



**UNIVERSITÄTS
KLINIKUM** **FREIBURG**

ZKJ ZENTRUM FÜR KINDER-
UND JUGENDMEDIZIN

Diamond-Blackfan Anämie, TEIL 1: Genetik und Pathophysiologie

Marcin Wlodarski

Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

Hämatologie Heute,
Ulm, 19. April 2013

LOUIS DIAMOND

1902 - 1999



Erfolge:

Nabelvenenkatheterisierung

DBA (1938)

Schwachman-Diamond Syndrom

Gardner-Diamond Syndrom

(Psychogene Purpura)

Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference BJH, (2008): 142(6): 859-76

Diagnostischen Kriterien der „klassischen“ DBA (Diamond et al, 1976) alle 4 müssen erfüllt sein:

- Alter < 1 Jahr
- Makrozytäre Anämie ohne weitere signifikante Zytopenien
- 3x** • Retikulozytopenie
- Fehlende/ reduzierte erythropoet. Vorläufer in einem normozellulärem KM

2x

Diagnose stützende Kriterien

Major

- Genmutationen beschrieben in klassischen DBA Fällen (~55%)
- Positive Familienanamnese (~30-45%)

Minor

- Erhöhte e-ADA (~80% of cases)
- Erhöhtes Hb F

3x

- Kongenitale Anomalien beschrieben in klassischer DBA (~40%)
- Andere IBMF ausgeschlossen

3x

Wahrscheinliche Dx

Diamond Blackfan Anämie (DBA): klinische Fakten



- **Kongenitales Syndrom mit Knochenmarkversagen**
Prävalenz ~5-7 Fälle/ Million Lebendgeburten
M=W, Ethnien-unabhängig
- 95% der Fälle vor dem 2. Lebensjahr diagnostiziert
- Labormarker: eADA und HbF (in ca. 75-90% erhöht)
- Gutes Ansprechen auf Steroidtherapie (initial bis $\frac{3}{4}$ aller Patienten)
- **Hypoplastische Anämie**
(Ausreifungsarrest von erythropoietischen Vorläuferzellen)
- **Angeborene Fehlbildungen** in 50-60% der Patienten:
kraniofazial, kardial, urogenital, skelettal, SGA
- Klinische Heterogenität, Inkomplette Penetranz, silenter Phänotyp



PATHOPHYSIOLOGIE

GENETIK 1: Mutationen

GENETIK 2: Mikrodeletionen

VERERBUNGSMODI BEI DBA

GENOTYP-PHÄNOTYP KORRELATION

FUNKTIONELLE/DIAGNOSTISCHE TESTS

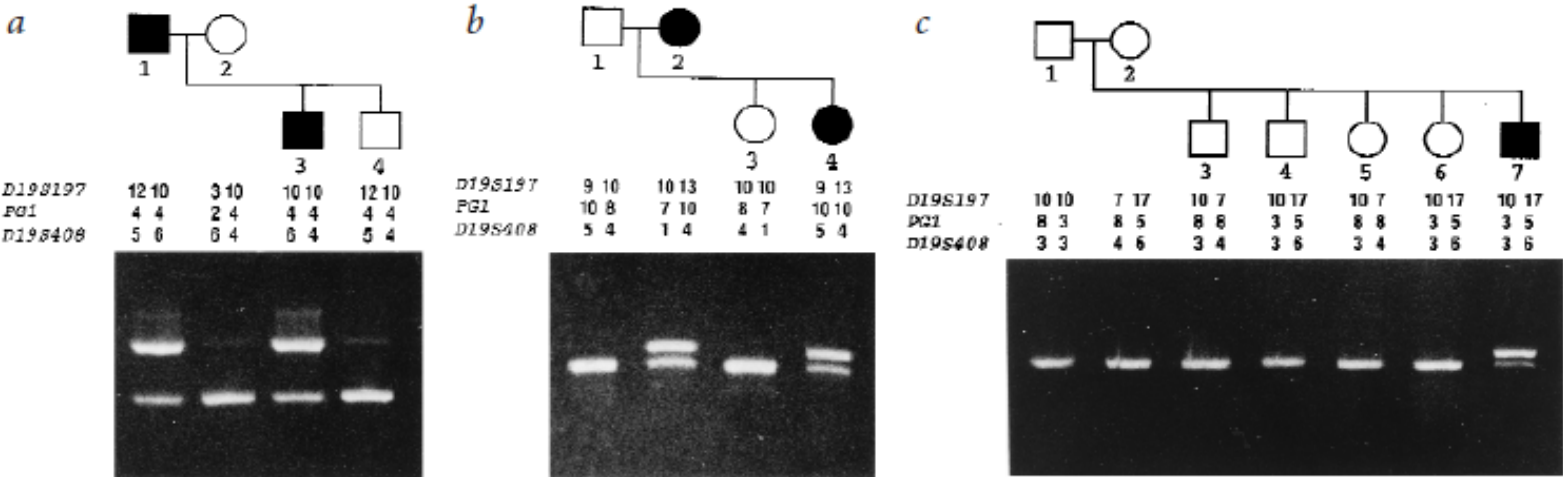
 © 1999 Nature America Inc. • <http://genetics.nature.com>

The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia

Natalia Draptchinskaia^{1*}, Peter Gustavsson^{1*}, Björn Andersson², Monica Pettersson³, Thiébaud-Noël Willig^{4,5}, Irma Dianzani⁶, Sarah Ball⁷, Gil Tchernia^{4,5}, Joakim Klar¹, Hans Matsson¹, Dimitri Tentler¹, Narla Mohandas⁴, Birgit Carlsson¹ & Niklas Dahl¹

