

Kapitel 20

Mosaik-Bildung bei Fanconi-Anämie

Prof. Dr. med. Holger Höhn

Institut für Humangenetik, Universität Würzburg

Als „*Mosaik*“ bezeichnet man die Existenz von genetisch unterschiedlichen Zellen in einem Organismus. Mosaik-Patienten haben sowohl typische FA-Zellen als auch selbstkorrigierte Zellen in ihrem Körper. Typische FA-Zellen sind genetisch „*homozygot*“ bzw. „*compound heterozygot*“. Das heißt, sie tragen Mutationen auf beiden Kopien eines FA-Gens, während selbstkorrigierte Zellen nur „*einfach heterozygot*“ sind, was bedeutet, dass nur eine der beiden Genkopien genetisch defekt ist.

Nach anfänglichen Einzelberichten wurde das Phänomen der Mosaik-Bildung bei der Fanconi-Anämie 1997 von der Arbeitsgruppe um Prof. Hans Joenje ausführlich beschrieben [vgl. Literaturhinweise Seite 198 (1)]. Wenn die Selbstkorrektur in einer *Stammzelle* des Knochenmarks erfolgt, so sind alle Nachkommen dieser Stammzelle „geheilt“ und erlangen offenbar einen Wachstumsvorteil gegenüber den ursprünglichen FA-Zellen.

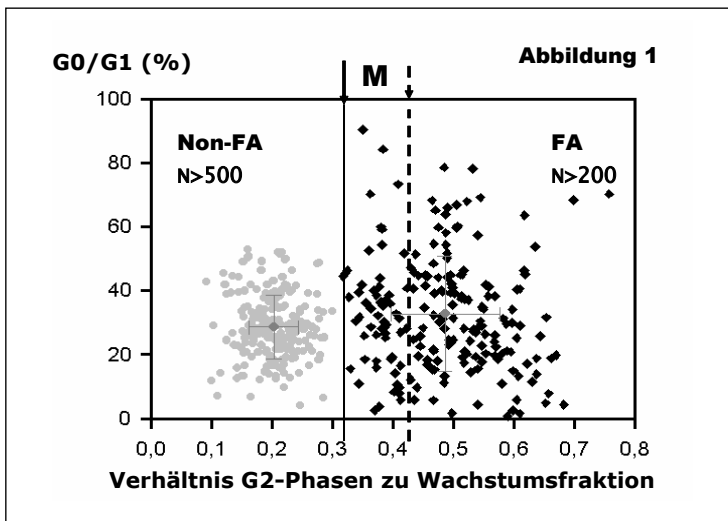
Diesen Wachstumsvorteil erkennt man daran, dass die ursprünglichen FA-Zellen im Verlaufe von mehreren Jahren im peripheren Blut immer mehr ausverdünnt werden, bis nur noch die korrigierten Zellen vorhanden sind. Dieser bei Mosaik-Patienten beobachtete *Wachstumsvorteil* der selbstkorrigierten Zellen spricht dafür, dass auch im Reagenzglas genetisch korrigierte und in den Körper zurückgegebene (Stamm-) Zellen therapeutisch erfolgreich sein können.

Die bei den Mosaik-Patienten beobachtete „natürliche“ Gentherapie ist ein entscheidender Hinweis dafür, dass eine im Reagenzglas durchgeführte „künstliche“ Gentherapie bei FA-Patienten prinzipiell ebenfalls erfolgreich sein könnte.

Wenn ein *komplettes somatisches Mosaik* vorliegt, d. h. wenn alle Zellen des peripheren Blutes nur noch eine statt zwei defekte Kopien eines FA-Gens aufweisen, kann die Diagnose „FA“ nicht mehr durch die Chromosomen- oder Zellzyklus-Untersuchung der peripheren Blutzellen bestätigt werden, da sich diese selbstkorrigierten (nunmehr einfach heterozygoten) Zellen wie völlig normale Zellen verhalten. Sie sind also nicht mehr MMC- oder DEB-überempfindlich, und sie zeigen keine Zellzyklus-Defekte.

