,8 auf 15,3 und befindet sich zum letzten Messzeitpunkt somit im Bereich normal stimulierbarer Lymphozyten. Der  $\sum$  G2/GF-Wert im März 98 lässt an eine Mosaikentwicklung denken, die, wenn vorhanden, allerdings instabil ist, da die  $\sum$  G2/GF-Werte wieder in den intermediären Bereich steigen (0,319, 0,341, 0,335). Anschließende Kontrollen im August 06 und April 07 bestätigen jedoch die anhand einer Fibroblastenkultur gefundene Mosaiksituation des Patienten. Die bereits erwähnte normale Stimulierbarkeit der Lymphozyten steht ebenfalls im Einklang mit der Entwicklung eines Mosaiks.

## Patient 14

### Komplementationsgruppe

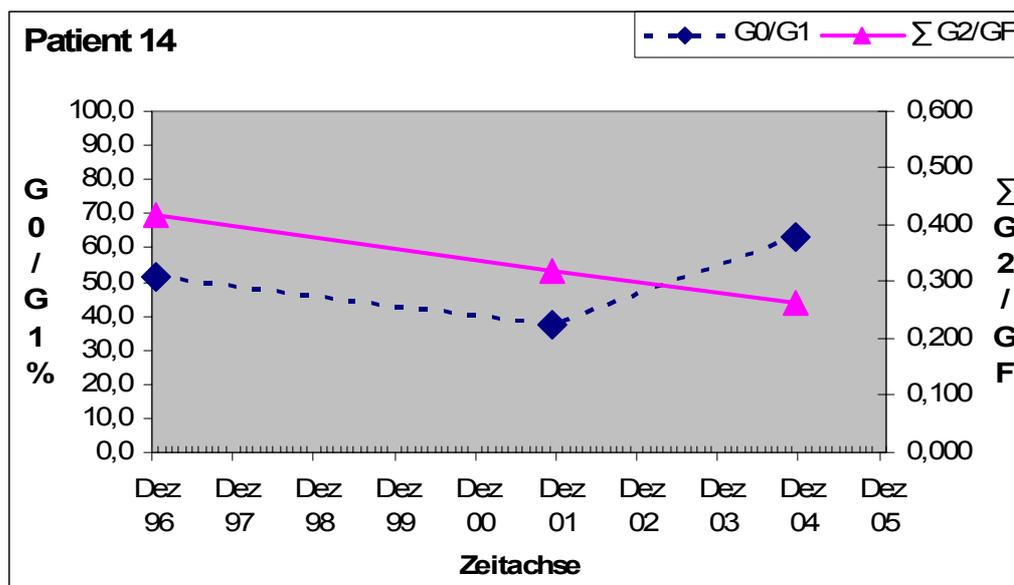
Unbekannt

### Klinik

Beim Patienten ist eine Mosaikkonstellation gesichert.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1973

### Flowzytometrie



### Interpretation

Bei diesem Patienten zeigt sich ein kontinuierliches Absinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes als typisches Beispiel für eine Mosaikentwicklung, die stabil ist, im Gegensatz zur Mosaiksituation von Patient 1. Eine Erklärung für die im Dez 04 beobachtete sehr hohe G0/G1-Fraktion (63,2) findet sich nicht.

## Patient 15

### Komplementationsgruppe

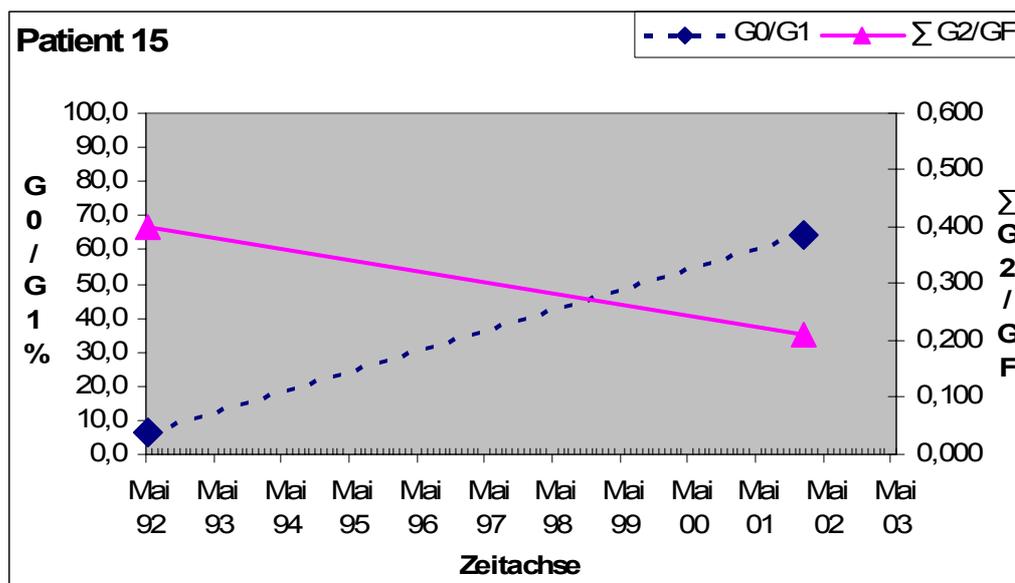
Unbekannt

### Klinik

Beim Patienten ist ein vollständiges Mosaik durch Fibroblasten-Untersuchung gesichert.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	Probe 2 war 3 Tage unterwegs
<u>Geburtsjahr:</u>	1989

### Flowzytometrie



### Interpretation

Auch hier zeigt sich klar der mosaiktypische Abfall des  $\Sigma G2/GF$ -Wertes in den Bereich Gesunder. Das Ansteigen des G0/G1-Wertes während der Mosaikentwicklung ist eher gegensätzlich zu den Erwartungen für diesen Wert. Möglicherweise hat die lange Transportdauer der Blutprobe zu einem vermehrten Zerfall von Lymphozyten in der Probe geführt, der Ursache des hohen G0/G1-Wertes zum Zeitpunkt Mai 02 ist.

## Patient 16

### Komplementationsgruppe

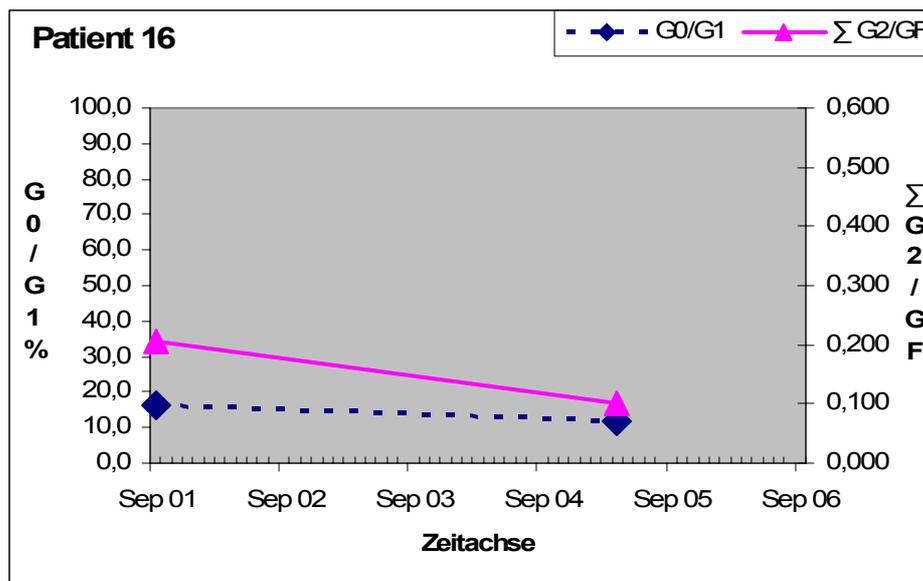
Unbekannt

### Klinik

06/2005 Die Verdachtsdiagnose FA wird mit Hilfe von Hautfibroblasten bestätigt. Es hat sich ein vollständiges Mosaik entwickelt.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1998

### Flowzytometrie



### Interpretation

Das im Juni 2006 anhand von Fibroblastenkulturen gesicherte Mosaik bestand schon zum Zeitpunkt der 1. Messung mit einem  $\Sigma$  G2/GF-Wert von 0,204, welcher innerhalb von 4 Jahren noch tiefer in den Bereich von Gesunden gesunken ist. Gleichzeitig erniedrigte G0/G1- und  $\Sigma$  G2/GF-Werte, wie man sie bei der Entwicklung eines kompletten Mosaikstatus erwartet, sind bei diesem Patienten gut zu erkennen. Die Lymphozyten sind mithilfe der Flowzytometrie nicht mehr von Lymphozyten Gesunder zu unterscheiden.

## Patient 17

### Komplementationsgruppe

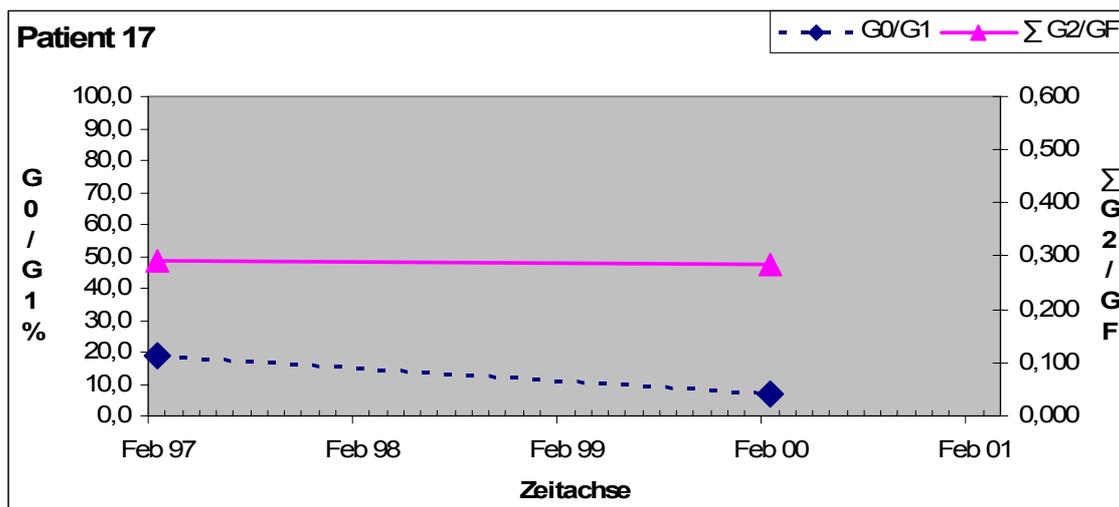
Unbekannt

### Klinik

Beim Patienten ist eine Mosaikkonstellation gesichert.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1951

### Flowzytometrie



### Interpretation

Da die Patientin trotz guter Stimulierbarkeit der Lymphozyten und nur leichter Erhöhung des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes FA-typische Symptome wie Thrombozyto-, und Erythrozytopenie aufwies, wurde eine Fibroblastenkultur im Hinblick auf eine FA-Erkrankung mit bereits bestehender Mosaikbildung untersucht. Dabei wurde die Diagnose FA bestätigt. Die Lage der Werte spiegelt den Verlust der FA-typischen Zelleigenschaften bei der Entwicklung eines Mosaiks wieder. Bemerkenswert ist insbesondere der sehr niedrige G0/G1-Wert, welcher die exzellente Mitogenantwort der revertierten Lymphozyten illustriert.

## Patient 18

### Komplementationsgruppe

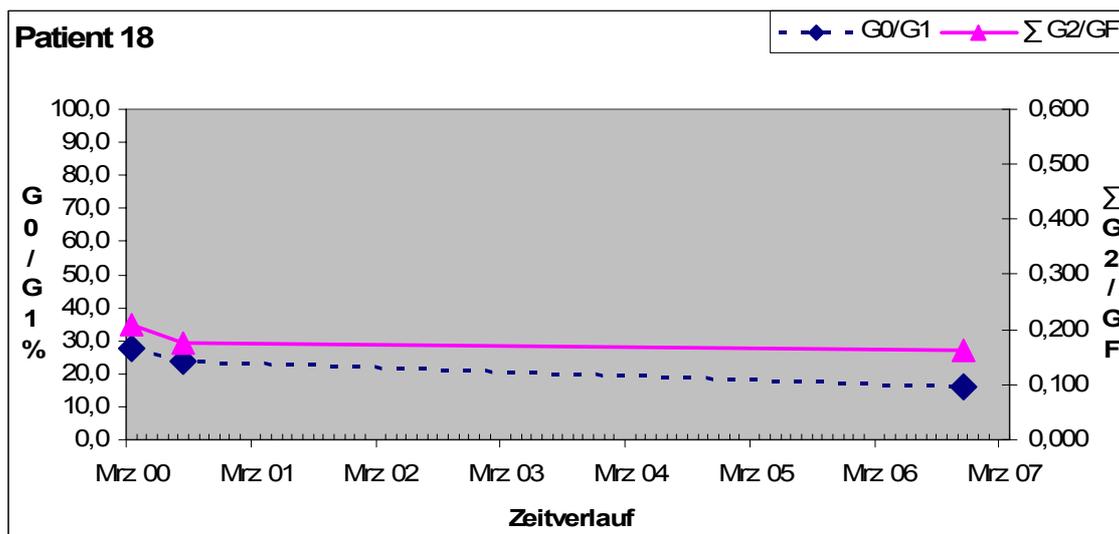
Unbekannt

### Klinik

Beim Patienten ist ein vollständiges Mosaik gesichert.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1979

### Flowzytometrie



### Interpretation

Der niedrige  $\Sigma$  G2/GF-Wert von 0,209 bei der ersten Messung spricht für eine Mosaikbildung, welche anhand von Fibroblastenkulturen gesichert wurde. Ein weiteres Absinken des Wertes über 0,176 nach 0,163 zeigt, dass das Mosaik zum ersten Messzeitpunkt noch nicht vollständig ausgebildet war. Auch das Absinken des G0/G1-Wertes auf ein Wertenniveau, das normale Stimulierbarkeit anzeigt, spricht für eine erfolgreiche und persistente Mosaikentwicklung.