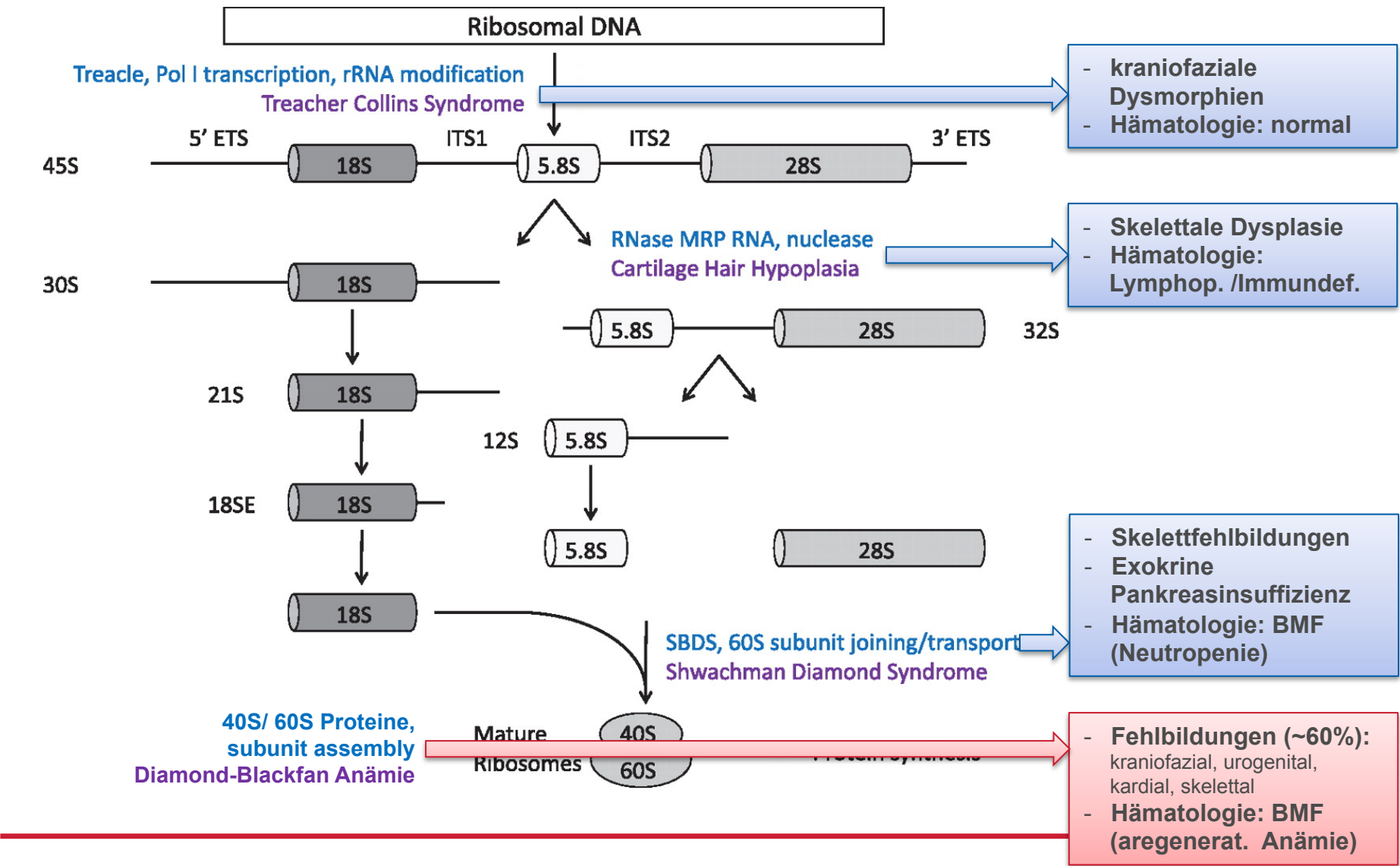
nature genetics • volume 21 • february 1999

Translokation Chr. x / Chr. 19 -> RPS19
RPS19 mutiert bei 25% aller DBA Patienten -> Ribosomenproblem

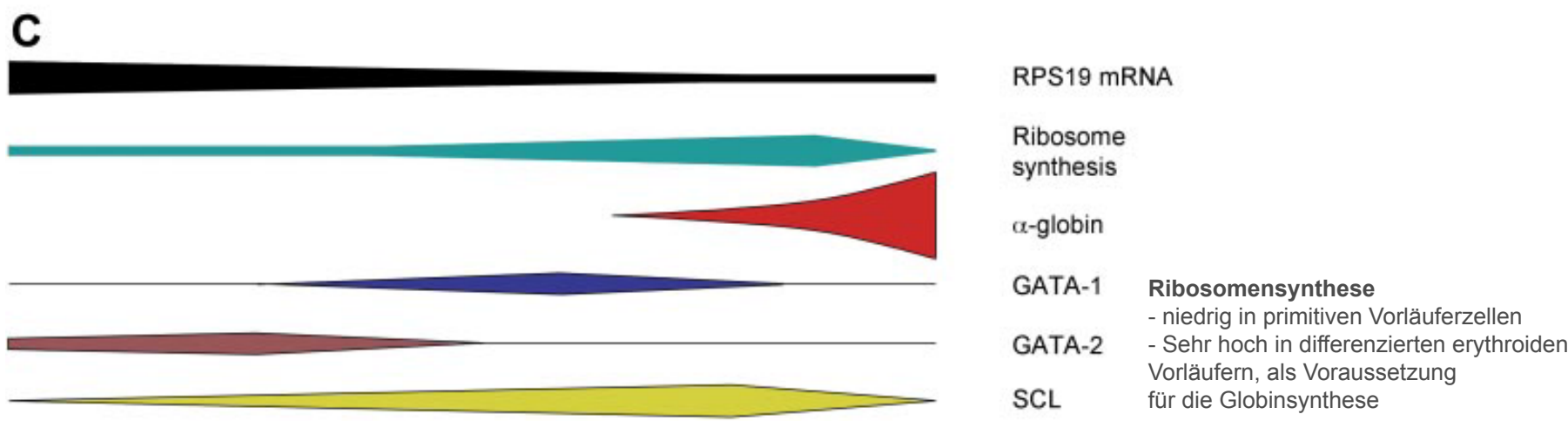
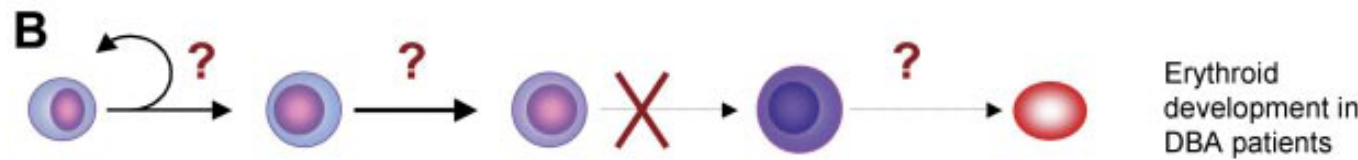
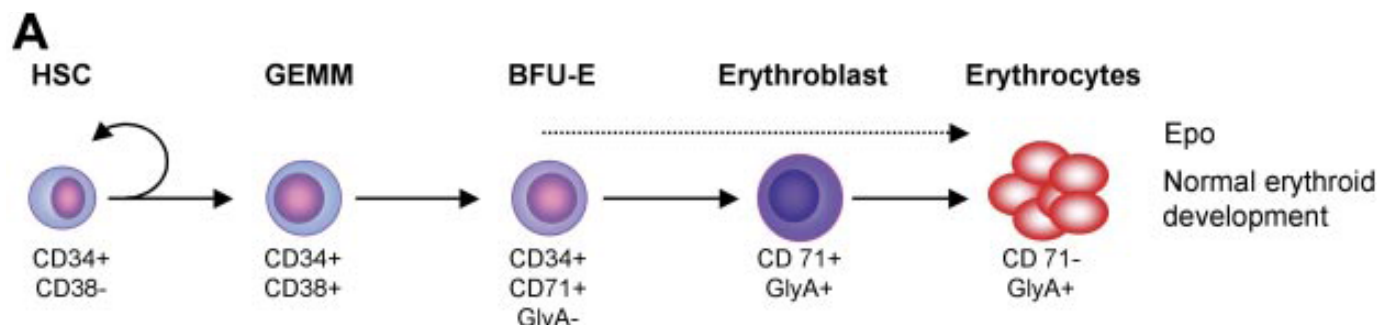


