Aus der Abteilung Innere Medizin III
(Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. H. Döhner)
der Fakultät für Medizin der Universität Ulm

Klonale Hämatopoese bei Aplastischer Anämie

Untersuchungen mittels X-Chromosom-Methylierung-Analysen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Hans Christian Hein
aus Rotterdam (Niederlande)

Ulm, 1999

Promotionsausschuß

Amtierender Dekan: Prof. Dr. P. Gierschik

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. A. Raghavachar

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. W. Just

Tag der Promotion: 14.01.2000

Meiner lieben Frau Bettina
und meinen beiden Kindern
Alexander und Frederike
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Aplastische Anämie 1
1.2 Der Klonalitätsbegriff in der Onkologie 2
1.2.1 Möglichkeiten des Klonalitätsnachweises 3
1.2.1.1 Lyon's Hypothese: Die X-Chromosom-Inaktivierung 4
1.2.1.2 X-Chromosom-Inaktivierungsanalysen 4
1.3 Pathophysiologie der Aplastischen Anämie 5
1.3.1 Argumente für eine Immunpathogenese bei AA 6
1.3.2 Argumente für einen primären Stammzelldefekt 7
1.3.3 Klonale Folgeerkrankungen der Aplastischen Anämie 9
1.3.3.1 Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie 9
1.3.3.2 Myelodysplastische Syndrome 10
1.3.3.3 Akute myeloische Leukämie 11
1.3.4 Zytogenetische Befunde bei AA 12
1.4 Zielsetzung der Arbeit 13

2 Patienten und Methode 14

2.1 Patienten 14
2.2 Methode 16
2.2.1 Grundlagen der angewandten Assays 16
2.2.1.1 X-Chromosom-Methylierung-Analysen 16
2.2.1.1.1 RFLP im Phosphoglyceratkinase-Gen 16
2.2.1.1.2 Variable Number Copy Tandem Repeats im Genlokus DXS 255 18
2.2.1.1.3 Short-Tandem-Repeats im Androgen-Rezeptor-Gen 19
2.2.1.2 Der GPI-Anker-Defekt 21
2.2.2 Versuchsprotokolle 23
2.2.2.1 Zellseparation und DNA-Extraktion 23
2.2.2.1.1 Zellseparation aus peripherem Blut 23
2.2.2.1.2 Zellseparation aus Knochenmarkskulturen 23
2.2.2.1.3 DNA-Extraktion 24
2.2.2.1.4 Extinktionsmessung 24
2.2.2.2 X-Chromosom-Methylierung-Analysen 25
2.2.2.2.1 Southern-Hybridisierung mit M27ß 25
2.2.2.2.2 PCR am Androgenrezeptor-Gen (HUMARA) 28
2.2.2.2.3 PCR am Phosphoglyceratkinase-Gen (PGK) 31
2.2.2.3 Durchflußzytometrie zur Analyse des GPI-Anker-Defektes 33
2.2.2.3.1 Aufbereitung der Leukozyten 33
2.2.2.3.2 Aufbereitung der Erythrozyten und Retikulozyten 33
2.2.2.3.3 Durchflußzytometrie mit dem FACScan 34

3 Ergebnisse 35

3.1 Sensitivität der Methoden 35
3.2 Validität der X-Chromosom-Methylierungsanalysen in Normal- und Positiv-Kontrollen 38
3.2.1 Normalpersonen 38
3.2.2 Patienten mit malignen Erkrankungen der Lympho-Hämopoese 38

3.3 Informativität der Klonalitätsassays 39
3.3.1 Heterozygotie-Rate für PGK, HUMARA und M27 ß 39
3.3.2 Informativität bei AA/PNH-Patienten 39
3.4 Kongruenz der HUMARA- und M27ß-Ergebnisse zu PGK-Ergebnissen 40
3.5 Ergebnisse der Klonalitätsassays bei AA-Patienten 41
3.5.1 Interpretationsvorgaben der X-Chromosom-Methylierungsmuster 41
3.5.2 Ergebnisübersicht 41
3.5.3 Vergleich von Ergebnissen der Klonalitätsassays und durchflußzytometrisch ermittelter GPI-Defizienz 43
3.5.4 Interpretation der Ergebnisse im X-Methylierungsassay 44

4 Diskussion 50

4.1 Besprechung der bisherigen Literatur 52
4.1.1 X-Chromosom-Inaktivierungsanalysen bei Aplastischer Anämie 52
4.1.2 Die Hypothese der limitierten Stammzell-Reserve 53
4.2 Besprechung der eigenen Ergebnisse 55
4.2.1 Monoklonale Hämatopoese 55
4.2.2 Korrelation der Ergebnisse des X-Methylierungsassays zum klinischen Verlauf 56
4.2.2.1 Klinischer Verlauf und Ansprechen auf immunsuppressive Therapie bei Patienten mit *balancierten* Mustern im X-Methylierungsassay 56
4.2.2.2 Klinischer Verlauf und Ansprechen auf immunsuppressive Therapie bei Patienten mit *imbalancierten* Mustern im X-Methylierungsassay 57
4.2.3 Vergleich der Ergebnisse des X-Methylierungsassays mit der durchflußzytometrischen Bestimmung eines PNH-Klons 57
4.3 Methodische Fallstricke 58
4.3.1 Definitionsprobleme bei X-Chromosom-Inaktivierungsassays 58
4.3.1.1 Fehlende Korrelation zu anderen Klonalitätsmarkern 58
4.3.1.2 Das Problem der extremen Lyonisierung 59
4.3.2 Interpretationsprobleme bei M27ß 61
4.4 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen für die Pathophysiologie der AA 62
4.4.1 Klonalität als Selektionsvorteil? 62
4.4.2 Klonalität als Ausdruck eines depletierten Stammzellpools? 63

5 Zusammenfassung 64

6 Danksagung 65

7 Quellenverzeichnis 66

Abkürzungsverzeichnis

α–^{32}P-dCTP	mit radioaktivem Phosphor markiertes Cytidin
AA	**A**plastische **A**nämie
ALG/ATG	**A**nti-**L**ymphozyten-**G**lobulin / **A**nti-**T**hymozyten-**G**lobulin
AML	**A**kute **m**yeloische **L**eukämie
B	**b**alanciertes Methylierungsmuster
Bb / kBp	**B**asen**p**aare / **K**ilo-**B**asen**p**aare (*Anzahl der Nukleotide in einem DNA-Fragment als Größeneinheit*)
CAFC	Hämatopoetische Progenitorzellen in vitro („***c**obblestone-**a**rea **f**orming **c**ells*“)
CD	„***C**luster of **D**ifferentiation*“, Klassifikation von Oberflächenantigenen zur Unterscheidung der Differenzierungsstadien von Zellen des hämatopoetischen Systems
CR	komplette Remission
CsA	**C**iclo**s**porin **A**
DAF	**D**ecay **a**ccelerating **f**actor (CD 55)
EBMT-WP	**E**uropean **B**one **M**arrow **T**ransplantation **W**orking **P**arty
ED	**E**rst**d**iagnose
EDTA	**E**thylen-**D**iamin-**T**etra**a**cetat
FAB	**F**rench-**A**merican-**B**ritish cooperative group *(zur Klassifizierung der Akuten Myeloischen Leukämien)*
FITC	**F**luoreszein**i**so**t**hio**c**yanat
G-6-PDH	**G**lucose-**6-P**hosphat**de**h**y**drogenase
G-CSF	**G**ranulozyten-**C**olonien-**s**timulierender **F**aktor
GPI	**G**lycosyl**p**hosphatidyl-**I**nositol
Gran	**Gran**ulozyten
GvHD	**G**raft-**v**ersus-**h**ost **d**isease *(Immunreaktion des Knochenmarktransplantates gegen den Empfängeroraganismus)*
HDMP	**H**och**d**osis-**M**ethyl**p**rednisolon
HPRT	**H**ypoxanthin-**P**hospho**r**ybosyl-**T**ransferase(-Gen)
HUMARA	**Hum**anes **A**ndrogen-**R**ezeptor-**A**-Gen
I	**i**mbalanciertes Methylierungsmuster
IL-3, IL-6	**I**nter**l**eukine **3** und **6**
IS	**I**mmun**s**upression, immunsuppressiv
KM / KMT	**K**nochen**m**ark / **K**nochen**m**ark**t**ransplantat(ion)
LTBMC	Langzeit-Knochenmark-Kulturen („**l**ong **t**erm **b**one **m**arrow **c**ulture“)
Lymph	**Lymph**ozyten
MDS	**M**yelo**d**ysplastisches **S**yndrom
MIRL	**M**embran-**I**nhibitor der **r**eaktiven **L**yse (CD 59)

n.d.	**n**icht **d**urchgeführt
NR	**N**on-**R**esponder *(kein Ansprechen auf die Therapie)*
OD	**O**ptische **D**ichte
PAGE	**P**oly**a**crylamid-**G**el**e**lektrophorese
PBS	Phospatgepufferte Kochsalzlösung („**p**hosphat **b**uffered **s**aline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („**p**olymerase **c**hain **r**eaction“)
PGK	**P**hospho**g**lycerat**k**inase(-Gen)
PNH	**P**aroxysmale **n**ächtliche **H**ämoglobinurie
PR	**p**artielle **R**emission
RFLP	**R**estriktions**f**ragment-**L**ängen**p**olymorphismus
SAA	Schwere („**s**evere“) **A**plastische **A**nämie
SDS	**S**odium(*Natrium)*-**D**odecyl-**S**ulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
STR	**S**hort **t**andem **r**epeats
TNF	**T**umor-**N**ekrose-**F**aktor
TBE	**T**ris-**B**orat-**E**DTA
TE	**T**ris-**E**DTA
VNTR	**V**ariable copy **n**umber **t**andem **r**epeats
VSAA	Sehr schwere („**v**ery **s**evere“) **A**plastische **A**nämie

1 Einleitung

1.1 Aplastische Anämie

Die erworbene Aplastische Anämie[1] (AA, *synonym:* Panmyelopathie) ist eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems, bei der mindestens zwei der drei myeloischen Zellreihen (Erythropoese, Granulopoese und Thrombopoese) durch eine Hypoplasie oder eine Aplasie betroffen sind. Dementsprechend findet man im peripheren Blutbild eine Granulozytopenie, eine Thrombopenie und / oder eine Anämie. Zeichen einer Dysplasie sind bei der Aplastischen Anämie in der Regel nicht anzutreffen, weshalb diese Erkrankung unter morphologischen Gesichtspunkten als *nicht-maligne* anzusehen ist. Dessenungeachtet haben Patienten mit Aplastischer Anämie ohne adäquate Therapie eine sehr schlechte Prognose: Unbehandelt starben früher 70% aller Erkrankten innerhalb von 2 Jahren an den Folgen einer Granulozytopenie oder einer Thrombozytopenie. Die Prognose der Aplastischen Anämie hat sich in den letzten Jahrzehnten durch die syngene und allogene Knochenmarktransplantation und durch die immunsuppressive Therapie mit Anti-Lymphozyten-Globulin (ALG) und Ciclosporin A (CsA) erheblich verbessert (BACIGALUPO *et al*., 1995). Hierdurch wurde es möglich, Langzeitverläufe zu studieren. Diese zeigten, daß für Patienten unter immunsuppressiver Therapie innerhalb dieser verlängerten Remissionsdauer das Risiko wächst, eine der aufgeführten klonalen hämatologischen Erkrankungen zu entwickeln, die vor der ALG-Ära nur selten beobachtet wurden:

1. die Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie (PNH)
2. ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS) oder
3. eine Akute Myeloische Leukämie (AML)

Das kumulative Risiko für AA-Patienten, eine dieser Folgeerkrankung unter immunsuppressiver Therapie zu entwickeln, wächst in fünfzehn Jahren auf ungefähr 42 Prozent; dabei wird ein direkter toxischer Effekt des ALG oder des CsA als unwahrscheinlich angesehen (TICHELLI et al., 1994). Es besteht vielmehr der Verdacht, daß eine abnormale hämatopoetische Vorläuferzelle unter den Bedingungen der Knochenmarksaplasie oder der immunsuppressiven Therapie einen Wachstumsvorteil erhält und sich daraus eine dieser Erkrankungen entwickeln kann, deren peripheres Blutbild von der erkrankten Population, dem

[1] Die *kongenitale* Aplastische Anämie, beispielsweise im Rahmen einer Fanconi-Anämie oder einer Dyskeratosis congenita, ist hiervon abzugrenzen und auch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Wenn im folgenden von Aplastischer Anämie die Rede ist, so ist damit nur die erworbene Form gemeint.

erkrankten *Klon*, dominiert wird. Diesem Verdacht entsprechend, ist diesen drei Folgeerkrankungen ein *monoklonales* Erscheinungsbild der Hämatopoese gemeinsam.

Schon 1967, als Immunsuppression und Knochenmarkstransplantation als Therapieformen noch nicht zur Verfügung standen, vermutete WILLIAM DAMASHEK, daß zwischen der AA, der PNH und der „hypoplastischen Leukämie“ ein pathophysiologischer Zusammenhang bestehen könnte (DAMASHEK, 1967). Bis heute ist dieser Zusammenhang trotz einer Flut von neuen zytomorphologischen, zellbiologischen, immunologischen und molekularbiologischen Erkenntnissen immer noch nicht klar.

JUDITH MARSH formulierte aufgrund der klinischen Verlaufsbeobachtungen in einer vielzitierten Übersichtsarbeit die Frage, ob es sich bei der Aplastischen Anämie selbst um eine präleukämische Erkrankung handeln könnte (MARSH & GEARY, 1991). In diesem Zusammenhang interessierten uns folgende Fragen:

- Ist die Aplastische Anämie primär eine klonale Erkrankung der Hämatopoese?
- Wenn nicht: Korreliert die Entwicklung eines klonalen Erscheinungsbildes mit der klinischen Progression zur PNH, zu einem MDS oder einer AML?
- Ist klonale Hämatopoese bei AA von klinischer Relevanz hinsichtlich der Prognose, insbesondere hinsichtlich des Ansprechens auf eine immunsuppressive Therapie?

Zur Klärung dieser Fragen sollten die folgenden Studien zur Klonalität der Hämopoese bei Aplastischer Anämie beitragen.

1.2 Der Klonalitätsbegriff in der Onkologie

Die Frage nach der Klonalität bei soliden und hämatologischen Neoplasien ist durchaus nicht akademisch, sondern hat weitreichende Konsequenzen für das Verständnis der Pathophysiologie. Für die Entstehung von Tumoren im allgemeinen werden zwei Modelle diskutiert (die hier nur stark vereinfacht dargestellt werden):

1. Im Genom einer einzelnen somatischen Zelle findet eine Mutation oder eine andere Form der Chromosomenaberration - spontan oder durch Noxen ausgelöst - an einer Zellzyklus-regulierenden Stelle, z.B. einem Tumor-Suppressor-Gen statt, so daß die Zelle beginnt, unkontrolliert zu proliferieren oder DNA fehlerhaft zu replizieren, wodurch die Entstehung weiterer Aberrationen begünstigt wird. Alle Tochterzellen der mutierten Zelle haben zunächst gleiche Eigenschaften, tragen somit auch den gleichen Defekt. Die Population aller Tochterzellen, die aus der Proliferation einer somatischen Zelle hervorgehen, nennt man definitionsgemäß einen *Klon* (SECKER-WALKER, 1985).

Erwächst diesem Klon durch seinen Defekt ein Wachstumsvorteil gegenüber gesundem Gewebe, indem er sich z.B. humoraler Regulation oder immunologischer Elimination entziehen kann, entsteht daraus ein Tumor. Man spricht dabei von **monoklonalem** Tumorwachstum.

2. Ein anderes Modell zur Tumorentstehung besagt, daß eine ganze Gruppe von Zellen in einem Gewebe durch Umwelteinwirkung auf gleiche Weise so geschädigt wird, daß daraus abnormes Wachstum resultiert (sog. "field effect"). Ein daraus entstehender Tumor enthält Zellen nicht eines und desselben Ursprungs, ist also (wie gesundes Zellgewebe auch) **polyklonal** oder **oligoklonal**.

Untersuchungen an vielen Arten solider als auch hämatologischer Malignome haben gezeigt, daß der allergrößte Teil von ihnen monoklonal ist (WAINSCOAT & FEY, 1990; GILLILAND *et al*., 1991). Auch ist die erste der beiden Hypothesen zur Tumorigenese mit den übrigen zytogenetischen, molekulargenetischen und immunologischen Befunden besser in Einklang zu bringen und hat sich deswegen gegen das „field effect"-Modell weitestgehend durchgesetzt.
Das hat zu der etwas ungenauen Assoziation von Malignomen und Klonalität geführt. Allerdings trifft der Umkehrschluß, daß es sich bei klonalen Erkrankungen immer um Malignome handelt, nicht zu. Naheliegenstes Beispiel ist die Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie (PNH), eine klonale Erkrankung, die aber nicht die histopathologischen Kriterien einer malignen Erkrankung (z.B. vermehrte und pathologische Mitosen, Zell- und Kernpolymorphie, Hyperchromasie, Anaplasie, abnorme Plasma-Kern-Relation usw.) erfüllt.

1.2.1 Möglichkeiten des Klonalitätsnachweises

Es gibt sehr unterschiedliche Ansätze, Klonalität von Zellpopulationen nachzuweisen. Dabei muß der untersuchte Zellbestandteil oder der betreffende Genlokus nicht zwingend mit der Pathogenese der Erkrankung zu tun haben. Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe Klonalitätsassays, mit denen man die Entstehung des Tumors aus einer einzigen Zelle nachweisen kann (siehe nächste Seite, Tabelle 1.2-1).
Bei neoplastischen Erkrankungen, die keine charakteristischen Tumormarker wie beispielsweise konstant nachweisbare Chromosomenaberrationen oder veränderte Oberflächenproteine haben, fällt es erwartungsgemäß schwerer, den tumorösen Zellklon einzugrenzen. Für solche Situationen eignet sich als „indirekter" Ansatz die X-Chromosom-Inaktivierung-Analyse, da sie einen Sachverhalt untersucht, der in allen Zellen eines weiblichen Organismus vorkommt und Zellklone ohne charakteristische Marker nachweisen kann.

1.2.1.1 Lyon's Hypothese: Die X-Chromosom-Inaktivierung

Grundlage der X-Chromosom-Inaktivierung- oder auch X-Chromosom-Methylierung-Analyse ist die nach ihrer Entdeckerin MARY F. LYON benannte Inaktivierung eines der beiden Geschlechtschromosomen in den Zellen weiblicher Säugetiere (LYON, 1961). Diese sogenannte *„Lyonization"* besitzt ihr morphologisches Korrelat im *Barr-Körperchen*, dem Geschlechtschromatin im Kern von Zellen mit mindestens zwei X-Chromosomen. Es wurde postuliert, daß alle X-chromosomale Gene immer nur von *einem* der beiden Heterosome exprimiert wird, nämlich von dem, das nicht als Geschlechtschromatin vorliegt.
Mitte der siebziger Jahre entdeckte man, daß die Methylierung einiger Cytosin-Basen in der Nukleotid-Sequenz X-chromosomaler Gene mit der X-Chromosom-Inaktivierung korreliert (RIGGS, 1975; HOLLIDAY & PUGH, 1975). Ob aber die Methylierung ursächlich für die Regulation X-chromosomaler Gene ist oder nur eine Begleiterscheinung darstellt, ist bis heute nicht zweifelsfrei entschieden.

1.2.1.2 X-Chromosom-Inaktivierungsanalysen

Wenn eine Zellpopulation nur von einer Mutterzelle abstammt, also einen Klon bildet, muß man annehmen, daß bei allen Zellen das gleiche X-Chromosom-Inaktivierungsmuster vorliegt. Um dies festzustellen, kann die Methylierung von Cytidinen zur Unterscheidung von aktivierten und inaktivierten X-chromosomalen Allelen genutzt werden. Zunächst muß man anhand von Punktmutationen oder variablen Sequenzwiederholungen das väterliche vom mütterlichen Allel unterscheiden können, z. B. durch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP). Gleichzeitig muß in diesem untersucheten Bereich eine Schnittstelle für die Methylgruppen-empfindlichen Endonucleasen Hpa II oder Hha I vorliegen, deren Methylierungszustand mit der Aktivierung bzw. Inaktivierung des Allels korreliert. Aufgrund der unterschiedlichen DNA-Fragmentlängen nach einem

Tabelle 1.2-1: Klonalitätsassays und deren Anwendung

Klonalitätsassay	Prinzip	Methode	Anwendung
Karyotyp-Analyse	Chromosomale Translokationen sind mikroskopisch / zytogenetisch nachweisbar	Morpholog. Untersuchung der Chromosomen in der Metaphase → Suche nach Translokationen	z.B. Chronische Myeloische Leukämie (bcr-abl-Translokation), AML (FAB M3)
Deletions-/ Punktmutations-Nachweis	Deletionen u. Punktmutationen verursachen beim Verdau mit DNAsen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen	RFLP-Untersuchungen mit Southern-blot-Analysen oder PCR	z.B. Follikuläres Lymphom (14;18-Translokation)
Immunglobulin-Genrearrangements	B-Lymphozyten des gleichen Klones produzieren das identische Immunglobulin	PCR im Bereich der Immunglobulin-codierenden Gene	B-Zell-Neoplasien z.B. Plasmozytom
T-Zell-Rezeptor-(TCR)-Genrearrangements	T-Lymphozyten des gleichen Klones tragen identische Rezeptoren auf der Zelloberfläche	PCR im Bereich der TCR-codierenden Gene	T-Zell-Lymphome
X-Chromosom-Inaktivierung-Analyse	Bei allen Zellen eines Klones aus weiblichem Gewebe ist das gleiche X-Chromosom inaktiviert	a) Isoenzym-Analysen bei G-6-PDH-Heterozygoten b) RFLP-Untersuchungen mit Southern-blot oder PCR	alle Neoplasien
Abkürzungen:	*PCR: Polymerase-Kettenreaktion*	*G-6-PDH: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase*	*RFLP: Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen*

Tabelle 1.3-1: Ätiologische Faktoren der erworbenen Aplastischen Anämie

Faktor	Gruppe	Beispiele
idiopathisch		*(größter Teil der Fälle)*
Medikamente / Drogen *	Analgetika, Antirheumatika	Phenylbutazon, andere NSAR, D-Penicillamin, Goldpräparate
	Antibiotika	Chloramphenicol
	Thyreostatika	Carbimazol, Methimazol
	Antidepressiva, Neuroleptika	Mianserin, Phenothiazinderivate
	Amphetaminderivate	„Ecstasy“ (MARSH *et al.,* 1994)
Chemikalien *	Insektizide, Lösungsmittel	Benzol
Virusinfektionen		Non-A-Non-B-Hepatitis, HIV, Epstein-Barr-Virus *(fraglich!)*
Schwangerschaft		

* Aufgeführt sind nur Noxen, die im Gegensatz beispielsweise zu Zytostatika *dosisunabhängig* und irreversibel eine Knochenmarksaplasie hervorrufen können.

Restriktionsverdau kann man väterliches und mütterliches Allel gel-elektrophoretisch trennen und in einem zweiten Schritt untersuchen, ob beide Allele oder nur eines von beiden durch das Methylgruppen-sensitive Enzym geschnitten wird. Wenn ausschließlich nur eines der beiden Allele geschnitten wird, kann man theoretisch daraus rückschließen, daß alle Zellen zu einem Klon gehören. Allerdings kann es wegen fehlender Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Klonalitätsassays zu Definitionsproblemen kommen, auf dieses Problem wird in der Diskussion noch eingegangen (Kap. 4.3.1).
Die Voraussetzungen für diesen Untersuchungsansatz erfüllen die Genloci für Phosphoglyceratkinase (PGK), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), den Androgen-Rezeptor und die Nonsense-Sequenz DXS 255 (Xcen-p11.22). Das Prinzip der jeweiligen Assays wird in Kap. 2.2.1.1 noch eingehend beschrieben.

1.3 Pathophysiologie der Aplastischen Anämie

Der Entstehungsmechanismus der Aplastischen Anämie ist auch heute - mehr als ein Jahrhundert nach ihrer Erstbeschreibung durch PAUL EHRLICH - noch nicht geklärt. Das weite Spektrum an ätiologischen Faktoren (siehe Tabelle 1.3-1) könnte Zweifel aufkommen lassen, ob es sich überhaupt um eine einheitliche Erkrankung handelt. Allerdings konnte die Vermutung, daß es sich bei der erworbenen Aplastischen Anämie um ein einheitliches Syndrom verschiedener Knochenmarkserkrankungen handelt, bisher weder bestätigt noch widerlegt werden.
Da in der Regel die drei myelopoetischen Zellreihen (Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten) betroffen sind, das lymphopoetische System hingegen nicht, muß man davon ausgehen, daß der Ort des Defektes auf der Ebene der myelopoetischen pluripotenten Stammzelle zu suchen ist. Untersuchungen zur Pathophysiologie der AA lieferten sehr unterschiedliche Hinweise, unter anderem auf

- einen primären Stammzelldefekt
- eine immunologische Suppression der Hämatopoese
- eine defekte Knochenmark-Stroma-Funktion oder
- eine Dysregulation von positiv oder negativ wirkenden Wachstumsfaktoren und Zytokinen.

Aus diesen zahlreichen pathophysiologischen Vorstellungen haben sich aber im wesentlichen zwei plausible Arbeitshypothesen herauskristallisiert, die sich auf klinische und zellbiologische Befunde stützen und auf die im folgenden noch näher eingegangen wird:

1. Eine Hypothese beschreibt eine **immunologisch bedingte Suppression** des Knochenmarks: Hämatopoetische Stammzellen sind Zielobjekt einer zellulären Autoimmunreaktion.
2. Die andere Hypothese geht von einem **primären Stammzelldefekt** aus: Die Ursache der Hypoplasie oder Aplasie im Knochenmark ist eine erworbene Proliferations- oder Differenzierungsstörung der pluripotenten Knochenmarksstammzelle.

1.3.1 Argumente für eine Immunpathogenese bei AA

Daß bei Patienten mit AA durch immunsuppressive Therapie mit Ciclosporin A (CsA), Antilymphozytenglobulin (ALG) und Methylprednisolon in hohem Maße Remissionen zu erzielen sind, drängt die Vermutung auf, daß es sich bei AA um eine Autoimmunerkrankung handeln könnte. In einer Übersichtsarbeit zählte CATHERINE NISSEN alle Befunde auf, die sowohl für als auch gegen ein autoimmunpathologisches Geschehen sprechen (NISSEN, 1991), von denen hier einige zitiert sind:

Pro	Contra
• Erhöhung der CD8+ T-Lymphozyten in der akuten Phase der Erkrankung	• Normale T-Zellen inhibieren ebenfalls Koloniewachstum in vitro.
	• Spezifische monoklonale Antikörper gegen T-Lymphozyten zeigen keinen therapeutischen Effekt.
• γ-Interferon und TNF α werden bei der AA übermäßig im Knochenmark produziert.	• Interferone und TNF α sind bei jedem viralen Infekt erhöht. Dies geht aber in den allermeisten Fällen ohne Aplasie einher.
• Inhibitorische Wirkung von Monocyten und Macrophagen auf KM-Kolonien in der Kultur	• Makrophagen- und Monozyten-Populationen sind in den meisten Fällen ebenfalls depletiert.
	• Der Nachweis antigen-spezifischer T-Lymphozyten oder Antikörper gegen Progenitorzellen ist bis heute nicht geglückt.

NISSEN postulierte aus den zusammengetragenen Befunden, daß einzelne, isoliert betrachtete immunologische Faktoren nicht als pathogenetische Verursacher in Frage kommen, allenfalls handelt es sich um ein sehr komplexes Geschehen, in dem unter anderem auch immunologische Vorgänge eine Rolle spielen. Um eine klassische Autoimmunerkrankung handelt es sich bei der AA demnach nicht.
Darüberhinaus ist die erfolgreiche Therapie mit ALG als Argument für eine reine Immunpathogenese der AA ebenfalls nicht stichhaltig genug, da dies die ebenfalls vorhandene immun*stimulatorische* Wirkung von ALG ignoriert, durch die u.a. eine Proliferation von T-Lymphozyten und Sekretion von Lymphokinen beobachtet werden konnte (KAWANO *et al.*, 1988; TANIGUCHI *et al.,* 1990).
Ein Autoimmunmechanismus sollte erwarten lassen, daß eine syngene Knochenmarkstransplantation bei einem Patienten mit AA unweigerlich zum Rezidiv führt, wenn der Patient nicht durch Immunsuppression präkonditioniert ist. Eine Studie, die im internationalen KMT-Register in Milwaukee (Wisconsin, USA) unter den zwischen 1978 und 1990 registrierten KM-Transplantatempfängern diejenigen seltenen AA-Patienten heraussuchte, die ein Zwillingsgeschwister als Spender haben, zeigte, daß bei 16 Patienten, die ein Knochenmarktransplantat vom Zwillingsgeschwister ohne Vorbehandlung erhielten, fünf KM-Transplantate (~31%) auf Anhieb anwuchsen, bei 11 mußte die Transplantation vom selben Spender nach Präkonditionierung wiederholt werden (HINTERBERGER, 1993). Auch dies zeigt, daß nicht generell in allen Fällen von einem immunpathologischen Geschehen ausgegangen werden kann.