Im Falle eines solchen kompletten Mosaiks kann die klinische Verdachtsdiagnose FA nur mit Hilfe der Untersuchung von *Hautfibroblasten* bestätigt werden, da in den Zellen des Hautbindegewebes weiterhin beide Kopien des jeweiligen FA-Gens defekt sind. Hautfibroblasten von Mosaik-Patienten sind daher weiterhin MMC-empfindlich, auch wenn die Blutzellen komplett unempfindlich geworden sind.

Bei der Diagnostik der FA entsteht der Verdacht auf ein Mosaik, wenn sich im peripheren Blut eine Mischung von FA- und selbstkorrigierten Zellen befindet. Bei der Chromosomenanalyse sieht man in solchen Fällen eine Mischung von stark betroffenen Zellen (mit mehr als 10 Brüchen pro Metaphase) und intakten Zellen ohne jegliche Chromosomenbrüche. Bei der Zellzyklus-



analyse entsteht der Verdacht auf eine Mosaik-Bildung, wenn sich das Verhältnis der Summe der G₂-Phasen zur Wachstumsfraktion im Bereich zwischen Normalwerten und typischen FA-Werten bewegt.

Im Beispiel der Abbildung 1 ist der Mosaik-„verdächtige“ Bereich zwischen 0,3 und 0,4 durch ein „M“ gekennzeichnet. Beim Vorliegen eines kompletten Mosaiks verhalten sich die Patienten-Blutzellen jedoch wie die Zellen von gesunden Spendern, d. h. die Werte fallen in den Bereich unter 0,3 und können daher nicht mehr als FA-Zellen erkannt werden.

An die Möglichkeit einer Mosaik-Bildung sollte man denken, wenn folgende Befunde vorliegen:

1. spontane Verbesserung der Blutwerte eines Fanconi-Anämie-Patienten;
2. ein Mischbefund von normalen und FA-typischen Zellen bei der Testung des peripheren Blutes auf Chromosomenbrüchigkeit oder Zellzyklusarrest;
3. Vorhandensein von MMC-resistenten Zellen im peripheren Blut bei weiterhin MMC-empfindlichen Hautfibroblasten;
4. MMC- oder DEB-Resistenz einer B-Zell-derivierten, lymphoblastoiden Zelllinie eines FA-Patienten.

Der Verdacht einer Mosaik-Bildung entsteht also bei einer graduellen Verbesserung der Blut-, Chromosomen- und Zellzykluswerte.

Allerdings muss ein milder Krankheitsverlauf nicht immer auf eine Mosaik-Bildung hinweisen. Wir kennen inzwischen genügend Beispiele von erwachsenen FA-Patienten mit relativ mildem Krankheitsverlauf, die in ihren Blutzellen kein Mosaik, sondern nur typische FA-Zellen aufweisen. Man geht davon aus, dass diese FA-Patienten Mutationen tragen, die nicht zu einem völligen Funktionsverlust des betroffenen FA-Gens führen und daher weniger schwere Auswirkungen haben (sogenannte „milde“ Mutationen).

Um die Mechanismen der Mosaik-Bildung besser zu verstehen, wurden die Blut- und Hautzellen von 5 Mosaik-Patienten durch die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Detlev Schindler (Uni Würzburg) und PD Dr. Helmut Hanenberg (Uni Düsseldorf) untersucht (2). Als Ursache der spontanen Verbesserung der Blut- und Zellzykluswerte konnte die molekulare Selbstkorrektur einer der beiden defekten Genkopien nachgewiesen werden.