## Patient 19

### Komplementationsgruppe

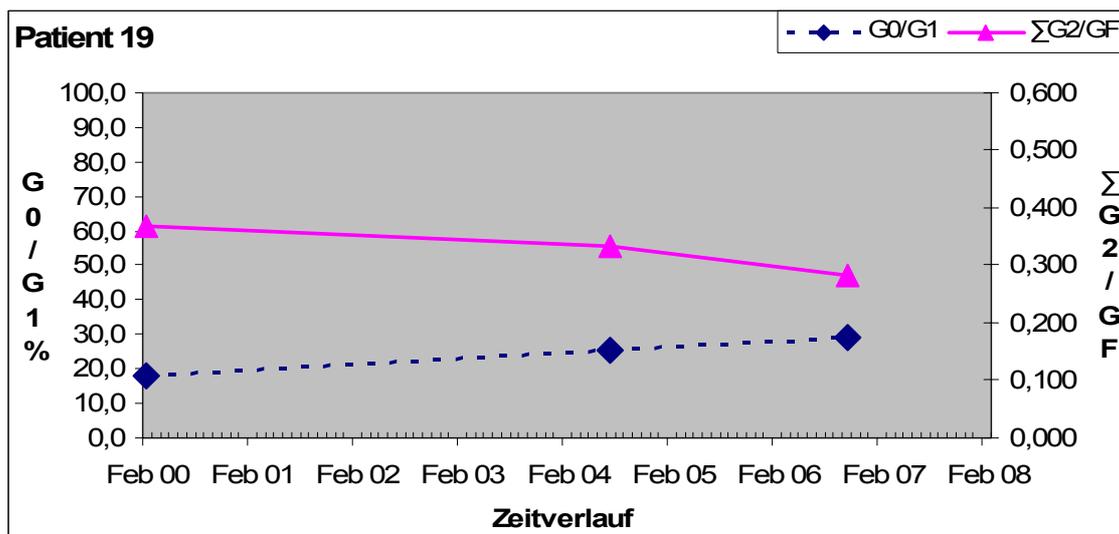
Unbekannt

### Klinik

Beim Patienten ist ein vollständiges Mosaik gesichert.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	nein
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1974

### Flowzytometrie



### Interpretation

Beim Patienten ist ein Mosaik anhand von Fibroblastenkulturen gesichert.  $\Sigma$  G2/GF-Werte knapp an der Grenze zwischen dem intermediären Bereich und dem Bereich Gesunder bzw. vollständiger Mosaik lassen weitere Verlaufskontrollen sinnvoll erscheinen. Dabei wird sich zeigen, ob das Mosaik auf diesem Niveau stabil, rückläufig oder noch in Entwicklung ist. G0/G1-Werte zwischen 16,2 und 29,1 stehen im Einklang mit der Entwicklung eines Mosaiks.

### 3.4 Änderungen des Verlaufs durch KMT

#### Patient 20

#### Komplementationsgruppe

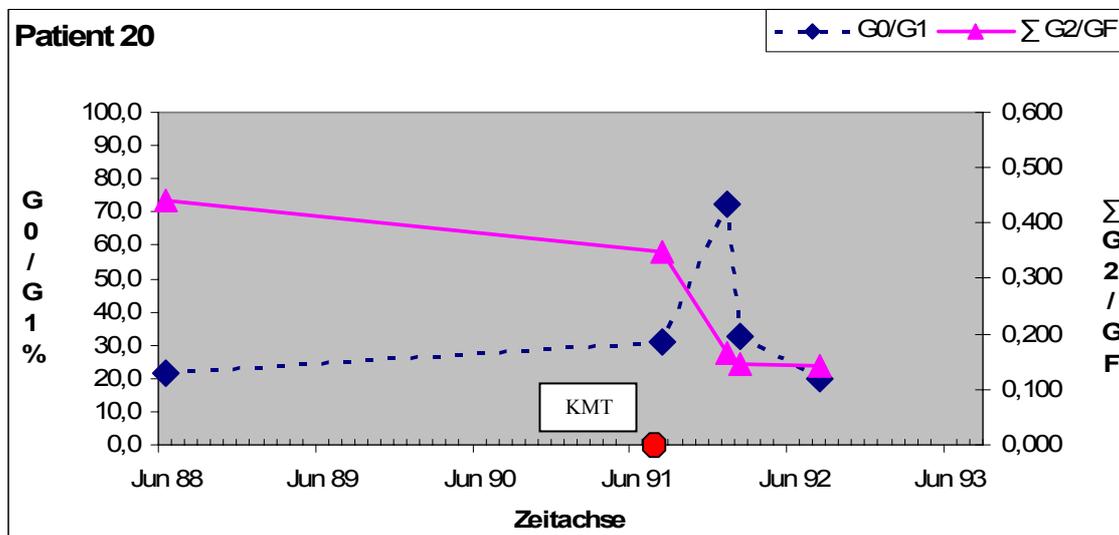
Unbekannt

#### Klinik

Im Alter von 4,5 Jahren fällt bei dem Patienten erstmals eine Thrombopenie auf. Äußerlich sind einige Café-au-Lait-Flecken erkennbar.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	Thrombozyten; sporadisch ab 1988 bis 1991
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	27/08/91
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	Probe 3 war vor der Aufbereitung 5 Tage lang unterwegs, Probe 4 3 Tage lang und Probe 5 6 Tage lang.
<u>Geburtsjahr:</u>	Unbekannt

#### Flowzytometrie



#### Interpretation

Anhand der Lage der G0/G1-, und  $\Sigma$  G2/GF-Werte kann man den Einfluss einer KMT auf das Zellzyklusverhalten der peripheren kernhaltigen Blutzellen gut nachvollziehen. Die beiden Wertepaare vom Juni 88 und August 91 liegen zeitlich gesehen vor KMT und spiegeln mit erhöhten  $\Sigma$  G2/GF-Werten (0,442 und 0,347) und leicht verringerter Lymphozytenstimulierbarkeit (21,8 und 31,2) Merkmale der FA-Erkrankung wieder. 4 Monate nach KMT liegt der  $\Sigma$  G2/GF-Wert mit 0,165 im Bereich Gesunder Patienten

und bleibt bei 2 weiteren Messzeitpunkten auf diesem niedrigen Niveau stabil (0,146 und 0,141). Der G0/G1-Wert zu Messzeitpunkt 3, direkt nach KMT, ist mit 72,5 stark erhöht im Vergleich zu den Werten vor KMT. Anschließend sinkt der G0/G1-Wert auf 32,4 und einige Monate später auf 19,8, einem Wert, der für normale Stimulierbarkeit der Lymphozyten steht. Erklärbar sind die starken Schwankungen des G0/G1-Wertes im Verlauf durch die begleitende immunsuppressive Therapie bei KMT. Sie schränkt die Lymphozytenstimulierbarkeit unmittelbar nach der Transplantation massiv ein und führt so zu hohen G0/G1-Werten. Mit der Dosisreduktion der immunsuppressiven Therapie sinken die G0/G1-Werte wieder auf das normale Niveau.

Zusätzlich sind die Blutproben des Patienten überdurchschnittlich lange unterwegs gewesen. Eine dadurch mögliche Erhöhung der G0/G1- und  $\sum$  G2/GF-Werte ist jedoch nicht zu erkennen.

## Patient 21

### Komplementationsgruppe

Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-G.

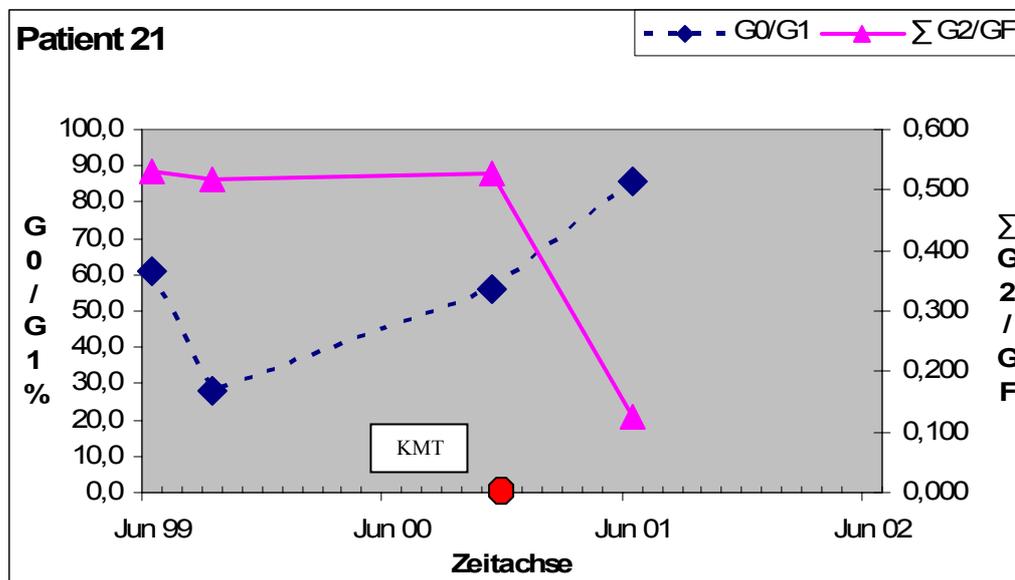
### Klinik

Postnatal werden beim Patienten eine Facialisparese rechts, Strabismus konvergens, Mikroophthalmie, Pigmentanomalien, Hypoplasie der Daumen, Klinodaktylie beidseits, Nierenagenesie links, Doppelniere rechts und ein Pankreas anulare diagnostiziert.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	seit 11/1997 bei Panzytopenie; Therapiebeginn mit Androgenen
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	04/12/00
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	festgestellt 09/1999
<u>Leukämieerkrankung:</u>	09/1999 4% Blasten im Blutbild
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1994

09/1999 Neben zytogenetischen Aberrationen wird ein myelodysplastisches Syndrom diagnostiziert.

### Flowzytometrie



### Interpretation

Σ G2/GF-Werte des Patienten vor KMT liegen im Bereich Erkrankter ohne Verdacht auf eine Mosaikkonstellation und schwanken im Verlauf nur minimal. Der G0/G1-Wert vor KMT, Ausdruck der Stimulierbarkeit der Lymphozyten, ist zunächst stark verringert (60,9), dann leicht verringert (28,2) und anschließend wieder stark verringert (55,9).

Eine Erklärung dieser Schwankung könnte der Nachweis von 4% Blasten im Blutbild zum 2. Messzeitpunkt (28,2) sein. Das Vorhandensein von Blasten in der Blutprobe kann eine Erhöhung oder Erniedrigung des G0/G1-Wertes hervorrufen. Der  $\sum$  G2/GF-Wert nach KMT, welche eine vollständige funktionelle Reversion des Knochenmarks bewirkt, liegt mit 0,124 wie erwartet im Bereich Gesunder. Der stark erhöhte G0/G1-Wert erklärt sich durch den Einsatz immunsuppressiver Medikamente während bzw. nach KMT.

## Patient 22

### Komplementationsgruppe

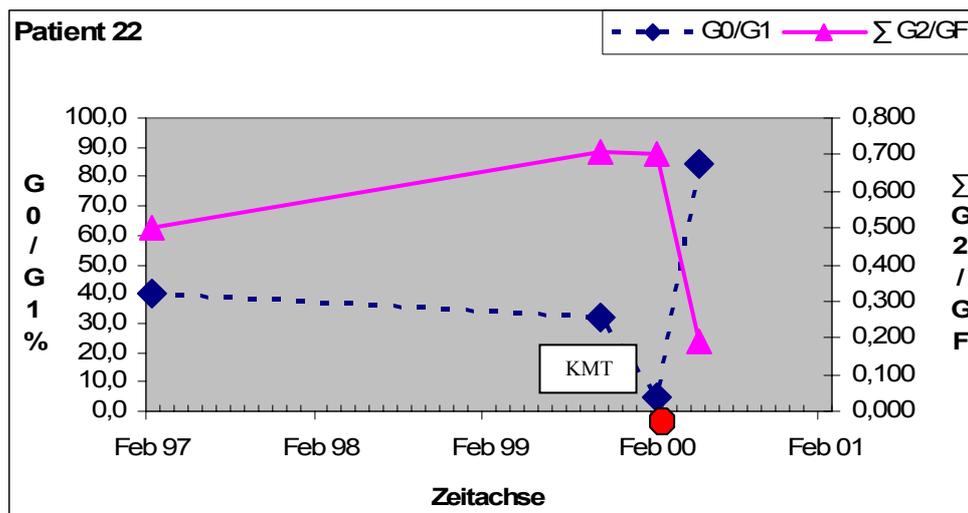
Unbekannt

### Klinik

Transfusionspflichtigkeit: nein  
Knochenmarkstransplantation: 10/03/00  
Zytogenetische Aberrationen: 09/1999 MDS mit Monosomie 7  
Leukämieerkrankung: nein  
Blutprobenbesonderheiten: Probe 1 ist bei Aufbereitung bereits 5 Tage alt  
Geburtsjahr: 1993

03/2000 Allogen-verwandte KMT, Spenderin Schwester.  
Konditionierung: Fludarabin, ATG

### Flowzytometrie



### Interpretation

Σ G2/GF-Werte vor KMT liegen im Vergleich zu anderen Patienten mit 0,691 und 0,703 besonders hoch und bestätigen die Diagnose FA. Eine Korrelation zwischen der Höhe des G2-Phasen-Arrestes und dem Schweregrad des Krankheitsverlaufs konnte bisher noch nicht festgestellt werden. Der G0/G1-Wert fällt zum 3. Messzeitpunkt mit 5,0 aus der Reihe. Eine Erklärung dafür findet sich anhand der vorhandenen Information jedoch nicht. Nach KMT zeigt sich der typische Abfall des Σ G2/GF-Wertes in den Bereich Gesunder sowie der medikamentös bedingte Anstieg des G0/G1-Wertes.

## Patient 23

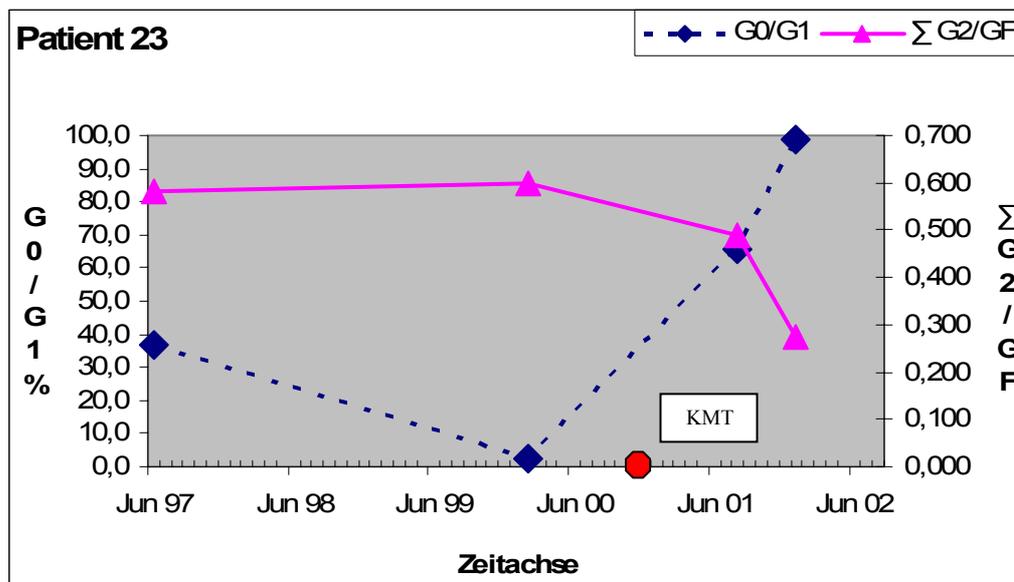
### Komplementationsgruppe

Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-C.