1.3.2 Argumente für einen primären Stammzelldefekt

Das letztgenannte Argument aus der KMT läßt sich für die Annahme eines primären Stammzell-Defektes genauso gut verwenden wie für eine immunpathologische Hypothese, je nachdem, ob man die präkonditionierten oder die nicht vorbehandelten Patienten betrachtet. Bisherige Versuche mit sogenannten Langzeit-Knochenmarkskulturen (*long term bone marrow culture,* LTBMC) bei AA haben aber klinische Beobachtungen untermauert, daß ein Stammzelldefekt vorliegen muß. Zunächst wurde auch vermutet, eine mangelnde supportive Funktion des Knochenmarksstromas könnte an der Pathogenese beteiligt sein. In einem Kreuzversuch mit Panmyelopathie-LTBMC in gesundem Stroma sowie gesunden LTBMC auf AA-Stroma konnte JUDITH MARSH jedoch beweisen, daß das Knochenmarkstroma bei der AA keine pathophysiologische Bedeutung hat: Gesunde Stammzellen proliferieren in AA-Stroma ungestört, die Proliferation von AA-Stammzellen in gesundem Stroma ist allerdings stark reduziert (MARSH *et al.*, 1991 a). In einem in-vitro-Ansatz einer Ulmer Arbeitsgruppe, die hämatopoetische Insuffizienz des Knochenmarks bei AA mittels Grenzverdünnungsanalysen

zu quantifizieren, konnte in LTBMC gezeigt werden, daß die Frequenz sogenannter „cobblestone area-forming cells“ (CAFC)[2], die als repräsentativ für pluripotente hämopoetische Progenitorzellen angesehen werden, bei AA im Vergleich zu Gesunden deutlich reduziert ist (SCHREZENMEIER *et al.,* 1996).

Das Auftreten klonaler Erkrankungen wie PNH, MDS oder AML nach Behandlung einer AA mit immunsuppressiver Therapie ist ein Argument für die Annahme, daß ein Stammzelldefekt vorliegen muß, welcher einem Zellklon möglicherweise durch sekundäre Ereignisse gegenüber dem restlichen hypoplastischen Knochenmark einen Wachstumsvorteil verschafft. Bezeichnenderweise tauchen die Folgeerkrankungen PNH, MDS und AML nach einer erfolgreichen Knochenmarkstransplantation nicht auf (SOCIE *et al.*, 1993). Es wurden zwar auch maligne Erkrankungen wie Akute lymphoblastische Leukämie, lymphoproliferative Erkrankungen und solide Tumoren nach KM-Transplantationen bei AA beobachtet, allerdings ist dies offensichtlich auf die Präkonditionierung mit Ganzkörperbestrahlung und die Behandlung einer *Graft-versus-host disease* (GvHD) mit Immunsuppressiva zurückzuführen (DEEG *et al.*, 1996).

Für einen primären Defekt der Stammzelle spricht auch die schon ältere Beobachtung, daß Progenitorzellen bei Aplastischer Anämie *in vitro* ähnlich empfindlich auf Komplement reagieren wie bei der PNH, was die Frage aufwirft, ob es sich bei AA und PNH um die gleiche Erkrankung mit unterschiedlicher klinischer Ausprägung handeln könnte (NISSEN *et al.*, 1986).

Einen großen Anteil zur Aufklärung der Pathophysiologie der AA haben Beobachtungen beigetragen, daß auf Blutzellen bei einem signifikanten Anteil von Patienten mit AA (Angaben zwischen 19 % und 52 %) Oberflächenproteine fehlen, die mit Glycosylphosphatidyl-Inositol (GPI) an der Zellmembran von Erythrocyten, Retikulozyten, Monocyten und Granulozyten verankert sind (VAN DER SCHOOT *et al.*, 1990; SCHUBERT *et al.*, 1991; GRISCELLI-BENNACEUR *et al.*, 1995; SCHREZENMEIER *et al.*, 1995). Dieses Phänomen wurde davor nur bei der Paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) nachgewiesen und ist für diese Erkrankung als pathophysiologische Ursache anerkannt. Der Nachweis dieses Defektes auch bei der AA, ohne daß klinische Anzeichen einer PNH oder ein positiver Säure-Serum-Test vorliegen, erschwert nunmehr wieder die Differenzierung zwischen beiden Erkrankungen und wirft erneut die Frage auf, ob es sich um verschiedene Entwicklungsstufen einer Krankheit handelt. Daher muß vergleichend auf die PNH - auch wenn sie nicht direkt Gegenstand dieser Arbeit ist - eingegangen werden.

[2] Der Name rührt von dem Pflasterstein-artigen Aspekt der Zellen in diesen Kulturen, wenn man sie unter dem Mikroskop betrachtet (PLOEMACHER *et al.,* 1989)

1.3.3 Klonale Folgeerkrankungen der Aplastischen Anämie

Die Beziehung der AA zu den klonalen Erkrankungen PNH, MDS und AML war - wie eingangs erwähnt - von DAMASHEK schon vor 30 Jahren hinterfragt worden. LEWIS und DACIE hatten damals bei 7 von 46 AA-Patienten einen positiven Ham-Test befundet, der serologisch als Zeichen für das Vorliegen einer PNH gilt, 15 von 60 PNH-Patienten wiederum entwickelten im Verlauf ihrer Erkrankung eine AA (LEWIS & DACIE, 1967). Eine neuere Studie aus Basel 1994 zeigte bei 129 AA-Patienten unter immunsuppressiver Therapie (IS) ein kumulatives Risiko von 42% ± 13% in 15 Jahren, eine klonale Erkrankung zu entwickeln. Das Risiko einer sekundären PNH beläuft sich der Studie zufolge auf 25% ± 5%, das Risiko eines MDS auf 26% ± 8% (TICHELLI *et al.,* 1994). Im Vergleich dazu hatte die Arbeitsgruppe für AA der Europäischen Kooperationsgruppe für Knochenmarkstransplantation (EBMT) bis 1989 209 langzeitüberlebende AA-Patienten nach IS-Therapie beobachtet, das kumulative Risiko einer PNH betrug nach 7 Jahren 13 %, das eines MDS und/oder einer AML 15% (DE PLANQUE *et al.,* 1989). Eine Übersicht über bisherige klinische Studien zu klonalen Spätkomplikationen bei AA gibt die Tabelle 1.3-2.

Tabelle 1.3-2: Klinische Studien zu den klonalen Spätkomplikationen MDS und AML bei AA-Patienten nach immunsuppressiver Therapie (*zum Teil entnommen aus*: RAGHAVACHAR, 1999)

Patienten	Anzahl	Entwicklung eines MDS / einer AML		Zeitspanne bis zur Erstmanifestation	Quelle
	n	*n*	*%*	*Monate [Median (Streubreite)]*	
Erwachsene	209	12	5,7	55 (30- 90)	DE PLANQUE *et al.,* 1989
Erwachsene	156	5	3,2	? (60-144)	NAJEAN & HAGUENAUER, 1990
Erwachsene und Kinder	860	43	10,4	MDS: 52 (2-122) AML: 47 (7-115)	SOCIÉ *et al.*, 1993
Erwachsene und Kinder	37	13	35	Keine Angaben	NARAYANAN *et al.*, 1994
Erwachsene	77	5	6,5	49 (30-126)	PAQUETTE *et al.,* 1995
Erwachsene und Kinder	227	20	8,8	Keine Angaben	DONEY *et al.,* 1997
Kinder	119	11	9,2	25 (12-74)	OHARA *et al.,* 1997

1.3.3.1 Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

Bei der Paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH, *synonym:* MARCHIAFAVA-MICHELI-Syndrom) handelt es sich um eine erworbene somatische Mutation auf der Ebene der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, bei der aufgrund einer Mutation des X-chromosomalen PIG-A-Genes das Glykan-Phosphatidylinositol-A-Protein (GPI-Anker), das zur Verankerung von Oberflächenproteinen an der Zellmembran dient, gar nicht oder nur defizient synthetisiert werden kann. Das Fehlen der GPI-verankerten Oberflächenproteine

an Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten erklärt die wesentlichen klinischen Symptome der PNH:

- eine korpuskuläre hämolytische Anämie
- eine thrombophile Diathese sowie
- eine erhöhte Infektionsneigung.

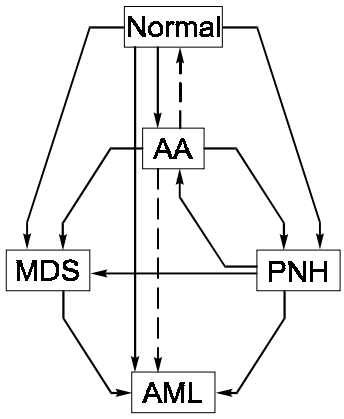


Abbildung 1.3-1: Beziehung der AA zu klonalen Folgeerkrankungen (*aus*: MARSH & GEARY, 1991)

Die namensgebende Hämoglobinurie mit „dunklem“ Urin tritt bei vielen Patienten nur vorübergehend, bei manchen gar nicht auf. Die Hämolyse beruht auf einer erhöhten Komplement-Empfindlichkeit der Erythrozyten, die in allererster Linie auf das Fehlen der GPI-verankerten, membranprotektiven Proteine *„decay accelerating factor“* (DAF = CD 55) und „Membran-Inhibitor der reaktiven Lyse“ (MIRL = CD 59) zurückzuführen ist. Die erhöhte Lysebereitschaft von PNH-Erythrozyten kann im Sucrose-Hämolyse-Test („Zuckerwasser-Test“) und im Säure-Serum-Test („Ham-Test“) nachgewiesen werden. Diese beiden Tests galten bis zur Entdeckung des GPI-Defektes und dem routinemäßigen Nachweis fehlender GPI-verankerter Oberflächenproteine durch Fluoreszenz-Durchflußzytometrie als Standard-Diagnostikum.

Die PNH kann mit einer Trizytopenie einhergehen, so daß sich das klinische Erscheinungsbild dann nicht wesentlich von dem einer Aplastischen Anämie unterscheidet. Die Differentialdiagnose ist in diesen Fällen nicht einfach. Es gibt auch eine Assoziation beider Erkrankungen, die als AA-PNH-Syndrom bezeichnet wird. Diese Bezeichnung trifft sowohl auf AA-Patienten mit nachgewiesenem GPI-Defekt wie auch auf PNH-Patienten mit Knochenmarksaplasie zu (RAGHAVACHAR & SCHREZENMEIER, 1995).

1.3.3.2 Myelodysplastische Syndrome

Der Begriff „Myelodysplastische Syndrome“ umfaßt eine Gruppe von klonalen hämatopoetischen Erkrankungen, die früher als „Präleukamien“ bezeichnet wurden. Sie sind durch unterschiedlich ausgeprägte Reifungsstörungen der Hämatopoese und durch ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer sekundären Akuten myeloischen Leukämie gekennzeichnet. Die Klassifizierung der *French-American-Britisch cooperative group (FAB)* unterscheidet nach morphologischen Kriterien und dem Blastenanteil in peripherem Blut und Knochenmark 5 Subtypen: Refraktäre Anämie (RA), Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS), Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuß (RAEB), RA mit Blastenüberschuß in

Transformation (RAEB-t) und Chronische Myelomonozytäre Leukämie (CMML) (BENNETT *et al.,* 1982). Diese Klassifikation korreliert mit der Prognose der Erkrankung.

Wichtigstes Merkmal sind dysplastische Veränderungen in einer oder mehreren myeloischen, aber auch lymphatischen Zellreihen im Blutausstrich und im Knochenmarksaspirat. Chromosomen-Aberrationen finden sich in bis zu 60% der Fälle, darunter Trisomie 8, Monosomie 5 und 7, Deletionen 5q-, 7q-, 9q- und 20q- und viele Translokationen. Am besten untersucht ist die (5q-)-Deletion, auf diesem Arm finden sich eine Vielzahl von Genen, deren Produkte die Hämatopoese regulieren, z.B. GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-4 und IL-5 (LE BEAU *et al.,* 1986). Allerdings weist weder diese noch eine der anderen nachgewiesen Aberrationen eine Spezifität für einen der MDS-Subtypen auf (BERGER, 1992).

Klonalitätsstudien mit verschiedenen X-Chromosom-Inaktivierungsassays etablierten die Hypothese, daß es sich bei den MDS um klonale Erkrankungen der multipotenten oder gar omnipotenten Stammzelle handelt. Dabei waren auch klonale Befunde bei Patienten ohne zytogenetische Defekte gefunden worden, so daß ein mehrschrittiger Pathomechanismus angenommen wird (PRCHAL *et al.,* 1978; RASKIND *et al.,* 1984; JANSSEN *et al.,* 1989; TEFFERI *et al.,* 1990).

1.3.3.3 Akute myeloische Leukämie

Daß die Blasten bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) klonal sind, ist heutzutage unbestritten. Die Erkenntnis entstand frühzeitig aufgrund zytogenetisch nachgewiesener Chromosomen-Anomalien, die bei AML in 70-90% der Fälle auftreten (BERGER, 1992). Diese Beobachtungen wurden - wie später auch bei den MDS - durch Klonalitätsassays mit X-Chromosom-Inaktivierungsanalysen untermauert (FIALKOW *et al.,* 1972). Im Gegensatz zu den MDS fand man bei der AML eine Korrelation von Chromosomen-Translokationen zu einzelnen AML-Subtypen (FAB M_1 bis M_6), gemäß Klassifikation der FAB-Koordinationsgruppe nach morphologischen Gesichtspunkten (BENNETT *et al.,* 1985).

Auffällig in einigen späteren Klonalitätsstudien war aber, daß bei rund einem Viertel der Patienten mit AML, bei denen eine komplette Remission mit morphologisch und zytogenetisch normalem Befund des Knochenmarks eingetreten war, immer noch klonale X-Chromosom-Inaktivierungsmuster nachzuweisen waren (BARTRAM *et al.,* 1989; FEARON *et al.,* 1986). Dieses Phänomen gab Anlaß zur Hypothese, daß die Pathogenese der AML in mehreren Schritten abläuft, mit nacheinander eintretenden, einander begünstigenden Mutationen, bei der die letzte das maligne Wachstum ermöglicht (FIALKOW *et al.,* 1991; BUTTURINI & GALE 1990).

1.3.4 Zytogenetische Befunde bei AA

Aufgrund des klinischen Zusammenhangs der Aplastischen Anämie mit MDS und AML ist es für die Frage des primären Stammzelldefektes naheliegend, auch hier nach zytogenetischen Abnormalitäten zu suchen. Diese Aufgabe wird bei AA aber im wesentlichen dadurch erschwert, daß aus einem hypo- oder aplastischen Knochenmark nur mit Mühe Zellen zu gewinnen sind, an denen Metaphase-Untersuchungen durchgeführt werden könnten.

Bereits 1987 versuchte eine Gruppe in Seattle zu klären, ob bei der Aplastischen Anämie reproduzierbare zytogenetische Veränderungen zu finden seien. Sie fanden in 176 Fällen mit SAA nur bei 7 zytogenetisch klonale Befunde (4%) (APPELBAUM *et al.,* 1987). In einer Studie der *European Bone Marrow Transplant - Severe Aplastic Anemia - (EBMT-SAA) Working Party* von 1974 bis 1994 wurden bei 170 Patienten mit der Erstdiagnose einer SAA zytogenetische Untersuchungen durchgeführt, in 23 Fällen (13,5%) zeigten sich abnorme Befunde, dabei gehäuft Trisomien und andere Aberrationen des Chromosoms 8 (6 Fälle). Hinweise auf eine spezifische Chromosomen-Aberration bei AA gab es allerdings nicht.

Die interessanteste Arbeit zu diesem Thema lieferte die Genueser Arbeitsgruppe um BACIGALUPO, sie untersuchte 69 Patienten mit SAA zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. während und nach immunsuppressiver Therapie (IS) (MIKHAILOVA *et al.,* 1996). Dabei wiesen 51 der 69 Patienten (74%) zu keinem Zeitpunkt zytogenetische Auffälligkeiten auf. Bei 18 Patienten (26%) kam es hingegen zu transienten oder permanenten Chromosomen-Aberrationen, auch hier überwog die Trisomie 8 (8 Fälle), gefolgt von der Monosomie 7 (2 Fälle). Aus ihren Beobachtungen zogen die Autoren folgende Rückschlüsse:

1. Der überwiegende Teil der Fälle mit Aplastischer Anämie weise in zytogenetischer Hinsicht keine abnormalen Klone auf.
2. Chromosomen-Aberrationen bei Aplastischer Anämie können durchaus auch transient sein, wobei das auch daher rühren könne, daß ein aberranter Klon zwar vorhanden bliebe, aber im Verhältnis zu den sich unter IS regenerierenden normalen Stammzellpopulationen stetig kleiner würde und irgendwann unter die Nachweisgrenze fiele.
3. Vor allem in der Gruppe mit persistierenden Chromosomen-Aberrationen bestehe ein besonderes Risiko, ein MDS oder eine AML zu entwickeln.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Für die Pathophysiologie der Aplastische Anämie bedeutet die Klonalitätsfrage:

- Handelte es sich bei der Aplastische Anämie um eine Erkrankung, die durch ein einziges *intrinsisches* Ereignis in einer einzigen pluripotenten Knochenmarksstammzelle - wie beispielsweise eine Punktmutation oder eine sonstige Aberration - verursacht würde, wäre eine überwiegend *monoklonale* Hämopoese zu erwarten.
- Wäre das Knochenmarkversagen auf einen *extrinsischen* Mechanismus zurückzuführen, der alle hämatopoetischen Stammzellen gleichermaßen betrifft (z.B. Autoimmunreaktion, Virusinfektion oder toxische Schädigung), so sollte die residuelle Hämopoese polyklonal oder allenfalls oligoklonal sein.

Anhand von X-Chromosom-Methylierung-Analysen und Immunfluoreszenz-Analysen soll in der vorgelegten Arbeit geklärt werden, ob

1. es sich bei der Aplastischen Anämie um eine klonale Erkrankung der Hämatopoese handelt,
2. das Auftreten eines klonalen Erscheinungsbildes mit dem Auftreten eines GPI-defizienten Klones korreliert,
3. eine nachgewiesene klonale Hämatopoese eine prognostische Bedeutung hinsichtlich des klinischen Auftretens klonaler Folgeerkrankungen (PNH, MDS oder AML) hat und
4. der Nachweis einer klonalen Hämatopoese durch das vorangegangene Therapieregime (insbesondere die Immunsuppression mit ALG/ATG mit und ohne Ciclosporin A) begünstigt wird.

Die Beantwortung dieser Fragen ließe Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der Aplastischen Anämie zu. Insbesondere würde sie zur Klärung darüber beitragen, ob es sich bei der AA und der PNH um einen ähnlichen oder identischen Pathomechanismus handelt, auch wenn sich die klinische Manifestation unterscheidet. Darüberhinaus soll diskutiert werden, ob die X-Methylierung-Analysen als prognostisches Werkzeug dienen kann und wo die Limitationen der Methode liegen.

2 Patienten und Methode

2.1 Patienten

Das Vorliegen zweier X-Chromosomen als Voraussetzung für den methodischen Zugang (siehe Kap. 1.2.1.1) erklärt, daß nur weibliche Patienten untersucht werden konnten. Insgesamt wurden Zellen des peripheren Blutes von 37 Patientinnen mit AA oder AA/PNH-Syndrom mittels den drei X-Chromosom-Methylierungsassays PGK-PCR, M27ß-Southern-Hybridisierung und HUMARA-PCR untersucht, bei 26 der 37 Patientinnen erbrachten die Methoden interpretierbare Ergebnisse, 11 Patienten waren für die angewendeten Assays nicht heterozygot (siehe Abbildung 3.4-1 auf S. 40).
Die klinischen Daten der 26 ausgewerteten Patientinnen bezüglich Alter, Schweregrad der Erkrankung, Zeitpunkt der Klonalitätsuntersuchung, Therapie und Behandlungserfolg sowie Auftreten sekundärer klonaler Erkrankungen sind der Tabelle 2.1-1 zu entnehmen. Die Definition des Schweregrades der Aplastischen Anämie und des Behandlungserfolges sind den auch international gültigen Richtlinien der Deutschen Studiengruppe für Aplastische Anämie entnommen (FRICKHOFEN *et al.*, 1991). Demzufolge wird eine Aplastische Anämie als schwer (*severe* - SAA) angesehen, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- Hypozelluläres Knochenmark (< 25%) mit weniger als 30 % hämatopoetischen Zellen
- Neutrophile Granulozyten < 0,5 G/l
- Thrombozyten < 20 G/l
- Retikulozyten < 20 G/l

Von sehr schwerer Aplasie (*very severe* - VSAA) spricht man bei einer Neutropenie unter 0,2 G/l.

Eine komplette Remission (CR) nach immunsuppressive Therapie wird definiert durch:

- Hämoglobin-Konzentrationsanstieg auf 120 g/ L
- Anstieg der Granulozyten auf 1,5 G/l
- Anstieg der Thrombozyten auf 100 G/l

Eine partielle Remission (PR) erforderte folgende Kriterien (Werte im Vergleich zum Ausgangsbefund):

- Anstieg der Granulozyten um 0,5 G/l
- Anstieg der Thrombozyten um 30 G/l
- Anstieg der Retikulozyten um 30 G/l
- keine Transfusionsabhängigkeit

Kein Ansprechen (NR) wurde bei Fehlen einer dieser Kriterien oder bei Tod konstatiert.

Den Patientinnen wurde nach Aufklärung über die Studie und deren Einverständnis im Rahmen der ambulanten oder stationären Behandlung wiederholt über einen Zeitraum von bis zu 3 Jahren venöses Vollblut entnommen.

Tabelle 2.1-1: Klinische Daten der untersuchten Patientinnen

ID-Nr.	Alter zum Zeitpunkt der ED	Diagnose	Therapie	Verlauf (Monate nach ED)	Klonale Komplikation (Mon. n. ED)
1	30	SAA	ALG, CsA, HDMP	PR	
2	20	SAA	ALG, CsA, HDMP	CR → Rezidiv (18) → PR	
3	22	VSAA	ALG, CsA, HDMP, G-CSF	CR	
4	29	AA	ALG, CsA, HDMP	CR→Rezidiv (9)→CsA→CR	
5	53	SAA	ALG, CsA, HDMP, IL-3,IL-6	NR	
6	36	AA	ATG, Pred	CR	
7	66	SAA	ALG, CsA, HDMP	Rezidive (33, 50, 90) → PR	
8	74	SAA	ALG, CsA, HDMP	PR	PNH (51)
9	55	SAA	CsA, ALG, Pred.	PR	
10	63	SAA	ALG, CsA, HDMP	PR	PNH (53)
11	42	AA	ALG, CsA, HDMP	PR	
12	44	SAA	ALG, CsA, HDMP	CR → sek. AML (64) → † (67)	AML (64)
13	24	SAA	ALG, CsA, HDMP	CR	
14	29	SAA	ALG, CsA, HDMP	CR	AML (120)
15	27	SAA	ALG, CsA, HDMP	CR	
16	10	AA	ALG, CsA, HDMP	PNH (216) → ALG, CsA → CR	PNH (216)
17	69	AA	ALG, CsA, HDMP, IL-3	NR	AML (28)
18	44	AA	ALG, CsA, HDMP	NR	PNH (84)
19	46	SAA	ALG, CsA, HDMP	CR	PNH (36)
20	20	AA	ALG, CsA, HDMP	CR	PNH (88)
21	14	SAA	*Diagnosestellung*		
22	16	VSAA	ALG, CsA, HDMP, G-CSF	PR	
23	31	VSAA	KMT	CR	
24	23	SAA	ALG, CsA, HDMP	PR	
25	28	SAA	ATG, CsA	Rezidiv (38) → PR unter CsA	
26	26	SAA	ALG, HDMP	NR, KMT	PNH (72)
Durchschnittsalter:	36,2 J.				

ALG: Anti-Lymphozytenglobulin
CsA: Ciclosporin A
HDMP: Hoch-Dosis Methylprednisolon
Pred: Prednisolon
CR: Komplette Remission
PR: Partielle Remission
NR: Non-Responder

2.2 Methode

2.2.1 Grundlagen der angewandten Assays

2.2.1.1 X-Chromosom-Methylierung-Analysen

2.2.1.1.1 RFLP im Phosphoglyceratkinase-Gen

Schon Mitte der 60er Jahre machte man sich das Isoenzym-Muster von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-(G-6-PDH)-heterozygoten Frauen zunutze, um Klonalität in Tumorgewebe nachzuweisen (LINDER & GARTLER, 1965). Aufgrund der in Kapitel 1.2.1.1 beschriebenen X-Inaktivierung wird im Organismus einer heterozygoten Frau von jeder einzelnen Zelle entweder nur das väterliche oder nur das mütterliche Allel exprimiert. In diesem Gewebe ist nach LYONS Hypothese zu erwarten, daß beide Allele nach dem Zufallsprinzip inaktiviert werden: Im Idealfall der Gauß'schen Normalverteilungskurve ist bei 50% der Zellen das mütterliche, bei den anderen 50% das väterliche Allel inaktiviert, somit werden auch beide Isoenzyme zu gleichen Teilen synthetisiert. Ist ein neoplastisches Gewebe klonal, besitzen alle Tochterzellen dieses Klons die gleichen Eigenschaften. So sind auch entweder nur alle mütterlichen oder nur alle väterlichen Allele des G-6-PDH-Gens inaktiviert, was zu vermuten ist, wenn nur eines der beiden Isoenzyme nachgewiesen werden kann.

Ein großes Problem ist allerdings, daß nur sehr wenige Frauen der indoeuropäischen Ethnien für G-6-PDH heterozygot sind. Um dieses Problem zu umgehen, griff Mitte der 80er Jahre der US-amerikanische Krebsforscher BERT VOGELSTEIN die Entdeckung der aktivitätsassoziierten Methylierung von X-Chromosomen auf. Dabei untersuchte er den Methylierungszustand eines x-chromosomalen Allels mit Methylgruppen-empfindlichen Endonukleasen Hpa II oder Hha I, die die für sie spezifische Nukleotidsequenz eines DNA-Abschnitts nur dann schneiden, wenn die darin enthaltenen Cytidine *nicht* methyliert sind. Voraussetzung für Vogelsteins Methode ist, daß väterliches und mütterliches X-Chromosom unterscheidbar sind, beispielsweise durch eine Punktmutation, die einen sogenannten Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) verursacht.

Diese Voraussetzung erfüllen die x-chromosomalen Genloci der Phosphoglyceratkinase (PGK) (siehe Abbildung 2.2-1) und der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT). Zunächst waren die Assays nur mit der Southern-blot-Hybridisierungsmethode zu bewerkstelligen, somit technisch und aufgrund Verwendung radioaktiver Isotope relativ aufwendig. Eine wesentliche Erleichterung brachte die Möglichkeit der X-Inaktivierung-Analyse am PGK_1-Gen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (GILLILAND *et al.,* 1991a, VAN KAMP *et al.,* 1991), bei der eine DNA-Amplifikation nur bei den methylierten (inaktivierten) Allelen

stattfinden kann, deren CCGG-Sequenz im vorausgehenden Hpa-II-Restriktionsverdau nicht geschnitten wird.
Im Gegensatz zum Southern-Blot wird der BstXI-Verdau erst am Schluß durchgeführt, um an den amplifizierten Allelen die Punktmutation im Bereich der BstXI-Schnittstelle nachzuweisen.
Der X-Inaktivierungsassay mit PGK_1 und auch der mit HPRT haben gegenüber der Isoenzym-Analyse bei G-6-PDH immerhin den Vorteil, daß 30 % der untersuchten Frauen für je beide Loci heterozygot sind, im Idealfall zusammengenommen 50 % (FEY *et al.*, 1992; 1994).