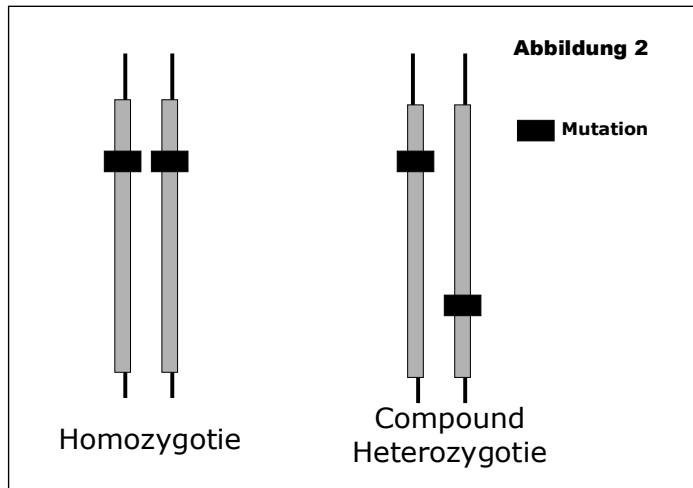
Durch diese Selbstkorrektur wird eine der beiden Genkopien des mutierten FA-Gens wieder in ihrer normalen „Wild-Typ“-Form hergestellt. Alle Tochterzellen der selbstkorrigierten Zelle erhalten eine defekte, aber auch eine intakte Kopie des jeweiligen FA-Gens, was für eine normale Zellfunktion ausreicht. Die einfach heterozygoten Eltern von FA-Patienten sind ja deshalb gesund, weil sie über zumindest *eine* intakte Kopie (= Allel) des jeweiligen FA-Gens verfügen.

Bei *autosomal-rezessiv* vererbten Krankheiten, wie der Fanconi-Anämie, kommt es bekanntlich nur zum Ausbruch der Krankheit, wenn *beide* Kopien eines FA-Gens mutiert und damit defekt sind.

Wenn die krankheitsverursachende Mutation auf beiden Kopien eines FA-Gens identisch ist und sich an der jeweils gleichen Stelle im Gen befindet, spricht man von klassischer „*Homozygotie*“. Wenn sich die krankheitsverursachende Mutation auf den beiden Kopien eines FA-Gens an verschiedenen Stellen befindet, spricht man von „*compound Heterozygotie*“ (vgl. Abb. 2).

In ihrer Auswirkung entspricht die „*compound Heterozygotie*“ der klassischen „*Homozygotie*“, weil *beide* Kopien des jeweiligen Gens defekt sind. Bei einer „*compound Heterozygotie*“ ist die Art der beiden Mutationen oft unterschiedlich. Zum Beispiel findet sich eine Punktmutation (Änderung eines Basenpaares) auf der einen Kopie und eine Deletion (Verlust von Basenpaaren) auf der anderen Kopie des defekten FA-Gens.

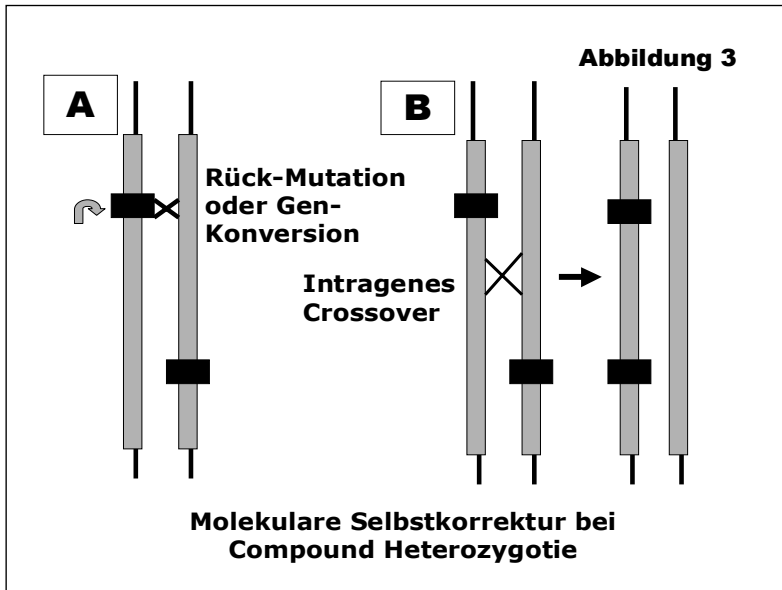
Im Falle der 5 Würzburger FA-Mosaik-Patienten wurde zunächst die jeweilige Komplementationsgruppe mit Hilfe der von Dr. Hanenberg entwickelten viralen Vektoren bestimmt. Dies musste in Hautzellen erfolgen, da das Blut der Patienten bereits eine



Mischung von defekten und korrigierten Zellen enthielt. Ein Patient wurde so der Komplementationsgruppe FA-C zugeordnet, die anderen vier der Komplementationsgruppe FA-A.