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	Thrombozyten; seit 10/1998
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	05/01/02
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	grünliches Serum bei der 4. Flowzytometrie am 16/01/02
<u>Geburtsjahr:</u>	1988

### Flowzytometrie



### Interpretation

Die ersten 3 Messungen lassen einen relativ gleichmäßigen Verlauf des  $\sum \text{G2/GF}$ -Wertes mit nur geringen Schwankungen erkennen. Im Gegensatz dazu schwankt der  $\text{G0/G1}$ -Wert erheblich. Nach KMT ist die Stimulierbarkeit (hoher  $\text{G0/G1}$ -Wert) in starkem Maße erniedrigt, der  $\sum \text{G2/GF}$ -Wert sinkt in den Bereich Gesunder. Dort befindet er sich allerdings an der Grenze zum intermediären Bereich, in welchem Werte kranker Patienten liegen. Üblicherweise sind  $\sum \text{G2/GF}$ -Werte transplantierter Patienten niedriger als 0,275. Eine mögliche Erklärung für die Erhöhung könnte durch den Zustand der Probe erklärbar sein (grünliches Serum), welcher zusätzlich zur Immunsuppression, die Stimulierbarkeit der Lymphozyten herabsetzt.

## Patient 24

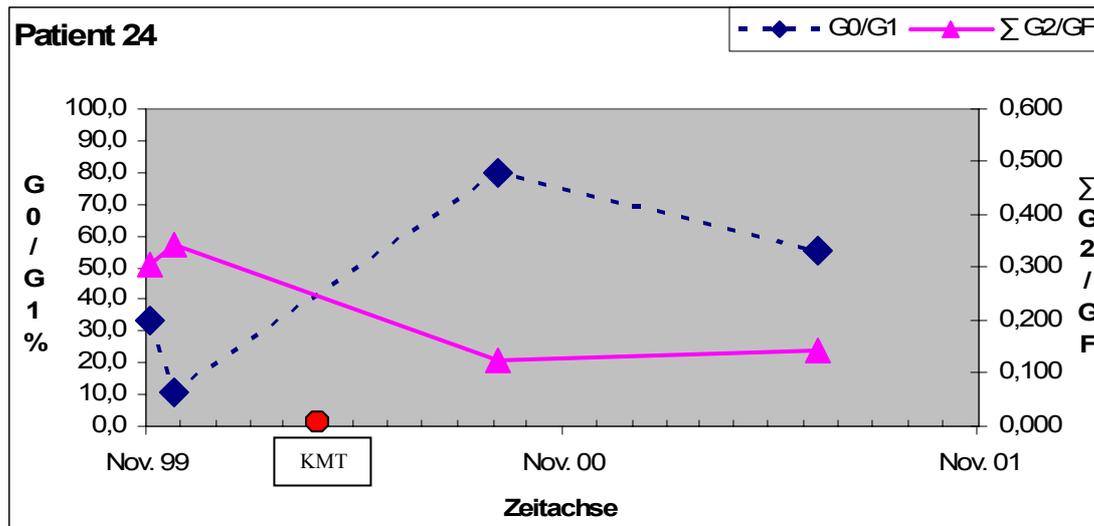
### Klinik

Beim Patienten fallen Hämatome, eine relative Mikrozephalie mit Mikrophtalmus und ein perimembranöser Ventrikelseptumdefekt auf.

Transfusionspflichtigkeit: seit der Geburt (1-2 TK/Woche)  
Knochenmarkstransplantation: 04/2000 1. KMT (AB0-, HLA-idente Schwester  
05/2000 Transplantatversagen  
06/2000 2. KMT

Zytogenetische Aberrationen: nein  
Leukämieerkrankung: nein  
Blutprobenbesonderheiten: nein  
Geburtsjahr: 1999

### Flowzytometrie



### Interpretation

Mit 0,307 und 0,343 ergeben sich initial  $\Sigma$  G2/GF-Werte im unteren Grenzbereich anderer Personen mit FA. Eine Untersuchung im Hinblick auf eine beginnende Mosaikbildung erfolgte nicht. Nach KMT zeigt sich als typisches Merkmal ein geringes, medikamentös bedingtes Lymphozytenwachstum (G0/G1-Wert von 80,0) und der  $\Sigma$  G2/GF-Wert liegt nun im Bereich Gesunder. Bei einer weiteren Kontrolle im Juni 06 erkennt man eine immer noch reduzierte Mitogenantwort bei einem G0/G1-Wert von 55,6. Insgesamt sieht man den typischen Verlauf der Flowzytometriewerte eines knochenmarkstransplantierten Patienten.

## Patient 25

### Komplementationsgruppe

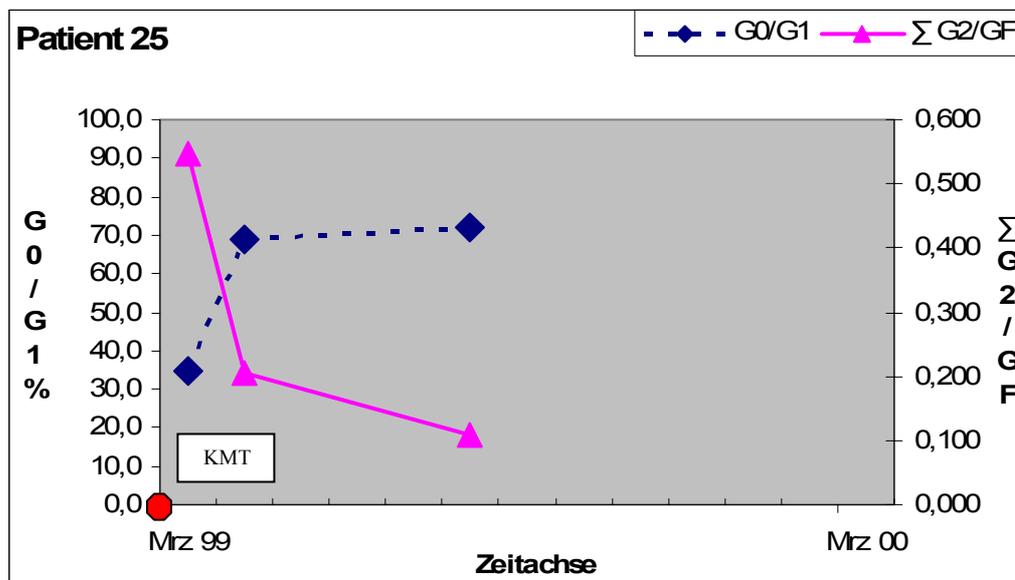
Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-A.

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	seit 07/1998 Polytransfusionen mit Thrombozyten und Erythrozyten
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	16/03/99
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	03/1999 25 von 30 Knochenmarkszellen haben Monosomie 7 + zusätzliche Aberrationen
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1987

- 07-09/1998 Therapieversuch mit Ciclosporin A, Erythropoetin, G-CSF und Steroiden
- 09/1998-02/1999 Therapie mit Androgenen, Erythropoetin und G-CSF
- 03/99 Allogene periphere Blutstammzelltransplantation, CD 34<sup>+</sup> angereichert vom HLA- und AB0-differenten Vater. Konditionierung mit Fludarabin und ATG. Anfangs gute hämatopoetische Regeneration mit späterem Abfall der Zellen.

### Flowzytometrie



## **Interpretation**

Medikamentös bedingte Erhöhung des G0/G1-Wertes (68,7 und 71,9) und Absinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes in den Bereich Gesunder als typische Merkmale nach KMT sind auch bei diesem Patienten erkennbar. Es fällt jedoch auf, dass der G0/G1-Wert auch noch einige Monate nach KMT stark erhöht ist (71,9) und nicht absinkt. Ein hoher  $\Sigma$  G2/GF-Wert von 0,548 und G0/G1-Wert von 34,6 vor KMT sprechen für die Diagnose FA.

## Patient 26

### Komplementationsgruppe

Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-A.

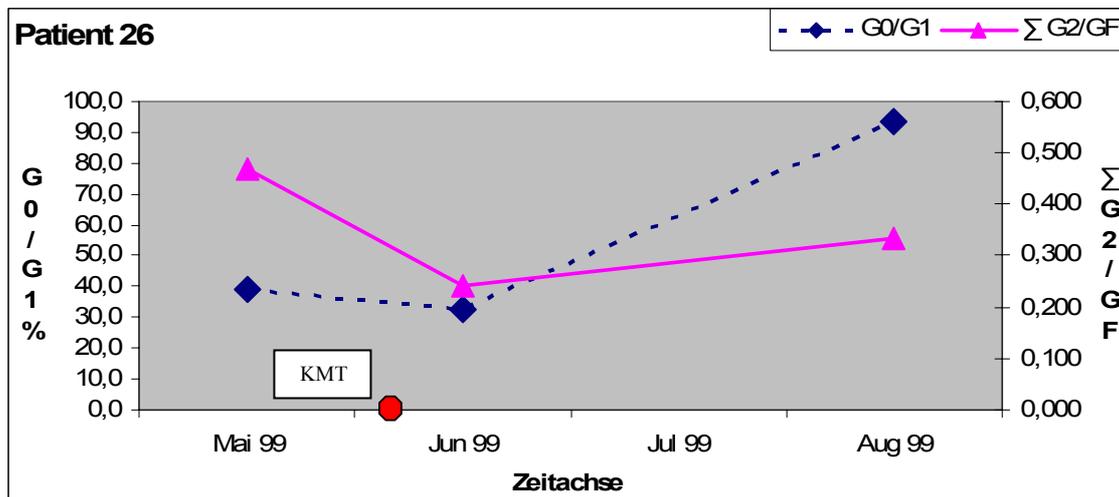
### Klinik

Der Patient hat Pigmentanomalien, typische Facies, Mikrophtalmie, relative Mikrozephalie, Daumenhypoplasie links und eine Beckenriere rechts.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	seit 02/1999
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	09/06/99
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	72 % der Knochenmarkszellen weisen Monosomie 7 auf
<u>Leukämieerkrankung:</u>	präleukämisch
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1987

05/1995-	Androgentherapie
04/1999	
06/99	PBSCT (HLA A-, B-, DRB1-identer, unverwandter Spender). Gute hämatopoietische Regeneration nach KMT.

### Flowzytometrie



### Interpretation

Auffällig bei diesem Patienten ist die ungewöhnliche Lage des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes nach KMT. Typisch wäre ein Abfall des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes in den unteren Bereich Gesunder Patienten. In diesem Fall liegt er jedoch mit 0,243 im oberen Bereich Gesunder und steigt im weiteren Verlauf mit 0,332 in den Bereich intermediärer Werte. Der zelluläre

FA-Phänotyp ist nach KMT noch zu erkennen. Anscheinend hat sich nach KMT kein vollständiger Chimärismus ausgebildet, was darauf zurückzuführen ist, dass beim milden FA-Konditionierungsprotokoll manchmal Knochenmarkszellen des FA-Patienten überleben. Diese FA-Zellen weisen im Gegensatz zu Gesunden einen erhöhten G2-Phasen-Arrest bei der Zellzyklusanalyse auf und sind die Ursache dafür, dass der  $\sum$  G2/GF-Wert nicht wie erwartet unter 0,3 absinkt, sondern weiterhin erhöht ist. Die geringe Stimulierbarkeit mit G0/G1-Werten von 32,4 und 93,3 ist medikamentös bedingt und nach KMT zu erwarten.

## Patient 27

### Komplementationsgruppe

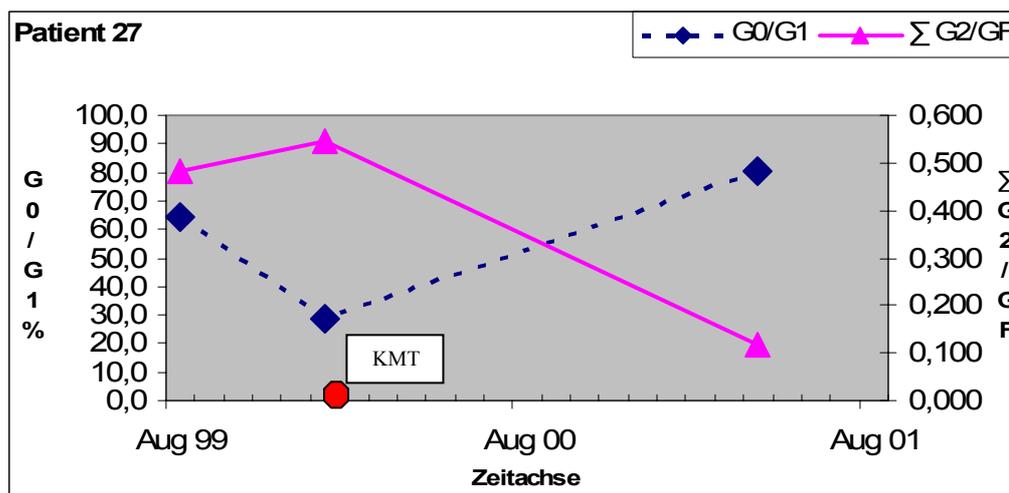
Unbekannt

### Klinik

Transfusionspflichtigkeit: seit 08/1999 für Erythrozyten und Thrombozyten  
Knochenmarkstransplantation: 28/02/00  
Zytogenetische Aberrationen: nein  
Leukämieerkrankung: nein  
Blutprobenbesonderheiten: nein  
Geburtsjahr: 1992

02/2000 KMT (HLA-haploidente (5/6 idente), AB0-idente Schwester).