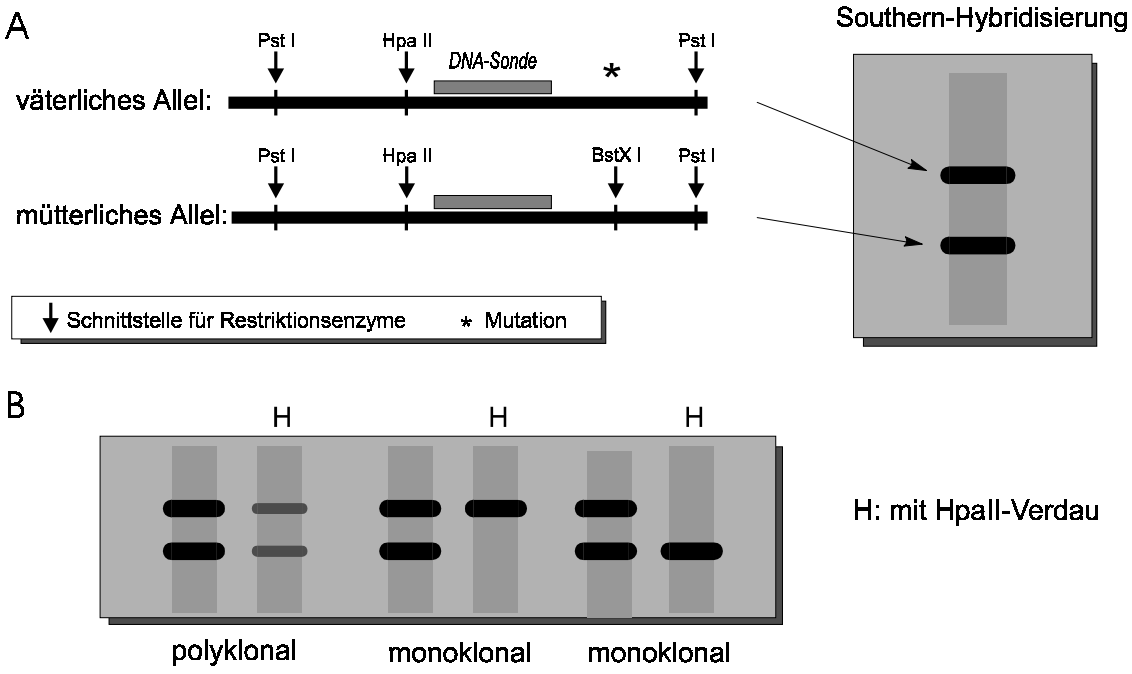


Abbildung 2.2-1: **Southern-Hybridisierung am Phosphoglyceratkinase-Gen**:
(A) Eine Punktmutation (*) auf einem der beiden Allele an einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym BstX I bewirkt, daß das Enzym dort nicht schneiden kann. Es kommt zu zwei unterschiedlich langen Restriktionsfragmenten, die aber beide mittels einer Gensonde nachweisbar bleiben. Aufgrund der verschiedenen Migrationsgeschwindigkeit der beiden Fragmentgrößen in der Gelelektrophorese zeigen sich zwei Banden. Ist nur eine Bande vorhanden, muß man davon ausgehen, daß die untersuchte Patientin für diese Allele homozygot ist, Patienten mit solchem Befund sind nicht informativ.
(B) Wird nach dem vorangegangenen Verdau eine Restriktion mit HpaII angeschlossen, werden zusätzlich bei einem der beiden Allele HpaII-zugängliche Sequenzen (CCGG) geschnitten, aber nur dann, wenn sie nicht methyliert sind. Wird das Allel geschnitten, so werden die Fragmente so klein, daß sie bei der Gelelektrophorese weit aus dem untersuchten Bereich hinauswandern, das Allel verschwindet quasi ganz. Liegt die Methylierung der CCGG-Sequenz auf beiden Allelen in gleicher Häufigkeit vor, wie man es in einem polyklonalen Zellverband erwartet, verschwinden von beiden Allel-Mengen idealerweise 50 %, beide bleiben aber - mit zu 50% schwächerer Intensität - nachweisbar. Ist durchgehend nur eines der beiden Allele methyliert, wie dies in einem klonalen Zellverband der Fall sein muß, erscheint ein Allel mit voller Intensität, das andere verschwindet ganz.

2.2.1.1.2 Variable Number Copy Tandem Repeats im Genlokus DXS 255

Eine Verbesserung der Anwendbarkeit von X-Inaktivierungsanalysen brachte die Nutzung des nicht codierenden Genlokus DXS 255 auf dem Abschnitt Xcen-p11.22 (ABRAHAMSON *et al.*, 1990). Für diesen Genlokus, der mit der Gensonde M27ß nachweisbar ist, sind mindestens 85 % aller untersuchten Frauen heterozygot (FEY *et al.*, 1992). Die hohe Heterozygotie-Rate beruht auf einer variablen Wiederholung einer 26 Basenpaare langen Nukleotid-Sequenz innerhalb des mit M27ß nachgewiesenen Restriktionsfragments (*variable copy number tandem repeats* - VNTR). Die Endonuklease Pst I schneidet ein 4 bis 7 kBp großes Restriktionsfragment aus dieser Region, das nahe dem 5'-Ende drei CCGG-Sequenzen besitzt und dort durch Hpa II geschnitten werden kann, sofern diese Sequenzen nicht methyliert sind. Auf diese Weise sollte es möglich sein, das aktive vom inaktiven Allel zu unterscheiden. Das Prinzip dieses Assays ist in Abbildung 2.2-2 im Detail erläutert.

Doch auch der M27ß-Southern-Hybridisierungsassay hat Nachteile, insbesondere Interpretationsschwierigkeiten, wenn sich nach dem Verdau mit der methylierungsempfindlichen Endonuclease Hpa II nicht zwei oder vier Banden darstellen, sondern drei oder fünf. FEY und Mitarbeiter haben versucht, die möglichen Ursachen dieser schwer interpretierbaren Bandenmuster zu ergründen. Zu den möglichen Ursachen zählt

1. die Tatsache, daß die Methylierung der zwei 5'-nahen CCGG-Sequenzen im interessierenden Bereich nicht streng genug mit der Inaktivierung des entsprechenden X-Chromosoms korrelliert. HENDRIKS und Mitarbeiter stellten fest, daß die zum 5'-Ende gelegene CCGG-Sequenzen (M1 und M2) des *aktiven* X-Chromosoms zwar immer zu 100% methyliert ist (außer in B-Lymphozyten), eine Methylierung der entsprechenden Sequenzen aber auch auf dem *inaktiven* Allel zwischen 0 und 60% schwankend vorliegen kann (HENDRIKS *et al.,* 1991). Die zum 3'-Ende gelegenen CCGG-Sequenz (M3) ist auf beiden Allelen immer methyliert, somit für Hpa II-Restriktionen nicht zugänglich.
2. daß es bei der Gewinnung von Zellen des Blutes zur Vermischung von gesunden, polyklonalen Zellen mit Abkömmlingen eines Klones kommen kann, wodurch Muster mit vier Banden entstehen, deren Intensität aber nicht dem polyklonalen Zufallsverteilungsmuster (annähernd 50:50, wie in Abbildung 2.2-2) entspricht.

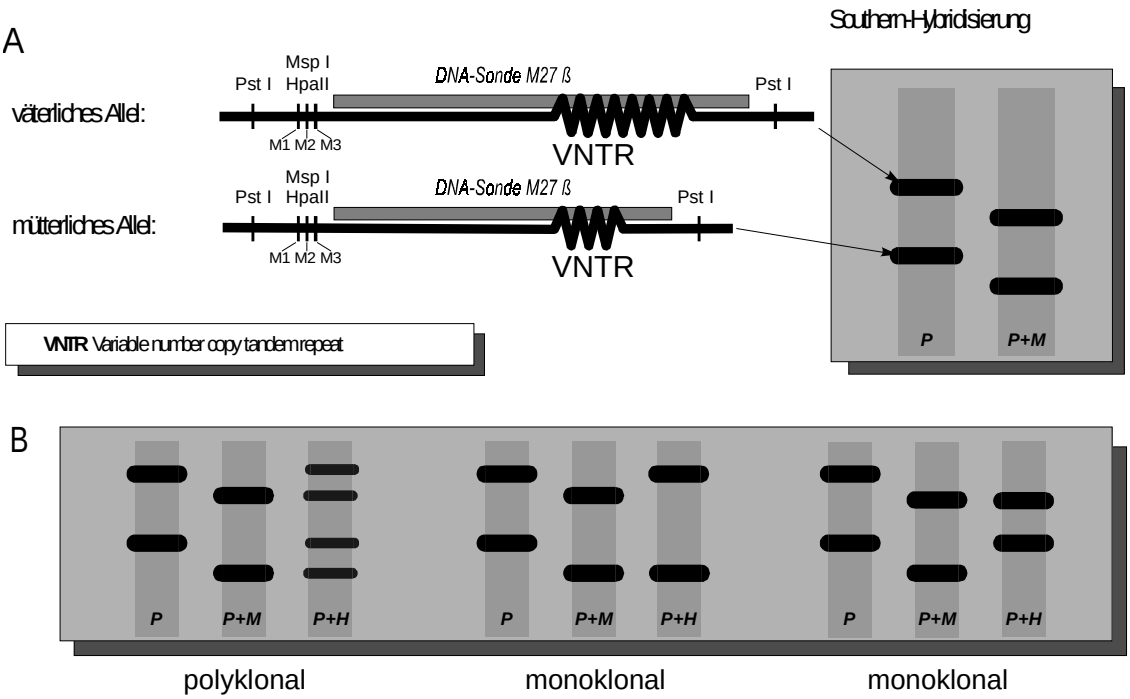


Abbildung 2.2-2: **Southern-Hybridisierung mit M27ß am Genlokus X cen-p11.22:**
(A): Die Länge der durch die Endonuklease Pst I hergestellten Restriktionsfragmente beider Allele unterscheidet sich aufgrund der unterschiedlich häufigen Wiederholung einer 26 Basenpaare langen Nukleotid-Sequenz im als „VNTR" bezeichneten Bereich. In dem Pst-I-Restriktionsfragment befindet sich in Nähe des 5'-Endes drei CCGG-Sequenzen (M1, M2 und M3), die sowohl von Msp I als auch von Hpa II erkannt und geschnitten werden, im Falle von HpaII aber nur, wenn das Cytidin in dieser Sequenz nicht methyliert ist. Die geringe Verkürzung der Fragmente durch Msp I / Hpa II bewirkt eine etwas schnellere Migration durch das Elektrophorese-Gel - die Banden rutschen daher tiefer (rechts oben, Spalte P+M).
(B): Liegen beide Allele gleichermaßen in methylierter und nicht-methylierter Form vor, werden beide idealerweise zu 50% von Hpa II geschnitten, es erscheinen nach Southern-Hybridisierung vier Banden (unten links, Spalte P+H). Ist in allen Zellen einer untersuchten Population nur eines der beiden Allele methyliert, so bleibt dieses unverändert, das andere Allel wird durch HpaII im Idealfall zu 100% verdaut, seine Bande wandert in der Elektrophorese vollständig weiter. Das methylierte bleibt auf der alten Höhe stehen (unten Mitte und rechts, Spalten P+H). Wohlgemerkt handelt es sich bei den dargestellten Mustern um Idealfälle, im wirklichen Experiment tauchen eine Reihe anderer Muster auf, die Interpretationsschwierigkeiten bereiten können und auf inkomplette oder fehlende Methylierung der zum 3'-Ende gelegenen CCGG-Sequenz zurückzuführen sind (siehe Text).

Die zahlreichen Varianten an Bandenmustern erschweren die Interpretation von M27ß-Southern-blots erheblich, so daß die Ergebnisse nur sehr eingeschränkten Aussagewert haben, sofern es sich nicht eindeutig um eines der drei in der Abbildung 2.2-2 dargestellten Muster handelt (siehe dazu auch FEY *et al.,* 1994).

2.2.1.1.3 Short-Tandem-Repeats im Androgen-Rezeptor-Gen

Der Androgen-Rezeptor-Genlokus erstreckt sich über eine Länge von mehr als 90 kBp auf dem X-Chromosom im Bereich Xcen-q13 und beinhaltet den Code für ein 917 Aminosäuren großes Protein. Im ersten Exon dieses Gens befindet sich eine für das Restriktionsenzym Hpa II schneidbare CCGG-Sequenz, die optimal die beiden Voraussetzungen für einen X-Chromosom-Inaktivierung-Assay erfüllt:

1. Die Methylierung dieser Sequenz korreliert streng mit der Inaktivierung des betroffenen Allels, d.h. durch einen Hpa-II-Verdau kann aktives vom inaktiven Allel differenziert werden.
2. Die Sequenz liegt weniger als 100 Basenpaare entfernt von einer in der Anzahl hochvariablen (11-31) Wiederholung des Trinukleotids CAG (*short tandem repeats - STR*), wodurch bisher 20 verschieden lange Allele nachgewiesen werden konnten (ALLEN *et al.,* 1992).

Dieser Polymorphismus bedingt eine Heterozygotie für dieses Allel bei 90% aller Frauen (ALLEN *et al.,* 1992). Ein weiterer günstiger Faktor ist, daß der gesamte interessierende Bereich nicht größer als 300 Bp groß ist, somit für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gut geeignet.
ALLEN und Mitarbeiter nutzten diese guten Voraussetzungen für einen PCR-gestützten X-Inaktivierung-Assay. Sie konstruierten aufgrund der bekannten Sequenz des Exons zwei 24 Basen lange Oligonukleotide, die als PCR-Primer den

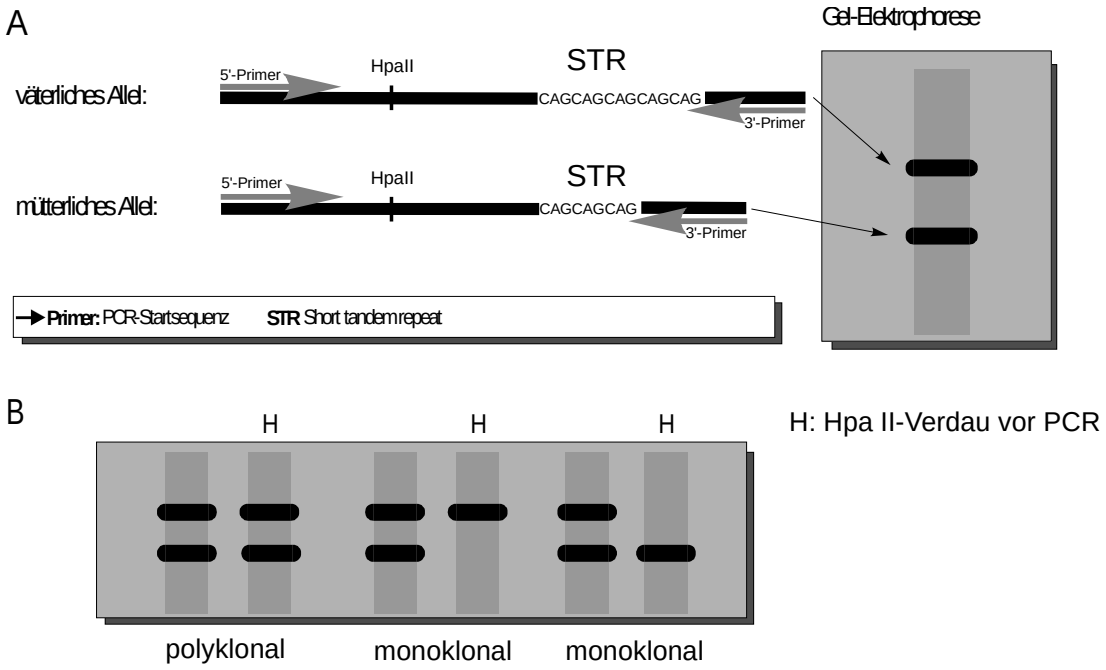


Abbildung 2.2-3: **Polymerase-Kettenreaktion am Androgen-Rezeptor-Gen:**
(A) Die beiden Oligonukleotide zum Starten der PCR (kurz „Primer" genannt) wurden so zusammengestellt, daß der von ihnen eingefaßte Abschnitt auf dem Exon 1 des Androgen-Rezeptor-Gens sowohl die HpaII-Schnittstelle als auch den STR beinhaltet. Der Verdau mit HpaII geht der PCR-Amplifikation voran. Im Fall, daß ein Allel inaktiviert ist, ist seine HpaII-Erkennungssequenz (CCGG) methyliert, d.h. sie kann von HpaII nicht geschnitten werden. Die anschließende PCR-Amplifikation findet ununterbrochen statt. Ist die CCGG-Sequenz hingegen nicht methyliert, wird sie von HpaII geschnitten. Bei der anschließenden PCR wird die DNA-Synthese an der Schnittstelle abgebrochen, sie erreicht nicht das 3'-Ende, ein gegenläufiger Zyklus mit dem 3'-Primer kann somit gar nicht stattfinden - die DNA wird nicht amplifiziert und ist damit in der Elektrophorese nicht nachweisbar.
(B) Bei einer polyklonalen Zellpopulation liegen von den mütterlichen wie von den väterlichen X-Chromosomen sowohl inaktivierte wie aktivierte Allele vor, im Idealfall im Verhältnis 50 : 50. Die inaktivierten Allele beider Chromosomen werden - da sie im HpaII-Verdau nicht geschnitten werden - in der PCR amplifiziert und beide damit in der anschließenden Gelelektrophorese nachweisbar. Bei monoklonalen Populationen ist davon auszugehen, daß ausschließlich nur das mütterliche oder nur das väterliche Allel inaktiviert ist und somit nur eins von beiden nach dem HpaII-Verdau amplifiziert wird.

interessierenden Bereich einfassen und in Verbindung mit einer Taq-DNA-Polymerase die Amplifikation eines ± 280 Bp großen Bereiches ermöglichen.
Ähnlich wie bei der PGK_1-PCR wird zunächst ein HpaII-Verdau durchgeführt. Dies bewirkt, daß nur die methylierten, demnach ungeschnittenen Allele durch die PCR amplifiziert werden. Die PCR-Produkte der beiden Allele unterscheiden sich in der Länge aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der STR (minimal 33 Basenpaare, maximal 93 Basenpaare Unterschied). Dieser Längenpolymorphismus ist sehr klein, daher muß eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt werden, um die Amplifikate sichtbar voneinander zu trennen.
ALLEN verwendet in seinem PCR-Protokoll zur anschließenden quantitativen Densitometrie der nachgewiesenen Allele radioaktiv markierte Cytosin-Nukleotide. Vor der PAGE werden die PCR-Produkte denaturiert, um als Einzelstränge durch das Gel zu wandern. Diese Methode weist aber das Problem des „shadow banding“ auf: beide Allele zeigen eine oder mehrere zusätzliche Banden auf. Möglicherweise wird dieses Phänomen entweder durch eine unterschiedliche Addition weiterer Nukleotide an das Amplifikat verursacht oder die beiden Einzelstränge eines Allels migrieren unterschiedlich schnell in der PAGE. Diese Probleme wurden in dieser Arbeit durch die Entwicklung einer nicht-radioaktiven PCR umgangen, bei der die PCR-Produkte vor der PAGE nicht denaturiert werden.

2.2.1.2 Der GPI-Anker-Defekt

1986 entdeckte DAVITZ *et al.*, daß der *decay-accelerating factor* (DAF, CD55), dessen Fehlen oder Defizienz bei PNH bereits bekannt war, mit einem Glycosylphosphatidyl-Inositol-(GPI)-Molekül an der Zellmembran von Blutzellen verankert ist. Dies konnte in nachfolgenden Arbeiten anderer Gruppen durch Immunfluoreszenz-Zytometrie auch für andere Oberflächenantigene an allen Blutzellreihen bei PNH nachgewiesen werden (SCHUBERT *et al.,* 1990, VAN DER SCHOOT *et al.,* 1990, SCHUBERT *et al.,* 1991).
Mittlerweile ist klar, daß das Fehlen GPI-verankerter Oberflächen-moleküle auf eine mangelhafte oder fehlende Biosynthese des Glykanphosphatidyl-Inositol-Ankerproteins selbst zurückzuführen ist. Dafür ist wiederum eine Mutation im X-chromosomalen PIG-A-Gen verantwortlich, das ein für die GPI-Anker-Synthese notwendiges Protein codiert. Die genaue Funktion dieses Proteins im Rahmen der GPI-Synthese ist aber nicht bekannt.

Tabelle 2.2-1: GPI-verankerte Oberflächen-Antigene auf peripheren Blutzellen und deren Funktion (modifiziert nach ROTOLI *et al.*, 1993 und SCHREZENMEIER, 1995)

CD	Name	Funktion	Expression auf peripheren Blutzellen						
			Ery	G	Mo	T-Ly	B-Ly	NK	Thro
Allgemeine									
CD48	Blast-1			●	●	●	●	●	
CD55	Decay accelerating factor (DAF)	Komplement-Regulation	●	●	●	●	●	●	●
CD58	LFA-3	Adhäsionsmolekül (Ligand für CD2)	●	○	○	○	○	○	
CD59	Membran-Inhibitor der reaktiven Lyse (MIRL)	Komplement-Regulation	●	●	●	●	●	●	●
Myeloid									
CD14	LPS-BP-Rezeptor	Rezeptor für LPS-Bindungsprotein		●	●			○	
CD16	Fcγ-Rezeptor III	Rezeptor für Immunglobulin-Fragmente		●					
CD24	BA-1	unbekannt		●			●		
CD66b	CGM6-Genprodukt	unbekannt		●					
	AP	Alkalische Phosphatase		●					
Erythroid									
	AchE	Acetylcholinesterase, Funktion in Erys unbekannt	●						
Lymphoid									
CD52	Campath-1 Antigen	unbekannt			●	●	●		
CD73	Ecto-5-NT	Nucleotidase				●	●		
CD87	uPAR	Rezeptor für Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ		●	●				

● Expression als GPI-verankertes Protein
○ Expression sowohl GPI-verankert als auch in einer als Transmembranprotein exprimierten Isoform

Ery: Erythrozyten, G: Granulozyten, Mo: Monozyten, T-/B-Ly: T-/B-Lymphozyten, NK: Natural Killer Cells, Thro: Thrombozyten

Das Fehlen GPI-verankerter Oberflächen-Proteine erklärt zwar alle klinischen Symptome einer PNH wie Hämolyse, thrombophile Diathese und Infektionsneigung, bisher aber nicht das häufige Auftreten einer hämatopoetischen Insuffizienz, das die Nähe der PNH zur Aplastischen Anämie demonstriert, bei der der GPI-Defekt mittlerweile auch nachgewiesen wurde (VAN DER SCHOOT *et al.*, 1990; SCHUBERT *et al.*, 1991; SCHREZENMEIER *et al.,* 1995; GRISCELLI-BENNACEUR *et al.*, 1995).

2.2.2 Versuchsprotokolle

2.2.2.1 Zellseparation und DNA-Extraktion

2.2.2.1.1 Zellseparation aus peripherem Blut

40 ml venöses Blut wurde in EDTA-benetzten Röhrchen aufgenommen und mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. Über einen Ficoll-Dichtegradienten (1,077g/ml, Lymphoprep®, Nycomed, Oslo, Norwegen) wurden zunächst die mononukleären Zellen abzentrifugiert, aus der Zwischenphase separiert und mindestens dreimal mit PBS gewaschen.
Granulozyten wurden aus dem Bodensatz des zentrifugierten Ficoll-Ansatzes durch Resuspension und 40minütiger Sedimentation in 5%iger Dextran-Lösung (Molekulargewicht 150.000 in PBS) aus dem Überstand gewonnen. Verunreinigende Erythrozyten wurden durch eine 40 s dauernde Lyse in destilliertem H_2O eliminiert. Die Lymphozyten- und die Granulozytenfraktion wurde anschließend mehrmals in PBS gewaschen und abzentrifugiert.

2.2.2.1.2 Zellseparation aus Knochenmarkskulturen

In einigen Fällen mußte konstitutionelle DNA aus Referenzgewebe untersucht werden, um unterscheiden zu können, ob es sich bei einem imbalancierten X-Chromosom-Methylierungsmuster um eine klonale Population oder um konstitutionelle extreme Lyonisierung handelte (siehe Kap. 4.3.1). Wir wählten dafür Knochenmark-Stroma aus Langzeit-Kulturen.
Knochenmarkszellen von gesunden Spendern wie auch von AA-Patienten bilden in geeignetem Kulturmedium (12,5% fetales Kälberserum, 12,5% Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 0,2 mM Inositol, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol) unter anderem ein konfluierendes Stroma-Layer, daß sich aus Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten, Makrophagen und extrazellulärer Matrix zusammensetzt (DEXTER *et al.,* 1984). Nach dieser Methode wurden in unserem Labor im Rahmen der Dissertationsarbeit von Frau JENAL (1995) Langzeit-Knochenmark-Kulturen (LTBMC) angelegt (publiziert in SCHREZENMEIER *et al.,* 1996).
Die Stroma-Zellen wurden aus diesen Kulturen gewonnen, indem nach 14 Tagen Inkubation nicht-adhärente Zellen durch Waschen entfernt wurden, die adhärenten Stromazellen mit Trypsin-Lösung vom Kulturplattenboden gelöst und in PBS als Einzelzellen suspendiert wurden. Die DNA-Extraktion erfolgte wie im Folgenden für Granulozyten und Lymphozyten beschrieben.

2.2.2.1.3 DNA-Extraktion

Methode 1: Aussalzen der DNA

Granulozyten- und Lymphozyten-Pellets wurden jeweils in 2 ml Lysis-Puffer (2% Sarkosyl, 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA) resuspendiert und mit 100 µl 10%igem SDS sowie 40 µl Proteinase K (10 mg/ml, Boehringer Mannheim, Deutschland) bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Verdauungsansätze wurden am nächsten Tag mit gesättigter Kochsalzlösung versetzt, 15 s rigoros geschüttelt und abzentrifugiert (MILLER *et al.*, 1988). DNA wurde aus dem abpipettierten Überstand mit gekühltem absoluten Ethanol präzipitiert, mit 70%iges Ethanol gewaschen und in 1-2ml H_2O oder 1xTE gelöst.

Methode 2: Phenolextraktion der DNA

Granulozyten und Lymphozyten wurden bei dieser Methode mit 300 µl des obengenannten Lysis-Puffers 30 min in 56°C vorbehandelt, dann mit 10 µl RNAse A (10 mg/ml) und 20 µl Proteinase K (10mg/ml) über mindestens 1 h in 37°C inkubiert.
Danach wurde der Verdau mit einem gleichem Volumen reinen Phenols (Rotiphenol® für DNA-Extraktion, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland), aufgeschüttelt, abzentrifugiert, und die wäßrige Phase (ohne Interphase!) sehr vorsichtig abpipettiert. Diese Schritte wurden mit der abpipettierten Phase jeweils mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (ebenfalls gebrauchsfertig von Roth) und zuletzt mit reinem Chloroform wiederholt. Aus der gereinigten Phase wurde mit 3 Volumina reinem, eiskaltem Ethanol und $^1/_5$ Volumen 3 M Natriumacetat genomische DNA präzipitiert und in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen, in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet, in dest. H_2O resuspendiert und anschließend gekühlt gelagert.

2.2.2.1.4 Extinktionsmessung

Zur Messung des DNA-Gehaltes wurden den Proben Aliquots entnommen, 1:10 verdünnt und im Spektral-Photometer auf ihre optische Dichte (OD) bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Aus dem Quotient OD260/OD280 berechnet sich die Reinheit der DNA (Referenzwert 1,7-2,0), die Konzentration ergibt sich aus dem Wert:

$$\text{conc} = \text{OD260} \cdot \frac{50\ \mu\text{g} \cdot \textit{Verdünnungsfaktor}}{1000\ \mu\text{l}}$$

Messungen der DNA-Proben aus beiden Extraktionsmethoden gaben qualitativ gleichwertige Ergebnisse mit Reinheitsquotienten zwischen 1,7 und 2,0.

2.2.2.2 X-Chromosom-Methylierung-Analysen

2.2.2.2.1 Southern-Hybridisierung mit M27ß

Restriktionsverdau

Für jede zu untersuchende DNA-Probe wurden drei Restriktionsansätze mit verschiedenen Enzym-Konstellationen zusammengesetzt:

1. Nur Pst I: Nachweis, ob die Patientin für den zu untersuchenden Genlokus überhaupt heterozygot und somit informativ ist (Schnittstelle für Pst I: CTGCA$^{\vee}$G)
2. Pst I und Msp I: Referenzverdau für Ansatz 3. Msp I schneidet wie Hpa II die Sequenz C$^{\vee}$CGG), allerdings sowohl methylierte (C$^{\vee}$mCGG) als auch nichtmethylierte Sequenzen.
3. Pst I und Hpa II: Hpa II schneidet wie Msp I, allerdings nur an unmethylierten Sequenzen.

Für jeden Restriktionsansatz wurden 10 µg DNA, 50 Units vom jeweiligen Restriktionsenzym (Pst I, Msp I und Hpa II alle von Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) und One-phor-all *Plus* buffer® von Pharmacia (1/10 des Gesamtvolumens) verwendet (Endkonzentration: 10 mM Tris-Acetat, pH7,5; 10 mM Magnesiumacetat; 50 mM Kaliumacetat).
Nach mindestens 4 h Inkubation in 37°C wurden die Reaktionsansätze mit $^1/_{20}$ Vol. 0,25 M NaEDTA und $^1/_{10}$ Vol. 3 M Na-Acetat durchmischt und anschließend eine Ethanolpräzipitation - wie bereits in Kap. 2.2.2.1.3 beschrieben - durchgeführt.
Für die anschließende Gel-Elektrophorese wurden die verdauten DNA-Proben in 25 µl dest. H_2O resuspendiert, 10 min im Wasserbad bei 65°C homogenisiert und mit jeweils 5 µl 2-Farben-Ladepuffer (5% Bromophenolblau, 5% Xylencyanol, 30% Glycerol in H_2O) versetzt.