Danach wurde die Art der Mutationen in den jeweiligen Genen (*FANCC* und *FANCA*) bestimmt und zwischen Blut- und Hautzellen verglichen. Dabei zeigte es sich, dass in den Hautzellen jeweils 2 Kopien, im überwiegenden Teil der Blutzellen jedoch nur noch eine Kopie des jeweiligen FA-Gens defekt war. Alle Patienten waren in ihren Hautzellen „compound heterozygot“, während zumindest ein Teil der Blutzellen einfache Heterozygotie aufwies. Die zweite, ursprünglich ebenfalls defekte Genkopie hatte sich in einer Vorläufer-Blutzelle offenbar selbst korrigiert.

Als Mechanismus dieser Selbstkorrektur konnte bei dem FA-C-Patienten ein sogenanntes „*intragenes Crossover*“ plausibel gemacht werden, wie es bereits 1997 von der Amsterdamer Gruppe nachgewiesen wurde (1). Bei diesem Vorgang kommt es durch einen Austausch innerhalb des *FANCC*-Gens zu einer Genkopie, welche zwei Mutationen trägt und einer Genkopie ohne jede Mutation (dargestellt in Abbildung 3B). Die resultierenden Zellen sind daher wiederum einfach heterozygot und normal funktionsfähig.



Bei dem Würzburger FA-C-Patienten hatte sich die Selbstkorrektur offensichtlich nur auf eine Vorläuferzelle der *lymphatischen* Zellreihe beschränkt, denn es kam nicht zu einer Verbesserung der übrigen Blutwerte.

Bei den vier Mosaik-Patienten der Komplementationsgruppe FA-A muss die Selbstkorrektur jedoch in einer gemeinsamen Vorläuferzelle („Stammzelle“) *aller* Blutreihen stattgefunden haben, denn nicht nur die Lymphozyten, sondern auch die Erythrozyten, die Granulozyten und die Thrombozyten zeigten im Verlauf von 3 bis 6 Jahren einen deutlichen Anstieg (vgl. Abb. 4).

Die Selbstkorrektur („natürliche Gentherapie“) einer blutbildenden *Stammzelle* wurde zum ersten Mal von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Arleen Auerbach in New York beschrieben (3). Die Tochterzellen von solchen selbstkorrigierten Blutstammzellen erlangen offensichtlich einen *Wachstumsvorteil* gegenüber den nichtkorrigierten Zellen, denn sonst wäre die Zunahme der korrigierten Zellen im peripheren Blut, und damit die deutliche Verbesserung der Blutwerte, nicht zu erklären.

Abbildung 4

**Zeitlicher Verlauf der Verbesserung
der Blutwerte bei einem Mosaik-Patienten**

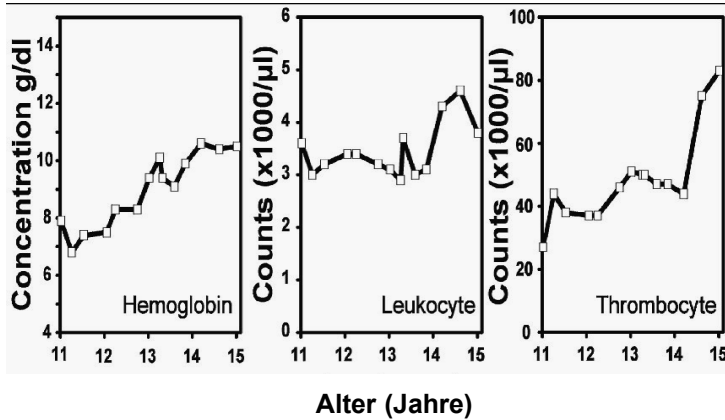
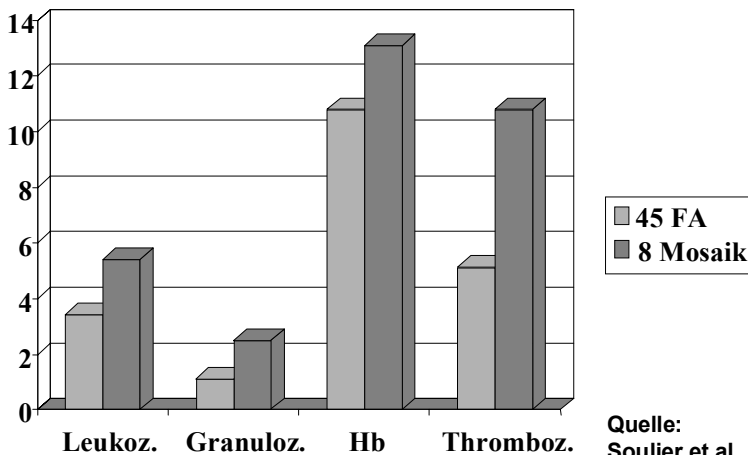