### Flowzytometrie



### Interpretation

Medikamentös bedingte Erhöhung des G0/G1-Wertes (80,1) und Absinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes in den Bereich Gesunder (0,117) als typische Merkmale nach KMT sind auch bei diesem Patienten erkennbar. Die  $\Sigma$  G2/GF- und G0/G1-Werte vor KMT sind typisch für einen Standardverlauf der Werte eines FA-Patienten, da sie trotz kleiner Schwankungen im Bereich Erkrankter ohne Mosaiktendenz bleiben. Dies gilt ebenso für die G0/G1-Werte, wobei die Post-KMT-Erhöhung ungewöhnlich lange persistiert.

## Patient 28

### Komplementationsgruppe

Unbekannt

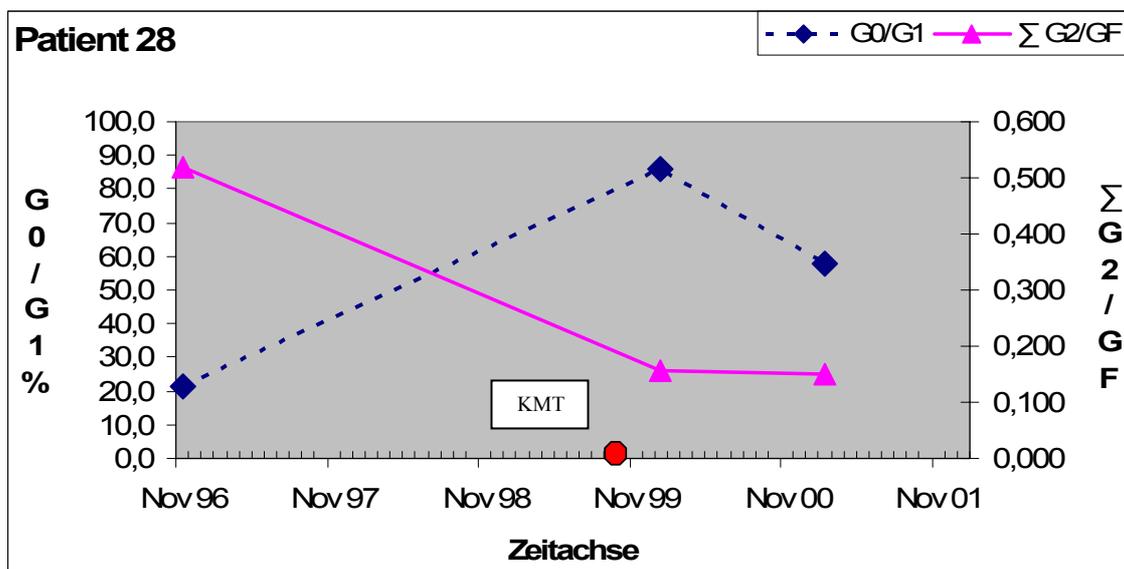
### Klinik

Der Patient hat eine FA-typische Facies und Pigmentanomalien.

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	01/1991-09/1995
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	29/10/99
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	11/1996 del(7)(q32-q36) 6/1999 weitere Zunahme
<u>Leukämieerkrankung:</u>	seit 09/1999 AML
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	Probe 3 ist bei Aufbereitung bereits 4 Tage alt
<u>Geburtsjahr:</u>	1985

10/1999 Eine unverwandte, periphere Blutstammzelltransplantation wird durchgeführt. Anschließend gute hämatopoietische Regeneration.

### Flowzytometrie



### Interpretation

Ein Standardverlauf eines knochenmarkstransplantierten FA-Patienten mit medikamentös bedingtem Anstieg des G0/G1-Wertes nach KMT, anschließend beginnender Normalisierung und dem Abfall des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes in den Bereich Gesunder ist hier erkennbar. Eine Beeinflussung der 3. Messung durch das erhöhte Alter der Blutprobe ist nicht zu erkennen, der G0/G1-Wert könnte dadurch etwas zu hoch gemessen sein.

## Patient 29

### Komplementationsgruppe

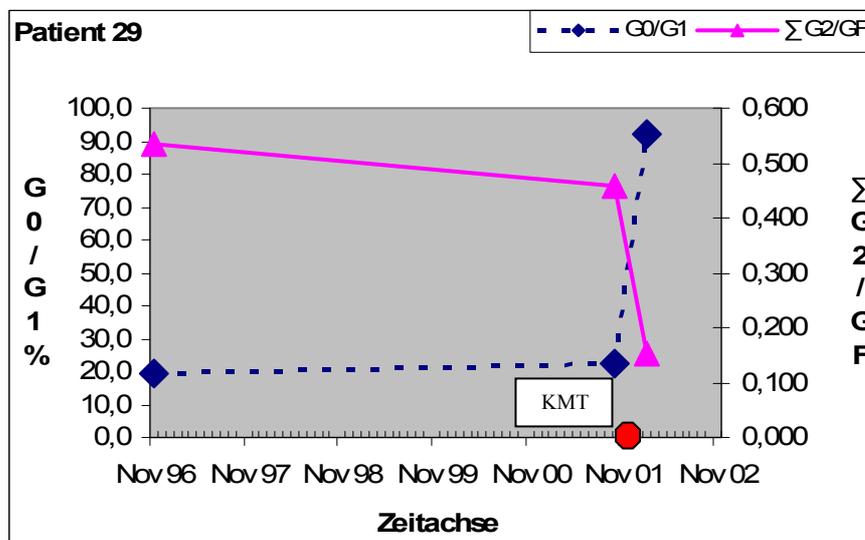
Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe FA-A.

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	seit 06/1999 Thrombozyten und Erythrozyten; zusätzlich Androgentherapie
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	06/12/01
<u>Zytopenetische Aberrationen:</u>	11/1996 Deletion im langen Arm Chromosom 7 02/2001 wieder verschwunden 10/2001 Partielle Monosomien 22q11.2-22qter
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1987

12/2001 Periphere Blutstammzelltransplantation von unverwandtem Spender. Anschließend gute hämatopoietische Regeneration.

### Flowzytometrie



### Interpretation

Medikamentös bedingte Erhöhung des G0/G1-Wertes (91,9) und Absinken des ΣG2/GF-Wertes (0,153) in den Bereich Gesunder als typische Merkmale nach KMT sind auch bei diesem Patienten erkennbar.

## Patient 30

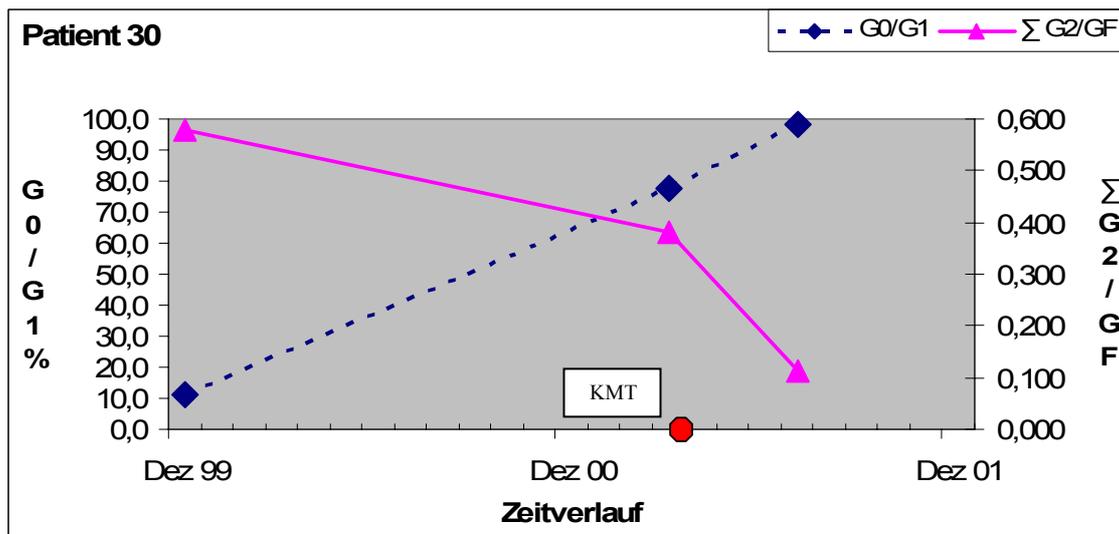
### Komplementationsgruppe

Unbekannt

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	04/2001 1. KMT (HLA-idente Schwester) 06/2001 2. KMT (HLA-idente Schwester) 09/2001 3. KMT (PBSCT, HLA-11/12-identer, unverwandter Spender)
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	1992

### Flowzytometrie



### Interpretation

Mit einem  $\Sigma$  G2/GF-Wert von 0,580 findet sich ein Wert, der die Diagnose FA bestätigt. In einem zeitlichen Abstand von etwa 1 Jahr sinkt dieser Wert auf 0,380 und eine partielle Mosaikbildung wäre denkbar, obwohl ein gleichzeitig stark erhöhter G0/G1-Wert von 77,8 eher nicht für eine Mosaikbildung spricht. Eine weitere Beobachtung dieses Verdachtes ist allerdings nicht möglich da nach einigen Monaten eine KMT durchgeführt wurde, die eine Erhöhung des G0/G1-Wertes (98,0) und ein Absinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes (0,113) in den Bereich Gesunder als typische Merkmale nach KMT erkennen lässt.

## Patient 31

### Komplementationsgruppe

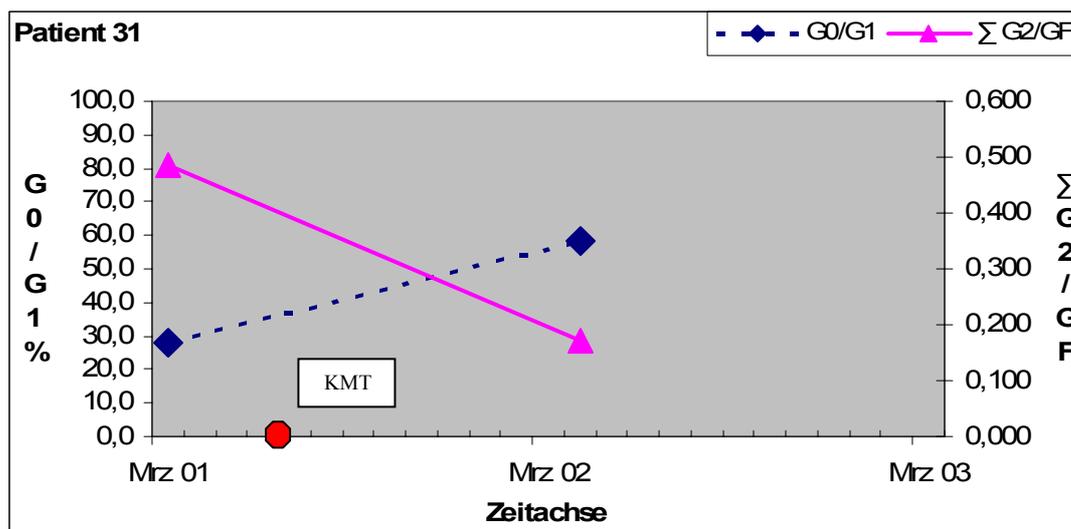
Unbekannt

### Klinik

Transfusionspflichtigkeit: unbekannt  
Knochenmarkstransplantation: 20/07/01  
Zytogenetische Aberrationen: nein  
Leukämieerkrankung: nein  
Blutprobenbesonderheiten: Probe 1 war EDTA- anstatt Heparin-Röhrchen  
Geburtsjahr: 1997

07/2001 Allogen-verwandte KMT. Stabiles Engraftment für alle 3 Blutlinien.

### Flowzytometrie



### Interpretation

Bei diesem Patienten wurde anstatt der üblichen, mit Heparin versetzten Blutprobe ein EDTA-Röhrchen zur Blutentnahme verwendet. Dies könnte eine Ursache für die Verminderung der Lymphozytenstimulierbarkeit sein (28,2). Weiterhin erkennt man den typischen medikamentös bedingten Anstieg des G0/G1-Wertes (58,2) und das Absinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes (0,173) in den Bereich Gesunder nach KMT.

## Patient 32

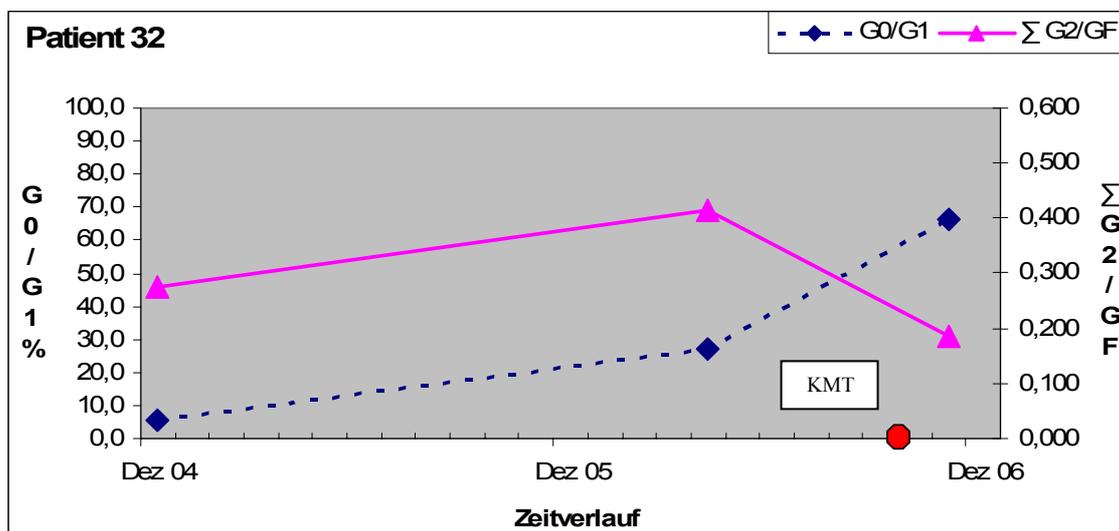
### Komplementationsgruppe

Der Patient gehört zur Komplementationsgruppe D2.