Gel-Elektrophorese

Die Elektrophorese zur Auftrennung der Restriktionsfragmente wurde mit 0,8%igen Agarose-Gelen in 1xTBE über eine Laufstrecke von 25 cm durchgeführt [Agarose (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit zusätzlich 0,5µg Ethidium-Bromid pro ml Agarose-Gel]. Die mit Ladepuffer vermischten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese unter einer Spannung von 40 Volt über circa 60 Stunden durchgeführt. Zum Größenvergleich lief in einer Spur ein DNA-Molekulargewichtsmarker mit (λ-Phagen-DNA, mit HinD III geschnitten, *DNA molecular weight marker II*, Boehringer Mannheim, Deutschland). Die

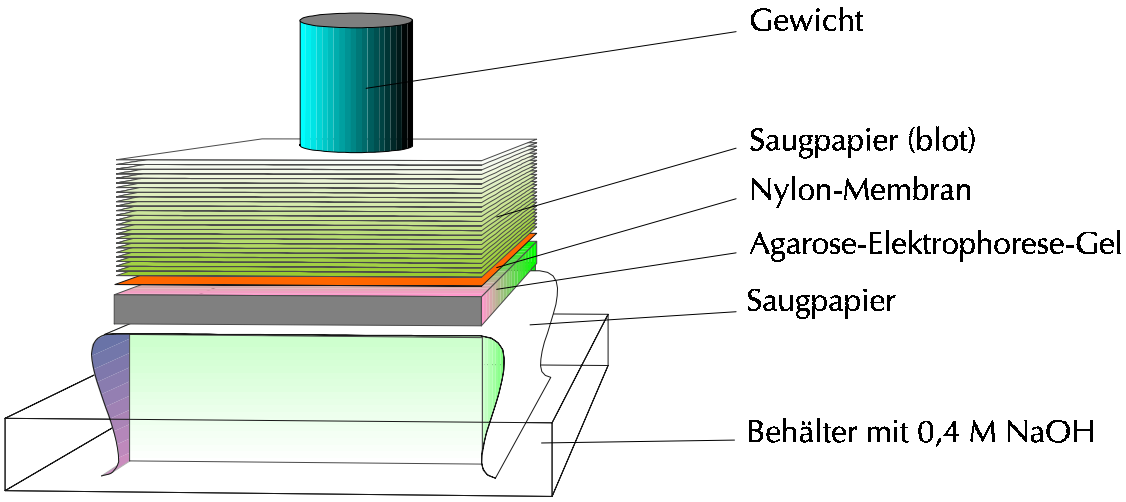


Abbildung 2.2-4: **Southern blotting**:
Aus einem Bassin saugt Blot-Papier die Transfer-Lösung, in diesem Fall 0,4 M NaOH, durch Kapillarkräfte nach oben, die Transferlösung migriert vertikal nach oben durch das Agarose-Gel und zieht die denaturierten DNA-Stränge mit. Diese bleiben in der auf dem Gel liegenden Nylon-Membran haften. In einem weiteren Schritt wird die DNA durch Backen der Membran im Vakuum-Ofen bei 80°C an der Membran-Oberfläche fixiert.

homogene Trennung der DNA-Fragmente kann unter UV-Durchleuchtung (λ = 256 nm) kontrolliert werden, da das Ethidiumbromid die DNA im Agarose-Gel fluoreszieren läßt.

Southern blot

Um zu verhindern, daß DNA-Restriktionsfragmente, die größer als 10.000 Basenpaare sind, beim Southern-blot-Transfer im Gel zurückbleiben, wurde dieses zur weiteren Fragmentierung der DNA-Stücke 15 min in 0,25 molarer Salzsäure eingeweicht, zweimal in entionisiertem Wasser gewaschen und zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge 15 min in 1,5 molare Kochsalzlösung / 0,5 molare Natronlauge gelegt. Der Saugpapier-Transfer („Southern blot“) der DNA vom Gel auf eine ungeladene Nylon-Membran (Qiabrane®) wurde mit 0,4 M NaOH über ca. 4 h durchgeführt (siehe Abbildung 2.2-4).
Nach dem Transfer wurde die Nylon-Membran in 2 × SSC kurz gewaschen, anschließend an der Raumluft getrocknet, die DNA auf der Membran durch Backen im Vakuumofen bei 80°C fixiert. Das Gel wurde anschließend zur Kontrolle erneut mit Ethidium-Bromid eingefärbt und unter UV-Licht auf erfolgreichen Transfer kontrolliert.

Hybridisierung mit der Gensonde M27ß

Bei der Gensonde M27ß handelte es sich um ein 2,3 kB großes EcoRI-Fragment aus einem DNA-Klon des Genlokus X cen p.11.22; die Sonde wurde uns freundlicherweise von Dres. FRASER, BOYD und CRAIG (Oxford, GB) zur Verfügung gestellt.

Pro Southern-blot-Membran wurden 15 - 30 ng Sonden-DNA mit Hilfe des „Rapid hybridization system / Multiprime®“ (Amersham International, GB), das zur DNA-Synthese das „Klenov“-Enzym verwendet, mit dem Radioisotop α-^{32}P-dCTP (entsprechend einer Aktivität von 50 µCi = 1,85 x 10^6 Bq) markiert.

Die Southern-blot-Membran wurde derweil mit wenigen Millilitern des vorgefertigen Hybridisierungspuffers (aus dem „Rapid-hybridization“-Kit von Amersham) in Folie eingeschweißt und mindestens 15 min lang in 65°C vorhybridisiert.

Nach der Synthetisierung der mit ^{32}P-dCTP markierten Sonden-DNA wurde zur Vermeidung hoher Hintergrundaktivität das nicht-inkorporierte ^{32}P-dCTP durch Zentrifugierung in Sephadex®-Säulen (Boehringer Mannheim) abgesondert. Anschließend wurde die spezifische Aktivität der Sonde (Cerenkov-Counts) im Szintillationszähler gemessen. Die radioaktiv markierte Sonde wurde nach Aufkochen im Wasserbad (zur Trennung der DNA-Stränge) dann der Hybridisierungslösung beigefügt, die aufgetrennten Plastikbeutel wieder zugeschweißt und die Filtermembran im Hybridisierungsofen erneut bei 65°C für weitere 2 h inkubiert. In dieser Phase lagern sich die Sonden-DNA-Einzelstränge spezifisch an die für sie komplementäre Basensequenz in der genomischen DNA an, d.h. an den Restriktionsfragmenten, die diese Sequenz enthalten.

Nach der Hybridisierung wurden die Filter den Beuteln entnommen und in absteigenden Konzentrationen von 2 x bis 0,7 x SSC (1 x SSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M NaCitrat, pH 7,0) bei 65°C gewaschen, um nicht spezifisch gebundene Sonden-DNA-Einzelstränge zu entfernen, um die Hintergrund-Aktivität so gering wie möglich zu halten. Vor der Autoradiographie sollten die Filter mit nicht mehr als 20 Bq/cm^2 strahlen.

In Belichtungsbehältern mit intensivierenden Innenbeschichtungen (DuPont Cronex III; DuPont Biotechnology, Bad Homberg, Deutschland) wurden Kodak X-Omat-S-Filme (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) mit den Filtern über einen Zeitraum zwischen 15 h und 10 Tagen exponiert. Die Behälter wurden dabei in -70°C aufbewahrt. Auf den Filmen konnte das Bandenmuster entsprechend der Abbildung 2.2-2 visuell gelesen und interpretiert werden.

2.2.2.2.2 PCR am Androgenrezeptor-Gen (HUMARA)

Das in dieser Arbeit verwendete PCR-Protokoll entstand in Anlehnung an die Methode von ALLEN *et al.*, 1992, mit dem Unterschied, daß keine radioaktiven Isotope verwendet und die PCR-Produkte während der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nicht denaturiert werden. Die Vorteile sind eine einfachere Handhabung sowie die Vermeidung von artifiziellen Schatten-Banden (siehe Kapitel 2.2.1.1.3).

Optimierung der PCR-Bedingungen

Für die Amplifikation von DNA-Sequenzen durch die Polymerase-Kettenreaktion gibt es trotz Verwendung ein und desselben Enzyms, der Taq-Polymerase, keine einheitlichen Reaktionsbedingungen, dies ist im wesentlichen auf den Anteil der Pyrimidin-Basen im zu amplifizierenden Genbereich zurückzuführen: je mehr Cytidin und Thymidin vorhanden ist, desto unspezifischer kann die Reaktion ablaufen - es entstehen zusätzliche Banden.
Auch andere Faktoren können die Spezifität einer PCR beeinflussen, unter anderem:

- die $MgCl_2$-Konzentration im Reaktionsgemisch
- die Annealing-Temperatur (bei der sich die Primer an die für sie komplementäre Sequenz der zu amplifizierenden DNA anlagern)
- die Anwesenheit von Detergenzien und Cosolventen wie DMSO, Glycerol, Formamid etc.

Zunächst wurden in zahlreichen Serienversuchen mit verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen und verschieden Annealing-Temperaturen die optimalsten Bedingungen für eine spezifische Amplifikation ermittelt. In einer zweiten Serienversuchsreihe wurden verschiedene Detergenzien und Cosolventen (DMSO, Glycerol, Formamid, Tween 20, NP-40, Triton X100) sowie Kombinationen daraus getestet, wobei sich DMSO als einziger geeigneter Zusatz erwies.

HpaII-Verdau

Von jeder Granulozyten- oder Lymphozyten-DNA-Probe wurden zwei Aliquots mit je 2 µg DNA entnommen und Restriktionsansätzen zu je 5 µl beigegeben (darin $^1/_{10}$ Volumen L-Buffer, Boehringer Mannheim, Endkonzentration: 10 mM TrisHCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithioerythitol, pH 7,5). Der eine Ansatz enthielt 10 Units des Restriktionsenzym HpaII (Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg), der andere blieb ohne Enzym. Beide Ansätze wurden über Nacht bei

37°C inkubiert, am nächsten Morgen für 10 min auf 95°C erhitzt, um HpaII zu inaktivieren und anschließend auf +4°C abgekühlt und aufgehoben.

Polymerase-Kettenreaktion

Für die PCR wurden die beiden Primer-Sequenzen verwendet, die ALLEN *et al.,* 1992, beschrieben hatten:

der 3'-seitige Primer AR_1: 5'-G CTG TGA AGG TTG CTG TTC CTC AT-3'
der 5'-seitige Primer AR_2: 5'-TC CAG AAT CTG TTC CAG AGC GTG C-3'

Beide Oligonukleotide wurden von der Sektion Polymere der Universität Ulm mit einem Gene Assembler (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) hergestellt.

Für 50 µl PCR-Ansatz wurde der gesamte Hpa-II-Restriktionsverdau (5µl) verwendet. Die weiteren Zutaten waren:

- Primer AR_1 und AR_2 mit einer Endkonzentration von je 1 µM
- 2,5 U *AmpliTaq*®-DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA),
- $^1/_{10}$ Vol. PCR-Puffer (Stock-Lösung: 100 mM TrisHCl, 500 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$)
- Nukleotid-Gemisch A:T:G:C im Verhältnis 1:1:1:1 (Endkonzentration je 500 µM)
- 8% DMSO
- doppelt destilliertes, sterilisiertes H_2O zum Auffüllen auf 50 µl.

Das Pipettieren erfolgte unter strenger Kühlung auf Eis. Alle Ansätze wurden im Eppendorf-Gefäß mit 1-2 Tropfen Mineralöl überschichtet, um Verdunstung und Kondensation am Gefäßdeckel zu vermeiden. Nach Denaturierung der DNA in Einzelstränge für 3 min bei 95°C wurden 35 Zyklen im PCR-Thermocycler TRIO-Thermoblock® (Biometra, Göttingen) durchgeführt, die folgende 3 Schritte wiederholten:

1. Denaturieren 1 min bei 95°C
2. Annealing 1 min bei 65°C
3. DNA-Synthese 1 min bei 72°C
   (mit einer Verlängerung von +2 s pro Zyklus)

Die letzte Synthese-Phase wurde über 10 min durchgeführt, die Ansätze dann auf +4°C heruntergekühlt und (ggf. bei längerer Lagerung in -20°C) aufbewahrt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die elektrophoretische Trennung der beiden Allele wurde ein 12,5%iges Polyacrylamid-Gel (Acrylamid : Bisacrylamid ≅ 29 : 1, Roth, Karlsruhe) in einer

Vertikal-Elektrophorese-Apparatur (MultiGel Long®, Biometra, Göppingen; Gelmaße H × B: 12 × 11 cm^2) gegossen. Eine der beiden Glasplatten wurde zuvor mit GelBond® PAG-Film (FMC/Biozym Diagnostik) beschichtet, um das spätere Ablösen des fragilen Gels zu erleichtern. Die Polymerisierung des Acrylamids erfolgte unter Beifügung von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED (Roth, Karlsruhe) über eine Zeit von mindestens 2 h.
Nach Einspannen der Glasplatten mit dem Gel in die Vertikal-Elektrophorese-Kammer und Auftragen der mit Ladepuffer vermischten PCR-Proben in die ausgesparten Geltaschen wurde die PAG-Elektrophorese mit konstanten 12 mA (bei 170-360V) unter 0,6 x TBE als Medium über einen Zeitraum von 2,5 bis 3 h ausgeführt. Zur Vermeidung einer Überhitzung wurde die Elektrophorese im Kühlraum bei +4°C durchgeführt. Als Fragmentgrößenreferenz lief ein Sizemarker (SM VI, Boehringer Mannheim) mit.

Silberfärbung von PAA-Gelen

Das an der GelBond®-Folie haftende Gel wurde nach der Elektrophorese in einer flachen Glasschale einer Silberfärbemethode zur Sichtbarmachung der PCR-Banden unterzogen (Modifikation nach SANGUINETTI *et al.,* 1994): Nach Schwenken in 10% Ethanol, 0,5% Essigsäure für 2 x 3 min, anschließend in 0,2 %iger wässriger Silbernitrat-Lösung für 10 min, wurde das Gel in frisch angesetzte Entwickler-Lösung (1,6%ige NaOH, 0,2%Formaldehyd) gelegt, nach ca. 15 min wurden die Banden sichtbar. Bei ausreichender Intesität der Banden-Zeichnung wurde der Vorgang mit 0,75%iger wäßriger Na_2CO_3-Lösung zum Stoppen gebracht. Das Bandenmuster wurde mit Polaroid-Fotos dokumentiert, anschließend in Klarsichtfolie einwickeln und konserviert. Das Gel konnte anschließend oder später für eine Densitometrie eingescannt werden.

Densitometrie

Die Densitometrie zur semiquantitativen Berechnung der X-Chromosom-Methylierungsverteilung wurde mit dem ImageMaster® DTS Plus (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Dazu wurden die PAA-Gele selbst aufgelegt und eingescannt. Das relative Verhältnis der optischen Dichte (OD) der Banden zueinander wurde durch die mitgelieferte Software des ImageMasters errechnet.

2.2.2.2.3 PCR am Phosphoglyceratkinase-Gen (PGK)

Die in unserem Labor angewandte Methode für X-Chromosom-Methylierungsanalysen am PGK-Genlokus lehnt sich an das von VAN KAMP entwickelte *„nested-PCR"*-Protokoll an (siehe Kap. 2.2.1.1.1) und verwendet auch die dort beschriebenen Oligonukleotide als Primer (VAN KAMP *et al.,* 1992). Die Optimierung der Methode und zahlreiche Untersuchungen wurden von der Diplom-Biologin Bettina Wagner durchgeführt.
Die Optimierung der PCR erfolgte auf ähnliche Weise wie bei der HUMARA-PCR (siehe Kap. 2.2.2.2.2). Das Besondere gegenüber anderen PCR-Verfahren wie beispielsweise dem für HUMARA ist, daß das PCR-Produkt der ersten Amplifikation durch eine zweite PCR mit Primern, die an dem Amplifikat spezifisch anlagern, sozusagen „geboostert" wird. Dadurch können noch geringere DNA-Mengen hochspezifisch amplifiziert und nachweisbar gemacht werden.

HpaII-Verdau

Von jeder Granulozyten- oder Lymphozyten-DNA-Probe wurden zwei Aliquots mit je 100 ng DNA entnommen und Restriktionsansätzen zu je 5 µl beigegeben (darin $^1/_{10}$ Volumen L-Buffer, Boehringer Mannheim, Endkonzentration: 10 mM TrisHCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithioerythitol, pH 7,5). Der eine Ansatz enthielt 20 Units des Restriktionsenzym HpaII (Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg), der andere blieb ohne Enzym. Beide Ansätze wurden mindestens 5 h bei 37°C inkubiert, für 10 min auf 95°C erhitzt, um HpaII zu inaktivieren und anschließend auf +4°C abgekühlt und aufgehoben.

Polymerase-Kettenreaktion

Für die PCR wurden die äußeren und inneren beiden Primer-Sequenzen verwendet, die VAN KAMP *et al.,* 1992, beschrieben hatten:

Für die erste PCR die äußeren Primer:
- der 5'-seitige Primer O5': 5'-GTG TGG GCC CTGTTC CTG CC-3'
- der 3'-seitige Primer O3': 5'-TAT CCT TTT GTG CAG GAA CC-3'

und für die „Booster"-PCR die inneren Primer:
- der 5'-seitige Primer A_1: 5'-TGT TCC GCA TTC TGC AAG CC-3'
- der 3'-seitige Primer B_3: 3'-TGT GAG ATG TGG GCC GTT TC-3'

Alle Oligonukleotide wurden von der Sektion Polymere der Abteilung Chemie der Universität Ulm mit einem Gene Assembler (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) hergestellt.

Im 50 µl PCR-Ansatz wurden folgende Endkonzentrationen hergestellt:

- Primer O5' und O3' mit einer Endkonzentration von je 5 pmol/l
- 1 U *AmpliTaq*®-DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA),
- 10 mmol/l TrisHCl (pH 8,8), 50 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l $MgCl_2$
- Nukleotid-Gemisch A:T:G:C im Verhältnis 1:1:1:1 (Endkonzentration je 200 µmol/l)
- 0,1% Triton X100
- 0,01% Gelatine
- doppelt destilliertes, sterilisiertes H_2O zum Auffüllen auf 50 µl.

Das Pipettieren erfolgte unter strenger Kühlung auf Eis. Alle Ansätze wurden im Eppendorf-Gefäß mit 1-2 Tropfen Mineralöl überschichtet, um Verdunstung und Kondensation am Gefäßdeckel zu vermeiden. Nach Denaturierung der DNA in Einzelstränge für 3 min bei 95°C wurden 15 Zyklen im PCR-Thermocycler TRIO-Thermoblock® (Biometra, Göttingen) durchgeführt, die folgende 3 Schritte wiederholten:

1. Denaturieren 45 s bei 96°C
2. Annealing 45 s bei 55°C
3. DNA-Synthese 45 s bei 72°C
   (mit einer Verlängerung von +2 s pro Zyklus)

Die letzte Synthese-Phase wurde über 1,5 min durchgeführt, die Ansätze dann auf +4°C heruntergekühlt und (ggf. bei längerer Lagerung in -20°C) aufbewahrt.
Die zweite PCR wurde mit 5 µl aus dem amplifizierten Reaktionsansatz der ersten PCR duchgeführt. Die Endkonzentrationen der Primer A_1 und B_3 betrugen je 50 pmol/l, die sonstigen Zusätze erfolgten wie bei der ersten PCR. Es wurden 40 Zyklen (45 s bei 95°C; 1min bei 62°C und 1 min bei 72°C) durchgeführt.

BstXI-Verdau

Ein Aliquot von 10 µl wurde dem Reaktionsprodukt der zweiten PCR entnommen und mit 20 U BstXI über 5 h in 55°C inkubiert. Der Verdau fand unter folgenden Endkonzentrationen statt:

- 10 mmol/l NaCl, 5 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l $MgCl_2$
- 0,1 mmol/l Dithiothreitol (pH 7,9 bei 25°C)

Gel-Elektrophorese

Die Elektrophorese zur Auftrennung der Restriktionsfragmente wurde mit 1,5%igen Agarose-Gelen (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in 1xTBE über eine Laufstrecke von 5-6 cm durchgeführt (Horizontal-Gelelektrophorese-System

Horizon11x14®, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland). Die mit Ladepuffer vermischten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese unter einer Spannung von 130 Volt über circa 1 h durchgeführt. Zum Größenvergleich lief in einer Spalte ein DNA-Molekulargewichtsmarker mit (φX174-Phagen-DNA, mit Hae III geschnitten; Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland). Nach Anfärbung des Gels in einer Ethidium-Bromid-Lösung können die PCR-Produkte unter UV-Durchleuchtung (λ = 256 nm) inspiziert und photographiert werden.

2.2.2.3 Durchflußzytometrie zur Analyse des GPI-Anker-Defektes

Wie in Kap. 2.2.1.2 beschrieben, kann der GPI-Defekt auf peripheren Blutzellen durch Immunfluoreszenz-Durchflußzytometrie mit Antikörpern nachgewiesen werden, die gegen GPI-verankerte Oberflächen-Antigene gerichtet sind. Die für die jeweiligen Zellreihen relevanten Antikörper sind der Tabelle 2.2-2 zu entnehmen.

2.2.2.3.1 Aufbereitung der Leukozyten

Für die Leukozyten-Analyse wurden 200 µl EDTA-Blut mit 200µl PBS (darin 0,1%(Gew./Vol.) BSA und 5 Vol.% Pferdeserum) suspendiert und in 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 50 µl des jeweiligen monoklonalen Antikörpers bzw. eines irrelevanten Kontrollantikörpers für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS/BSA-Lösung Resuspension des Pellets in 200 µl PBS/BSA und Inkubation mit FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper (Verdünnung 1:60, Dako) für erneute 20 min bei Raumtemperatur, anschließend wieder Waschen mit PBS/BSA. Anschließend wurden die Erythrozyten im Zellpellet durch Suspension in 1ml Immuno-Lysis Working Solution® (Coulter, Hialeah, Fl, USA) lysiert, die Lyse nach 2 min durch Zugabe einer Fixierlösung beendet. Dann erneutes Waschen und Resuspension in 500 µl PBS/BSA mit 2% Paraformaldehyd.

2.2.2.3.2 Aufbereitung der Erythrozyten und Retikulozyten

Für die Erythrozyten-/Retikulozyten-Analyse wurde 2 µl EDTA-Blut in 200 µl PBS/BSA/Pferdeserum aufgenommen und unter gleichen Bedingungen wie die Leukozten mit monoklonalen Antikörpern und Kontroll-Antikörpern inkubiert. Die Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper sind aber nicht mit FITC, sondern mit Phycoerythrin (PE) konjugiert. Statt der Lysebehandlung schließt sich bei

diesem Ansatz eine Resuspension des Pellets in 2 ml PBS/BSA und eine Inkubation mit Thiazolorange (Retic-COUNT®, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei Raumtemperatur über 30 min in der Dunkelheit an.

2.2.2.3.3 Durchflußzytometrie mit dem FACScan

Die Immunfluoreszenz-Durchflußzytometrie wurde mit einem FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt und mit der Software LYSIS II ausgewertet. Aus dem Leukozyten-Ansatz wurden die Lymphozyten-, Monocyten- und Granulozyten-Populationen auf Grund ihres spezifischen Vorwärts- und Seitwärts-Streulichtes („forward and right angle light scatter“) identifiziert und eingegrenzt. Retikulozyten wurden aufgrund ihrer Thiazolorange-Anfärbung identifiziert.
Für die Analyse der Leukozyten war ein Minimum von 10^3 Zellen erforderlich, für Erythrozten und Retikulozyten 10^5 Zellen.
Dargestellt wurde in den Histogrammen (Fluoreszenzintensität als logarithmischer Parameter der Abszisse, gemessene Zellzahl als Parameter der Ordinate) die Referenz mit den irrelevanten Kontrollantikörpern als leere Hüllkurve und die Population mit spezifischen Antikörpern gegen GPI-verankerte Oberflächen-Proteine als schwarze Fläche. Fehlt bei einer untersuchten Population das nachzuweisende GPI-verankerte Oberflächenprotein, so stellt sich diese im Bereich der Referenzkurve dar.

Tabelle 2.2-2: Angewandte kommerzielle Antikörper bei der Immunfluoreszenz-Zytometrie

Antigen	Bezeichnung	kommerzieller Antikörper	Expression auf periph. Blutzellen			
			Erys	Gran	Monos	Lymph
CD 14	LPS-BP-Rezeptor	My4 (Coulter, Krefeld, BRD)		○	●	
CD 16	Fcγ-RIIIb-Rezeptor	anti-Leu-11b (Becton Dickinson, Heidelb., BRD)		●		
CD 48	Blast-1	IOL-48 (Immunotech, Hamburg,BRD)		○	●	●
CD 52	Campath-1 Antigen	Campath-1 (Wellcome, Beckenham, GB)		○	○	●
CD 55	Decay accelerating factor	Bric-110 (Serotec, Wiesbaden, BRD)	●	●	●	○
CD 58	LFA-3	IOL-58 (Immunotech, Hamburg,BRD)	●	○	○	○
CD 59	MIRL	MEM-43 (Serotec, Wiesbaden, BRD)	●	○	○	●
CD 66b	CGM6-Genprodukt	ION-2 (Immunotech, Hamburg,BRD)		●		

Abkürzungen:

DAF decay accelerating factor
MIRL Membran-Inhibitor der reaktiven Lyse

● wird vom Zelltyp exprimiert / Anwendung in der FACS-Analyse
○ wird vom Zelltypexprimiert / keine Anwendung in der FACS-Analyse

3 Ergebnisse

3.1 Sensitivität der Methoden

Die Mengen an DNA, die für den M27ß-Hybridisierungsassay einerseits und für die PGK- und HUMARA-PCR andererseits benötigt wurden, unterschieden sich erheblich: Waren für ein Southern-Assay 30 µg genomische DNA manchmal noch nicht ausreichend, kamen die PCR-Methoden mit einem Zehntel der Menge und weniger aus, dies ist bei leukopenischen AA-Patienten, aus deren peripherem Blut oft nur wenig Zellen gewonnen werden konnten, ein nicht zu vernachlässigender Aspekt.

Als Sensitivität der Methode wird bei X-Chromosom-Methylierung-Assays der Grenzbereich definiert, in dem trotz leichter Kontamination einer klonalen Zellpopulation mit polyklonalen Zellen eine deutliche Imbalance der beiden Allele zu zeigen ist (mindestens 80 : 20 oder 20 : 80). Dieses sei per definitionem ein *imbalanciertes* Muster.

Die Sensitivität wurde aufgrund des erheblichen methodischen Aufwands und der Interpretationsprobleme beim M27ß-Assay nur bei den PCR-Assays für HUMARA und PGK geprüft. Für HUMARA wurde von 10 männlichen gesunden Probanden nach den beschriebenen Methoden venöses Vollblut entnommen, die mononukleären Zellen isoliert und die DNA extrahiert. Die DNA der beiden Männer, deren HUMARA-PCR-Produkt sich längenmäßig in der PAGE am meisten unterschieden, wurde in einer Titrationsreihe von 0:100 bis 100:0 miteinander vermischt. Diese DNA-Mischungen wurden nach dem beschriebenen HUMARA-PCR-Protokoll amplifiziert, die Allele in einer PAGE separiert und sichtbar gemacht (siehe Abbildung 3.1-1).

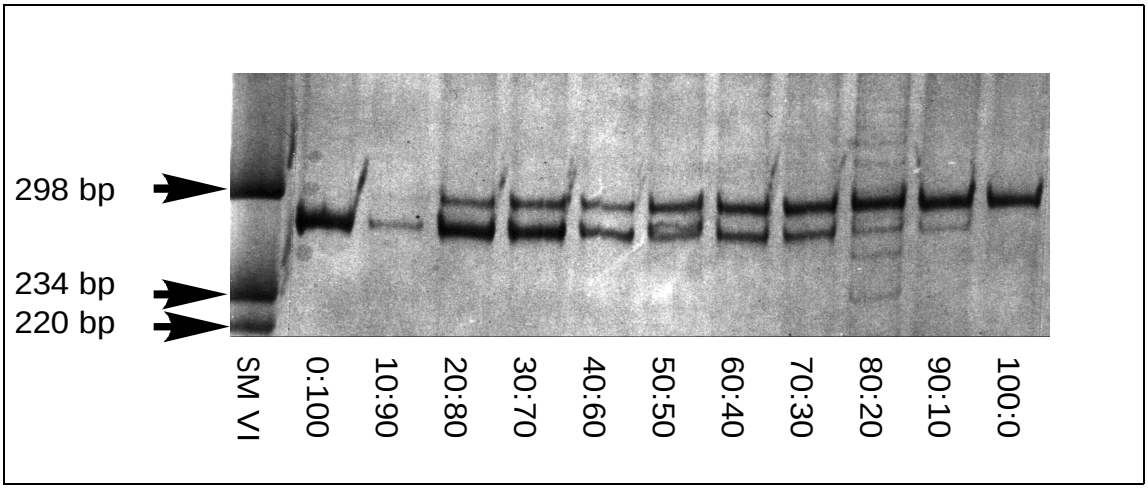


Abbildung 3.1-1: **Sensitivitätsversuch zu HUMARA mit DNA-Titrationsreihe:**
Die Verhältniszahlen zeigen den Mengenanteil beider Allele, die von zwei verschiedenen männlichen Probanden stammen. *(Legende: SM VI – Sizemarker VI (Boehringer, Mannheim, Deutschland), Fragmentgrößenreferenz; bp – Basenpaare.)*

Tabelle 3.1-1: Korrelation des Allel-Mischungsverhältnis titrierter, PCR-amplifizierter DNA zur Densitrometrie (bezieht sich auf die DNA-Titrationsreihe in Abbildung 3.1-1).