Abbildung 5

**Vergleich der Blutwerte zwischen
8 Mosaik- und 45 Nicht-Mosaik-Patienten**



Quelle:
Soulier et al,
Blood, 2004

Dass es im Verlauf der Mosaik-Bildung zu einer deutlichen Verbesserung der Blutwerte kommt, wird von einer französischen Studie der Gruppe von Prof. Dr. Eliane Gluckman eindrücklich bestätigt. In dieser Studie wurden die Blutwerte von 8 Mosaik-Patienten mit denen von 45 Nicht-Mosaik-Patienten verglichen (4). Wie die Abbildung 5 zeigt, hatte die Gruppe der Mosaik-Patienten signifikant bessere Blutwerte als die Gruppe der Nicht-Mosaik-Patienten.

Bei der Untersuchung des Mechanismus der molekularen Selbstkorrektur der Würzburger FA-A-Mosaik-Patienten ergab sich ein überraschendes Ergebnis: Bei allen vier Patienten hatte sich auf einer Kopie des *FANCA*-Gens die ganz normale „Wild-Typ“-Basenpaarfolge wiederhergestellt (vgl. Abb. 6).

Korrektur der ursprünglichen Mutation durch Genkonversion oder Rückmutation bei 4 FANCA-Patienten **Abbildung 6**

Patient	Ex-on	Krankheitsverursachende Mutation	Reversion = intakte DNA-Sequenz
1	10	A[GGAGTAGTCCTCC]	A[GGAGCAGTCCTCC]
2	10	TA[GGAGGAGTCTCC]	CA[GGAGGAGTCTCC]
3	11	CCC <u>G</u> GGA	CCCT <u>G</u> GA
4	29	<u>C</u> AGCAGG	<u>C</u> GGCAGG

Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Zum einen kann eine sogenannte „Genkonversion“ erfolgt sein, bei der die intakte, homologe Genkopie als Matrize für die Korrektur dient, oder es handelt sich schlicht und einfach um eine *Rückmutation*, d. h. der mutierte DNA-Baustein wurde durch eine weitere Mutation wieder in seinen ursprünglichen Zustand zurückversetzt (vgl. Abb. 3A).

Wie häufig ist Mosaizismus bei Fanconi-Anämie?

Hierzu gibt es mehrere Anhaltspunkte. Zum einen wird die Häufigkeit von MMC-resistenten (und damit revertierten) lymphoblastoiden (B-Zell-)Linien von den meisten Labors zwischen 15 und 30% angegeben. Zum anderen fanden sich in der bereits zitierten französischen Studie (4) unter 53 FA-Betroffenen 8 Mosaik-Patienten (15%). Die Würzburger Zellzyklusdaten (vgl. Abb. 1) weisen ebenfalls darauf hin, dass zumindest jeder fünfte FA-Patient im Laufe seines Lebens ein Mosaik entwickelt. Da FA-A die häufigste Untergruppe ist, gehören auch die meisten der bisher beschriebenen Mosaik-Patienten der Gruppe FA-A an. Darüber hinaus sind jedoch eine Reihe von Mosaik-Patienten der Gruppen FA-C und FA-D2 bekannt.

Wann kann man mit einer molekularen Selbstkorrektur einer der beiden Gen-Kopien eines FA-Gens und damit der Entstehung eines Mosaik-Zustands rechnen?