### Klinik

<u>Transfusionspflichtigkeit:</u>	nein
<u>Knochenmarkstransplantation:</u>	02/04/06
<u>Zytogenetische Aberrationen:</u>	nein
<u>Leukämieerkrankung:</u>	nein
<u>Blutprobenbesonderheiten:</u>	nein
<u>Geburtsjahr:</u>	Unbekannt

### Flowzytometrie



### Interpretation

Die Lymphozytenstimulierbarkeit ist mit einem G0/G1-Wert von 5,6 zum 1. Messzeitpunkt im normalen Bereich. Gleichzeitig ergibt sich ein  $\Sigma$  G2/GF-Wert von 0,276, der im oberen Bereich Gesunder liegt. Eine ausgeprägte Sensitivität der Zellen auf Mitomycin C bestätigt jedoch die Diagnose FA. Normale Stimulierbarkeit und erniedrigte  $\Sigma$  G2/GF-Werte sind Kennzeichen von Patienten mit partieller Mosaikbildung und sprechen für eine angehende Mosaikbildung bei diesem Patienten. Zum 2. Messzeitpunkt liegen die Werte des Patienten mit einem G0/G1-Wert von 25,8 und einem  $\Sigma$  G2/GF-Wert von 0,414 allerdings nicht mehr im Bereich von Mosaikpatienten. Ein Mosaik zum ersten Messzeitpunkt war entweder nicht vorhanden oder ein eventuell in Entwicklung befindlich gewesenes Mosaik war rückläufig. Andere Faktoren, welche die niedrigen Werte des 1. Messzeitpunktes erklären könnten, sind in diesem Fall nicht vorhanden. Zum 3. Messzeitpunkt erkennt man den typischen

medikamentös bedingten Anstieg des G0/G1-Wertes (65,5) und das Absinken des  $\Sigma$  G2/GF-Wertes (0,184) in den Bereich Gesunder nach KMT.

### 3.5 Zusammenfassende Darstellung der Datenlage aller Patienten

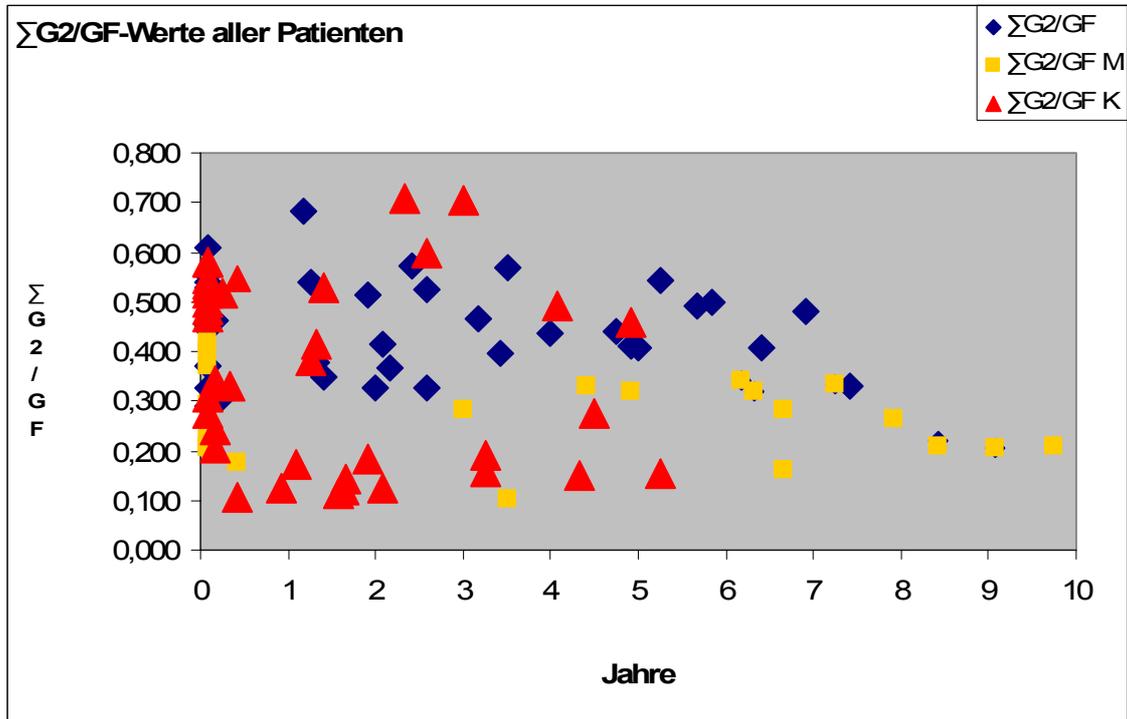


Diagramm 3.1

In Diagramm 3.1 sind die Werte aller Patienten, aufgliedert in Gruppe 1 ( $\Sigma G2/GF$ , entspricht Patienten ohne Mosaik bzw. KMT), Gruppe 2 ( $\Sigma G2/GF M$ , entspricht Patienten mit gesichertem Mosaik) und Gruppe 3 ( $\Sigma G2/GF K$ , entspricht Patienten bei welchen eine KMT durchgeführt wurde), zu sehen. Die X-Achse bildet den zeitlichen Abstand der Messungen ab, wobei zum Zeitpunkt 0 die Erstdiagnose erfolgte. Dabei lässt sich erkennen, dass die  $\Sigma G2/GF$ -Werte von Patienten mit Mosaik durchschnittlich niedriger als  $\Sigma G2/GF$ -Werte von Patienten ohne Mosaik/KMT sind. Die  $\Sigma G2/GF$ -Werte von Patienten vor KMT liegen im Bereich an FA erkrankter ( $\geq 0,4$ ) und nach Transplantation auch im Bereich Gesunder unter 0,3.

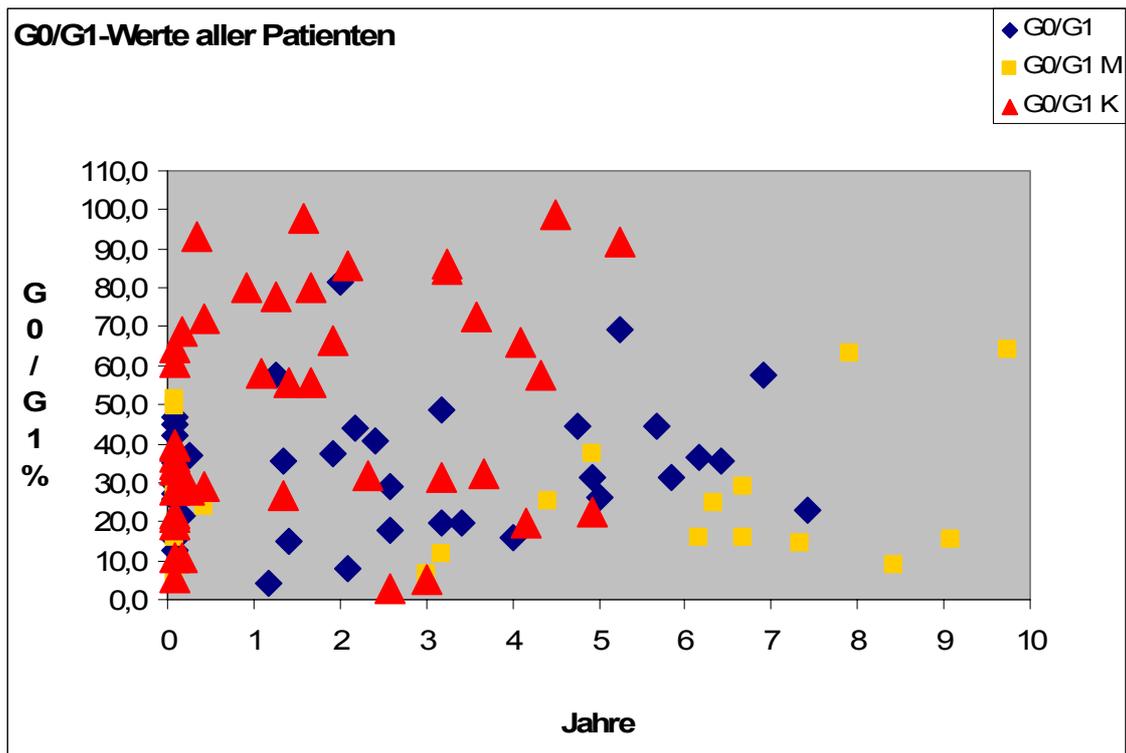


Diagramm 3.2

Die G0/G1-Werte von Patienten der Gruppe 1 (G0/G1, entspricht Patienten ohne KMT bzw. Mosaik) und Patienten der Gruppe 2 (G0/G1 M, entspricht Patienten mit gesichertem Mosaik) liegen in überlappenden Bereichen, ein signifikanter Unterschied ist nicht zu erkennen. Dagegen lässt sich ein Unterschied im Wertenniveau des G0/G1-Wertes zwischen den Gruppen 1/3 und 2/3 erkennen, der die medikamentös bedingte sehr starke Erhöhung des G0/G1-Wert (niedrige Stimulierbarkeit der Lymphozyten) nach KMT bei Gruppe 3 widerspiegelt. Bei den Gruppen 1 und 2 liegen die G0/G1-Werte eher im mittleren Bereich liegt.

### 3.6 Statistische Auswertung

Für die folgenden statistischen Tests wurde, soweit nicht anders erwähnt, ein  $\alpha$ -Fehler von 0,05 festgelegt. Um eine Nullhypothese abzulehnen, muss das Testergebnis (p-Wert) kleiner als der  $\alpha$ -Fehler sein.

#### **3.6.1 Korreliert das Alter der Blutprobe mit einer Veränderung des $\Sigma$ G2/GF-Wertes bzw. des G0/G1-Wertes?**

##### **Verwendete Werte:**

Das Alter der Probe wird in Stunden angegeben und beschreibt die Zeitspanne zwischen Blutabnahme des Patienten und Beginn der Verarbeitung der Blutprobe im humangenetischen Labor in Würzburg. Bei der anschließend durchgeführten Analyse des Blutes im Durchflusszytometer erhält man den jeweils zugehörigen G0/G1-, bzw.  $\Sigma$  G2/GF-Wert.

Da nicht bei jedem Patienten das Alter der Blutprobe der 1. Messung bekannt ist, wird jeweils das erste vorhandene Wertepaar G0/G1-Alter der Blutprobe bzw.  $\Sigma$  G2/GF-Alter der Blutprobe verwendet. Insgesamt ergeben sich für die beiden Parameter  $\Sigma$  G2/GF und G0/G1 29 Wertepaare, die statistisch untersucht werden können. Bei 3 Patienten war das Alter der Blutprobe bei keiner Messung in der Akte vermerkt.

##### **Statistischer Test:**

Die Gültigkeit der Nullhypothesen soll mittels eines nichtparametrischen Verfahrens, des bivariaten Korrelationskoeffizienten nach Spearman, untersucht werden.

Nullhypothese 1: Es gibt keinen Zusammenhang zwischen dem Alter der Blutprobe und dem  $\Sigma$  G2/GF-Wert.

Nullhypothese 2: Es gibt keinen Zusammenhang zwischen dem Alter der Blutprobe und dem G0/G1-Wert.

##### **Testergebnis:**

Nullhypothese 1:

Bei der Berechnung der Korrelation zwischen dem Alter der Blutprobe und dem  $\Sigma$  G2/GF-Wert ergibt sich ein p-Wert von 0,290, der deutlich größer als der  $\alpha$ -Fehler (0,05) ist. Die Nullhypothese wird deshalb nicht abgelehnt und eine Korrelation zwischen dem Alter der Blutprobe und dem  $\Sigma$  G2/GF-Wert kann nicht nachgewiesen werden.

Nullhypothese 2:

Mit einem p-Wert von 0,339 erfolgt auch bei der Prüfung der Korrelation zwischen dem Alter der Blutprobe und dem G0/G1-Wert keine Ablehnung der Nullhypothese. Es lässt sich keine Korrelation nachweisen.

### **3.6.2 Veränderung des $\Sigma$ G2/GF-Wertes und des G0/G1-Wertes nach KMT**

#### **Verwendete Werte:**

Es wird jeweils der letzte Wert vor und der 1. Wert nach KMT verglichen. Damit ergeben sich sowohl für den  $\Sigma$  G2/GF-Wert, als auch für den G0/G1 – Wert 10 Wertepaare. 5 der 15 Knochenmarkstransplantierten Patienten haben keinen Wert vor bzw. nach KMT und werden deshalb bei diesem Test nicht berücksichtigt.

#### **Statistischer Test:**

Die Prüfung der Nullhypothesen erfolgt mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben.

Nullhypothese 1: Es gibt keinen Unterschied zwischen den  $\Sigma$  G2/GF-Werte vor bzw. nach KMT.

Nullhypothese 2: Es gibt keinen Unterschied zwischen den G0/G1-Werten vor bzw. nach KMT.

#### **Testergebnis:**

Nullhypothese 1:

Bei einem p-Wert von 0,008, der deutlich kleiner als der  $\alpha$ -Fehler ist, wird die Nullhypothese abgelehnt. Dies bedeutet, dass ein Unterschied der  $\Sigma$  G2/GF-Werte vor bzw. nach KMT besteht.

Nullhypothese 2:

Das Testergebnis von 0,011 und die damit verbundene Ablehnung der Nullhypothese beweist einen signifikanten Unterschied der G0/G1-Werte vor bzw. nach KMT.

### **3.6.3 Statistischer Gruppenvergleich**

#### **Verwendete Daten:**

Um die 3 verschiedenen Gruppen (Transplantierte, Mosaikpatienten, Patienten ohne Mosaik/KMT) zu vergleichen, wurde für den  $\Sigma$  G2/GF-Wert und den G0/G1-Wert als charakteristische Größe für jeden Patienten jeweils der Mittelwert der einzelnen, über die Zeit hinweg aufgenommenen Messungen dieser Werte berechnet.

#### **Statistischer Test:**

Als Prüfverfahren für die Nullhypothesen wird der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dieses nichtparametrische Verfahren ist auch bei nicht-normalverteilten Daten für einen Vergleich von Gruppen anwendbar und wird deshalb an dieser Stelle verwendet. Der Kruskal-Wallis-Test unterzieht Rangwerte einer Varianzanalyse und ermittelt dabei p. Ist p kleiner als der  $\alpha$ -Fehler bedeutet dies, dass die Nullhypothese abgelehnt werden muss. Bei Ablehnung der Nullhypothese können die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test klassifiziert werden.

Nullhypothese 1: Die Mittelwerte des  $\sum G2/GF$ -Wertes in den 3 Gruppen unterscheiden sich nicht voneinander.

Nullhypothese 2: Die Mittelwerte des  $G0/G1$ -Wertes in den 3 Gruppen unterscheiden sich nicht voneinander.

**Testergebnis:**

Nullhypothese 1 wird mit einem p-Wert von 0,003 und Nullhypothese 2 bei einem p-Wert von 0,005 abgelehnt. Daraus lässt sich folgern, dass sowohl beim  $\sum G2/GF$ -Wert als auch  $G0/G1$  – Wert Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen müssen.