Allel-Mix	Peak OD	Trace OD x mm	Fläche OD x mm^2
0:100	1,5 : 98,5	**0,4 : 99,6**	1,3 : 98,7
10:90	5,6 : 94,4	5,3 : 94,7	**11,6 : 88,4**
20:80	33,7 : 66,3	**22,6 : 77,4**	16,5 : 83,5
30:70	38,0 : 62,0	**31,7 : 68,3**	41,2 : 58,8
40:60	**39,1 : 60,9**	36,7 : 63,3	34,0 : 66,0
50:50	60,7 : 39,3	**51,1 : 48,9**	51,3 : 48,7
60:40	57,0 : 43,0	**57,2 : 42,8**	63,5 : 36,5
70:30	62,5 : 37,5	61,1 : 38,9	**69,5 : 30,5**
80:20	67,6 : 32,4	**78,8 : 21,2**	85,8 : 14,2
90:10	70,8 : 29,2	**86,9 : 13,1**	93,4 : 6,6
100:0	98,4 : 1,6	**99,5 : 0,5**	98,7 : 1,3

Anmerkung: Alle Angaben in Prozent (%). Die gemessenen Werte entstammen einer Densitrometrie der in Abbildung 3.1-1 gezeigten Sensitivitätsversuches. Die grau unterlegten Felder zeigen die Berechnungsmethode, die dem DNA-Mischungsverhältnis am nächsten kommt. Die Berechnungsmethode, die die Optische Dichte (OD) entlang der Spaltenstrecke (*Trace*) mißt (OD x mm), zeigt die meisten Übereinstimmungen.

Die Densitometrie dieser Banden mit dem ImageMaster ergab quantitativ gut übereinstimmende Werte der optischen Dichte (OD) zum Titrationsverhältnis der DNA. Allerdings spielte es eine Rolle, auf welche Weise die Software die relative Dichte errechnete: die Messung der maximalen OD in der Bande, die OD multipliziert mit dem Durchmesser der Bande oder die OD multipliziert mit der Fläche der Bande. Die zweite der drei Berechnungsarten gab in der Regel die naheliegensten Ergebnisse (siehe Tabelle 3.1-1).

Für die Sensitivitätsmessung bei der PGK-PCR wurde nach zwei männlichen Probanden gesucht, wovon der eine die BstXI-Schnittstelle im PGK-Locus besitzt und der andere nicht. Die aus peripherem Blut isolierten Lymphozyten beider Probanden wurden gegeneinander in 10%- bzw. 5%-Schritten titriert. Aus diesen Zellmischungen wurde die DNA nach den beschriebenen Verfahren isoliert, mit Hpa II vorverdaut, mit dem beschriebenen nested-PCR-Verfahren amplifiziert, schließlich mit BstXI verdaut und in der Elektrophorese sichtbar gemacht. Die Densitometrie ergab folgende Raten:

Zell-Titer (in%)	20	30	40	45	50	55	60	70	80	90
Densitometrie (in %)	13,5	18,9	24,3	31	35,8	47,7	48,5	56,5	65,5	87,5

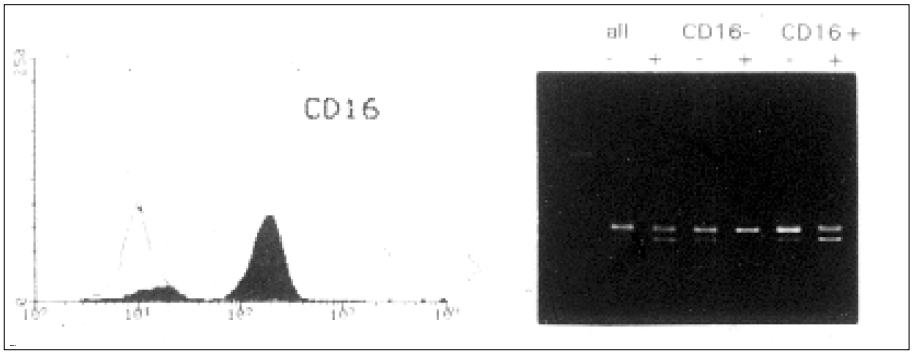
Der Unterschied in der Sensitivität beider Methoden liegt vor allem daran, daß bei HUMARA isolierte DNA gegeneinander titriert wurde, bei PGK hingegen die Zellen. Die letztere Methode entspricht zwar eher den Versuchsbedingungen, ist aber aufgrund der nicht vorherseh- und kontrollierbaren Beeinflussung der DNA-Konzentrationen durch die Extraktionsmethode wesentlich ungenauer.

Zur Bestimmung der Sensitivität der PGK-PCR wurde daher am Beispiel zweier Patientinnen mit „PNH-Phänotyp“ eine Analyse der Leukozytenfraktionen *vor* und *nach* Separation in GPI-intakte und GPI-defiziente Zellen durchgeführt, um festzustellen, ob der klonale Befund dieser durchflußzytometrisch bestimmten Subpopulationen mit dem des PGK-PCR-Assays übereinstimmt. Dafür wurden Granulozyten mit dem monoklonalen Antikörper gegen CD16, die Lymphozyten hinsichtlich CD48 (wie in Kapitel 2.2.2.2.3 beschrieben) mit dem FACScan separiert. $CD16^+$ und $CD16^-$- bzw. $CD48^+$- und $CD48^-$-Zellpopulationen wurden separat mit der PGK-PCR auf ihr Methylierungsmuster hin untersucht. Die Abbildung demonstriert in den gezeigten Beispielen bei den Patientinnen Nr. 26 und 10 gute Übereinstimmungen der beiden Assays: Die GPI-intakte Zellpopulation erweist sich im Methylierungsassay polyklonal, die GPI-defiziente Population als monoklonal. Diese Übereinstimmung war bei der Untersuchung von unsepariertem Ausgangsmaterial nicht nachzuweisen (siehe Kap. 3.5.3)

A Patient Nr. 26

CD16-Expression

X-Methylierungsanalyse bei durchfluß-zytometrisch sortierten Zellpopulationen auf Basis der CD16-Expression



B Patient Nr. 10

CD48-Expression

X-Methylierungsanalyse bei durchfluß-zytometrisch sortierten Zellpopulationen auf Basis der CD48-Expression

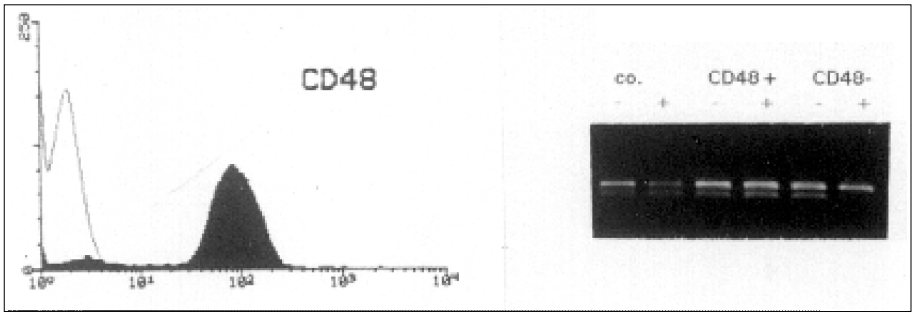


Abbildung 3.1-2: **X-Methylierungsanalysen von durchflußzytometrisch separierten GPI-intakten und GPI-defizienten Granulozyten- und Lymphozyten-Populationen:**
(A) Bei Patientin Nr. 26 wurden Granulozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen CD16 fluoreszenzmarkiert und im FACScan separiert. Die CD16-negative Fraktion entspricht der GPI-defizienten Population, die sich in der PGK-PCR (rechts) erwartungsgemäß klonal zeigt (imbalanciertes Muster).
(B) Entsprechende Vorgehensweise und Ergebnisse mit Lymphozyten der Patientin Nr. 10, die mit monoklonalen Antikörpern gegen CD48 fluoreszenzmarkiert wurden.

3.2 Validität der X-Chromosom-Methylierungsanalysen in Normal- und Positiv-Kontrollen

3.2.1 Normalpersonen

Von 15 gesunden Probandinnen wurde venöses Vollblut entnommen, die Granulozyten und Lymphozyten - wie beschrieben - isoliert und daraus DNA extrahiert. 9 Proben wurden für HUMARA gescreent, davon waren 7 (77,8%) heterozygot, d.h. informativ, von diesen 7 zeigten 6 (85,7%) wie erwartet ein balanciertes Muster, eine hingegen ein imbalanciertes. Mit M27ß wurden 7 Probandinnen untersucht, 6 davon waren heterozygot (85,7%), allerdings zeigte nur eine ein interpretierbares Ergebnis nach HpaII-Verdau; dieses war imbalanciert. In unserem Labor wurden außerdem 60 gesunde Probandinnen mit dem PGK-PCR-Assay gescreent, von denen 25 informativ waren (41,6%). Von diesen wiederum zeigten 21 das erwartete balancierte Muster (84,0%), 4 waren imbalanciert.
Lediglich eine Normalperson war für HUMARA und PGK gleichermaßen informativ, beide Assays zeigten übereinstimmend ein balanciertes Muster.

3.2.2 Patienten mit malignen Erkrankungen der Hämatopoese

11 Patientinnen mit nachgewiesenermaßen klonalen hämatologischen Erkrankungen (8 mit Chronischer Lymphatischer Leukämie, 3 mit Chronischer Myeloischer Leukämie) wurden mit HUMARA und PGK untersucht, 6 waren für HUMARA informativ (54,5%), von denen 5 das erwartete imbalancierte Muster zeigten, 1 war nicht interpretierbar. Für PGK zeigten sich 4 Patientinnen informativ, alle 4 wiesen imbalancierte Muster auf. 2 dieser Patientinnen waren sowohl für HUMARA als auch für PGK heterozygot und zeigten in beiden Assays übereinstimmende Muster.

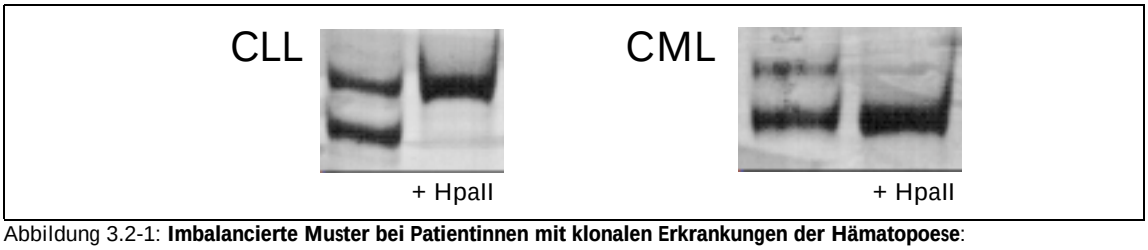


Abbildung 3.2-1: **Imbalancierte Muster bei Patientinnen mit klonalen Erkrankungen der Hämatopoese**:
Untersucht wurden Lymphozyten-Populationen zweier Patientinnen mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) einerseits und Chronischer Myeloischer Leukämie (CML) andererseits mit dem HUMARA-Assay. Die beiden Banden der jeweils ersten Spur zeigen, daß die untersuchte Person heterozygot, also informativ für den Assay ist, die zweite Spur (*+HpaII*) demonstriert durch das komplette Verschwinden einer der beiden Banden, daß allen Zellen der untersuchten Lymphozyten-Population das gleiche X-Chromosom inaktiviert ist, daraus kann in diesem Fall geschlußfolgert werden, daß die Population klonal ist.
Für die Patientin mit CLL war in der PGK-PCR ein übereinstimmendes Ergebnis erhältlich, bei den CML-Patientinnen war keine informativ für PGK. Daß die Lymphozyten-Population bei der CLL-Patientin klonal ist, wurde bereits vorher mittels Durchflußzytometrie mit monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD5, CD19, HLA-DR und CDw52 (Campath-1) festgestellt.

3.3 Informativität der Klonalitätsassays

3.3.1 Heterozygotie-Rate für PGK, HUMARA und M27 ß

Zählt man Patienten und Probanden zusammen, wurden insgesamt 78 Frauen mit mindestens einem der drei Klonalitätsassays untersucht. Für HUMARA waren 28 von 40 untersuchten Frauen heterozygot (70,0%). Bei M27 ß waren 13 von 19 untersuchten Frauen informativ (68,4%). Im Vergleich dazu waren bei PGK-Assays von 65 Frauen 28 heterozygot (43,1%) (siehe Tabelle 3.3-1).

3.3.2 Informativität bei AA/PNH-Patienten

Insgesamt wurden 37 Patientinnen mit Aplastischer Anämie oder einer kombinierten AA/PNH-Erkrankung untersucht. Von diesen 37 Patientinnen waren 26 (70,3%) für mindestens einer der beiden Klonalitätsassays heterozygot und somit informativ (siehe auch Abbildung 3.4-1). Im einzelnen:

- Im HUMARA-Assay waren 14 von 19 untersuchten Patienten (73,7%) heterozygot, 3 weitere waren nicht sicher beurteilbar.
- Im M27ß-Southern-Assay waren 7 von 12 untersuchten Patienten (58,3%) informativ, 3 weitere Patienten waren nicht eindeutig beurteilbar.
- Für PGK waren 19 von 36 untersuchten Patienten heterozygot (52,8%), ein weiterer Patient war nicht sicher beurteilbar.

Tabelle 3.3-1: Heterozygotie-Rate (Informativität) der X-Inaktivierungsassays

Assay	**HUMARA**	**M27 ß**	**PGK**
Gesunde Kontrollen	9	7	17
heterozygot	7/9 (77,8%)	6/7 (85,7%)	5/17 (29,4%)
davon balanciert	6/7 (85,7%)		5/5 (100%)
imbalanciert	1/7 (14,3%)		
nicht beurteilbar		6/6	
Positiv-Kontrollen	12		12
heterozygot	7/12 (58,3%)		4/12 (33,3%)
davon imbalanciert	6/7 (85,7%)		4/4 (100%)
nicht beurteilbar	1		
AA-Patienten	19	12	36
heterozygot	14/19 (73,7%)	7/12 (58,3%)	19/36 (52,8%)
insgesamt	**40**	**19**	**65**
heterozygot	**28/40 (70%)**	**13/19 (68,4%)**	**28/65 (43,1%)**

3.4 Kongruenz der HUMARA- und M27ß-Ergebnisse zu PGK-Ergebnissen

Wie vorhin erwähnt, gab es bei den Normalpersonen nur eine, die für HUMARA und PGK gleichzeitig informativ war, das Ergebnis war kongruent. Bei den Positiv-Kontrollen stimmten von 2 untersuchten beide Ergebnisse überein. Von den 26 AA-Patienten, die in dieser Studie auswertbare Bandenmuster brachten, waren 11 Patienten für zwei Assays informativ, ein Patient für alle drei.

Bei 9 von 9 Patienten zeigten sich im HUMARA- und im PGK-Assay gleiche Ergebnisse (ID-Nr. 3, 8, 10, 11, 12, 14, 19, 23 und 26). M27ß zeigte mit PGK bei beiden von 2 Patienten, die für beide Loci heterozygot waren, übereinstimmende Ergebnisse (ID-Nr. 15 und 26). HUMARA stimmte mit M27ß in 4 von 4 Patienten überein (ID-Nr. 7, 16, 20 und 26).

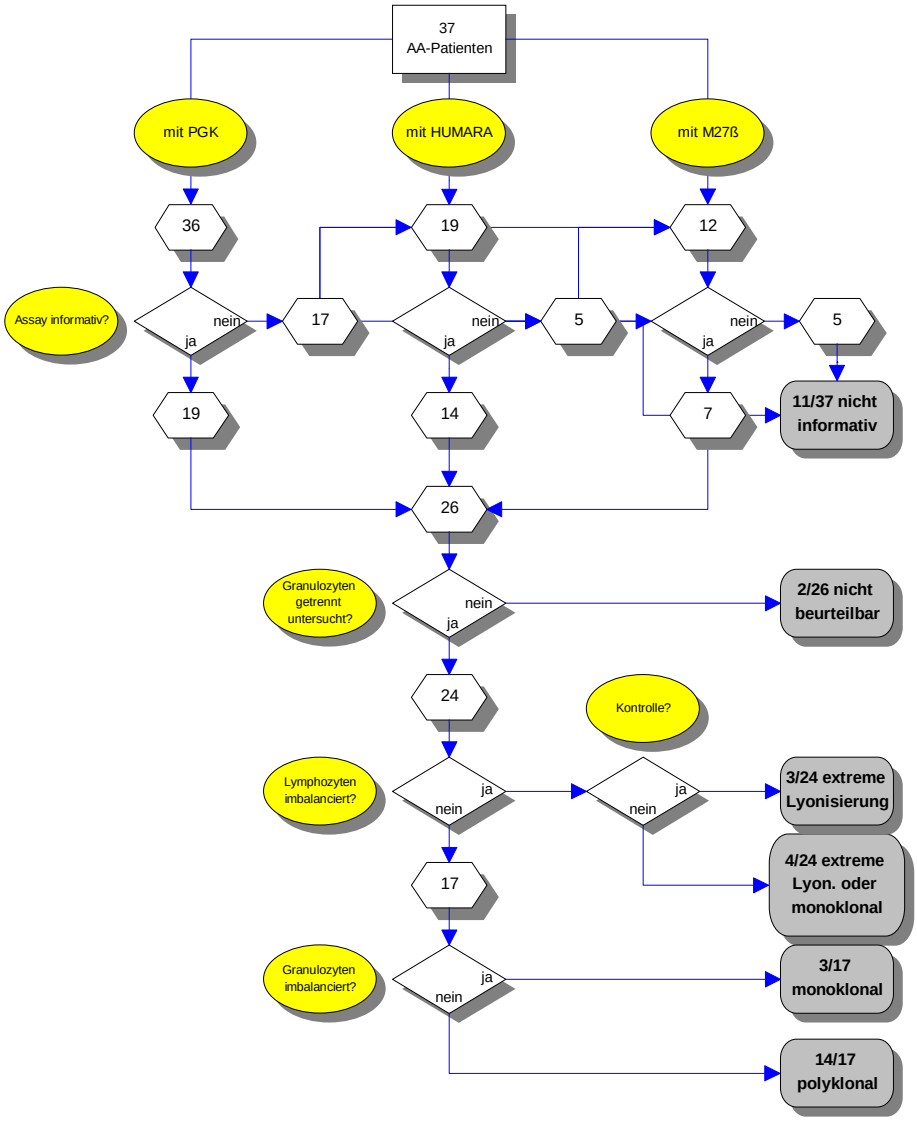


Abbildung 3.4-1: **Auswertungsalgorithmus bei 37 untersuchten AA-Patientinnen**

3.5 Ergebnisse der Klonalitätsassays bei AA-Patienten

3.5.1 Interpretationsvorgaben der X-Chromosom-Methylierungsmuster

Von einem imbalancierten Muster wurde per definitionem dann gesprochen, wenn beim HUMARA-Assay die Densitometrie bei einem der beiden Banden weniger als 20 % des Gesamtwertes beider Banden ergab, bei PGK wurde visuell geschätzt. Bei M27ß wurde grundsätzlich von einem balancierten Muster gesprochen, wenn vier von der Intensität her ungefähr gleich starke Banden nach HpaII-Verdau nachzuweisen waren. Bei zwei Banden wurde dann von einem imbalancierten Muster gesprochen, wenn nach HpaII-Verdau eine der beiden Banden entsprechend der Höhe der MspI-Referenzbande weitergewandert war (siehe Abbildung 2.2-2, Seite 19). War keine der beiden Banden weitergewandert, mußte man von einem insuffizienten HpaII-Verdau ausgehen. Lag hingegen eines der beiden Allele zu 50 % geschnitten vor, das andere aber komplett ungeschnitten (Drei-Banden-Muster), interpretierten wir dies nach der Auslegung von FEY *et al.* (1994) als imbalanciert, da in diesem Fall die aktivitätsassoziierte Methylierung nicht der Zufallsverteilung unterliegt, sondern *nur* väterliches oder *nur* mütterliches Allel betrifft, ungeachtet der partiellen Methylierung auch des inaktiven Allels, was laut HENDRIKS *et al.* (1991) bei bis zu 60% vorkommen kann.

3.5.2 Ergebnisübersicht

Die Ergebnisse sind im Überblick der Tabelle 3.5-1 zu entnehmen. Von den 26 Patientinnen (7 mit AA, 16 mit SAA und 3 mit VSAA) zeigten 14 Patientinnen im Verlauf balancierte X-Methylierungsmuster sowohl in der Granulozyten- wie auch in der Lymphozyten-Fraktion, zeigten somit eine polyklonale Hämatopoese (14/26 = 53,8 %).

10 Patientinnen zeigten in der Granulozyten-Fraktion imbalancierte Methylierungsmuster. Bei 6 dieser Patienten waren auch die Lymphozyten imbalanciert, Kontrolluntersuchungen von Knochenmarkstroma (siehe Kap. 2.2.2.1.2) in 3 Fällen zeigte das gleiche Muster, so daß hier von extremer Lyonisierung ausgegangen werden muß. Die anderen 3 Patientinnen mit imbalancierten Mustern bei Granulozyten und Lymphozyten *ohne zusätzliche Kontrolle* wurden wegen fehlender Hinweise auf Klonalität ebenfalls dieser Gruppe zugerechnet. Eine Patientin mit imbalancierten Mustern in beiden Linien, aber einer PNH konnte dieser Gruppe nicht zweifelsfrei zugeordnet werden.

Tabelle 3.5-1: Ergebnisse der X-Methylierung-Assays bei 26 AA-Patienten im Überblick

ID-Nr.	Diagnose	Klonale Kompl. *(Mon. n. ED)*	Zeitraum ED → Assay	Polymorphismus HUM	M27ß	PGK	Gran	Muster Lymph	KontrolI	Interpretation	GPI-FACS
1	SAA		4 Mon.	-		+	I	B			●
			8 Mon.				I	B			
			10 Mon.				I	B		monoklonal	
2	SAA		66 Mon.			+	B	B		polyklonal	●
3	VSAA		4 Mon.	+		+	B	B		polyklonal	●
4	AA		78 Mon.			+	B	B		polyklonal	●
5	SAA		34 Mon.		-	+	I	I			●
			42 Mon.				I	I	*KM:* I	*Extr. Lyon.*	
6	AA		58 Mon.	+		-	*n.b.*	B		*n.b.*	●
7	SAA		87 Mon.	+	+	-	I	I		mk / *extr. Lyon.* ?	
8	SAA		35 Mon.	+	-	+	B	*n.d.*			
			40 Mon.				B	B			
		PNH (51)	51 Mon.				B	B		polyklonal	●
9	SAA		95 Mon.			+	I	I	*MS:* I	*Extr. Lyon.*	
10	SAA	PNH (53)	97 Mon.	+		+	B	B			●
			107 Mon.				B	B			●
			111 Mon.				B	B			
			113 Mon.				B	*n.b.*		polyklonal	●
11	AA		20 Mon.	+		+	B	B			
			21 Mon.				B	B			●
			27 Mon.				B	B		polyklonal	
12	SAA		12 Mon.	+		+	*n.d.*	B	*KM:* I		
			43 Mon.				I	B			
		AML (64)	50 Mon.				I	I		monoklonal	●
13	SAA		22 Mon.	-	+	-	I	I	*KM:* I		
			28 Mon.				I	I		monoklonal oder	
			34 Mon.				I	I		*extr. Lyon.*	●
14	SAA		46 Mon.	+	-	+	B	B			
			52 Mon.				B	B			
		AML (120)	66 Mon.				B	B		polyklonal	●
15	SAA		5 Mon.	-	+	+	B	B			
			9 Mon.				B	B			
			15 Mon.				B	B			●
			21 Mon.				B	B			
			27 Mon.				B	B		polyklonal	
16	AA	PNH (216)	240 Mon.	+	+	-	I	B		monoklonal	●
17	AA		24 Mon.	*n.b.*	*n.b.*	+	B	B			●
		AML (28)	34 Mon.				B	B		polyklonal	
18	AA	PNH (104)	124 Mon.	*n.b.*	+	-	I	I			
			127 Mon.				I	I			
			136 Mon.				I	*n.d*		monoklonal oder	●
			139 Mon.				*n.b.*	I		*extr. Lyon.*	
19	SAA		< 1 Mon.	+	-	+	I	I	*KM:* I		●
			5 Mon.				I	I			●
		PNH (36 Mon.)	8 Mon.				I	I		*Extr. Lyon.*	●
20	AA		69 Mon.	+	+	-	B	B			
		PNH (88 Mon.)	88 Mon.				B?	B?		polyklonal	●
21	SAA		< 1 Mon.			+	I	I		mk /*extr. Lyon.* ?	●
22	VSAA		< 1 Mon.	-		+	*n.d.*	B		*n.b.*	
23	VSAA		< 1 Mon.	+		+	B	B		polyklonal	●
24	SAA		11 Mon.			+	B	B		polyklonal	●
25	SAA		32 Mon.	+			B	B			
			40 Mon.				B	B		polyklonal	●
26	SAA		60 Mon.	+	+	+	B	B			
		PNH (72)	72 Mon.				B	B			●
			74 Mon.				B	B		polyklonal	●

B - balanciert I – imbalanciert n.d. - nicht durchgeführt n.b. - nicht beurteilbar

KM: Knochenmark +: informativ -: nicht informativ extr. Lyon.: Extreme Lyonisierung

MS: Mundschleimhaut

GPI-FACS: Fluoreszenz-Durchflußzytometrie auf der Basis Glycan-Phosphatidylinositol-verankerter Oberflächen-Antigene

3 Patientinnen zeigten ein imbalanciertes Muster in der Granulozyten-Fraktion und ein balanciertes in der Lymphozyten-Fraktion. Diese Ergebnisse wurden als monoklonale Hämatopoese angesehen, da eine extreme Lyonisierung hier ausgeschlossen werden kann.

3.5.3 Vergleich von Ergebnissen der Klonalitätsassays und durchflußzytometrisch ermittelter GPI-Defizienz

Um festzustellen, ob das polyklonale bzw. monoklonale Erscheinungsbild in der X-Methylierungsanalyse eine Korrelation zum Vorhandensein eines GPI-defizienten Klones bei einem AA-Patienten aufweist (siehe auch Kap. 1.3.2 und Kap. 1.3.3), wurden parallel zu den in dieser Arbeit beschriebenen X-Methylierungsanalysen aus den Blutproben Aliquots abgezweigt, die mittels Durchfluß-Zytometrie auf die Expression der GPI-verankerter Oberflächen-Antigene CD 16, CD 66b und CD 55 auf Granulozyten sowie CD 48 und CD 52 auf Lymphozyten untersucht wurden.
Anhand von Messungen an 20 gesunden Kontrollen wurden Grenzwerte für Zellpopulationen ermittelt, die nicht die oben genannten Antigene exprimierten. Die Grenzwerte wurden aus der Summe von Mittelwert + 2 Standardabweichungen definiert. Als GPI-defiziente Zellpopulation wurde eine gemessene Leukozyten-Fraktion bezeichnet, die diesen Grenzwert überschritt (Tabelle 3.5-2).

Tabelle 3.5-2: Grenzwerte für GPI-defiziente Zellpopulationen (SCHREZENMEIER *et al.,* 1995).

Zelltyp	Granulozyten			Lymphozyten	
Antigen	CD 16	CD66b	CD55	CD48	CD52
Grenzwert	4,4%	2,5%	4,9%	4,1%	13,4%

Betrachtet man in der nebenstehenden Tabelle 3.6-1 aber einzelne Befunde, bei der große Populationen mit GPI-Defizienz innerhalb der Granulozyten- oder Lymphozyten-Fraktion zu sehen sind, fällt auf, daß diese Befunde keinen Niederschlag im X-Inaktivierungsmuster finden. Dieses sei exemplarisch an zwei Beispielen diskutiert:

- Pat. ID.Nr. 10 zeigt in der Granulozyten-Fraktion einen Anteil von 54,4% GPI-defizienten Zellen. Dies müßte im Klonalitätsassay eine deutliche Verschiebung des Allel-Musters (bei einer idealisierten Lyonisation von 50:50 eine Verschiebung nach HpaII-Verdau auf circa 75:25) erwarten lassen. In der Densitometrie der Gel-Elektrophorese-Banden nach HUMARA-PCR jedoch zeigt sich in der Spur ohne HpaII-Verdau ein „natives“ Verteilungsmuster von 51,7% zu 48,3%. In der Spur mit HpaII-Verdau hat sich das Verhältnis nur unwesentlich auf 55,4% zu 44,6% verschoben, ein balancierter Befund, der nicht vermuten läßt, daß 54,4% der Population einem Klon angehören könnte.
- Der umgekehrte Fall zeigt sich bei Pat. ID.Nr. 16: Der X-Inaktivierungsassay weist sowohl bei HUMARA wie bei M27 ß in der Granulozyten-Fraktion ein eindeutig imbalanciertes Muster auf, während die Lymphozyten ein balanciertes Muster zeigen. Im FACS hingegen zeigt sich kein Hinweis auf das Vorliegen einer GPI-defizienten Granulozyten-Population.