Was ist eine Ribosomopathie?

modifiziert nach: Narla A , and Ebert B, Blood 2010



Warum Anämie? Ausreifungsstop der Erythropoese





PATHOPHYSIOLOGIE

GENETIK 1: Mutationen

GENETIK 2: Mikrodeletionen

VERERBUNGSMODI BEI DBA

GENOTYP-PHÄNOTYP KORRELATION

FUNKTIONELLE/DIAGNOSTISCHE TESTS

DBA-assozierte RP-Gene: Chronologie

RP Genkomplex: Evolutionär sehr alt: 80 funktionelle RP Gene, > 2000 Pseudogene

47 Ribosomale Proteine
RPL = large



33 Ribosomale Proteine
RPS = small

RPL35a

RPL19

1999-2008

2009

RPL5

RPL9

2010

RPL11

RPL26

RPS19

RPS26

RPS24

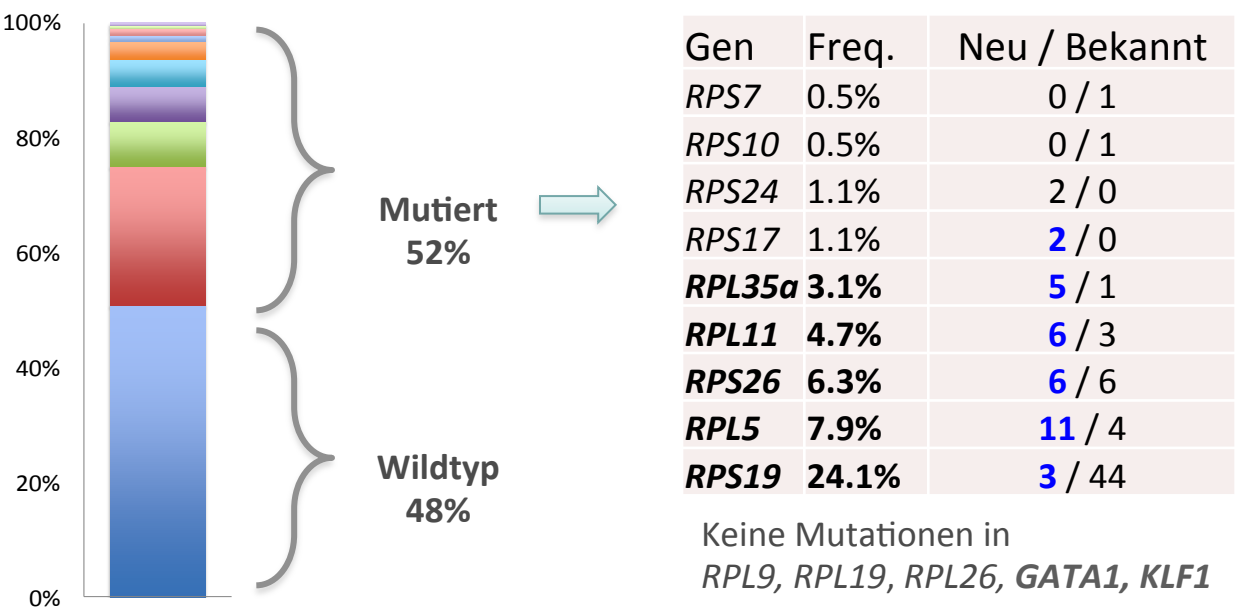
RPS7

RPS17

RPS10

DBA-GPOH Studie: RP-Genmutationen

- Register geführt seit Jahr 2000 in Freiburg (Dt. Österreich, Schweiz)
2013: **244 Patienten** registriert (USA > 800, Paris ~250)
- 186 Patienten sequenziert für 12 bekannte RP-Gene
- **96 Patienten (52%): Mutationen** in 9 RP Genen gefunden
- **90 Patienten (48%): Keine Mutationen** in 12 RP Genen

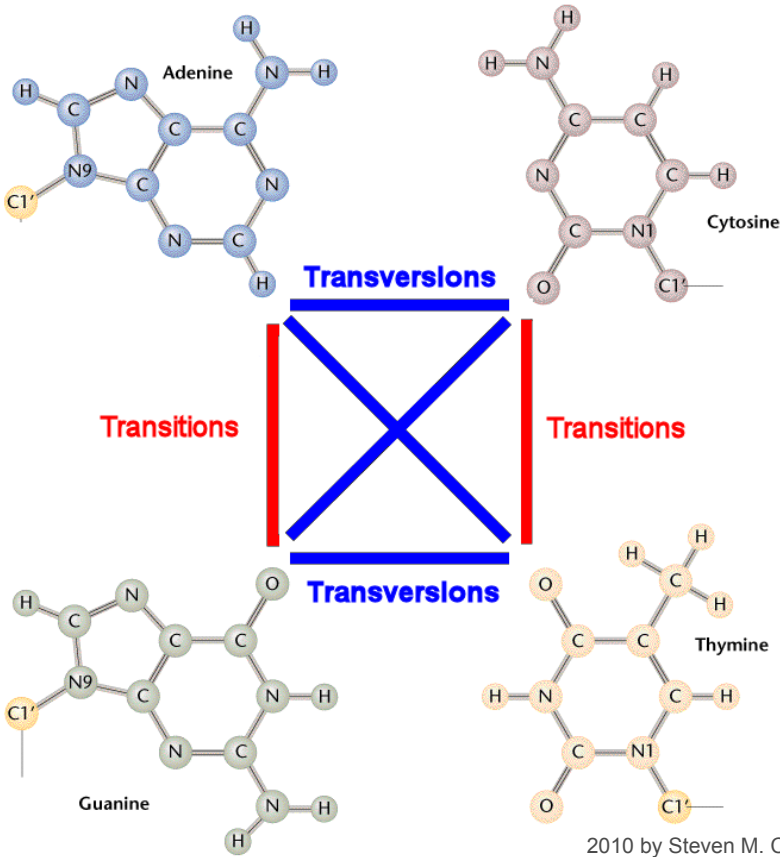


Arten von RP-Genmutationen

Gene	Transition	Transvers
<i>RPS19</i>	25	3
<i>RPL5</i>	4	4
<i>RPS26</i>	7	2
<i>RPL11</i>	0	2
<i>RPL35a</i>	1	3
<i>RPS17</i>	0	0
<i>RPS24</i>	0	1
<i>RPS10</i>	1	0
<i>RPS7</i>	0	1
TOTAL	38	16