Um diese Unterschiede zu klassifizieren, vergleicht man nun jeweils 2 der Gruppen mithilfe des Mann-Whitney-U-Testes miteinander. Der Test wird dabei dreimal durchgeführt, sodass am Ende jede der 3 Gruppen einmal mit jeder anderen verglichen wurde. Um bei dreimaliger Durchführung des Testes eine hohe Fehlerwahrscheinlichkeit zu vermeiden, wird mittels Bonferroni-Korrektur ein neues  $\alpha$ -Fehlerniveau von 0,016 ermittelt. Ein p-Wert, der kleiner ist als 0,016, führt dabei zur Ablehnung der Nullhypothese.

Ermittelte p-Werte im Gruppenvergleich:

	$\sum G2/GF$	$G0/G1$
Gruppe 1/2	0,001	0,380
Gruppe 1/3	0,046	0,013
Gruppe 2/3	0,032	0,005

Für den  $\sum G2/GF$ -Wert ergibt sich im Gruppenvergleich zwischen Gruppe 1 und 2 ein p-Wert kleiner als der  $\alpha$ -Fehler und damit ein signifikanter Unterschied des Wertes zwischen diesen Gruppen. Im Gegensatz dazu scheint es mit p-Werten von 0,046 und 0,032 keinen signifikanten Unterschied des  $\sum G2/GF$ -Wertes zwischen den Gruppen 1/3 und 2/3 zu geben.

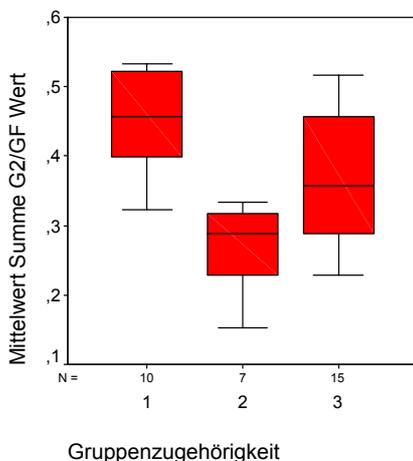


Abb. 3.1: In der Abbildung wird der  $\sum G2/GF$  – Wert im Gruppenvergleich per Boxplot abgebildet. Dabei sind die obere und untere Grenze der Box das 25-, bzw. 75 % Quantil, die Linie innerhalb der Box stellt den Median dar. Ober-, und unterhalb der Whisker liegen jeweils weitere 25% der Werte. Der signifikante Unterschied des Wertenniveaus zwischen Gruppe 1 und 2 ist gut zu erkennen, es besteht nur ein minimaler Überlappungsbereich der Whisker. Dagegen gibt es große Überlappungsbereiche bei Gruppe 1/3 und 2/3.

Für den G0/G1-Wert ergeben sich im Gruppenvergleich zwischen den Gruppen 1/3 bzw. 2/3 p-Werte kleiner als der neue  $\alpha$ -Fehler und damit ein signifikanter Unterschied des G0/G1-Wertes zwischen den Gruppen. Zwischen Gruppe 1/2 lässt sich bei einem p-Wert von 0,380 kein signifikanter Unterschied des G0/G1-Wertes feststellen.

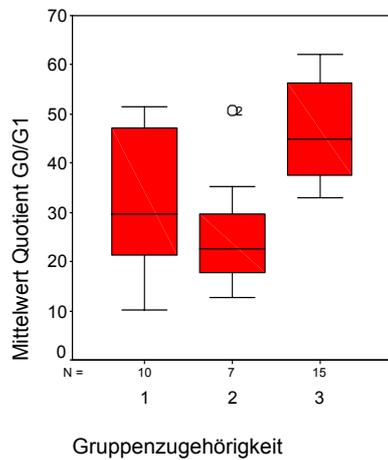


Abb. 3.2: In der Abbildung wird der G0/G1-Wert im Gruppenvergleich per Boxplot abgebildet. Dabei sind die obere und untere Grenze der Box das 25-, bzw. 75 % Quantil, die Linie innerhalb der Box stellt den Median dar. Ober-, und unterhalb der Whisker liegen jeweils weitere 25% der Werte. Der signifikante Unterschied des Wertenniveaus zwischen Gruppe 1/3 und 2/3 ist gut zu erkennen, es sind nur kleine Überlappungsbereiche zu erkennen. Dagegen überschneiden sich die Werte von Gruppe 2 komplett mit den Werten von Gruppe 3.

## 4. Diskussion

Die traditionelle Art der Diagnosestellung bei der FA beruht auf der Chromosomenbruchanalyse (Auerbach 1995). Dahingegen wurde am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg das alternative, schnellere und kostengünstigere Verfahren der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie an Lymphozyten etabliert (Seyschab et al, 1995). Dieses Verfahren macht sich die Tatsache zunutze, dass DNA-Schäden in mit Mitomycin C behandelten Lymphozyten von FA-Patienten nicht- oder fehlrepariert werden und sich somit in der Zelle anhäufen (Demuth et al. 2003; Thompson et al. 2005). Diese Zellen akkumulieren während der Zellzyklusanalyse am Übergang von der S- in die G<sub>2</sub>-Phase und besitzen einen 4cDNA-Gehalt (Schindler et al, 2003; 2007). Allerdings findet sich ein 4cDNA-Gehalt sowohl bei Zellen am S/G<sub>2</sub>-, als auch bei Zellen am G<sub>2</sub>/M-Phasen-Checkpoint des Zellzyklus. Die Zugehörigkeit zur jeweiligen Phase kann folglich nicht durch den DNA-Gehalt festgestellt werden. Um zwischen einer Arretierung der Zellen am S/G<sub>2</sub>- bzw. G<sub>2</sub>/M-Übergang zu differenzieren, erfolgt deshalb die gleichzeitige Messung des DNA-Gehaltes und der Expression von Phosphohiston H3 (H3P), ein Protein, welches nur in der M-Phase exprimiert wird. Bei den Untersuchungen zeigt sich, dass nur ein geringer Teil der arretierten Zellen mit 4cDNA-Gehalt HP3 exprimiert und der M-Phase zugehörig ist. Als Zeitpunkt der Arretierung von Zellen mit DNA-Schäden während des Zellzyklus konnte durch dieses Experiment demzufolge der S/G<sub>2</sub>-Phasen-Checkpoint identifiziert werden (Schindler et al, 2007).

Hinsichtlich statistischer Aussagekraft und Zeitaufwand ist die Zellzyklusanalyse der Chromosomenbruchanalyse überlegen. Die  $\sum$  G<sub>2</sub>/GF- und G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Werte bei FA-Patienten mit vollständig ausgebildetem Mosaik verhalten sich bei der Zellzyklusanalyse jedoch wie die Werte eines Patienten, der nicht an FA erkrankt ist und eine sichere Unterscheidung Erkrankter und Gesunder ist in diesem Fall problematisch (Gross et al, 2002; Hoehn et al. 2007). Im Zweifelsfall muss der Verdacht einer Mosaikbildung durch die Untersuchung von Hautfibroblasten des Patienten gesichert bzw. ausgeschlossen werden (Hoehn et al. 2007). Bei einer Mosaikkonstellation, die sich im Entstehen befindet, existiert aufgrund der Langlebigkeit der Lymphozyten neben der neuen, revertierten Zelllinie gleichzeitig die alte Zelllinie mit FA-typischen Merkmalen fort. Diese Mischung aus Lymphozyten mit und ohne FA-typische Eigenschaften äußert sich bei der Zellzyklusanalyse in intermediären  $\sum$  G<sub>2</sub>/GF-Werten, welche eine Diagnosestellung ebenfalls erschweren.

Durch die Auswertung sequentieller Zellzyklusanalysen bei einem Patienten und die Identifikation möglicher Ursachen für Werteschwankungen im Verlauf der Messungen soll eine Verbesserung der Interpretation der Zellzyklusdaten angestrebt werden.

### 4.1 Bedeutung der eigenen Ergebnisse

Die durchflusszytometrische Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose FA basiert im Wesentlichen auf 2 Parametern, dem  $\sum$  G<sub>2</sub>/GF- und dem G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Wert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass diese beiden Werte keine konstanten, für jeden Patienten charakteristischen Parameter darstellen, sondern im Krankheitsverlauf teilweise erheblich schwanken. Mögliche Ursachen dieser Schwankungen sind bereits

im Methodikteil aufgeführt und werden an dieser Stelle beispielhaft an einzelnen Patienten erläutert und kritisch hinterfragt. Um die Gültigkeit der Rückschlüsse auf die möglichen Ursachen von Schwankungen zu prüfen, wurden statistische Tests eingesetzt, die im Folgenden erläutert werden sollen.

Die Korrelation zwischen dem Alter der Blutprobe und einer Erhöhung des G0/G1-Wertes bzw. des  $\sum$  G2/GF-Wertes konnte statistisch nicht belegt werden. Bei der Berechnung wurden 29 Wertepaare verwendet, davon wiesen allerdings nur 2 Paare ein erhöhtes Alter der Blutprobe auf. Bei einer Wiederholung des Testes mit einer größeren Stichprobe, bei der eine größere Anzahl an Wertepaaren zu alter Blutproben repräsentativ vertreten ist, wird eine Korrelation zwischen dem Alter der Blutprobe und einer Erhöhung des G0/G1-Wertes und des  $\sum$  G2/GF-Wertes erwartet.

Die im Ergebnisteil beschriebene Änderung der flowzytometrischen Werte nach KMT wird durch den Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben bestätigt und ein signifikanter Unterschied der Wertepaare vor bzw. nach KMT belegt. Durch KMT, die eine funktionelle Reversion des Knochenmarks darstellt, sinkt der  $\sum$  G2/GF-Wert in den Bereich Gesunder unter 0,3. Der nach der KMT stark erhöhte G0/G1-Wert reflektiert die durch Immunsuppression verringerte Stimulierbarkeit der Lymphozyten. Dieses zumeist transitorische Phänomen, wird an dieser Stelle durch statistische Testung nochmals bestätigt.

Die Vermutung, dass der  $\sum$  G2/GF-Wert und der G0/G1-Wert zwischen den 3 eingangs definierten Patientengruppen im Mittel unterschiedlich ist, wird durch den Kruskal-Wallis-Test wie folgt demonstriert. Für den  $\sum$  G2/GF-Wert ergibt sich im Gruppenvergleich ein deutlicher Unterschied des Mittelwertes zwischen Patienten ohne Mosaik/KMT (1) und Patienten mit entwickeltem Mosaik (2). Die Erkenntnis, dass Mosaikpatienten im Verlauf niedrigere  $\sum$  G2/GF-Werte haben als Patienten ohne Mosaik/KMT, wird dadurch gestützt. Patienten der Gruppen 1 und 3 haben vor KMT gleichermaßen erhöhte  $\sum$  G2/GF-Werte. Nach KMT, welche eine Gesundung des Knochenmarks herbeiführt, haben Patienten der Gruppe 3, im Gegensatz zur Gruppe 1, erniedrigte  $\sum$  G2/GF-Werte und man würde vermuten dass der Kruskal-Wallis-Test einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe 1 und 3 bestätigt. Da bei diesem Test jedoch Mittelwerte verglichen werden und bei Patienten der Gruppe 3 nach KMT meist nur ein  $\sum$  G2/GF-Wert ermittelt wurde, allerdings mehrere erhöhte  $\sum$  G2/GF-Werte vor KMT in die Berechnung des Mittelwertes eingehen, kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Würden in die Berechnung der Mittelwerte von Patienten der Gruppe 3 mehrere  $\sum$  G2/GF-Werte nach KMT einfließen, könnte sich bei einem Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 1/3 zeigen. Zwischen Gruppe 2 und 3, das heißt zwischen Transplantierten und Mosaikpatienten wird durch den Test ebenfalls kein Unterschied der Lage der Mittelwerte festgestellt. Da beide Gruppen durch ein Absinken des  $\sum$  G2/GF-Wertes im Verlauf charakterisiert sind, war dies auch nicht zu erwarten.

Für den G0/G1-Wert erwartet man einen Unterschied zwischen den Gruppen 1/3 und 2/3, weil nach KMT die Stimulierbarkeit der Lymphozyten, medikamentös bedingt sehr gering (stark erhöhter G0/G1-Wert) und die Stimulierbarkeit bei Gruppe 1 und 2 in den interpretierten Patientenverläufen eher im mittleren Bereich liegt. Diese Mutmaßung wird durch den Kruskal-Wallis-Test bewiesen. Lediglich zwischen Gruppe 1 und 2

(Mosaikpatienten und Patienten ohne Mosaik/KMT) wurde kein signifikanter Unterschied der Lage der mittleren G0/G1-Werte ermittelt.

Neben der statistischen Auswertung der Daten erfolgte auch eine exemplarische Interpretation des Werteverlaufs der Patienten. Durch diese Untersuchungen der individuellen Flowzytometriewerte der Patienten im zeitlichen Verlauf konnten 4 Gruppen mit unterschiedlichen Charakteristika definiert werden.

### **Beispiele für Standardverläufe**

Charakteristika dieser Gruppe sind  $\sum$  G2/GF-Werte, die sich im oberen Bereich von Patienten mit FA befinden ( $\geq 0,4$ ). Die Werte unterliegen leichten Schwankungen, die sich jedoch auf hohem Wertenniveau abspielen. Die G0/G1-Werte dieser Gruppe sind meist, typisch für Patienten mit FA, leicht erhöht, können jedoch auch niedrig im Bereich normaler Stimulierbarkeit liegen.

### **Beispiele für variable Verläufe**

Dieser Gruppe können keine eindeutigen Charakteristika zugeordnet werden, da der Verlauf der Werte sehr inhomogen ist. In einigen Fällen ist nicht klar, ob sich ein Mosaik in Entwicklung befindet. Die nötige Untersuchung von Fibroblastenkulturen wurde in diesen Fällen jedoch nicht durchgeführt. Anhand einzelner Patienten lässt sich erkennen, dass durch äußere Faktoren bedingte Werteschwankungen den Verlauf der Werte eines Patienten mit sich in Entwicklung befindlichem Mosaik imitieren können.