Mögliche Gründe für die fehlende Übereinstimmung werden im Kapitel 4.3.1.1 noch diskutiert.

3.5.4 Interpretation der Ergebnisse im X-Methylierungsassay

14 der 26 informativen Patienten zeigten balancierte X-Inaktivitätsmuster bei Granulozyten und Lymphozyten, ihre Hämatopoese war somit polyklonal. Bei 2 Patienten waren nur Lymphozyten untersucht worden, nicht aber die Granulozyten, so daß hier keine Aussage über die Myelopoese gemacht werden kann.
10 Patienten (ID.Nr. 1, 5, 7, 9, 12, 13, 16, 18, 19 und 21) zeigten ein imbalanciertes Muster, davon muß aber bei 3 Patienten aufgrund der imbalancierten Ergebnisse nicht nur in Granulozyten und Lymphozyten, sondern auch in Kontrollen mit Knochenmark-Stroma (siehe Kap. 2.2.2.1.2) von **extremer Lyonisierung** ausgegangen werden (ID.Nr. 5, 9 und 19).

Tabelle 3.5-3: Vergleich von X-Methylierungsmustern und GPI-Defizienz einer Zellpopulation

Pat.ID	Zeitpunkt	Granulozyten		Lymphozyten		Klonale Folgeerkr.
	nach ED	GPI-Defizienz	X-Methylier.	GPI-Defizienz	X-Methylier.	(Monate n. ED)
1	4 Mon.	6,5 %	I	1,8 %	B	
2	66 Mon.	1,2 %	B	0,1 %	B	
3	4 Mon.	25,1 %	B	0,5 %	B	
4	78 Mon.	3,4 %	B	0,4 %	B	
5	32/34 Mon.	1,2 %	I	0,8 %	I	
6	58 Mon.	0,6 %	n.b	0,5 %	B	
8	51 Mon.	15,8 %	B	11,4	B	PNH (51 Mon.)
10	97 Mon. 107 Mon. 113 Mon.	54,4 % 69,1 % 89,5 %	B B B	7,6 % 1,2 % 2,4 %	B B *n.b.*	PNH (53 Mon)
11	21 Mon.	23,2 %	B	0,5 %	B	
12	50 Mon.	3,7 %	I	3,3 %	I	AML (64 Mon.)
13	34 Mon.	5,5 %	I	0,6 %	I	
14	66 Mon	0,7 %	B	1,0 %	B	AML (120 Mon.)
15	15 Mon.	0,4 %	B	0,7 %	B	
16	240 Mon.	0,0 %	I	1,0 %	B	PNH (216 Mon.)
17	24 Mon.	12,6 %	B	4,0 %	B	AML (28 Mon)
18	136 Mon.	57,5 %	I	2,9 %	*n.d.*	PNH (84 Mon.)
19	< 1 Mon. 5 Mon. 8 Mon.	8,9 % 14,7 % 11,3 %	I I I	0,9 % 1,1 % 1,8 %	I I I	
20	88 Mon.	35,5 %	B?	9,8 %	B?	PNH (88 Mon.)
21	< 1 Mon.	3,2 %	I	0,8 %	I	
23	< 1 Mon.	10,8 %	B	6,8 %	B	
24	11 Mon.	1,4 %	B	0,3 %	B	
25	40 Mon.	2,0 %	B	0,0 %	B	
26	72 Mon. 74 Mon.	15,0 % 13,6 %	B B	1,7 % 1,2 %	B B	PNH (72 Mon.)

I: imbalanciertes Muster B: balanciertes Muster

Die anderen Fälle im Detail dargestellt:

Pat. ID.Nr. 1: SAA, partielle Remission nach IS mit ALG und CsA. **Keine sekundäre klonale Erkrankung** in einem Nachbeobachtungszeitraum über 10 Monate. Granulozyten zeigen in Verlaufskontrollen 4, 8 und 10 Monate nach Erstdiagnose im PGK-PCR-Assay ein imbalanciertes Muster, Lymphozyten hingegen ein balanciertes. Die FACS-Analyse 4 Monate nach ED zeigt lediglich 6,5% GPI-defiziente Granulozyten und 1,8% defiziente Lymphozyten.
Interpretation: **Klonale Population in der Granulopoese**.

Pat. ID.Nr. 7: SAA, partielle Remission nach IS mit CsA und IL-6, **kein Hinweis auf klonale Sekundärerkrankung**. Myeloische und lymphatische Zellen zeigen ein imbalanciertes Muster im HUMARA-Assay (Abbildung 3.5-1), eine Verlaufskontrolle mit M27 ß drei Monate später ist nicht eindeutig beurteilbar (3-Bandenmuster). Eine Kontrolle mit Referenzgewebe wie Fibroblasten liegt nicht vor. Ein FACS zum späteren Zeitpunkt zeigt keinen Hinweis auf eine GPI-defiziente Population.
Interpretation: Fraglich klonal, extreme Lyonisierung nicht ausgeschlossen.

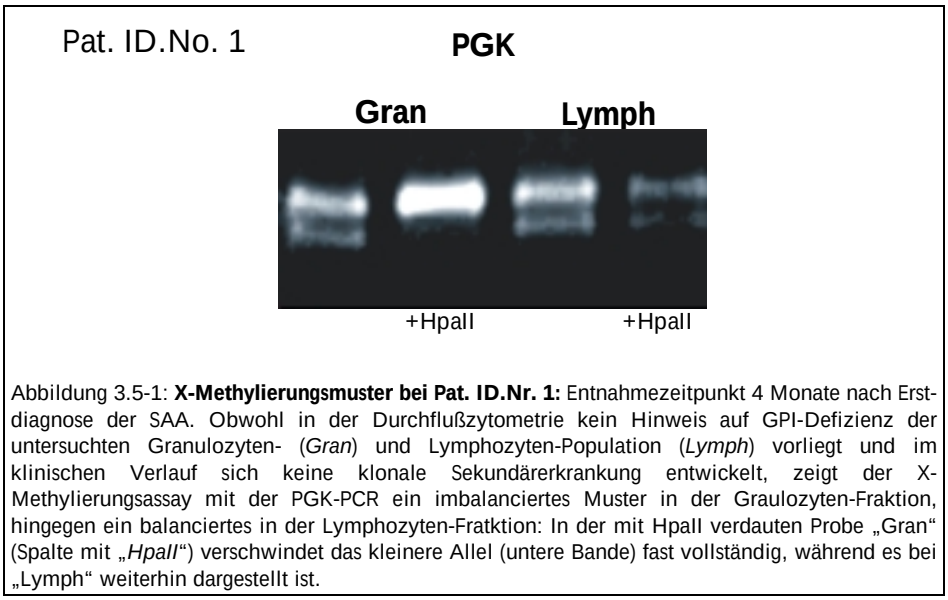


Abbildung 3.5-1: **X-Methylierungsmuster bei Pat. ID.Nr. 1:** Entnahmezeitpunkt 4 Monate nach Erstdiagnose der SAA. Obwohl in der Durchflußzytometrie kein Hinweis auf GPI-Defizienz der untersuchten Granulozyten- (*Gran*) und Lymphozyten-Population (*Lymph*) vorliegt und im klinischen Verlauf sich keine klonale Sekundärerkrankung entwickelt, zeigt der X-Methylierungsassay mit der PGK-PCR ein imbalanciertes Muster in der Graulozyten-Fraktion, hingegen ein balanciertes in der Lymphozyten-Fratktion: In der mit HpaII verdauten Probe „Gran“ (Spalte mit „*HpaII*“) verschwindet das kleinere Allel (untere Bande) fast vollständig, während es bei „Lymph“ weiterhin dargestellt ist.

Pat. ID.Nr. 12: SAA, nach IS mit ALG und CsA Rezidiv, 64 Mon. nach ED Progression zur **sekundären AML**, Tod 3 Monate später. Im FACS parallel zu den Klonalitätsassays kein Hinweis auf GPI-Defizienz. Mit HUMARA imbalanciertes Muster in Granulozyten und Lymphozyten 14 Mon. vor Diagnose der AML (Abbildung 3.5-2). In vorangegangener Untersuchung mit PGK-PCR imbalanciertes Muster bei Granulozyten, Lymphozyten noch balanciert. KM-Stroma als Kontrolle zeigt 12 Mon. n. ED ein imbalanciertes Muster.

Interpretation: **Klonal** dominierte Hämatopoese, 52 Monate vor Diagnose einer sekundären AML.

Pat. ID.No. 12

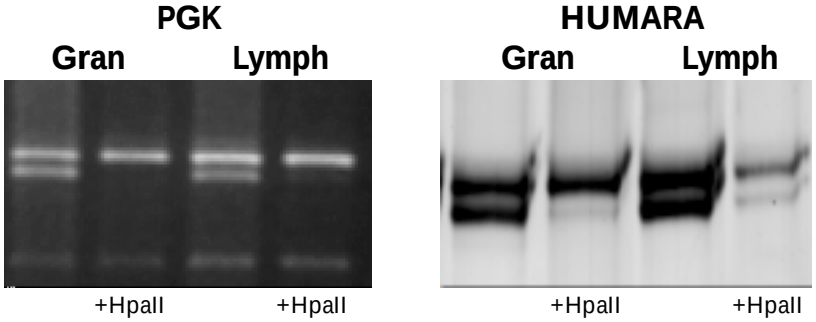


Abbildung 3.5-2: **X-Methylierungsmuster bei Pat. ID.Nr. 12** (50 Monate nach Erstdiagnose der SAA, 14 Monate vor Entwicklung einer sekundären AML). Die untersuchte DNA beider X-Inaktivierungsassays (PGK- und HUMARA-PCR) stammen vom gleichen Entnahmezeitpunkt und zeigen sowohl in der Granulozyten- wie auch in der Lymphozytenfraktion imbalancierte Methylierungsmuster.

Pat. ID.Nr. 13: SAA, komplette Remission nach IS mit ALG und CsA, **kein Hinweis auf klonale Sekundärerkrankung**, im FACS kein Hinweis auf eine GPI-defiziente Population. Granulozyten und Lymphozyten zeigen mit M27ß ein imbalanciertes Muster. Pat. ist für andere Assays nicht informativ. Eine Kontrolle mit Fibroblasten liegt nicht vor. *Interpretation:* Am ehesten **konstitutionelle extreme Lyonisierung**, klonale Hämatopoese nicht sicher ausgeschlossen.

Pat. ID.Nr. 16: AA, Diagnose einer **sekundären PNH** durch positiven Ham's-Test 216 Monate nach ED der AA. Klonalitätsassay mit HUMARA und M27 ß 24 Monate später zeigen beide für Granulozyten ein imbalanciertes, für Lymphozyten ein *balanciertes (!)* Muster. Im FACS zum gleichen Zeitpunkt kein Hinweis auf GPI-defiziente Populationen (Abbildung 3.5-3).

Interpretation: **Klonale** Myelopoese.

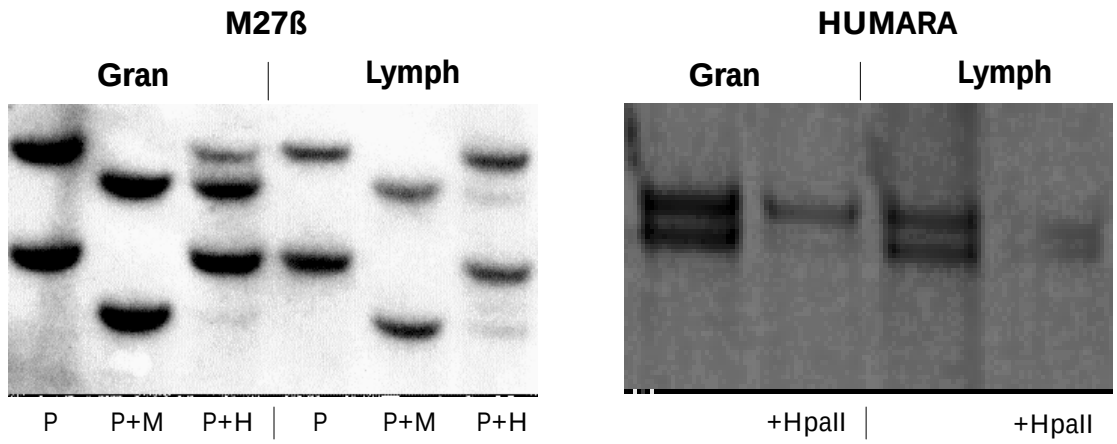


Abbildung 3.5-3: **X-Methylierungsmuster bei Pat. ID.Nr. 16:** Beide Assays untersuchen DNA der gleichen Blutprobe, entnommen 240 Monate nach ED einer AA und 24 Monate nach Diagnose einer sekundären PNH. Im M27ß-Assay zeigt die Granulozyten-Fraktion (*Gran*) ein Drei-Band-Muster im mit HpaII verdauten Aliquot, das Muster ist somit imbalanciert, der Assay mit HUMARA (rechts) zeigt ebenso ein imbalanciertes Muster. Die Lymphozyten-Fraktion zeigt in beiden Assays ein balanciertes Muster.
(*Abkürzungen: P – verdaut mit Pst I; P+M – verdaut mit Pst I und Msp I; P+H – verdaut mit Pst I und Hpa II.)*

Pat. ID.Nr. 18: AA, Diagnose einer **PNH** 104 Monate nach ED. Im FACS 136 Mon. nach ED große GPI-defiziente Population unter den Granulozyten (57,5 %), korrespondierend dazu ein imbalanciertes Muster im M27ß-Assay (Drei-Band-Muster, siehe Abbildung 3.5-4). In der Lymphozyten-Fraktion keine GPI-Defizienz, in vorangegangenen Klonalitätsuntersuchungen mit M27ß imbalanciertes Muster. Keine Kontrolle mit KM-Fibroblasten. *Interpretation:* **Klonale** Hämatopoese, extreme Lyonisierung nicht ausgeschlossen.

Pat. ID.Nr. 21: SAA. Klonalitätsassays zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, vor Beginn einer Therapie. Granulozyten und Lymphozyten zeigen imbalancierte Muster, die FACS-Analyse zeigt hingegen nur 3,2% resp.

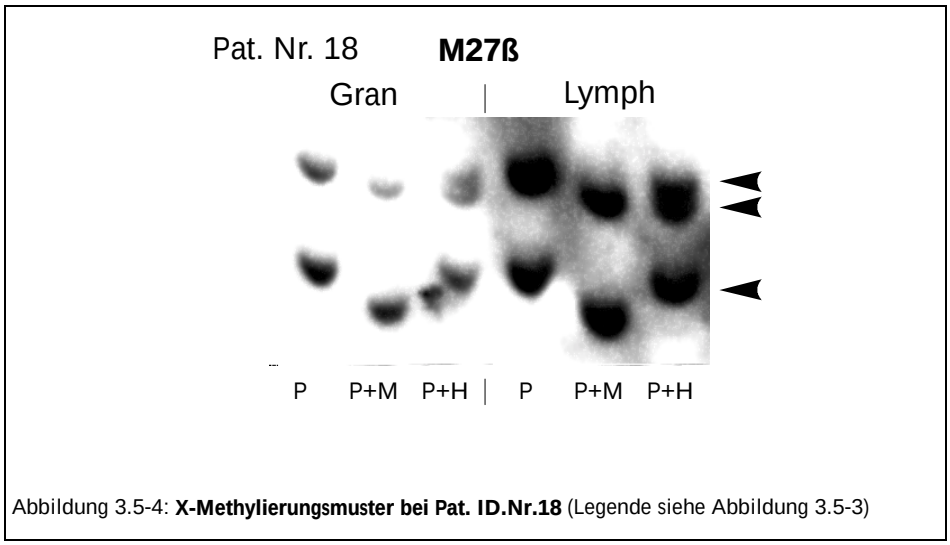


Abbildung 3.5-4: **X-Methylierungsmuster bei Pat. ID.Nr.18** (Legende siehe Abbildung 3.5-3)

0,8% GPI-defiziente Zellen. Keine Kontrollen mit Fibroblasten. *Interpretation:* Extreme Lyonisierung oder monoklonale Hämatopoese.

Unter den 14 Patienten mit polyklonalem X-Inaktivierungsmuster in der Hämopoese gab es sechs (Pat. ID.Nr. 8, 10, 14, 17, 20 und 26), die klonale Folgeerkrankungen entwickelten:

Pat. ID.Nr. 8: SAA, Entwicklung einer sekundären PNH 51 Monate nach ED. Dabei in X-Methylierungsassays mit PGK vorher und auch zum Zeitpunkt der PNH-Diagnose balancierte Muster in Granulozyten wie Lymphozyten, die FACS-Analyse zeigt 15,8 % GPI-defiziente Granulozyten und 11,4 % GPI-defiziente Lymphozyten.

Pat. ID.Nr. 10: SAA, Entwicklung einer sekundären PNH 53 Monate nach ED. Nach weiteren 54 Monaten ist das X-Inaktivitätsmuster im HUMARA-Assay noch immer balanciert, obwohl in der FACS-Analyse eine große Granulozyten-Fraktion (54,4 %) GPI-defizient ist.

Pat. ID.Nr. 14: SAA, Entwicklung einer sekundären AML 10 Jahre nach ED. Verlaufskontrollen bezüglich des X-Methylierungsmusters zum Zeitpunkt 46, 52 und 66 Monate nach ED zeigen durchgehend balancierte Muster in Granulozyten- und Lymphozytenfraktion (siehe Abbildung 3.5-5). Die FACS-Analyse 66 Monate n. ED weist 0,7% GPI-defiziente Granulozyten und 1,0% GPI-defiziente Lymphozyten auf.

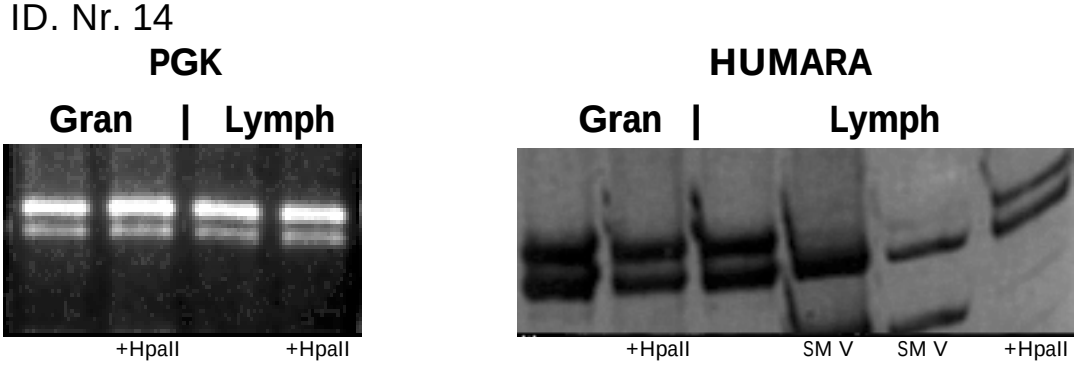


Abbildung 3.5-5: **X-Methylierungsmuster bei Pat. ID.Nr. 14:**
Entnahmezeitpunkt 52 Mon. nach ED. Beide Assays (PGK und HUMARA) zeigen balancierte Muster in der Granulozyten- („*Gran*“) und Lymphozytenfraktion („*Lymph*“). Im HUMARA-Assay befinden sich in der Lymphozyten-Fraktion zwischen dem unverdauten und dem mit HpaII vorverdauten Aliquot („*+HpaII*“) zwei Spuren mit dem Size-Marker V („SM V“; Boehringer, Mannheim, Deutschland) als Fragmentgrößenreferenz.

Pat.ID.Nr. 17: AA, Entwicklung einer sekundären AML 28 Mon. nach ED der AA, dennoch in X-Methylierungsuntersuchungen vor und nach Diagnose der AML kein imbalanciertes Muster, zeitgleich durchgeführte FACS-Analysen zeigen 12,6 % GPI-defiziente Granulozyten (Lymphozyten 4,0 %).

Pat. ID.Nr. 20: Sekundäre PNH, diagnostiziert 89 Mon. nach ED der AA. In vorangegangenen Untersuchungen mit M27 ß (69 Mon. nach ED) balancierter Befund. 1 Monat vor Diagnosestellung der PNH im FACS 35,5 % GPI-defiziente Granulozyten und 9,8% GPI-defiziente Lymphozyten. Im HUMARA-Assay zum gleichen Zeitpunkt fraglich balanciertes Muster bei beiden Zellarten.

Pat. ID.Nr. 26: SAA, Sicherung der Diagnose PNH 72 Monate nach ED der SAA. Im HUMARA-Assay 2 Mon. später balanciertes Muster sowohl bei Granulozyten wie bei Lymphozyten, der FACS zeigt allerdings 15,0 % GPI-defiziente Granulozyten und 1,7% ebensolche Lymphozyten.

4 Diskussion

Eine der Kernfragen zur Pathophysiologie der Aplastischen Anämie und ihrer Beziehung zu den klonalen Erkrankungen PNH, MDS und AML stellte JUDITH MARSH 1991 in ihrer vielzitierten Übersichtsarbeit: *„Is aplastic anaemia a pre-leukaemic disorder?“*
Zur Beantwortung dieser Frage wäre der Nachweis klonaler Hämatopoese von großer Bedeutung einerseits als Hinweis auf einen primären Stammzelldefekt, zum anderen definierte er den Beginn einer Kaskade von Ereignissen, die schlußendlich in eine Myelodysplasie oder eine Akute myeloische Leukämie münden könnten. Da die zytogenetische Analyse bei AA aufgrund der Knochenmarksaplasie und dem Mangel an Zellen in Metaphase naturgegebene Grenzen hat, sollte die X-Chromosom-Methylierungsanalyse zur Klonalitätsfrage weitere Aufschlüsse liefern, zumal pathognomonische Oberflächenmarker oder *spezifische* genomische Aberrationen als Klonalitätsmarker bei AA bis dato immer noch nicht entdeckt worden sind. Darüberhinaus steuert aber die Immunfluoreszenz-Durchflußzytometrie zum Nachweis GPI-defizienter Populationen bei AA hilfreiche Erkenntnisse bei.

Mit dieser Arbeit, deren Ergebnisse zum Teil in eine internationale Publikation einflossen (RAGHAVACHAR *et al.,* 1995), sollte geklärt werden, ob

1. es sich bei der Aplastischen Anämie um eine klonale Erkrankung der Hämatopoese handelt,
2. das Auftreten eines klonalen Erscheinungsbildes mit dem Auftreten eines GPI-defizienten Klones korreliert,
3. eine nachgewiesene klonale Hämatopoese im X-Chromosom-Inaktivierungsassay eine prognostische Bedeutung hinsichtlich des klinischen Auftretens klonaler Folgeerkrankungen (PNH, MDS oder AML) hat und
4. der Nachweis einer klonalen Hämatopoese durch das vorangegangene Therapieregime (insbesondere die Immunsuppression mit ALG/ATG mit und ohne Ciclosporin A) begünstigt wird.

Zu 1.:
Bei der Aplastischen Anämie sollte eine klonale Hämatopoese in zwei Situationen zu erwarten sein:

- Bei der Entwicklung einer klonalen Sekundärerkrankung wie PNH, MDS oder AML
- Bei einem stark reduzierten hämatopoetischen Stammzellpool.

Die vorliegenden Ergebnisse haben diese Vermutung nicht bestätigt. Sie zeigen in den X-Chromosom-Methylierungsassays ein überwiegend polyklonales Erscheinungsbild der Hämatopoese bei der Aplastischen Anämie (14 von 26 Patientinnen), dabei konnte die Entwicklung einer klonalen Sekundärerkrankung in 6 Fällen nicht mit einem Wechsel zu einem klonalen Befund in der X-Chromosom-Methylierungsanalyse nachvollzogen werden. Offen ist dabei, ob sich möglicherweise kleine klonale Populationen - die den Ausgangspunkt einer klonalen Sekundärerkrankung darstellen - der Nachweisgrenze dieser Methode entziehen.

Zu 2.:

Die Untersuchung von GPI-defizienten Leukozyten bei AA ergab, daß die Frequenz dieses an sich für die PNH pathognomonische Phänomens bei AA wesentlich höher ist, als man sie durch konventionelle Nachweismethoden der PNH (Säure-Serum-Test oder Sucrose-Hämolyse-Test) erwarten würde (10 von 23 Patientinnen = 43%), so daß man hier spekulieren kann, ob es sich zumindest bei einer Untergruppe der Aplastischen Anämie doch um eine primär klonale Erkrankung handelt, bei der sich die Größe des Klons der Nachweisgrenze der X-Chromosom-Methylierungsanalyse entzieht. Eine Korrelation zwischen der Größe GPI-defizienter Klone und Zellpopulationen mit imbalanciertem X-Inaktivierungsmuster konnte allerdings nicht festgestellt werden (siehe Kap. 4.2.3). Lediglich die Untersuchung bereits im FACS separierter GPI-defizienter Populationen erbrachte den erwarteten imbalancierten Befund.

Zu 3.:

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß ein polyklonaler Befund in der X-Chromosom-Inaktivierungsanalyse kein verläßlicher Parameter für ein gutes Outecome ist, da unter diesen immerhin 43% (6/14) eine klonale Sekundärerkrankung entwickelten, davon ein Drittel sogar eine AML. Im umgekehrten Fall erkrankten 2/3 der AA-Patientinnen mit klonalen Befunden an einer PNH bzw. AML, mangels Signifikanz ist hier aber keine sichere Aussage zu treffen.
Zusammenfassend ist eine zuverlässige Prognosestellung hinsichtlich der Entwicklung einer klonalen Sekundärerkrankung bei AA anhand der X-Chromosom-Methylierungsanalyse nicht möglich.

Zu 4.:

Von 10 AA-Patientinnen, die auf immunsuppressive Therapie (IS) mit einer kompletten Remission ansprachen (allerdings erkrankten später zwei Patientinnen an einer AML), zeigte die Hälfte in der X-Chromosom-Inaktivierungsanalyse ein polyklonales Muster, 20% ein imbalanciertes Muster in der granulozytären

Fraktion und 20% eine extreme Lyonisierung. Bei den 9 Patientinnen, die eine partielle Remission aufwiesen, betrug der Anteil polyklonaler Befunde 56% sowie der Anteil kontrolliert klonaler Befunde 11%. Unter den 4 Patientinnen, die auf IS gar nicht ansprachen, zeigte ebenfalls die Hälfte einen polyklonalen Befund in der X-Chromosom-Methylierungsanalyse.
Diese Ergebnisse geben keinen sicheren Hinweis darauf, daß die immunsuppressive Therapie mit CsA und ATG die Entwicklung einer klonalen Hämatopoese im Sinne der X-Inaktivierungsanalyse beeinflußt.

4.1 Besprechung der bisherigen Literatur

4.1.1 X-Chromosom-Inaktivierungsanalysen bei Aplastischer Anämie

Hinsichtlich X-Chromosom-Methylierungsanalysen bei AA lagen zu Beginn dieser Arbeit einige, allerdings im Ergebnis widersprüchliche Arbeiten vor (JOSTEN *et al.,* 1991; VAN KAMP *et al.,* 1991a; TSUGE *et al.,* 1993; ANAN *et al.,* 1995). Während Arbeitsgruppen um JOSTEN und TSUGE überwiegend *polyklonale* Hämatopoese bei AA befundeten (6 von 7 [86%] Patienten bei JOSTEN, 14 von 18 [78%] bei TSUGE), beobachteten die beiden anderen Autorengruppen ein überwiegend *klonales* Erscheinungsbild (13 von 18 [72%] Patienten bei VAN KAMP, 4 von 6 [66%] bei ANAN) werden.
Die erste Publikation, die Klonalität bei Aplastischer Anämie behandelte, erschien 1984 als *case report*. ABKOWITZ und Mitarbeiter stellten mittels der G-6PDH-Isoenzym-Analyse an einem zwölfjährigen farbigen Mädchen mit Panzytopenie, bei dem keine Hinweise auf eine Fanconi-Anämie, eine Myelodysplasie oder eine Leukämie bestanden, fest, daß alle peripheren Blutzellen sowie auch Progenitorzellen in Zellkulturen nur ein Isoenzym besaßen, was auf eine klonale Hämatopoese hindeutete (ABKOWITZ *et al.,* 1984).
JOSTEN *et al.* untersuchten zum Klonalitätsnachweis bei Aplastischer Anämie mittels X-Chromosom-Methylierungsanalysen 6 Patienten mit AA, 2 Patienten mit einem AA/PNH-Syndrom und 3 Patienten mit PNH, und postulierten aufgrund der Ergebnisse, daß AA eine polyklonale Erkrankung der Hämatopoese sein müsse, im Gegensatz dazu die PNH aber erwartungsgemäß eine klonale Erkrankung sei (JOSTEN *et al.,* 1991). Zeitgleich erschien in der gleichen Ausgabe von *„Blood“* eine - zu einem völlig konträren Ergebnis führende - Arbeit von VAN KAMP und Mitarbeitern, die mit vergleichbarer Methode bei 13 von 18 informativen AA-Patienten (72%) imbalancierte Muster befundeten und daraus eine klonale Hämatopoese schlußfolgerten (VAN KAMP *et al.,* 1991a).