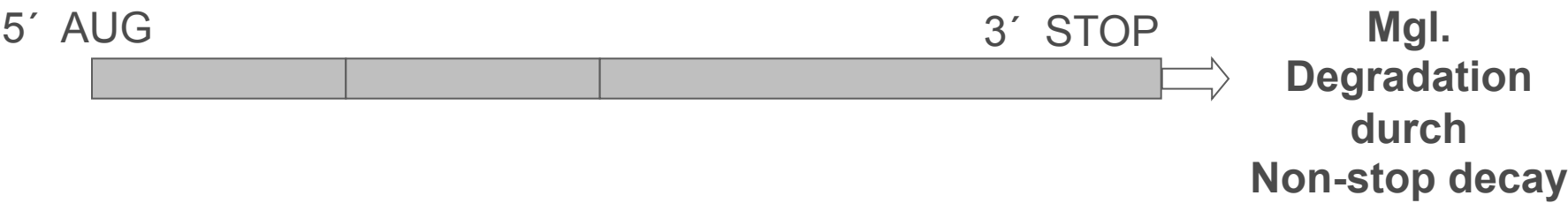
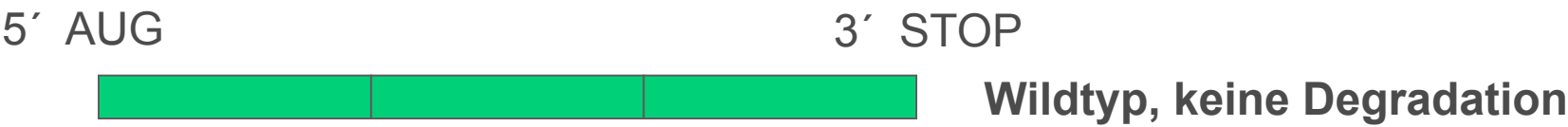


1. Transitionen vs. Transversionen



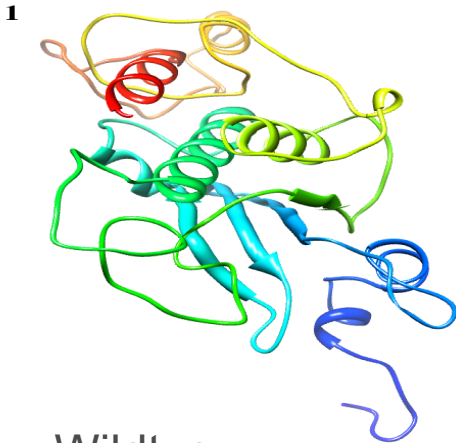
Wie erwartet, die meisten Veränderungen sind:
Transitionen und Indels (Deletionen häufiger)