Ein Faktor, der die Selbstkorrektur begünstigt, ist das Vorliegen einer „compound Heterozygotie“. Denn wenn die jeweiligen Mutationen auf den beiden Kopien eines FA-Gens nicht identisch, sondern verschieden angeordnet sind, können Mechanismen wie intragenes Crossover oder Genkonversion ihre heilende Wirkung entfalten (vgl. Abb. 3). Compound Heterozygotie findet man vor allem bei Patienten, die zu den Fanconi-Anämie-Komplementationsgruppen A, C, D1 und D2 gehören.

Die Amsterdamer Gruppe von Prof. Joenje hat jedoch bereits 1999 gezeigt, dass es auch bei klassisch homozygoten Patienten zumindest zu einer teilweisen Selbstkorrektur kommen kann, und zwar durch den Mechanismus einer „kompensatorischen“ Zweit-Mutation, welche die Wirkung der ursprünglichen, krankheitsverursachenden Mutation auf einer der beiden Genkopien zumindest teilweise aufhebt (5).

Insgesamt kann man sagen, dass die genetische Instabilität von FA-Zellen, die leider ein Risikofaktor für das Versagen des Knochenmarks sowie für die Entstehung von Leukämien und Tumoren

ist, auf der anderen Seite auch die molekulare Selbstkorrektur und damit die Mosaik-Entstehung begünstigen kann. Falls die molekulare Selbstkorrektur eine Stammzelle des Knochenmarks betrifft, kommt es im Verlauf von mehreren Jahren zu einer deutlichen Verbesserung der Blutwerte als Ausdruck eines Wachstumsvorteils der genetisch korrigierten Blutzellen (1, 2, 4). Es erscheint jedoch sehr schwierig, die Chancen der Mosaik-Bildung z. B. durch Medikamenteneinsatz gezielt zu erhöhen ohne dabei gleichzeitig das Leukämie- und Krebsrisiko zu erhöhen.

Es ist noch unbekannt, ob die Nachkommenschaft einer einzigen, selbstkorrigierten Knochenmarkstammzelle ausreicht, um für lebenslangen Nachschub an intakten Blutzellen zu sorgen. Theoretisch ist dies zwar zu erwarten, aber eine definitive Beantwortung dieser Frage wird erst nach einer Langzeitbeobachtung von einer größeren Zahl von Mosaik-Patienten möglich sein. Der Würzburger Arbeitsgruppe sind inzwischen 2 Mosaik-Patienten bekannt, bei denen sich die jahrelange Verbesserung der Blutwerte wieder abgeschwächt hat. Entgegen der theoretischen Erwartungen könnte es also sein, dass eine einzige selbstkorrigierte Blutstammzelle nicht ausreicht, um den Körper lebenslang mit Blutzellen zu versorgen.

Ein weiterer problematischer Aspekt der Mosaik-Bildung betrifft die Knochenmarkstransplantation. Da sich im Blut von Mosaik-Patienten sowohl korrigierte als auch ursprüngliche FA-Zellen befinden, reicht eine niedrig dosierte Cyclophosphamid-Gabe zwar aus, um die FA-Zellen auszuschalten, während die selbstkorrigierten Zellen gegenüber der Konditionierung sehr viel weniger empfindlich sind und daher überleben. Dies kann nach der Transplantation zu Komplikationen führen. Vor jeder geplanten Transplantation sollte daher ein möglicher Mosaik-Status des Patienten überprüft werden.

Literaturhinweise:

1. Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Verman AJP, van Weel M, Pauli RM, Shahidi NT, Dokal I, Roberts I, Altay C, Gluckman E, Gibson RA, Mathews CG, Arwert F, Joenje H: Somatic mosaicism in Fanconi Anemia: Molecular basis and clinical significance. *European Journal of Human Genetics* 5:137-148 (1997)

2. Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H: Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenetic and Genome Research* 98:126-135 (2002)
3. Gregory JJ, Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD: Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 98:319-329 (2001)
4. Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, Esperou H, Jubert C, Feugeas JP, Henri A, Toubert A, Socie G, Baruchel A, Sigaux F, D'Andrea AD, Gluckman E: Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi Anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood*, September 21, 2004
5. Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CG, Hoatlin M, Lanzano L, Gibson RA, Arwert F, Savoia A, Mathew CG, Pronk J, Joenje H: Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi anemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nature Genetics* 22:379-383 (1999)