Die Diskrepanz muß darauf zurückgeführt werden, daß die niederländische Gruppe von VAN KAMP zum einen nur in 7 der 18 untersuchten Patienten Granulozyten und Lymphozyten separat untersucht hat (3 Patienten mit balanciertem und 4 mit imbalanciertem Muster - bei diesen 4 Patienten waren sowohl Granulozyten wie auch Lymphozyten imbalanciert). Zum anderen wurden Kontrollen mit Referenzgewebe nicht durchgeführt, so daß in allen 13 Fällen eine extreme Lyonisierung nicht ausgeschlossen werden kann.

TSUGE und Ko-Autoren untersuchten in Japan 20 Mädchen mit Aplastischer Anämie im Alter zwischen 3 und 17 Jahren anhand der Methylierungsmuster von PGK, HPRT und M27ß. In nur 2 von 18 auswertbaren Fällen (11%) zeigten sich Hinweise auf monoklonale Hämatopoese, zwei weitere mit imbalanciertem Muster wurden aufgrund der Kontrollen mit Knochenmarksfibroblasten als extreme Lyonisierung angesehen (TSUGE *et al.,* 1993).

ANAN *et al.* untersuchten separierte Leukozyten von 6 AA-Patienten mittels HUMARA-PCR und stellte bei 4 Patienten (67%) mit imbalanciertem Muster in der Granulozyten-Fraktion eine klonale Hämatopoese fest, da Kontrollen mit DNA aus Mundschleimhaut in allen Fällen balancierte Muster zeigten (ANAN *et al.,* 1995).

Die bisher größte Klonalitätsstudie wurde von RAGHAVACHAR *et al.* 1995 publiziert, 30 AA-Patientinnen wurden mit PGK-PCR bzw. –Southern-blot-Hybridisierung und M27ß-Southern-blot untersucht. Wegen imbalancierten Befunden sowohl in den Leukozyten-Fraktionen als auch in Kontrollen von Knochenmarksfibroblasten mußten von 10 imbalancierten Befunden 4 als extreme Lyonisierung eingestuft werden, 2 imbalancierte Ergebnisse konnten mangels Kontrolle nicht interpretiert werden. Letztlich wurde bei 4 von 30 Patientinnen (13,3%) eine monoklonale Hämatopoese festgestellt.

Faßte man die Studien mit Ausnahme der von VAN KAMP, in der keine Kontrollen durchgeführt wurden, zusammen, käme man hinsichtlich des Auftretens einer monoklonalen Hämatopoese bei Aplastischer Anämie auf eine Inzidenz von 11 : 61 (18 %).

4.1.2 Die Hypothese der limitierten Stammzell-Reserve

Im vorangegangenen Kapitel wurde anfangs das 12-jährige G-6-PDH-heterozygote Mädchen mit Aplastischer Anämie erwähnt, bei dem Frau ABKOWITZ und Mitarbeiter innerhalb einer Nachbeobachtungszeit von 13 Jahren mit stabiler Remission unter Behandlung mit Oxymetholon kontinuierlich nur das Isoenzym G-6-PDH Typ B in hämatopoetischen Progenitorzellen nachwiesen und daraus eine klonale Hämatopoese schlußfolgerten (siehe dazu auch Kap. 2.2.1.1.1).

ABKOWITZ stellte zu dieser Beobachtung mehrere mögliche Hypothesen auf (ABKOWITZ, 1993):

1. Es handelte sich bei der Patientin nicht um Aplastische Anämie, sondern um eine Myelodysplasie, deren dysplastischer hämopoetischer Klon in den hypo- oder aplastischen Knochenmarksbiopsien bisher nicht nachweisbar war (dagegen sprechen aber der klinisch stabile Verlauf sowie der mangelnde Nachweis zytogenetischer Aberrationen, die bei MDS eher häufig anzutreffen sind)
2. Der Pool hämatopoetischer Stammzellen sei durch den initialen Krankheitsverlauf stark reduziert, die Remission werde lediglich durch ein oder wenige Stammzellklone zuwege gebracht, die alle das gleiche Isoenzym exprimieren.
3. Ein bisher unbekanntes Gen, dessen Allele mit denen des G-6-PDH-Gen auf dem X-Chromosom gekoppelt bei der Mitose auf die Tochterzelle übertragen werden (Ko-Segregation), biete der Zelle einen selektiven Vorteil (oder Nachteil). Das würde bedeuten, daß alle die Zellen, bei denen das unbekannte Allel durch X-Chromosom-Methylierung aktiviert ist, auch nur ein gleiches Isoenzym des G-6-DPH exprimieren, in diesem Falle nur Typ B. Ganz gleich, ob die Hämatopoese von wenigen oder vielen Stammzellen getragen würde, bei allen würde nur G-6-DPH Typ B exprimiert.

Die Hypothese 2 zur begrenzten Stammzell-Reserve wurde von ABKOWITZ tierexperimentell weiterverfolgt. Zunächst wurde an Mäusen die Potenz einzelner hämatopoetischer Stammzellklone ermittelt, die gesamte Hämopoese nach Knochenmarksdepletion für ein gesamtes Mäuseleben (2 Jahre) zu gewährleisten.
Um bessere Rückschlüsse auf die Dimensionen größerer Organismen ziehen zu können, wurden als Tiermodell Katzen mit einem zellulären Mosaik, einer Heterozygotie für G-6-DPH, gezüchtet (ABKOWITZ *et al.,* 1990). Eine gesunde Katze mit diesem Mosaik zeigte eine ausgewogene Verteilung beider G-6-DPH-Isoenzyme in hämopoetischen Progenitorzellen. Wurde das hämatopoetische System durch Ganzkörper-Bestrahlung komplett depletiert und wurden anschließend asservierte autologe Knochenmarksstammzellen reinfundiert, konnte sich das Verteilungsmuster der Isoenzyme im Verlauf der hämopoetischen Rekonstitution erheblich zugunsten eines Isoenzymes verschieben und auch wechseln, was vermuten ließ, daß nur wenige Stammzellen - und dies abwechselnd - zur Hämopoese beitrugen. Ähnliche Befunde wurden nach allogener Knochenmarkstransplantation beim Menschen berichtet (TURHAN *et al.,* 1989).
Allerdings wurde von GALE und Mitarbeitern die X-Chromosom-Inaktivierung bei 23 Patientinnen mit hämatologischen Erkrankungen nach chemotherapeutischer Behandlung mittels PGK- und HPRT-RFLP untersucht und festgestellt, daß sich die Inzidenz eines imbalancierten Musters in dieser Gruppe trotz therapiebedingter

Knochenmarksdepletion nicht wesentlich von der Kontrollgruppe mit gesunden Frauen unterscheidet (26% bzw. 23%) (GALE *et al.,* 1991).

Die Hypothese der limitierten Stammzellreserve bei AA wird aber von einer anderen Beobachtung wiederum unterstützt. So wurde mit der Grenzverdünnungsanalyse bei Knochenmark-Langzeitkulturen eine Methode etabliert, mit der die Anzahl der Knochenmark-Stammzellen, die noch die Potenz zur Proliferation und Differenzierung besitzen, bei Patienten mit AA quantifiziert werden kann (SCHREZENMEIER *et al.,* 1996; siehe auch Kap. 1.3.2). Auf präformiertem KM-Stroma, daß durch mononukleäre Knochenmarkszellen gesunder Spender in Mikrotiter-Platten mit Langzeitkultur-Medium generiert und anschließend bestrahlt wurde, wurden in verschiedenen Konzentrationen mononukleäre KM-Zellen von AA-Patienten inkubiert und nach 35 Tagen unter dem Phasenkontrast-Mikroskop auf das Auftreten sogenannter „Cobblestone areas“ (benannt nach ihrem pflastersteinartigen Aspekt) untersucht. Bei den Zellen, die solche Formationen bilden, sogenannte „Cobblestone area forming cells“ (CAFC), handelt es sich um pluripotente Knochenmarksstammzellen. Mit dieser Methode konnte bei gesunden Spendern eine Frequenz von durchschnittlich 84,4 CAFC pro 10^5 mononukleären KM-Zellen, bei AA-Patienten hingegen durchschnittlich nur 6,6 CAFC pro 10^5 mononukleären KM-Zellen nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, daß auch bei AA-Patienten, die sich nach immunsuppressiver Therapie in Remission befanden, die Frequenz von CAFC mit 7,6 pro 10^5 mononukleären KM-Zellen deutlich reduziert war.

Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, daß bei der Aplastischen Anämie eine Limitierung der Stammzellreserve vorliegt, die sich auch nach immunsuppressiver Therapie nicht bessert. Hinsichtlich der X-Chromosom-Inaktivierungsanalyse bedeutet das aber, daß ein imbalanciertes Erscheinungsbild nicht nur klonales Wachstum einer hinsichtlich der Proliferation außer Kontrolle geratenen Population, sondern auch eine Stammzelldepletion signalisieren kann, durch die eine Dominanz weniger, die Hämatopoese unterhaltender Stammzellen entsteht.

4.2 Besprechung der eigenen Ergebnisse

4.2.1 Monoklonale Hämatopoese

In der vorgelegten Arbeit zeigten insgesamt 10 von 26 AA-Patientinnen sowie eine gesunde Kontrollperson imbalancierte Muster in der Granulozyten-Fraktion. Allerdings war bei lediglich **3 von 26 AA-Patientinnen (11,5%)** sicher auf eine **monoklonale Hämatopoese** zu schließen, da dort die Lymphozyten balancierte Muster zeigten. Dieser Anteil läßt sich aber mit einer Meta-Analyse der bespro-

chenen Publikationen vereinbaren (18%; siehe Kap. 4.1.1). Bei 3 Patienten mußte man aufgrund der imbalancierten Muster auch in Lymphozyten- und KM-Fibroblasten-DNA von einer extremen Lyonisierung ausgehen. Bei weiteren 4 Patienten konnte mangels Kontroll-Gewebe eine extreme Lyonisierung nicht ausgeschlossen werden.

4.2.2 Korrelation der Ergebnisse des X-Methylierungsassays zum klinischen Verlauf

4.2.2.1 Klinischer Verlauf und Ansprechen auf immunsuppressive Therapie bei Patienten mit *balancierten* Mustern im X-Methylierungsassay

Wie schon im Kapitel 3.5.4 aufgeführt, traten bei sechs der 14 AA-Patientinnen mit polyklonaler Hämatopoese im Verlauf klonale Sekundärerkrankungen der Hämatopoese (PNH und AML) auf, ohne daß sich das Methylierungsmuster in Richtung Imbalance verändert hätte. In zwei Fällen entwickelte sich sogar eine AML (ID.Nr. 14, 17). Bei Pat.ID.Nr. 14 könnte dabei allerdings eine Rolle spielen, daß zwischen dem Zeitpunkt der letzten Untersuchung mit X-Methylierungsassay sowie Durchflußzytometrie und dem Zeitpunkt der Diagnose einer sekundären AML 54 Monate lagen, in denen sich möglicherweise ein klonales Bild im X-Inaktivierungsassay hätte bilden können. Unter den Patientinnen, die ohne Korrelat im X-Inaktivierungsassay eine PNH entwickelten, ist besonders auffällig Pat. ID.Nr. 10, bei der die Größe der GPI-defizienten Granulozyten-Population auf jeden Fall ein imbalanciertes X-Methylierungsmuster erwarten ließe, dieses aber eindeutig balanciert ausfällt (siehe auch 4.2.3). Diese Beobachtung läßt sich auch nicht durch eine mangelnde Sensitivität der Methode erklären.

Hinsichtlich des Ansprechens auf Immunsuppression mit ALG und CsA waren unter diesen 6 Patienten zwei Non-Responder (ID.Nr. 17, 26), zwei zeigten eine partielle Remission (ID.Nr. 8, 10) und zwei zunächst eine komplette Remission (ID.Nr. 14, 20).

Unter den 8 Patientinnen, die ein balanciertes Muster in beiden Leukozyten-Fraktionen zeigten und auch keine klonalen Sekundärerkrankungen im Nachbeobachtungszeitraum entwickelten, sprachen vier Patientinnen mit einer kompletten Remission und vier mit einer partiellen Remission auf immunsuppressive Therapie (IS) an.

4.2.2.2 Klinischer Verlauf und Ansprechen auf immunsuppressive Therapie bei Patienten mit *imbalancierten* Mustern im X-Methylierungsassay

Bei den drei Patientinnen, bei denen man sicher von einer monoklonalen Hämatopoese ausgehen kann, entwickelte sich bei einer Patientin eine sekundäre AML, obwohl sie zunächst auf IS mit einer kompletten Remission ansprach (ID.Nr. 12). Bei einer weiteren Patientin war zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits eine PNH aufgetreten (ID.Nr. 16). Sie sprach auf IS mit ALG und CsA gut an und befand sich anschließend in kompletter Remission. Die dritte Patientin (ID.Nr. 1) zeigte in dem kurzen Nachbeobachtungszeitraum von 10 Monaten keinen Hinweis auf eine klonale Sekundärerkrankung, sie befand sich nach IS in einer partiellen Remission.
Anhand dieser Beobachtungen - bei allerdings geringer Fallzahl - kann der X-Chromosom-Methylierungsanalyse kein prädiktiver Wert im Hinblick auf Therapieerfolg zugesprochen werden.

4.2.3 Vergleich der Ergebnisse des X-Methylierungsassays mit der durchflußzytometrischen Bestimmung eines PNH-Klons

Die Übersichts-Tabelle 3.5-3 auf Seite 44 zeigt auf einen Blick, daß der Nachweis und die Größe GPI-defizienter peripherer Blutzellpopulationen keinen Niederschlag im Ergebnis der X-Inaktivierungsanalysen am gleichen Zellmaterial hat:
Bei Pat.ID.Nr. 10 hätte man aufgrund des hohen Anteiles von GPI-defizienten Granulozyten (89,5%) auf jeden Fall ein imbalanciertes Muster in der X-Methylierungsanalyse erwartet, ausgehend von der Annahme, daß es sich bei den GPI-defizienten Zellen um eine klonale Population handelt. Die Ergebnisse der X-Methylierungsanalyse mit PGK und HUMARA zeigen aber im gesamten Verlauf ausschließlich balancierte Muster. Genauso verhält es sich bei den Patienten ID.Nr. 3, 11 und 20.
Die umgekehrte Situation konnte auch gezeigt werden: 5 Patienten mit imbalancierten Mustern, bei denen eine monoklonale Hämatopoese nachgewiesen oder zumindest nicht sicher ausgeschlossen ist, zeigen mit Ausnahme von Pat.ID.Nr. 18 keine GPI-defizienten Subpopulationen, die über einen Anteil von 14,7% hinausgehen (ID.Nr. 19), die Densitometrie des Bandenmusters nach HUMARA-Assay zeigt in diesem Fall aber eine Allel-Verteilung von 81%:19%, was einer Größe der klonalen Subpopulation von annähernd 60% entsprechen müßte.
Diese Beobachtung muß daran denken lassen, daß eine klonale Hämatopoese zwar durch eine GPI-defiziente Stammzelle verursacht werden *kann*, daß aber eine klonale Hämatopoese nicht zwangsläufig im Umkehrschluß einen GPI-Defekt aufweisen muß.

4.3 Methodische Fallstricke

4.3.1 Definitionsprobleme bei X-Chromosom-Inaktivierungsassays

Ungenau ist der Begriff der Klonalität aufgrund der unterschiedlichen Zellbestandteile, die den verschiedenen Klonalitätsassays als Parameter dienen. Wie in Kapitel 1.2.1 erwähnt, gibt es Assays, die die Expression bestimmter Gene anhand von Isoenzym-Verteilungen, Immunglobulin-Bestandteilen oder Oberflächenproteinen untersuchen. Demgegenüber untersucht die X-Inaktivierung-Analyse einen chromosomalen Sachverhalt, der schon in der sehr frühen Embryonalphase eines Organismus determiniert wird und mit dem Krankheitsgeschehen nicht ursächlich in Zusammenhang steht. So ist zum Beispiel denkbar, daß die Untersuchung zweier Zellpopulationen mittels eines Immunglobulin-Gen-Assays ergibt, daß es sich um zwei verschiedene Klone handelt; der X-Inaktivierung-Assay hingegen kann sie nur als einen einzigen Klon identifizieren, da er nur die gesamte Zellpopulation erfassen kann, die ontogenetisch einer Morula-Zelle entstammt, in der aber sekundär das Immunglobulin-Genrearrangement stattgefunden hat (WAINSCOAT & FEY, 1990).

Ein weiteres Problem ist das Phänomen der *extremen Lyonisierung*: Es wurde beobachtet, daß bei 3-4% gesunder, junger erwachsener Frauen eine Inaktivierung der elterlichen X-chromosomalen Allele nicht im idealen Verhältnis von ca. 50%:50%, sondern von 90%:10% oder extremer vorliegt. Dies ließe sich durchaus mit der Gauß'schen Zufallsverteilungskurve erklären. Bemerkenswert ist aber, daß der Anteil Frauen mit extremer Lyonisierung in den neutrophilen Granulozyten mit zunehmendem Alter auf 33% ansteigt (GALE *et al. ,* 1997). Extreme Lyonisierung kann aber das Vorliegen einer klonalen Zellpopulation vortäuschen. Welches Gewebe zur Prüfung des konstitutionellen Musters herangezogen werden kann, ist aber auch nicht eindeutig, da innerhalb eines Organismus das X-Inaktivierungsmuster gewebsspezifisch unterschiedlich sein kann (GALE *et al.,* 1994). Auf beide Probleme wird im folgenden eingegangen.

4.3.1.1 Fehlende Korrelation zu anderen Klonalitätsmarkern

Statistische Berechnungen an Granulozyten von weiblichen Individuen in Familien mit „*chronic granulomatous disease*" (CGD)[3] zeigten, daß die Lyonisierung, also die zufällige Inaktivierung eines der beiden X-Chromosome, in einem Embryonalstadium stattfindet, in dem sich erst 8 embryonale Vorläuferzellen gebildet haben, aus denen die Hämatopoese hervorgeht (BUESCHER *et al.,* 1985). Zum gleichen Ergebnis kamen auch GARDNER, LYON *et al.* mit einem Mäuse-

[3] CGD: Hereditäre X-chromosomal gebundene Erkrankung der neutrophilen Granulozyten mit einer Defizienz, freie Radikale für eine zytotoxische Aktivität zu entwickeln.

modell mit zwei X-chromosomal gebundenen Fellfarb-Genen (GARDNER *et al.,* 1985).
Somit ist es theoretisch zwangsläufig, daß ein Ereignis, das erst im Laufe des weiteren Lebens eines Organismus im hämatopoetischen System zu klonalem Wachstum führt, z.B. eine Mutation im Bereich eines Onkogens, nur innerhalb einer der 8 Populationen, bei denen entweder nur die väterlichen oder nur die mütterlichen X-chromosomalen Allele inaktiviert sind, auftreten kann. Alle Zellen dieses Klones müssen an sich das gleiche X-Inaktivierungsmuster besitzen. Umgekehrt muß nicht jede Zelle, die das gleiche Inaktivierungsmuster wie eine kranke Zelle hat, zu diesem Klon gehören.
Am deutlichsten wird dies durch die fehlende Korrelation zwischen den Ergebnissen der X-Methylierungsanalysen und der FACS-Analysen des GPI-Defektes demonstriert (siehe Kap. 3.5.3 und 4.2.3). Man muß davon ausgehen, daß es sich bei einer GPI-defizienten Granulozyten- oder Lymphozyten-Population um einen Klon handelt, da die Defizienz eindeutig auf Mutationen im PIG-A-Gen zurückzuführen ist (MIYATA *et al.,* 1994, YAMADA *et al.,* 1995, ROSSE & WARE, 1995). Diese Tatsache kann aber allenfalls erklären, daß trotz imbalancierten Befunden in der X-Methylierungsanalyse bei AA keine größeren Populationen mit einem GPI-Defekt nachweisbar sind. Daß große GPI-defiziente Populationen keinen Niederschlag im X-Inaktivierungsassay finden, bleibt in Anbetracht der vorangegangenen Überlegungen ungeklärt.

4.3.1.2 Das Problem der extremen Lyonisierung

Wie einleitend bemerkt, erfolgt die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosome in der embryonalen Entwicklung wahrscheinlich nach dem Zufallsprinzip. Theoretisch ist die Chance, daß entweder die mütterlichen oder die väterlichen x-chromosomalen Allele inaktiviert werden, für jede einzelne Zelle 50:50. Im Extremfall könnten aber bei allen embryonalen Stammzellen z.B. nur die väterlichen Allele inaktiviert sein. Alle Nachfolgerzellen und somit das gesamte hämatopoetische System des erwachsenen Organismus zeigten in der späteren X-Methylierungsanalyse nur ein aktives bzw. inaktives Allel. Zu erkennen wäre dies z.B. daran, daß in Erkrankungen der Myelopoese auch die Lymphozyten mitbetroffen wären.
Bei 15 von 65 gesunden Frauen (23%) wurde mittels PGK- und HPRT-Assays eine extreme Lyonisierung festgestellt (GALE *et al.,* 1991). BUSQUE und Mitarbeiter wiesen nach, daß die Inzidenz imbalancierter Muster im HUMARA-PCR-Assay bei gesunden weiblichen Individuen altersabhängig ist: Bei 162 weiblichen Neugeborenen wies er je nach Strenge der Kriterien eine Inzidenz von 1,9 bis 8,6%, bei 67 jungen Frauen im Alter zwischen 28 und 32 Jahren eine Inzidenz

zwischen 4,5 und 16,4%, sowie bei 66 Frauen über 60 Jahren eine Quote von 22,7 bis 37,9% nach (BUSQUE *et al.,* 1996). Daraus kann geschlossen werden, daß neben einer *konstitutionellen* extremen Lyonisierung, die „in Reinform" nur beim Neugeborenen nachweisbar ist, auch alterungsbedingte Einflüsse zu einer *erworbenen* extremen Lyonisierung führen können. Als Möglichkeiten nennt BUSQUE:

- Stammzelldepletion, die zu einer stochastischen Dominanz weniger Klone führt (siehe Abkowitz' These in Kap. 4.1.2)
- Wachstumsvorteile aufgrund X-chromosomaler, nur durch ein Elternteil vererbter Gene
- wirkliches klonales Wachstum als Ausdruck einer erworbenen genetischen Aberration im Laufe des Alterns, (noch) ohne Krankheitswert.

Alle Beobachtungen hinsichtlich der extremen Lyonisierung bei gesunden weiblichen Individuen lassen Kontrollanalysen von Referenzgewebe der untersuchten Patientin notwendig erscheinen. Bei soliden Tumoren stellt dies kein Problem dar, da meist gesunde Biopsien des gleichen Gewebes für Kontrolluntersuchungen gewinnbar sind. Die Wahl des Kontrollgewebes bei hämatologischen Erkrankungen ist aber problematisch, wenn es sich wie bei der Aplastischen Anämie um eine Erkrankung einer frühen Vorläuferzelle des Knochenmarks handelt, da ontogenetisch ältere, gesunde Stammzellen nicht diskriminiert werden können. Einige Autoren sind deswegen auf Hautbiopsien oder Fibroblasten-Kulturen als Kontrollgewebe ausgewichen.

Daß dies unzuverlässig ist, zeigten GALE und Mitarbeiter in X-Chromosom-Inaktivierungsanalysen verschiedener Gewebsbiopsien von 20 hämatologisch normalen Frauen, die sich einer Magenoperation unterzogen: In 9 der 20 (45%) Frauen wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster in den verschiedenen Gewebearten nachgewiesen, beispielsweise peripheres Blut sich in der X-Inaktivierungsanalyse mit einer extremen Lyonisierung, also mit einem imbalancierten Bandenmuster, darstellte, Haut- oder Muskelbiopsien als Referenzgewebe hingegen ein balanciertes Muster zeigten (GALE *et al.,* 1994).

Die DNA von Haarfollikeln als Kontrolle zu untersuchen, bietet sich auch nicht an, da in Studien mit für G-6-DPH oder für X-chromosomale Fellfarb-Gene heterozygoten Säugetieren nachgewiesen wurde, daß das Mosaik im Fell flächig verteilt ist (GARTLER *et al.,* 1971, GARDNER *et al.,* 1985), wodurch meistens imbalancierte Muster zu erwarten sind. Eine weitere Alternative ist, Wangenschleimhaut als Kontrollgewebe zu gewinnen, wobei GALE dabei eine Kontamination mit einer großen Anzahl neutrophiler Granulozyten beobachtete.

In der oben zitierten Studie von GALE wurde die Beobachtung gemacht, daß bei hämatologisch gesunden Kontrollpersonen die myeloischen und lymphatischen

Zellpopulationen hinsichtlich der X-Inaktivierungsmuster streng miteinander korrelieren, so daß man, wenn Granulozyten ein imbalanciertes und Lymphozyten ein balanciertes Muster zeigen, von einer monoklonalen Myelopoese ausgehen könnte. Doch selbst diese Möglichkeit der Kontrolle wurde durch eine Studie von CHAMPION *et al.* (1997) in Frage gestellt, da diese Gruppe neben älteren Patientinnen mit myeloproliferativen und myelodysplastischen Erkrankungen auch altersentsprechende Kontrollpersonen mit dem HUMARA-Assay untersuchte und dabei feststellte, daß ein klonales Muster unter Ausschluß einer extremen Lyonisierung (Granulozyten balanciert, T-Lymphozyten imbalanciert) bei 23% der 65 gesunden Kontrollpersonen auftrat (gegenüber 63% bei den myeloproliferativ Erkrankten).
In der hier vorgelegten Arbeit benutzten wir zum Ausschluß einer extremen Lyonisierung, also wenn sowohl die myeloische als auch die lymphatische Zellreihe ein imbalanciertes Muster aufwies, Knochenmarkstroma als Kontrollgewebe. Die Überlegung dabei ist, daß wegen der gewebe-spezifischen X-Inaktivierungsmuster (GALE *et al.,* 1994) Referenzgewebe desselben Organs (in diesem Falle Knochenmark) zum Vergleich herangezogen werden muß.

4.3.2 Interpretationsprobleme bei M27ß

Während beim PGK- oder HUMARA-Assay keine Probleme beim Lesen der Bandenmuster entstanden, bot M27ß abgesehen von technischen Problemen mit der sehr störanfälligen und aufwendigen Southern-blot-Hybridisierungstechnik Interpretationsprobleme aufgrund einer inkonstanten zusätzlichen Methylierung des inaktiven X-chromosomalen Allels (Variabilität zwischen 0 und 60%). Dies führt dazu, daß nicht nur Vier- oder Zwei-Banden-Muster als Ausdruck für ein balanciertes oder imbalanciertes Verhältnis auftreten können, sondern auch Drei- oder Fünf-Banden-Muster. Auf diese Tatsache und deren mögliche Ursachen wurde im Kapitel 2.2.1.1.2 schon ausführlich eingegangen. Bei Patientinnen ID.Nr. 16 und 18 wurde ein Drei-Banden-Muster nach HpaII-Verdau unter Berücksichtigung der von FEY *et al.* (1994) gemachten Anmerkungen als imbalanciert angesehen, da die nicht mit HpaII verdauten Kontrollspalten ein Vier-Banden-Muster zeigten.

4.4 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen für die Pathophysiologie der AA

4.4.1 Klonalität als Selektionsvorteil?

Für Hypothesen zur Pathophysiologie der Aplastischen Anämie bietet die in dieser Arbeit offenkundig gewordene Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Durchflußzytometrie und den X-Chromosom-Methylierungsanalysen eine gute Diskussionsgrundlage. In einem Review von NEAL S. YOUNG von 1992 über das Problem der Klonalität bei Aplastischer Anämie bezeichnete er das Phänomen der Klonalität als eine mögliche Folge eines Selektionsdrucks unter einer autoaggressiven Attacke des Immunsystems, insbesondere zytotoxischer T-Lymphozyten gegen Progenitorzellen des eigenen hämopoetischen Systems, wobei eine Progenitorzelle und deren Tochterzellen sich durch eine sekundär auftretende Mutation im PIG-A-Gen, die zum Verlust mehrerer Oberflächenantigene (u.a. des Antigens, das das Ziel der Attacke bildet) führt, dieser Autoimmunreaktion entziehen kann. Letztendlich würde dann die Hämatopoese nur noch durch einen GPI-defizienten Klon aufrechterhalten. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, daß unter Patienten mit Aplastischer Anämie ein erheblicher Prozentsatz GPI-defiziente Populationen aufweist, in der vorgelegten Arbeit sind dies 12 von 23 Patientinnen (57%), dies entspricht in der Größenordnung dem Ergebnis umfassenderer Publikationen zu diesem Thema (SCHUBERT *et al.,* 1991 SCHREZENMEIER *et al.,* 1995). Nun läßt das erwarten, daß dies auch Niederschlag in den X-Chromosom-Inaktivierungsanalysen in Form einer nachweisbaren klonalen Hämatopoese fände. Aber gerade dies ist nicht der Fall. Nun kann die Vermutung dafür herhalten, daß die X-Chromosom-Inaktivierungsanalyse nicht sensitiv genug sei. Allerdings hätte man doch im Fall der Patientin ID.Nr. 10 mit einer GPI-defizienten Granulozyten-Population in einer Größenordnung von fast 70% selbst dann ein imbalanciertes Muster erwarten müssen.