Frameshift-Mutationen in DBA

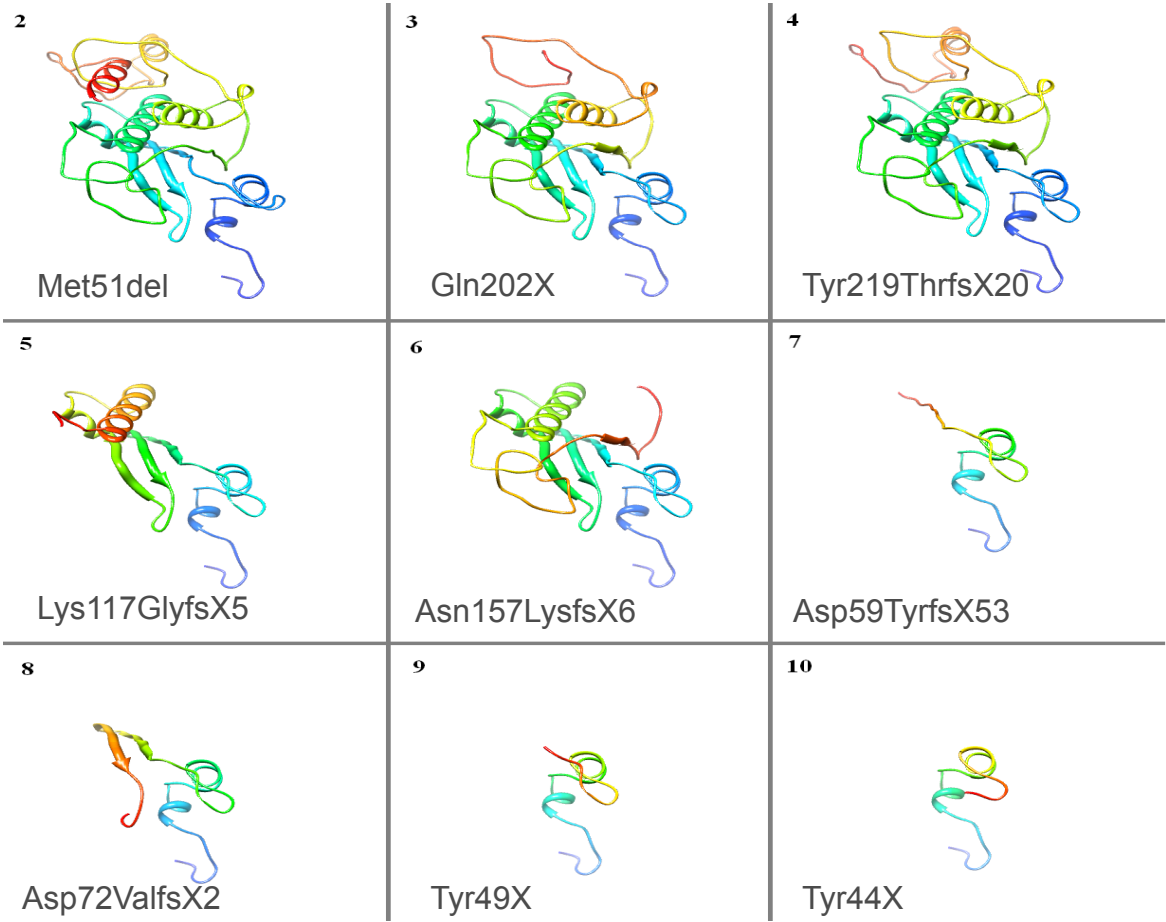


*RNA degradation in DBA:
Andrew Chatr, Human Mutation 2004*

Auswirkung der Mutationen auf Protein-Struktur



Wildtyp
Tyr210Cys
Ala218 Ser



in silico 3 D modeling



PATHOPHYSIOLOGIE

GENETIK 1: Mutationen

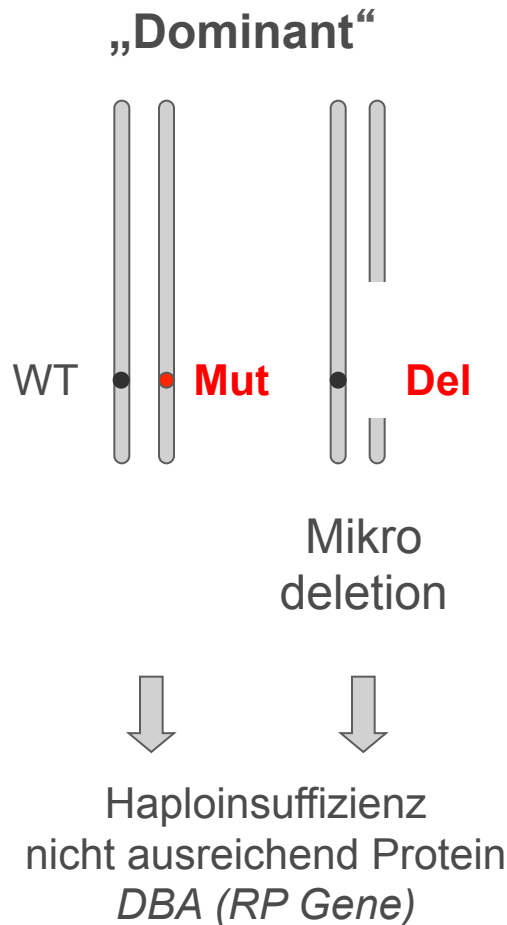
GENETIK 2: Mikrodeletionen

VERERBUNGSMODI BEI DBA

GENOTYP-PHÄNOTYP KORRELATION

FUNKTIONELLE/DIAGNOSTISCHE TESTS

Mechanismen der Haploinsuffizienz

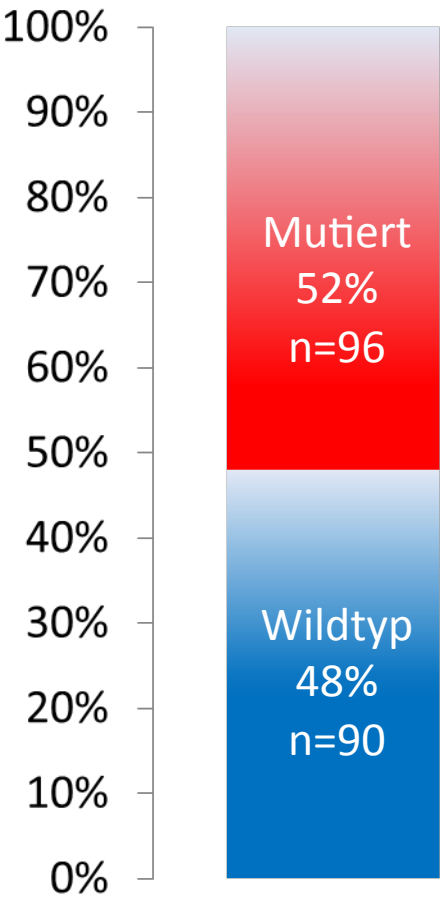


Haploinsuffizienz ist der Hauptmechanismus der Pathogenese von autosomal dominanten Erkrankungen

FRAGESTELLUNG:

Kommen Deletionen gesamter Gene (nicht sichtbar mit Sequenzierung) auch bei DBA vor?

Ganzgenom-Analyse: große Mikroteletionen



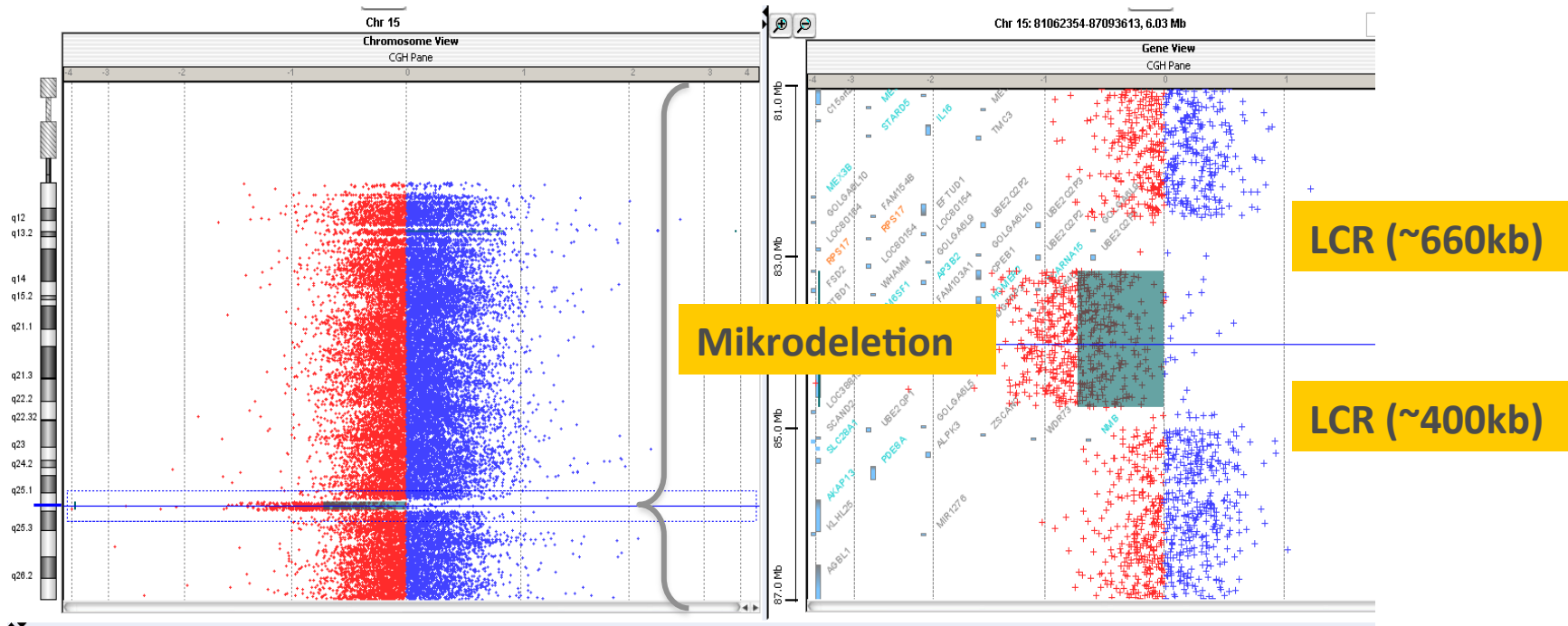
SNP Array Affymetrix 6.0
~ 2 Millionen Marker

36 Patienten untersucht
Bias: mehr Patienten mit Fehlbildungen

11 / 36 Patienten:
monoallelische Mikroteletionen,
RP-Gene betroffen

Bestätigung der Gendeletionen mittels HR-CGH

- In 3 Patienten mit RPS17-Mikrodeletion (Chr. 15):