### **Beispiele für die Entwicklung eines somatischen Mosaiks**

Bei Patienten mit Mosaikbildung gibt es 2 unterschiedliche Verläufe der Werte. Im ersten Fall beginnt die Entwicklung des Mosaiks schon vor dem 1. Messzeitpunkt und die flowzytometrische Messung zeigt von Anfang an verminderte oder normalisierte  $\sum$  G2/GF-Werte. Im anderen Fall beginnt die Entwicklung des Mosaiks erst nach dem 1. Messzeitpunkt und es lässt sich ein deutlicher Abfall des  $\sum$  G2/GF-Wertes im Verlauf erkennen. Ein solcher Abfall kann jedoch auch durch äußere Beeinflussung des Wertes bedingt sein und ist damit nicht beweisend für die Tendenz zur Mosaikentwicklung. Der G0/G1-Wert sinkt häufig, aber nicht zwingend bei Entwicklung eines Mosaiks und ist ebenfalls äußeren Einflüssen ausgesetzt, die Ursache für Schwankungen sein können.

### **Änderungen des Verlaufs durch KMT**

Charakteristika einer Flowzytometrie Kurve knochenmarkstransplantierte Patienten sind ein sprunghafter Abfall des  $\sum$  G2/GF-Wertes in den Bereich Gesunder unter 0,3 und ein stark erhöhter G0/G1-Peak direkt nach KMT, verbunden mit einem anschließenden Absinken des G0/G1-Wertes im Zuge der Dosisreduktion der immunsuppressiven Therapie. Ausnahmen zeigen sich bei Patienten mit unvollständigem Chimärismus nach KMT. Ihre  $\sum$  G2/GF-Werte können höher als 0,3 liegen und sind Ausdruck einer gemischten Population an Knochenmarkszellen, bestehend aus Zellen des Spenders und FA-Zellen des Empfängers.

### **Unterschiede und Gemeinsamkeiten der 4 Gruppen**

Obwohl charakteristische Merkmale für jede der 4 Gruppen bestehen, kann anhand des Werteverlaufs oder -niveaus keine eindeutige Zuordnung zu einer Gruppe erfolgen, da sich einige Merkmale überlappend in unterschiedlichen Gruppen wiederfinden.

So gibt es ähnliche Verläufe bei Patienten mit Mosaikbildung und Patienten ohne Mosaikbildung. Beispielsweise gleichen sich die Werte von Patient 12 und Patient 19 stark, beide zeigen vom 1. Messzeitpunkt an intermediäre  $\sum G2/GF$ -Werte, welche während weiterer Messungen relativ konstant bleiben. Während sich bei Patient 19 nachweislich ein Mosaik gebildet hat, ist dieses bei Patient 12 nicht der Fall. Zudem gibt es in der Gruppe der variablen Verläufe mehrere Patienten (8 und 10), welche anfangs intermediäre  $\sum G2/GF$ -Werte zeigen, die für eine Tendenz zur Mosaikbildung sprechen könnten, anschließend jedoch wieder Werte im Bereich Erkrankter ohne Mosaiktendenz ( $\geq 0,4$ ) aufweisen. Daraus lässt sich folgern, dass aufgrund eines einzelnen intermediären Wertes noch keine eindeutige Aussage im Bezug auf eine Mosaikentwicklung getroffen werden kann. Diese Tatsache unterstreicht die Wichtigkeit der Untersuchung von Fibroblastenkulturen zum Ausschluss bzw. zur Bestätigung einer Mosaikkonstellation, um einen intermediären Wert eindeutig einzuordnen. Ist im Falle eines Patienten mit intermediären  $\sum G2/GF$ -Werten die Frage nach einer bestehenden Mosaikentwicklung nicht sehr dringlich, kann anstatt der Analyse von Fibroblastenkulturen auch eine jährliche Verlaufskontrolle ausreichend sein.

Die in der Fragestellung angesprochene Problematik des Erkennens eines Mosaiks bleibt also weiterhin bestehen. Ebenso bleibt die Frage nach der Korrelation zwischen der Höhe der G2-Phasen-Akkumulation und dem Krankheitsverlauf ungeklärt. Eine derartige Untersuchung erfordert Daten, die den Krankheitsverlauf widerspiegeln. Dafür geeignet sind aktuelle Thrombo-, Erythro- und Leukozytenwerte, die dem Institut für Humangenetik jedoch nicht vorliegen.

### **Zusätzliche Faktoren**

Die bereits im Teil Material und Methoden vorgestellten Parameter, die Schwankungen des  $\sum G2/GF$ -Wertes und des G0/G1-Wertes bewirken können sind die Ursache dafür, dass die erhobenen Zellzyklusdaten für den einzelnen Patienten nicht konstant sind. An dieser Stelle werden exemplarisch einige Beispiele für den Einfluss verschiedener Faktoren auf das Wertenniveau gegeben.

Eine Leukämieerkrankung kann eine Erniedrigung des  $\sum G2/GF$ -Wertes und ein Absinken oder Ansteigen des G0/G1-Wertes hervorrufen. Bei Patient 9 sinkt der  $\sum G2/GF$ -Wert nach Leukämieerkrankung von 0,540 auf 0,327, der G0/G1-Wert steigt von 37,4 auf 81,5. Patient 21 bricht zum Zeitpunkt einer Leukämieerkrankung mit dem G0/G1-Wert ein (60,9 auf 28,2), sein  $\sum G2/GF$ -Wert verändert sich dabei kaum. Patient 9 und 21 sind Beispiele für eine mögliche Werteschwankung im Zusammenhang mit einer Leukämieerkrankung. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Interpretation der Werteschwankungen nur Mutmaßungen und keine wissenschaftlich belegten Tatsachen sind.

Obwohl bei der statistischen Untersuchung der Daten keine Korrelation zwischen dem Alter der Blutprobe und der Höhe der  $\sum G2/GF$ - und  $G0/G1$ -Werte bestand, wurden bei Patient 15 und 23 Anhaltspunkte für eine mögliche Beeinflussung der Werte durch das Alter der Probe gefunden. Bei Patient 15 hat möglicherweise die lange Transportdauer der Blutprobe zu einem vermehrten Zerfall von Lymphozyten in der Probe geführt, der Ursache des hohen  $G0/G1$ -Wertes bzw. der niedrigen Lymphozytenstimulierbarkeit im Vergleich mit den vorherigen Werten ist. Eine mögliche Erklärung für die drastische Erhöhung des  $G0/G1$ -Wertes bei Patient 23 zum 3. Messzeitpunkt (98,9) könnte durch den Zustand der Probe erklärbar sein (grünliches Serum), welcher zusätzlich zur Immunsuppression, die Stimulierbarkeit der Lymphozyten herabsetzt.

Patient 26 stellt eine Ausnahme in der sonst sehr homogenen Gruppe der Knochenmarkstransplantierten Patienten dar. Der  $\sum G2/GF$ -Wert dieses Patienten steigt nach KMT, gegensätzlich zu den Erwartungen wieder auf einen Wert von 0,332 an. Der FA-typische Phänotyp ist hier noch zu erkennen. Ursächlich kommt ein unvollständiger Chimärismus nach KMT in Frage, bei dem neben den Knochenmarkszellen des Spenders noch Knochenmarkszellen des FA-Patienten vorhanden sind.

## 4.2 Diskussion der Fehlermöglichkeiten

Die Interpretation der Daten im Ergebnisteil beruht nur teilweise auf wissenschaftlich belegten Tatsachen und teilweise auf Erfahrungswerten. Diese Erfahrungswerte bei der Interpretation der Werte eines Patienten im Verlauf orientieren sich an häufig beobachteten Zusammenhängen zwischen dem Wertenniveau und seiner Tendenz und davor bzw. danach eingetretenen Ereignissen sowie an plausibel erscheinenden Thesen. Dass das Alter der Blutprobe Einfluss auf den  $G0/G1$ -Wert und damit die Stimulierbarkeit der mononukleären Blutzellen nimmt erscheint als These sinnvoll, konnte aufgrund der vorliegenden Daten jedoch nicht bewiesen werden. Entsprechende Rückschlüsse im Bezug auf dadurch bedingte Schwankungen könnten daher unzutreffend sein. Weiterhin ist nicht mit Sicherheit auszuschließen, ob nicht weitere Faktoren existieren, die Schwankungen der Werte verursachen und in dieser Arbeit nicht berücksichtigt oder falsch interpretiert wurden. Wegen der begrenzten Fallzahl sowie dem überwiegenden Fehlen klinischer Informationen bleiben Qualität und Aussagekraft der Dateninterpretation eingeschränkt. Erforderlich sind weitere statistische Untersuchungen, welche einen Zusammenhang zwischen den Werteschwankungen und dem Krankheitsverlauf, dem Blutprobenalter und der Komplementationsgruppe anhand einer umfangreicheren und klinisch besser charakterisierten Patientenkohorte überprüfen.

## 4.3 Zukünftige Verbesserung

Eine darüber hinaus gehende Verbesserung der Dateninterpretation erfordert vor allem eine lückenlose Dokumentation von Untersuchungsergebnissen. Fehlende Daten verursachen bei einer ohnehin geringen Patientenzahl Lücken, die statistische Untersuchungen aufgrund zu geringer Datenmenge unmöglich machen oder zu nicht-signifikanten Ergebnissen führen und das Hauptproblem dieser Arbeit darstellten. Um

zukünftig weitere statistische Tests durchführen zu können, die eine Verbesserung der Interpretation anstreben, sollten aktiv Daten zu den einzelnen Patienten gesammelt werden. Dies kann beispielsweise durch einen Fragebogen geschehen, den der behandelnde Arzt nach der Erstdiagnose der FA erhält und ausfüllt.

Ein derartiger Fragebogen könnte folgendermaßen aussehen:

Sehr geehrter Stationsarzt,  
bei ihrem Patienten soll eine Zellzyklusanalyse zum Ausschluss bzw. einer Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose „Fanconi Anämie“ durchgeführt werden. Im Interesse einer möglichst umfassenden und fehlerfreien Interpretation der Untersuchungsbefunde möchten wir Sie bitten, folgenden Fragebogen zum Krankheitsverlauf Ihres Patienten auszufüllen. Die Daten werden für statistische Erhebungen des Institutes für Humangenetik in Würzburg benötigt wodurch eine Optimierung der Ergebnisinterpretation der Zellzyklusanalyse angestrebt wird.

Bitte füllen Sie die folgenden Tabellen so genau wie möglich aus:

Blutentnahme für Zellzyklusanalyse:

Name	
Geburtsdatum	
Datum/Uhrzeit d. Blutentnahme	
Verwendetes Blutentnahmemedium	

Aktuelle Blutwerte:

Datum der Blutprobe	
Thrombozyten /mm <sup>3</sup>	
Leukozyten /mm <sup>3</sup>	
Erythrozyten Mill./mm <sup>3</sup>	

Ist der Patient transfusionsbedürftig?  ja  nein  
Art der Transfusion?  Erythrozyten  
 Thrombozyten  
Seit wann? \_\_\_\_\_

Ist eine Knochenmarkstransplantation erfolgt?  ja  nein  
Wann? \_\_\_\_\_

Ist der Patient an Leukämie erkrankt?  ja  nein  
Seit wann? \_\_\_\_\_  
Art der Leukämie? \_\_\_\_\_

Vorhandensein chromosomaler Aberrationen?  ja  nein  
Seit wann? \_\_\_\_\_

Aktuelle medikamentöse Therapie des Patienten?  
\_\_\_\_\_

#### **4.4 Diskussion im Zusammenhang**

Trotz Schwierigkeiten aufgrund einer unzureichenden Datenmenge konnten einige, bereits bekannte bzw. beobachtete Entwicklungen wie das Absinken des  $\sum G2/GF$ - und Ansteigen des  $G0/G1$ -Wertes nach KMT und die vermutete teils unterschiedliche Lage der Mittelwerte des  $\sum G2/GF$ - und  $G0/G1$ -Wertes zwischen den Gruppen bestätigt und statistisch gesichert werden. Zusätzlich wurden die Parameter definiert, die Ursache von Werteschwankungen sind bzw. sein könnten und somit das Fundament für zukünftige Untersuchungen gelegt. Das Potenzial der Fragestellung könnte nach Erhebung der nötigen Daten durch den entworfenen Fragebogen noch weiter ausgeschöpft werden und die Interpretation von individuellen Zellzyklusdaten weiter verbessert werden.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Parameter  $\sum G2/GF$  und  $G0/G1$  der hochauflösenden, zweiparametrischen Zellzyklusanalyse von Lymphozyten des peripheren Blutes bei Patienten mit der Diagnose Fanconi Anämie (FA) untersucht. Die retrospektive Untersuchung konzentrierte sich auf Patienten, bei denen mehrere Zellzyklusanalysen durchgeführt wurden, da die Frage geklärt werden sollte, inwieweit die erhobenen Zellzyklusdaten konstante, für jeden Patienten konsistente Parameter darstellen, oder ob sie im zeitlichen Verlauf starken Schwankungen unterworfen sind. Eventuell gefundene Schwankungen sollten im Bezug auf die zugrunde liegenden Ursachen geprüft werden. Hierzu wurden die Langzeitdaten von 32 Patienten ausgewertet, die in 3 Gruppen aufgeteilt wurden:

- FA-Patienten ohne gesichertes Mosaik, ohne KMT
- FA-Patienten mit gesicherter Mosaikkonstellation
- FA-Patienten mit KMT

Bei der Auswertung der Daten stellte sich heraus, dass die  $\sum G2/GF$ - und  $G0/G1$ -Werte keine im zeitlichen Verlauf konstanten Parameter für den einzelnen Patienten darstellen. Daraufhin wurden das Alter der Blutprobe, die Möglichkeit der Mosaikbildung, die Art der Komplementationsgruppe, eine mögliche Leukämieerkrankung, sowie das Auftreten von chromosomalen Aberrationen im Knochenmark und Knochenmarkstransplantation als den  $\sum G2/GF$ - und  $G0/G1$ -Wert beeinflussende Parameter in Betracht gezogen. Bei der statistischen Auswertung der Daten konnten einige bereits bekannte bzw. beobachtete Schwankungen, wie das Absinken des  $\sum G2/GF$ - und das Ansteigen des  $G0/G1$ -Wertes nach KMT oder die vermutete, teils unterschiedliche Lage der Mittelwerte des  $\sum G2/GF$ - und  $G0/G1$ -Wertes zwischen den 3 Gruppen statistisch analysiert werden. Als Ergebnis dieser Analyse zeigte sich, dass der  $\sum G2/GF$ -Wert im Gruppenvergleich in der Mosaikpatientengruppe (2) und der KMT-Patientengruppe (3) im Mittel signifikant niedriger als in der Patientengruppe ohne Mosaik/KMT (1) liegt. Zwischen Gruppe 2 und 3 gibt es hingegen keinen signifikanten Unterschied des mittleren  $\sum G2/GF$ -Wertes. Der mittlere  $G0/G1$ -Wert ist laut Statistik in der Patientengruppe ohne Mosaik/KMT (1) und der Patientengruppe mit Mosaik (2) niedriger als in der Gruppe der KMT-Patienten (3).