Daß die GPI-Defizienz allein keine Erklärung für das Auftreten einer klonalen Hämatopoese sein kann, wird durch die umgekehrten Fälle deutlich, in denen eine als klonal befundete Myelopoese (Pat. ID.Nr. 1, 12 und 16) keine nennenswert großen GPI-defizienten Granulozyten-Populationen im peripheren Blut aufweist. Es muß also noch andere Faktoren geben, die eine klonale Hämatopoese bedingen.

4.4.2 Klonalität als Ausdruck eines depletierten Stammzellpools?

In der bereits zitierten Dissertationsarbeit von MARIANNE JENAL (1995) wurde unter anderen auch bei den AA-Patientinnen, die in der hier vorgelegte Arbeit untersucht wurden, festgestellt, daß die Frequenz von „*cobblestone area-forming cells*“ (CAFC), die als *in vitro*-Korrelat von unreifen, pluripotenten Knochenmarksstammzellen angesehen werden, gegenüber Gesunden signifikant reduziert ist, und zwar unabhängig von Schweregrad und Dauer der Erkrankung und dem Ansprechen auf immunsuppressive Therapie. Offen bleibt dabei aber, ob die Reduktion der CAFC-Frequenz auf einen intrinsischen Stammzelldefekt, der zu einer Proliferations- bzw. Differezierungsstörung führt, oder auf eine Stammzellreduktion aufgrund extrinsischer Einflüsse (wie beispielsweise eine zytotoxische Immunreaktion) zurückzuführen ist.

An den gemeinsam untersuchten Patientinnen zeigte sich im Vergleich, daß die CAFC-Frequenz *grundsätzlich* gegenüber Normalkontrollen reduziert war, dies sich aber nicht genauso häufig als imbalanciertes Muster in der X-Chromosom-Methylierungsanalyse niederschlägt, was man auch nicht unbedingt erwarten kann, wenn der Stammzellpool nicht gerade bis auf eine einzige Progenitorzelle depletiert ist. Ein Wechsel imbalancierter Muster in den Verlaufsbeobachtungen als möglichen Hinweis auf eine wechselnde Rekrutierung weniger hämatopoetischer Stammzellklone konnte aber auch nicht beobachtet werden.

5 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse lassen bezüglich der Klonalitätsfrage bei Aplastischer Anämie (AA) folgende Feststellungen zu:

- Bei der Aplastischen Anämie überwiegt in den meisten Fällen eine **polyklonale Hämatopoese**. Dennoch gibt es Hinweise auf eine klonale Hämatopoese von Subpopulationen bei Aplastischer Anämie, die für die Entwicklung klonaler Erkrankungen verantwortlich sein könnte.
- Patienten, bei denen eine monoklonale Hämatopoese (unter Berücksichtigung adäquater Kontrolluntersuchungen) nachgewiesen werden kann, haben ein hohes Risiko, eine klonale Folgeerkrankung zu entwickeln. Allerdings kann sich auch bei einem polyklonalen Aspekt der Hämatopoese eine klonale Folgeerkrankung entwickeln, in der vorliegenden Studie in 6 von 14 Patienten (~43%), in zwei Fällen sogar eine Akute Myeloische Leukämie. Der Umkehrschluß, daß ein balanciertes Muster in der X-Chromosom-Methylierungsanalyse eine günstigere Prognose bedeutet, ist somit nicht zulässig.
- Es besteht ein enger pathophysiologischer Zusammenhang zwischen Aplastischer Anämie und Paroxysmaler Nächtlicher Hämoglobinurie (PNH) – gezeigt durch den durchflußzytometrischen Nachweis von fehlenden Glycosylphosphatidyl-Inositol-(GPI)-verankerten Oberflächenproteinen auch bei AA-Patienten. Möglicherweise handelt es sich bei AA und PNH um zwei verschiedene Phänotypen einer genetischen Aberration. Eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der X-Methylierungsanalysen und der Durchfluß-zytometrie mit Nachweis GPI-verankerter Oberflächenproteine konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, möglicherweise aufgrund zu geringer Sensitivität der X-Inaktivierungsassays.
- Das Erscheinungsbild der Hämopoese im X-Chromosom-Methylierungsassay hat keinen prädiktiven Aussagewert hinsichtlich des Ansprechens auf eine immunsuppressive Therapie.
- Klonalitätsassays mit X-Chromosom-Methylierungsanalysen sind in ihrer Interpretierbarkeit eingeschränkt, da sie einen Parameter untersuchen, der mit der Erkrankung nichts zu tun hat. Vor allem das Phänomen der extremen Lyonisierung, das ein monoklonales Erscheinungsbild vortäuschen kann, schmälert die Aussagekraft dieser Methode.

6 Danksagung

Mein besonderer und erster Dank geht an die Herren Privat-Dozenten Dres. A. Raghavachar und H. Schrezenmeier für die Betreuung dieser Arbeit. In ihrem Labor und mit ihrer Unterstützung hatte ich die optimalsten Bedingungen zur Erstellung dieser experimentellen Arbeit. Insbesondere danke ich ihnen auch für die Ermöglichung meiner Teilnahme am Kongreß der *International Society for Experimental Hematology* 1993 in Rotterdam, was die Arbeit an dieser Dissertation sehr gefördert hat.

Professor H. Heimpel gebührt mein Dank nicht nur für die Motivation, an diesem Thema zu arbeiten, ich bin auch stolz und dankbar, während meines Medizinstudiums von ihm klinische Arbeit gelernt zu haben. In seinem Umgang mit Patienten und Mitarbeitern wird er mir immer ein Vorbild sein. Ein besonderes Erlebnis war das Doktoranden-Seminar 1992 in Falkau.

Herrn Dr. K. M. Josten verdanke ich die Einarbeitung in die Southern-Hybridisierungsmethode mit M27ß. Außerdem ermöglichte er mir einen Aufenthalt im St.George-Hospital in London, in dessen Rahmen ich die Gelegenheit hatte, Professor Gordon-Smith und Fr. Dr. Judith Marsh zu begegnen.

Bettina Wagner gebührt mein Dank für das methodische Ausfeilen der PGK- und HUMARA-PCR sowie das Durchführen vieler PGK-Untersuchungen.

Bei Nane Gerok (jetzt Jenal), Friedemann Thewald und Bruno Merck möchte ich mich ganz herzlich für die ständige Motivation auch während Durststrecken und den Gedankenaustausch über das Mysterium des Southern-blottings und der Polymerase-Kettenreaktion bedanken. Dank ihnen herrschte im Labor eine ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

Frau Fischer, Frau Szmaragowska und Frau Wiest waren mir eine sehr große Hilfe bei methodischen Problemen im Umgang mit Zellen und DNA.

7 Quellenverzeichnis

Abkowitz, J.L., Fialkow, P.J., Niebrugge, D.J., Raskind, W.H., Adamson, J.W. (1984): Pancytopenia as a Clonal Disorder of a Multipotent Hematopoietic Stem Cell. *J. Clin. Invest.*, **73**, 258-261. 52

Abkowitz, J. (1993): Clonal Hematopoiesis: Limited Stem Cell Reserve vs. Neoplastic Disease. In: A. Raghavachar, H. Schrezenmeier, N. Frickhofen (Hrsg.): " Aplastic Anemia: Current Perspectives on the Pathogenesis and Treatment", Blackwell-MZV, Wien, 1993, 34-39. 53

Abkowitz, J.L., Linenberger, M.L., Newton, M.A., Shelton, G.H., Ott, R.L., Guttorp, P. (1990): Evidence for the maintenance of the hematopoiesis in a large animal by sequential activation of stem-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9062-9066. 54

Abrahamson, G., Fraser, N.J., Boyd, Y., Craig, I., Wainscoat, J.S. (1990): A highly informative X-chromosome probe, M27ß, can be used for the determination of tumour clonality. *Br. J. Haematol.,* **74**, 371-377. 18

Allen, R.C., Zoghbi, H.Y., Moseley, A.B., Rosenblatt, H.M., Belmont, J.W. (1992): Methylation of HpaII and HhaI Sites Near the Polymorphic CAG Repeat in the Human Androgen Receptor Gene Correlates with X Chromosome Inactivation. *Am.J.Hum.Genet.*, **51**, 1229-39 20

Anan, K., Ito, M., Misawa, M., Ohe, Y., Kai, S., Kohsaki, M., Hara, H. (1995): Clonal analysis of peripheral blood and haemopoietic colonies in patients with aplastic anaemia and refractory anaemia using the polymorphic short tandem repeat on the human androgen-receptor (HUMARA) gene. *Br. J. Haematol.*, **89**, 838-844 53

Appelbaum, F.R., Barrall, J., Storb, R., Ramberg, R., Doney, K., Sale, G.E., Thomas, E.D. (1987):Clonal cytogenetic abnormalities in patients with otherwise typical aplastic anemia. *Exp. Hematol.,* **15**, 1134-1139 12

Bacigalupo, A., Broccia, G., Corda, G., Arcese, W., Carotenuto, M., Gallamini, A., Locatelli, F., Mori, P.G., Saracco, P., Todeschini, G., Coser, P., Iacopino, P., van Lint, MT., and Gluckman E. (1995): Antilymphocyte Globulin, Cyclosporin, and Granulocyte Colony-Stimulating Factor in patients with aquired Severe Aplastic Anemia (SAA): A pilot study of the EBMT SAA Working Party. *Blood*, **85**, 1348-53 1

Bartram, C.R., Ludwig, W.D., Hidderman, W., Lyons, J., Buschle, M., Ritter, J., Harbott, J., Frolich, A., Janssen, J.W.G. (1989): Acute myeloid leukemia: Analysis of Ras gene mutation and clonality reffered by polymorphic X-linked loci. *Leukemia*, **3**, 247-256. 11

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan, C. (1982): Proposals for the classification of the myeloplastic syndroms. *Br. J. Haematol.*, **51**, 189-199. 10

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, MT., Flandrin, G., Galton, DA., Gralnick, HR., Sultan, C. (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann. Intern. Med.*, **103**, 620-625. 11

Berger, R. (1992): The cytogenetics of haematological malignancies. *in: Ballière's Clinical Haematology*, **5**, 791-814 11

Buescher, E.S., Alling, D.W., Gallin, J.I. (1985): Use of an X-linked Human Neutrophil Marker to Estimate Timing of Lyonization and Size of the Dividing Stem Cell Pool. *J. Clin. Invest.*, **76**, 1581-1584 58

Busque, L., Mio, R., Mattioli, J., Brais, E., Blais, N., Lalonde, Y., Maragh, M., Gilliland, D.G. (1996): Nonrandom X-Inactivation Patterns in Normal Females: Lyonization Ratios Vary With Age. *Blood*, **88**, 59-65. 60

Champion, K.M., Gilbert, J.G.R., Asimakopoulos, F.A., Hinshelwood, S., Green, A.R. (1997): Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.*, **97**, 920-926. 61

Damashek, W. (1967): Riddle: What do aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and "hypoplastic leukemia" have in common? *Blood*, **30**, 251. 2

Davitz, M.A., Low, M.G., Nussenzweig, V. (1986): Release of decay-accelerating factor from the cell membrane by phosphatidyl-inositol-specific phospholipase C (PIPLC). *J Exp Med.*, **163**, 1150-1161 21

de Planque, M.M., Bacigalupo, A., Wursch, A., Hows, J.M., Devergie, A., Frickhofen, N., Brand, A., Nissen, C., *for the Severe Aplastic Anaemia Working Party of the European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT)* (1989): Long-term follow-up of severe aplastic anaemia patients treated with antithymocyte globulin. *Br. J. Haematol.*, **73**, 121-126 9

Deeg, H.J., Socié, G., Schoch, G., Henry-Amar, M., Witherspoon, R.P., Devergie, A., Sullivan, K.M., Gluckman, E., and Storb, R. (1996): Malignancies After Bone Marrow Transplantation for Aplastic Anemia and Fanconi Anemia: A Joint Seattle and Paris Analysis of Results in 700 Patients. *Blood*, **87**, 386-392. 8

Dexter, T.M., Spooncer, E., Simmons, P., Allen, T.D. (1984): Long-term marrow culture: an overview of techniques and experience. *in: Wright, D.G., Greenberger, J.S. (eds.): Long-term bone marrow culture.* Alan R. Liss, Inc., New York, 57-96. 23

Doney, K., Leisenring, W., Storb, R., Appelbaum, F.R. (1997): Primary treatment of aquired aplastic anemia: outcomes with bone marrow transplantation and immunosuppressive therapy. Seattle Bone Marrow Transplant Team. *Ann. Intern. Med.*, **126**, 166-168 9

Fearon, E.R., Burke, P.J., Schiffer, C.A., Zehnbauer, B.A., Vogelstein, B. (1986): Differentiation of leukemia cells to polymorphonuclear leukocytes in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *N. Eng. J. Med.*, **315**, 15-24. 11

Fey, M.F., Liechti-Gallati, S., von Rohr, A., Borisch, B., Theilkäs, L., Schneider, V., Oestreicher, M., Nagel, S., Ziemiecki, A., Tobler, A. (1994): Clonality and X-Inactivation Patterns in Hematopoietic Cell Populations Detected by the Highly Informative M27ß DNA Probe. *Blood*, **83**, 931-938 19

Fey, M.F., Peter, H.J., Hinds, H.L., Zimmermann, A., Liechti-Gallati, S., Gerber, H., Studer, H., and Tobler, A. (1992): Clonal Analysis of Human Tumors with M27ß, a High Informative Polymorphic X Chromosomal Probe. *J. Clin. Invest.*, **89**, 1438-1444. 17

Fialkow, P.J. (1972): Use of genetic markers to study cellular origin and development of tumors in human females. *Adv. Cancer Res.*, **15**, 191. 11

Fialkow, P.J., Janssen, J.W.G., Bartram, C.R. (1991): Clonal remission in acute nonlymphocytic leukemia: Evidence for a multistep pathogenesis of malignancy. *Blood*, **77**, 1415-1417. 11

Frickhofen, N., Kaltwasser, J., Schrezenmeier, H., Raghavachar, A., Vogt, H., Hermann, F., Freund, M., Meusers, P., Salama, A., und Heimpel, H. for the German Aplastic Anemia Study Group (1991): Treatment of Aplastic Anemia With Antilymphocyte Globulin And Methylprednisolone With or Without Cyclosporine. *N. Engl. J. Med.*, **324**, 1297-1304. 14

Gale, R.E., Fielding, A.K., Harrison, C.N., Linch, D.C. (1997): Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br. J. Haematol.*, **98**, 512-519. 58

Gale, R.E., Wheadon, H., Boulos, P., Linch, D.C. (1994): Tissue specifity of X-chromosome inactivation patterns. *Blood*, **83**, 2899-2905. 58

Gale, R.E., Wheadon, H., Linch, D.C. (1991): X-chromosome inactivation patterns using HPRT and PGK polymorphisms in haematologically normal and post-chemotherapy females. *Br. J. Haematol.,* **79**, 193-197 59

Gardner, R.L., Lyon, M.F., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. (1985): Clonal analysis of X-chromosome inactivation and the origin of the germ line in the mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **88**, 349-363 59

Gartler, S.M., Gandini, E., Hutchinson, H.T., Campbell, B., Zechhi, G. (1971): Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: Utilization in the study of hair follicle variegation. *Ann. Hum. Genet.*, **35**, 1 ff. 60

Gilliland, D.G., Blanchard, K.L., Bunn, H.F. (1991): Clonality in Aquired Hematologic Disorders. *Annu. Rev. Med.*, **42**, 491-506 3

Gilliland, D.G., Blanchard, K.L., Levy, J., Perrin, S., Bunn, H.F. (1991a): Clonality in myeloproliferative disorders: Analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6848-6852 16

Griscelli-Bennaceur, A., Gluckman, E., Scrobohaci, M.L., Jonveaux, P., Vu, T., Bazarbachi, A., Carosella, E.D., Sigaux, F., and Socié, G. (1995): Aplastic Anemia and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Search for a Pathogenetic Link. *Blood*, **85**, 1354-1363. 8

Hendriks, R.W., Kraakman, M.E.M., Mensink, R.G.J., Schuurman, R.K.B (1991): Differential methylation at the 5' and the 3' CCGG sites flanking the X chromosomal hypervariable DXS255 locus. *Hum. Genet.*, **88**, 105-111. 18

Hinterberger, W., for the Scientific Advisory Comittee of the International Bone Marrow Transplant Registry (1993): Bone Marrow Transplantation from Genotypically-Identical Twins with Aplastic Anemia. *In: Raghavachar, A.., Schrezenmeier, H., Frickhofen, N. (eds.): Aplastic Anemia - Current Perspectives on the Pathogenesis and Treatment.*Blackwell-MZV, Wien, 1993, 102-103.7

Holliday, R. and Pugh, J.E. (1975): DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, **187**, 226-232. 4

Janssen, J.W.G., Buschle, M., Layton, M., Drexler, H.G., Lyons, J., van den Berghe, H., Heimpel, H., Kubanek, B., Kleihauer, E., Mufti, G.J., Bartram, C.R. (1989): Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. *Blood*, **73**, 248-254. 11

Jenal, M. (1995): Defekt hämatopoetischer Stammzellen bei Aplastischer Anämie: Quantitative Untersuchung durch Grenzverdünnungsanalyse in der Knochenmark-Langzeitkultur. *Dissertationsschrift aus der Abteilung Innere Medizin III der Fakultät für Medizin der Universität Ulm,* 18-21. 23

Josten, K.M., Tooze, J.A., Borthwick-Clarke, C., Gordon-Smith, E.C., Rutherford, T.R. (1991): Aquired Aplastic Anemia and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Studies on Clonality. *Blood*, **78**, 3162-3167. 52

Kawano, Y., Nissen, C., Gratwohl, A., Speck, B. (1988): Immunostimulatory effects of different antilymphocyte globulin preparations: A possible clue to their clinical effect. *Br. J. Haematol.*, **68**, 115 7

Le Beau, M., Westbrook, C.A., Diaz, M.O., Larson, R.A., Rowley, J.D., Gasson, J.C., Golde, D.W., Sherr, C.J. (1986): Evidence for the involvement of GM-CSF and fms in the deletion (5q) on myeloid disorders. *Science*, **231**, 984-987. 11

Lewis, S.M., and Dacie, J.V. (1967): The aplastic anaemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *Br. J. Haematol.*, **13**, 236 ff. 9

Linder, D. und Gartler, S.M. (1965): Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science,* **150**, 67-69 16

Lyon, MF (1961): Gene action in the X-chromosome of the mouse (*mus musculus* L.). *Nature,* **190**, 372 4

Marsh, J.C.W. and Geary, C.G. (1991): Annotation: Is Aplastic Anaemia a pre-leukaemic disorder? *Br. J. Haematol.,* **77,** 447-452 2

Marsh, J.C.W., Chang, J., Testa, N.G., Hows, J.M., Dexter, T.M. (1991a): In vitro assessment of marrow 'stem cell' and stromal cell function in aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.,* **78**, 258-267 7

Marsh, J.C.W., Abboudi, Z.H., Gibson, F.M., Scopes, J., Daly, S., O'Shaunnessy, D.F., Baughan, A.S.J., and Gordon-Smith, E.C. (1994): Aplastic Anaemia Following Exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy'). *Br. J. Haematol.*, **88**, 281-285 5

Mikhailova, N., Sessarego, M., Fugazza, G., Caimo, A., De Filippi, S., van Lint, M.T., Bregante, S., Valeriani, A., Mordini, N., Lamparelli, T., Gualandi, F., Occhini, D., Bacigalupo, A. (1996): Cytogenetic abnormalities in patients with severe aplastic anemia. *Haematologica*, **81**, 418-42212

Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 1215. 24

Miyata, T., Yamada, N., Yoshiyasu, I., Nishimura, J., Takeda, J., Kitani, T., Kinoshita, T. (1994): Abnormalities of *Pig-A* Transcripts in Granulocytes from Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.*, **330**, 249-255 59

Najean, Y., Haguenauer, O. (1990): Long-term (5 to 20 years) Evolution of nongrafted aplastic anemias. The Cooperative Group for the Study of Aplastic and Refractory Anemias. *Blood*, **76**, 2222-8 9

Narayanan, M.N., Geary, C.G., Freemont, A.J., Kendra, J.R. (1994): Long-term follow-up of aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.*, **86**, 837-843 9

Nissen, C., Gratwohl, A., Speck, B., Wursch, A., Moser, Y., and Weis, J. (1986): Aquired aplastic anaemia: a PNH-like disease? *Br. J. Haematol.*, **64**, 355-362. 8

Nissen, C. (1991): The Pathophysiology of Aplastic Anemia. *Sem. Hematol.*, **28**, 313-318 6

Ohara, A., Kojima, S., Hamajima, N., Tsuchida, M., Imashuku, S., Ohta, S., Sasaki, H., Okamura, J., Sugita, K., Kigasawa, H., Kiriyama, Y., Akatsuka, J., Tsukimoto, I. (1997): Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia as a Late Clonal Complication in Children With Aquired Aplastic Anemia. *Blood*, **90**, 1009-1013 9

Paquette, R.L., Tebyani, N., Frane, M., Ireland, P., Ho, W.G., Champlin, R.E., Nimer, S.D. (1995): Long-term outcome of aplastic anemia in adults treated with antithymocyte globulin: comparison with bone marrow transplantation. *Blood*, **85**, 283-290 9

Ploemacher, R.E., van der Sluis, J.P., Voerman, J.S.A., Brons, N.H.C. (1989): An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood*, **74**, 2755-63 8

Prchal, J.T., Throckmorton, D.W., Carrol, A.J., Fuson, E.W., Gams, R.A., Prchal, J.F. (1978): A common progenitor for myeloid and lymphoid cells. *Nature*, **274**, 590-591. 11

Raghavachar, A., Janssen, J.W.G., Schrezenmeier, H., Wagner, B., Bartram, C.R., Schulz, A.S., Hein, C., Cowling, G., Mubarik, A., Testa, N.G., Dexter, T.M., Hows, J.M., Marsh, J.C.W. (1995): Clonal Hematopoiesis as Defined by Polymorphic X-Linked Loci Occurs Infrequently in Aplastic Anemia. *Blood*, **86**, 2938-2947 50

Raghavachar, A., Schrezenmeier, H. (1995): The aplastic anemia-paroxysmal nocturnal hemoglobinuria syndrome. *In: Gluckman, E., Coulombel, L. (Eds.): Ontogeny of hematopoiesis. Aplastic Anemia. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.,* Vol. **235**, 233-238. 10

Raghavachar, A. (1999): Aplastic Anemia and other clonal disorders. In: Schrezenmeier, H., Bacigalupo, A. (Hrsg.): "Aplastic Anemia" Cambridge University Press 9

Raskind, W.H., Tirumali, N., Jacobson, R., Singer, J., Fialkow, P.J. (1984): Evidence for a Multistep Pathogenesis of a Myelodysplastic Syndrome. *Blood*, **63**, 1318-1323. 11

Riggs, A.D. (1975): X-inactivation, differentiation and DNA methylation. Cytogenet. Cell. Genet., **14**, 9-25. 4

Rosse, W.F., Ware, R.E. (1995): The Molecular Basis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood*, **86**, 3277-3286 59

Rottoli, B., Alfinito, F., Rocco, S. (1993): Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Aplastic Anemia. In: A. Raghavachar,H. Schrezenmeier, N. Frickhofen (eds.): " Aplastic Anemia: Current Perspectives on the Pathogenesis and Treatment", Blackwell-MZV, Wien, 1993, 40-48. 22

Sanguinetti, C.J., Neto, E.D., Simpson, A.J.G (1994): Rapid Silver Staining and Recovery of PCR Products Separated on Polacrylamide Gels. *BioTechniques*, **17**, 914-921 30

Schrezenmeier, H., Hertenstein, B., Wagner, B., Raghavachar, A., and Heimpel, H. (1995): A pathogenetic link between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is suggested by a high frequency of aplstic anemia patients with a deficiency of phosphatidylinositol glycan anchored proteins. *Exp. Hematol.*, **23**, 81-87. 8

Schrezenmeier, H., Jenal, M., Herrmann, F., Heimpel, H., Raghavachar, A (1996): Quantitative analysis of cobblestone area-forming cells in bone marrow of patients with aplastic anemia by limiting dilution assay. *Blood*, **88**, 4474-80 8

Schubert, J., Uciechowski, P., Delany, P., Tischler, H.-J., Kolanus, W., Schmidt, R.E. (1990): The PIG-Anchoring Defect in NK Lymphocytes of PNH Patients. *Blood*, **76**, 1181-1187 21

Schubert, J., Alvarado, M., Uciechowski, P., Zielinska-Skowronek, M., Freund, M., Vogt, H., and Schmidt, R.E. (1991): Diagnosis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br. J. Haematol.*, **79**, 487-492. 8

Secker-Walker, L.M. (1985): The meaning of a clone. *Cancer Genet. Cytogenet.,* **16**, 87-88 2

Socie, G., Henry-Amar, M., Bacigalupo, A., Hows, J., Tichelli, A., Ljungman, P., McCann, S.R., Frickhofen, N., Van't-Veer-Korthof, E., Gluckman, E. (1993): Malignant tumors occurring after treatment of aplastic anemia. European Bone Marrow Transplantation-Severe Aplastic Anaemia Working Party. *N. Engl. J. Med.*, **329**, 1152-7 8

Taniguchi, Y., Frickhofen, N., Raghavachar, A., Digel, W., Heimpel, H. (1990): Antilymphocyte immunoglobulins stimulate peripheral blood lymphocytes to proliferate and release lymphokines. *Eur. J. Haematol.*, **44**, 244-51 7

Tefferi, A., Thibodeau, S.N., Solberg, L.A., Jr. (1990): Clonal Studies in the Myeloplastic Syndrome Using X-Linked Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Blood*, **75**, 1770-1773. 11

Tichelli, A., Gratwohl, A., Nissen, C., Speck, B. (1994): Late clonal complications in severe aplastic anemia. *Leuk. Lymphoma*, **12**, 167-175 1

Tsuge, I., Kojima, S., Matsuoka, H., Abe, T., Kamachi, Y., Torii, S., Matsuyama, T. (1993): Clonal haematopoiesis in children with acquired aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.*, **84**, 137-143 53

Turhan, A.G., Humphries, R.K., Phillips, G.L., Eaves, A.C., Eaves, J. (1989): Clonal hematopoiesis demonstrated by X-linked DNA polymorphisms after allogenic bone marrow transplantation. *New. Engl. J. Med.*, **320**, 1655-1661. 54

Van der Schoot, C.E., Huizinga, F.W.J., van't Veer-Korthof, E.T., Wijmans, R., Pinkster, J., and von dem Borne, A.E.G.K. (1990): Deficiency of Glycosyl-Phosphatidylinositol-Linked Membrane Glycoproteins of Leukocytes in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Description of a New Diagnostic Cytofluorometric Assay. *Blood*, **76**, 1853-1859 8

Van Kamp, H., Jansen, R., Willemze, R., Fibbe, W.E., Landegent, J.E. (1991): Studies on clonality by PCR analysis of the PGK-1 gene. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 2794 16

Van Kamp, H., Landegent, J.E., Jansen, R.P.M., Willenze, R., Fibbe, W. E. (1991a): Clonal Hematopoiesis in Patients With Acquired Aplastic Anemia. *Blood*, **78**, 3209-3214. 52

Van Kamp, H., Fibbe, W.E., Jansen, R.P.M., van der Keur, M., de Graaff, E., Willemze, R., Landegent, J.E. (1992): Clonal involvement of granulozytes, but not of T and B lymphocytes and natural killer cells in patients with myelodysplasia: Analysis by X-linked restriction fragment length polymorphism and polymerase chain reaction of the phosphoglycerate kinase gene. *Blood*, **80**, 1774-80. 31

Wainscoat, J.S. und Fey, M.F. (1990): Assessment of Clonality in Human Tumors: A Review. *Cancer Res.*, **50**, 1355-60 3

Yamada, N., Miyata, T., Maeda, K., Kitani, T., Takeda, J., Kinoshita, T. (1995): Somatic Mutations of the PIG-A Gene Found in Japanese Patients With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood*, **85**, 885-892 59

Young, N.S. (1992): The Problem of Clonality in Aplastic Anemia: Dr Damashek's Riddle, Restated. *Blood*, **79**, 1385-92. 62