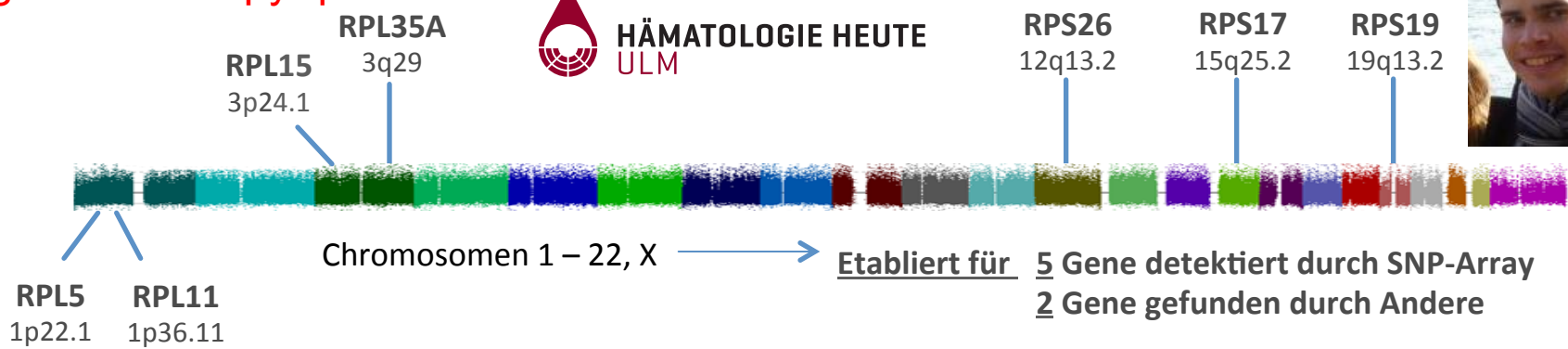
- Mikrodeletionen nicht zufällig -> lokalisiert zwischen Regionen mit low copy repeats (LCR)/ segmentalen Duplikationen (instabile Genombereiche, begünstigen Bildung von Doppelstrangbrüchen durch NHAR)

Systematische Suche nach Gendeletionen

Targeted Gencopy qPCR:



HÄMATOLOGIE HEUTE
ULM



Validierung der SNP-Genomarrays mittels qPCR:

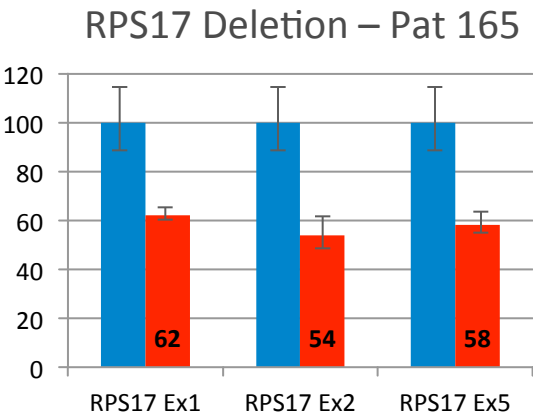
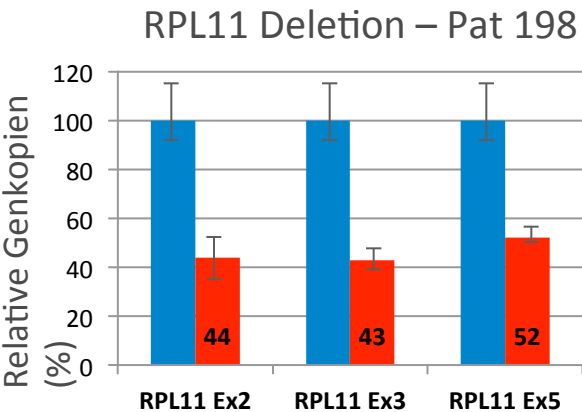


Systematische Suche nach Gendelektionen

Untersuchung von 80 Patienten ohne Mutation / Deletion

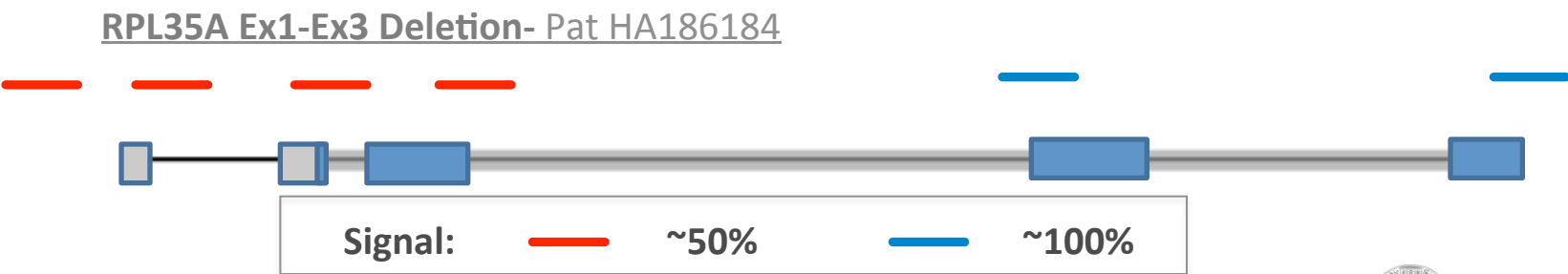


Deletionen gesamter Gene (n=6)



Blau: Mittelwert gesunde Referenz (n= 5 - 10) Rot: Patienten

Intragenische Deletionen (n=3)



Zusammenfassung: Mutationen und Mikrodeletionen

n= 186
Index patients subjected
to mutational analysis

→

**MUTATIONS
(n=96):
52%**

Gene	Patients	Reported Mutations	Novel Mutations
<i>RPS19</i>	47 (24.1%)	44	3
<i>RPL5</i>	15 (7.9%)	4	11
<i>RPS26</i>	13 (6.9%)	6	7
<i>RPL11</i>	9 (4.7%)	6	7
<i>RPL35a</i>	6 (3.1%)	1	5
<i>RPS17</i>	2 (1.1%)	0	2
<i>RPS24</i>	2 (1.1%)	0	2
<i>RPS10</i>	1 (0.5%)	1	0
<i>RPS7</i>	1 (0.5%)	1	0

No mutations in *RPL9*, *RPL19*, *RPL26*, *GATA1* and *KLF1*

n= 90
Mutation negative
patients: analysis by SNP
arrays and qPCR

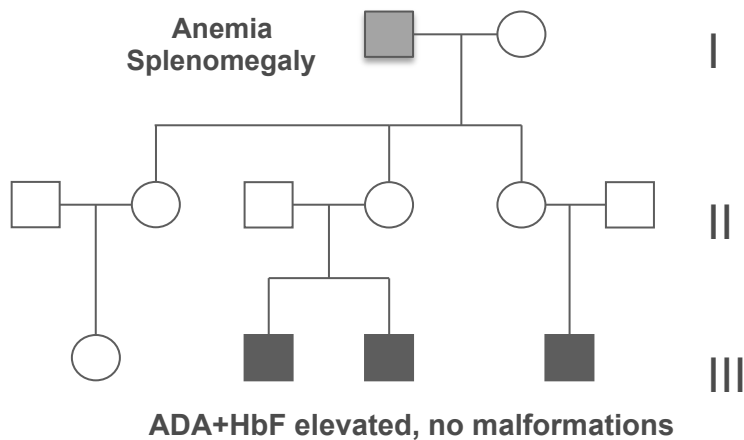
→

**DELETIONS
(n=20):
11%**

Gene	Number of pts with deletions
<i>RPS17</i>	6
<i>RPL5</i>	5
<i>RPS19</i>	3
<i>RPL11</i>	3
<i>RPL35a</i>	3

What next?