Als Schlussfolgerung kann festgestellt werden, dass die Langzeitanalyse des Zellzyklusverhaltens peripherer Blutlymphozyten die klinische Situation der betroffenen Patienten weitgehend reflektiert. Allerdings ergeben sich im zeitlichen Verlauf auch eine Reihe von Abweichungen, welche mit der verfügbaren Patientenzahl sowie der unzureichendem klinischen Datenlage nicht mit Sicherheit interpretiert werden können.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alter BP. **Annotation , Fanconi`s anaemia an its variability.** British Journal of Hematology 1993; 85: 9-14
- Alter BP, Knobloch ME, Weinberg RS. **Erythropoiesis in Fanconi`s Anemia.** Blood 1991; 78: 602-608
- Auerbach AD. **Fanconi Anemia.** Dermatologic clinics 1995; 13:41-48
- Boyer MW, Gross TG, Loechelt B, Leemhuis T, Harris RE. **Low Risk of Graft-Versus-Host Disease With Transplantation of CD 34 Selected Peripheral Blood Progenitor Cells From Alternative Donors for Fanconi Anemia.** Journal of Pediatric Hematology/Oncology 2003; 25: 890-895
- de Kerviler E, Guermazi A, Zagnoski AM, Gluckman E, Frija J. **The Clinical and Radiological Features of Fanconi`s anaemia.** Clinical Radiology 2000; 55: 340-345
- Demuth I, Wlodarski M, Digweed M. **Fanconi-Anämie: Paradigma der genetischen Heterogenität.** Medizinische Genetik 2003; 2: 17-23
- Ebell W. **Stammzellen und Stammzelltransplantation.** Fanconi Anämie 2005; 211-219
- Fanconi G. **Familial Constitutional Panmyelozytopathy, Fanconi`s anaemia (F.A.). I. Clinical aspects.** Seminars in Hematology 1967; 4: 233-240
- Fanconi G. **Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution).** Jahrbuch für Kinderheilkunde 1927; 117: 257-280
- Frohnmayr D, Frohnmayr L. **Definition, Merkmale und Diagnose der Fanoni-Anämie.** Fanconi Anämie 2005; 37-56
- Gross M. **Mutationsanalyse in den Fanconi-Anämie Genen unter besonderer Berücksichtigung von FANCA.** Medizinische Genetik 2003; 2: 64-72
- Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H. **Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction.** Cytogenetic Genome Res 2002; 98; 126-135
- Hoehn H, Kalb R, Neveling K, Friedl R, Bechtold A, Herterich S, Sun Y, Gruhn B, Hahnenberg H, Schindler D. **Revertant Mosaicism in Fanconi Anemia: Natural Gene Therapy at Work.** Fanconi Anemia - A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging 2007; 149-173

- Kalb R, Höhn H. **Cartaker-Gene: Schutz vor exogener und endogener DNA-Schädigung.** Medizinische Genetik 2003; 2:11-16
- Kalb R, Neveling K, Herterich S, Schindler D. **Fanconi Anemia Genes: Structure, Mutations, and Genotype-Phenotype-Correlations.** Fanconi Anemia - A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging 2007a; 39-58
- Kalb R, Neveling K, Hoehn H et al. **Hypomorphic Mutations in the Gene Encoding a key Fanconi Anemia Protein, FANCD2, Sustain a Significant Group of FA-D2 Patients with Severe Phenotype.** The American Journal of Human Genetics 2007b; 80: 895-910
- Landmann E, Bluettters-Sawatzki R, Schindler D, Gortner L. **Fanconi anaemia in a neonate with pancytopenia.** Journal of Pediatrics 2004; 77: 50-54
- Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJ, van Weel M, Pauli RM, Shahidi MT, Dokal I, Roberts I, Altay C, Gluckman E, Gibson RA, Mathew CG, Arwert F, Joene H. **Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance.** European Journal of Human Genetics 1997; 5: 137-148
- Maschan AA, Trakhtman PE, Balashov DN, Shipicina IP, Skorobogatova EV, Skvortsova YV, Dyshlevaja ZM, Samochatova EV, Rumiantsev AG; **Fludarabin, low-dose busulfan and antithymocyte globulin as conditioning for Fanconi anemia patients receiving bone marrow transplantation from HLA-compatible related donors.** Bone Marrow Transplantation 2004; 34: 305-307
- Neitzel H, Kühl J.-S., Gerlach A, Ebell W, Tönnies H. **Clonal Chromosomal Aberrations in Bone Marrow Cells of Fanconi Anemia Patients: Result and Implications.** Fanconi Anemia - A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging 2007; 79-94
- Rabinovitch PS, Kubbies M, Chen YC, Schindler D, Hoehn H. **BrdU-Hoechst Flow Cytometry: A Unique Tool for Quantitative Cell Cycle Analysis.** Experimental Cell Research 1988; 174: 309-318
- Rackoff W, Orazi A, Robinson CA, Cooper RJ, Alter BP, Freedman MH, Harris RE, Williams DA. **Prolonged Administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Filgrastim) to Patients With Fanconi Anemia: A Pilot Study.** Blood 1996; 88: 1588-1593
- Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. **Cancer incidence in persons with Fanconi Anaemia.** Blood 2003; 101: 822-826
- Schindler D, Friedl R, Gavvovidis I, Kalb R, Neveling K, Linka Y, Hanenberg H, Kubbies M, Hoehn H. **Applications of Cell Cycle Testing in Fanconi Anemia.** Fanconi Anemia - A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging 2007; 110-130

Schindler D, Hoehn H. **Fanconi Anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen.** American Journal of Human Genetics 1988; 43: 429-425

Schindler D, Hoehn H. **Flow cytometric testing for syndromes with chromosomal instability, aplastic anemia and related hematological disorders;** In: R.-D. Wegener (Hrsg.): Diagnostic Cytogenetics; Springer Verlag Berlin/ Heidelberg 1999; 269-281

Schindler D, Hanenberg H. **Komplementationsgruppenbestimmung bei Fanconi-Anämie mit Hilfe retroviraler Vektoren.** Fanconi Anämie 2005; 159-172

Schindler D, Friedl R, Güthle G, Gross M, Kalb R, Sobeck A, Ebbell W, Schneider H, Hanenberg H, Höhn H. **Zellzyklusdiagnostik bei Fanconi-Anämie.** Medizinische Genetik 2003; 2: 45-52

Seyschab H, Friedl R, Yujie S, Schindler D, Hoehn H, Hentze S, Schroeder-Kurth T. **Comparative Evaluation of Diepoxybutane Sensitivity and Cell Cycle Blockage in the Diagnosis o Fanconi Anemia.** Bood 1995; 85: 2233-2237

Shimamura A. **Behandlung der hämatologischen Probleme von Patienten mit Fanconi-Anämie.** Fanconi Anämie 2005; 105-123

Thompson LH, Hinz JM, Yamada NA, Jones NJ. **How Fanconi anemia proteins promote the four Rs: Replication, recombination, repair, and recovery.** Environmental and Molecular Mutagenesis; 45: published online 24 January

Vaz F et al. **Mutation of the RAD51C gene in Fanconi anemia – like disorder.** Nature genetics 2010; 42: 406-409

## 7. Werteverzeichnis

	$\Sigma$ G2/GF	G0/G1	Zeitpunkt
<b>Patient 1</b>	0,445	25,8	06/08/96
	0,490	44,3	18/04/02
<b>Patient 2</b>	0,610	33,1	07/03/95
	0,513	37,5	19/12/97
	0,466	48,5	07/05/97
	0,544	69,1	07/06/99
<b>Patient 3</b>	0,473	18,0	24/09/98
	0,682	4,3	24/11/99
	0,414	7,9	31/10/00
<b>Patient 4</b>	0,453	44,8	18/06/98
	0,572	40,9	09/11/00
	0,480	57,5	23/07/04
<b>Patient 5</b>	0,530	12,5	17/08/97
	0,568	19,7	19/02/97
	0,499	31,4	23/06/99
<b>Patient 6</b>	0,553	41,9	19/10/99
	0,379	35,5	28/02/01
	0,367	44,1	07/12/01
	0,524	28,8	28/05/02
	0,398	19,8	16/01/03
<b>Patient 7</b>	0,450	35,0	08/06/99
	0,435	16,0	02/12/03
	0,409	26,2	09/06/04
	0,381	35,5	03/11/05
	0,331	23,1	03/11/06
<b>Patient 8</b>	0,370	47,0	01/07/97
	0,310	37,0	01/10/97
	0,442	44,7	19/04/02
<b>Patient 9</b>	0,540	15,5	30/07/99
	0,540	57,4	30/10/98
	0,327	81,5	01/07/99
<b>Patient 10</b>	0,325	29,3	10/08/94
	0,461	21,6	06/09/94
	0,410	31,3	07/07/99

	$\Sigma$ G2/GF	G0/G1	Zeitpunkt
<b>Patient 11</b>	0,536	27,0	25/08/99
	0,349	36,3	26/10/05
<b>Patient 12</b>	0,291	18,2	16/03/04
	0,347	15,1	11/08/05
	0,328	17,7	17/10/06
<b>Patient 13</b>	0,223	49,8	02/03/98
	0,341	15,8	26/05/04
	0,319	24,7	13/07/04
	0,335	14,7	26/07/05
	0,211	8,7	25/08/06
	0,207	15,3	04/04/07
<b>Patient 14</b>	0,418	51,6	02/12/96
	0,319	37,4	20/11/01
	0,263	63,2	02/11/04
<b>Patient 15</b>	0,400	6,3	03/05/92
	0,211	64,3	09/01/02
<b>Patient 16</b>	0,204	16,1	11/09/01
	0,101	11,6	27/04/05
<b>Patient 17</b>	0,293	18,6	19/02/97
	0,284	6,6	12/02/00
<b>Patient 18</b>	0,209	27,5	30/03/00
	0,176	23,9	16/08/00
	0,163	16,1	15/11/06
<b>Patient 19</b>	0,369	18,2	12/02/00
	0,332	25,4	22/07/04
	0,282	29,1	28/10/06
<b>Patient 20</b>	0,442	21,8	01/06/88
	0,347	31,2	20/08/91
	0,165	72,5	21/01/92
	0,146	32,4	27/02/92
	0,141	19,8	24/08/92
<b>Patient 21</b>	0,530	60,9	23/06/99
	0,517	28,2	23/09/99
	0,527	55,9	09/11/00
	0,124	85,8	20/06/01

	$\Sigma$ G2/GF	G0/G1	Zeitpunkt
<b>Patient 22</b>	0,481	39,8	19/02/97
	0,691	31,9	27/10/99
	0,703	5,0	09/02/00
	0,190	84,6	12/05/00
<b>Patient 23</b>	0,580	36,5	28/01/97
	0,598	2,6	04/02/00
	0,490	65,9	16/08/01
	0,275	98,9	16/01/02
<b>Patient 24</b>	0,307	33,1	04/11/99
	0,343	10,9	25/11/99
	0,125	80,0	05/09/00
	0,142	55,6	13/06/01
<b>Patient 25</b>	0,548	34,6	02/03/99
	0,206	68,7	14/04/99
	0,108	71,9	18/08/99
<b>Patient 26</b>	0,468	39,1	19/05/99
	0,243	32,4	24/06/99
	0,332	93,3	18/08/99
<b>Patient 27</b>	0,481	64,5	11/08/99
	0,546	28,9	13/01/00
	0,117	80,1	05/04/01
<b>Patient 28</b>	0,518	21,1	13/11/96
	0,157	85,9	05/01/00
	0,149	57,6	13/02/01
<b>Patient 29</b>	0,536	19,3	13/11/96
	0,458	22,5	23/10/01
	0,153	91,9	13/02/02
<b>Patient 30</b>	0,580	10,9	15/12/99
	0,380	77,8	23/03/01
	0,113	98,0	28/07/01
<b>Patient 31</b>	0,485	28,2	03/03/01
	0,173	58,2	25/04/02
<b>Patient 32</b>	0,276	5,6	02/12/04
	0,415	26,8	11/04/06
	0,184	66,5	15/11/06

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. H. Höhn danke ich für die rundum engagierte Betreuung meiner Arbeit und die sympathische Aufnahme ins Team der Humangenetik.

Herrn Prof. Dr. med. D. Schindler danke ich für die Übernahme des Koreferates, sowie seinen Mitarbeitern Herrn Richard Friedl, Frau Benni Gottwald und Herrn Reinhard Kalb für die freundliche Hilfestellung bei der Datenbearbeitung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit meines Studiums unterstützt haben, mir Rückhalt gaben und dadurch nicht unwesentlich an den Leistungen, die ich erbracht habe, beteiligt sind.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Dr. med. Fritze und Dr. med. Mechthild Gerlach dafür, dass sie mich der Medizin noch ein Stückchen näher gebracht haben, einfach dadurch, dass sie da waren.

Meinen lieben Freunden danke ich für aufmunternde Worte, geteiltes „Statistik-Leid“ und wertvolle Tipps und Tricks in Sachen MS-Excel.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Yvonne Kochler  
Geburtsdatum: 17/02/82  
Geburtsort: Dinkelsbühl  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

1988-1992 Besuch der Grundschule in Ehingen, Lkr. Ansbach, Bayern  
1992-2001 Besuch des Gymnasiums in Dinkelsbühl; Abitur

## Hochschulbildung

2001-2008 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilian-Universität in Würzburg

08/2003 Ärztliche Vorprüfung

07/2008 2. Teil der ärztlichen Prüfung

2006-2007 Praktisches Jahr

Innere Medizin: Missionsärztliche Klinik, Würzburg  
Dermatologie: Universitätsklinik Würzburg  
Chirurgie: Leopoldina Krankenhaus, Schweinfurt  
Kilimanjaro Christian Medical Centre,  
Moshi/Tansania

## Berufserfahrung

08/08-12/09 **Assistenzärztin Innere Medizin, Allgemeine Innere Medizin,**  
Krankenhaus Wertheim

02/10-7/10 **Assistenzärztin Innere Medizin, Schwerpunkt**  
**Rheumatologie/Immunologie, Med. Klinik II,**  
Universitätsklinik Würzburg

Ab 10/10 **Assistenzärztin Anästhesiologie, Missionsärztliche Klinik Würzburg**

Würzburg, den 25.02.2011