- Whole Exome Sequenzierung: **schwierig** bei autosomal dominanten Erbgängen mit inkompletter Penetranz
- WES - Bisher wenig Erfolg: Einzelfälle mit wenigen seltenen mutierten RP-Genen (Exome Seq, ASH 2012, 2 Gruppen: Mutationen in 3 RP Genen) - unklar ob private Polymorphismen
- Andere genetische Mechanismen? z.b. lncRNA...
- Alternative NGS Methoden gefordert: Transkriptom/ WGS



X-Chromosomale RP-Gene:

RPSx4

RPL39

RPL10

RPL36a

NEGATIV



PATHOPHYSIOLOGIE

GENETIK 1: Mutationen

GENETIK 2: Mikrodeletionen

VERERBUNGSMODI BEI DBA

GENOTYP-PHÄNOTYP KORRELATION

FUNKTIONELLE / DIAGNOSTISCHE TESTS

Mutationen und familiäre Vererbung

68 Familientrios untersucht, unabhängig vom Elternphänotyp:

1. MUTATIONEN vererbt:



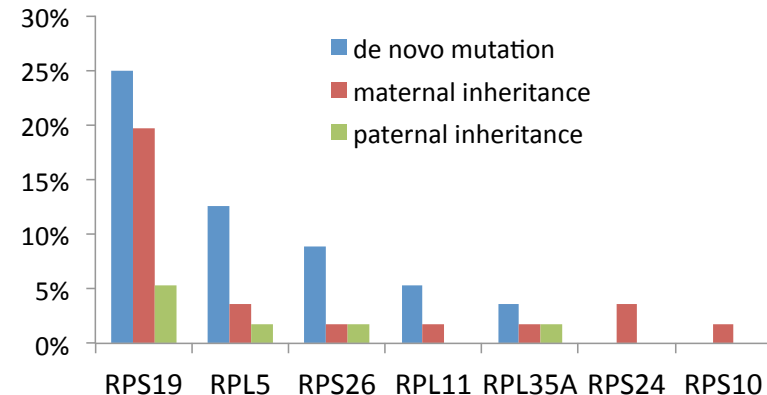
34% von der Mutter

11% vom Vater

55% de novo



keine Gen-Korrelation:



Jessica Mötter

2. DELETIONEN vererbt:

1/10: Vater und Sohn mit Mikrodeletion haben beide DBA-Phänotyp

9/10 Familien: DE NOVO

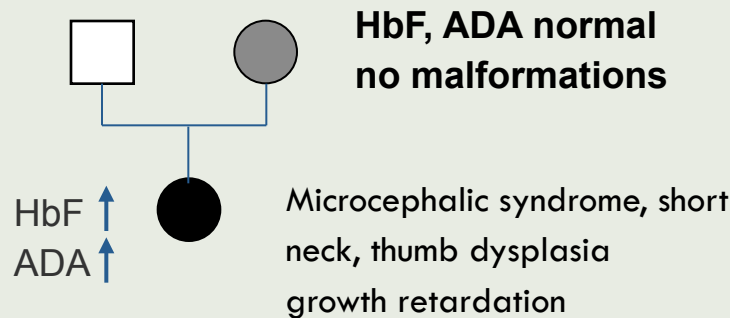
Silenter Phänotyp / inkomplette Penetranz



HÄMATOLOGIE HEUTE
ULM

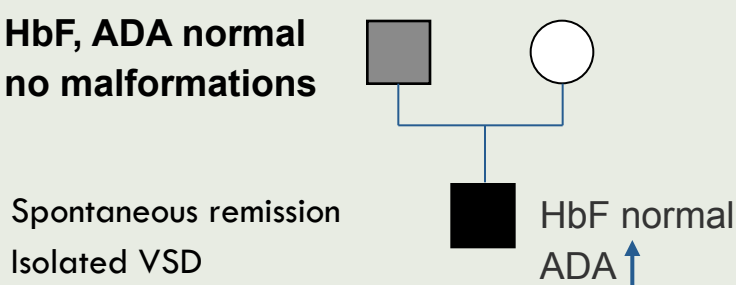
RPL5, Ex6:

c.625C>T (p.R209C), novel



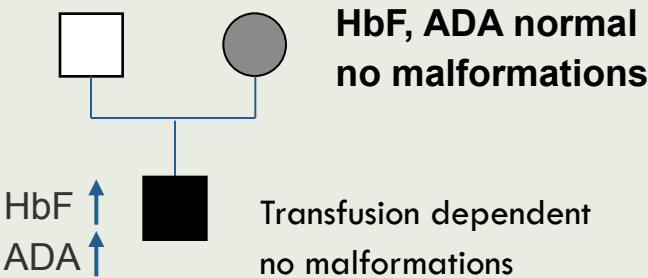
RPL5, Ex1:

c.3+3G>C (splice site), previously reported



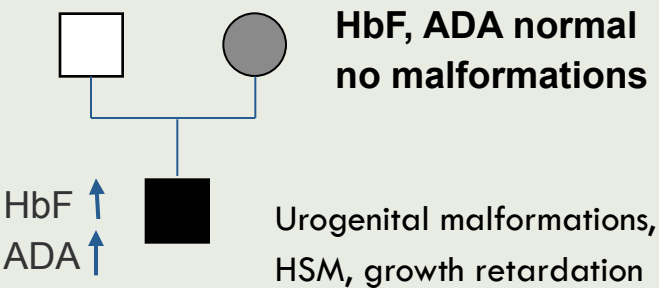
RPS10, Ex2:

c.71A>G(p.K24R), reported as mutation of unknown significance (Patient is WT for other RP genes)



RPS24, Ex 3:

c.210_211insAACT (p.G71NfsX8), novel



Genetische Antizipation?

Auswertung klinischer Daten von Indexpatienten
und deren Eltern, die ebenfalls Mutationsträger sind:

	Pat. in Remission und silente Träger	Körperliche Fehlbildungen
Patienten	1/25 (4%)	17/21 (81%)
Eltern	21/25 (84%)	5/21 (24%)
(P-Wert)	(<.001)	(<.001)



Statistische Antizipation (klinische Bias)



PATHOPHYSIOLOGIE

GENETIK 1: Mutationen

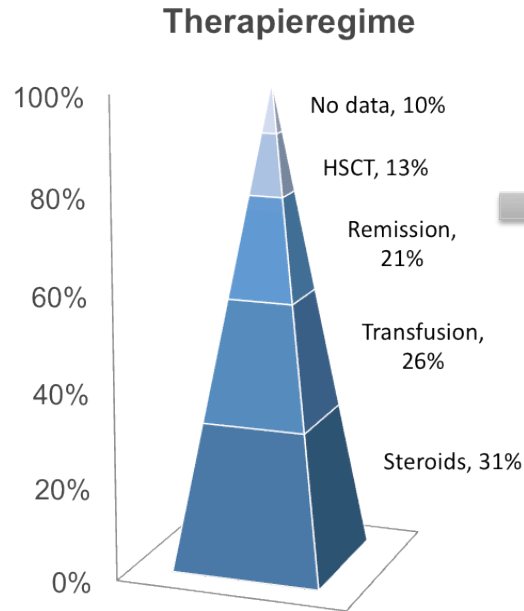
GENETIK 2: Mikrodeletionen

VERERBUNGSMODI BEI DBA

GENOTYP-PHÄNOTYP KORRELATION

FUNKTIONELLE / DIAGNOSTISCHE TESTS

Mutationen und klinischer Phänotyp



Hämatologie:

Bisher keine Korrelation (Thr, ANC),
Therapieansprechen mit Mutationsgruppe

Fehlbildungen:

- **Gaumenspalte** nur bei Patienten mit **RPL5 /RPL11** Mutationen ($p= 0.007$), wie bei Gazda 2008
- **Wachstumsretardierung** bei 60% **RPL5-** vs. 8% **RPS19-** Patienten ($p= 0.008$)

Mikrodeletion: 15q25.2 nicht selten (6/20, 30%)

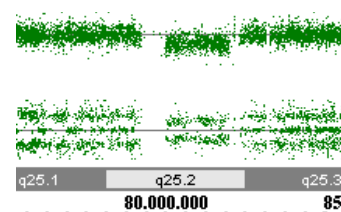
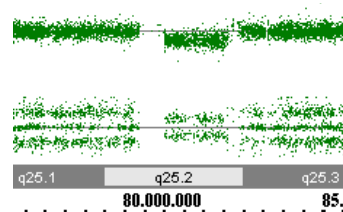
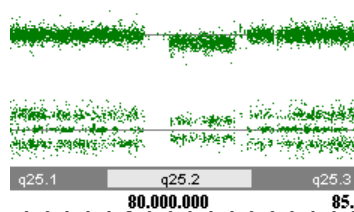
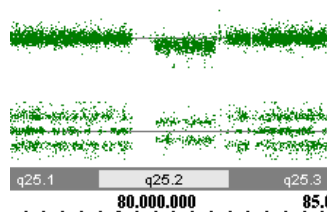
2,2Mb del15q25.2 (*RPS17*):

DBA 011

DBA 024

DBA 068

DBA 265



DBA-Mikrodeletionssyndrom?

(Wat et al, J Med Genet 2010: Recurrent microdeletions of 15q25.2 are associated with increased risk of congenital diaphragmatic hernia, cognitive deficits...

- 5 DBA patients (+1 qPCR) with recurrent 2,8Mb del on Chr. 15q25.2, between 2 LCR regions (breakpoints)
- 16 Genes contained (including both copies of *RPS17*)
- Several genes implicated in the development of a phenotype with nonhematologic symptoms (**soft tissue defects/ Hernia**), and **cognitive deficits**
- *RPS17* deletions recently reported in DBA pts. by Farrar et al

Mikrodeletionen und klinischer Phänotyp

Pt / sex	Region	RP Gene	Anomalies
126 / f	Chr1p36.11	<i>RPL11</i>	Head (Pierre-Robin), heart, skelettal
072 / f	Chr3q29	<i>RPL35a</i>	CNS, GIT, skelettal
P20 / f	Chr3q29	<i>RPL35a</i>	Heart, severe neutropenia, 10% blasts
280 / f	Chr1p22.1	<i>RPL5</i>	CNS, Heart, SGA
224 / f	Chr1p22.1	<i>RPL5</i>	Head (Pierre-Robin), cognitive deficits, SGA
282 / m	Chr1p22.1	<i>RPL5</i>	Head (ears), SGA
068 / m	Chr15q25.2	<i>RPS17</i>	Cognitive deficits, cryptorchidism, heart
265 / m	Chr15q25.2	<i>RPS17</i>	Seizures
011 / m	Chr15q25.2	<i>RPS17</i>	Bilateral inguinal hernia
024 / f	Chr15q25.2	<i>RPS17</i>	Head, polysplenia, skelettal

94% aller Mikrodeletionspatienten haben Fehlbildungen oder kognitive Einschränkungen
(vs. ~60% der Mutationspatienten)

Effekt der Haploinsuffizienz der benachbarten Gene: (Contiguous Gene Syndrome)?



HÄMATOLOGIE HEUTE
ULM

Patienten ohne bekannte Genveränderung (~37%)



HÄMATOLOGIE HEUTE
ULM

Variable	Mut/ Del+ (n=116)	Negative patients (n=70)
Age at diagnosis	0.3 years	0.7 years
Increased HbF/ADA	73%	75%
<i>Physical anomalies in evaluable patients:</i>		
Heart	37.5%	26.5%
Urogenital	6.7%	8.8%
Thumb	11.5%	5.9%
SGA	17.0%	10.5%
Craniofacial	39.4%	35.3%
<i>Treatment modalities in evaluable patients:</i>		
Transfusion	37.4%	23.3%
Steroids	34.3%	35.7%
HSCT	13.1%	8.9%
Remission	15.2%	32.1%

- Spontanremission höher in Patienten ohne bekannte Genveränderung: (32.1% vs. 15.2%, $p < 0.05$)
- Andere Gene (non-RP Gene) involviert?



PATHOPHYSIOLOGIE

GENETIK 1: Mutationen

GENETIK 2: Mikrodeletionen

VERERBUNGSMODI BEI DBA

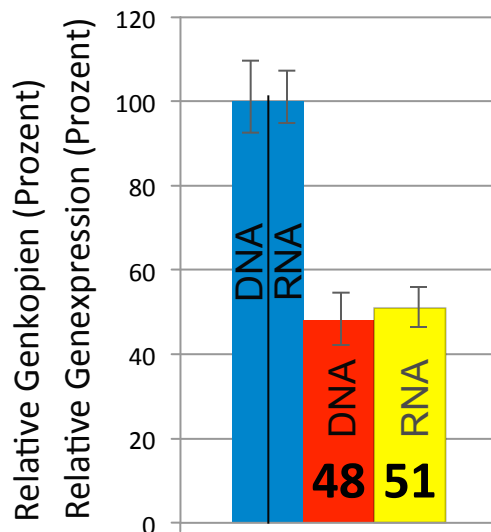
GENOTYP-PHÄNOTYP KORRELATION

FUNKTIONELLE /DIAGNOSTISCHE TESTS

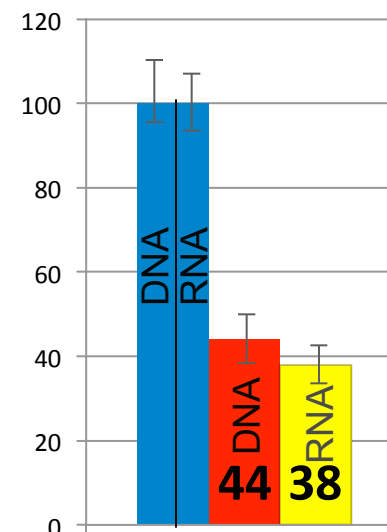
Erniedrigte RP RNA-Expression als Ausdruck der Haploinsuffizienz

- Bestätigung der Haploinsuffizienz auf **RNA-Level (RPL5, RPL35a)**

RPL5 Deletion – DBA224



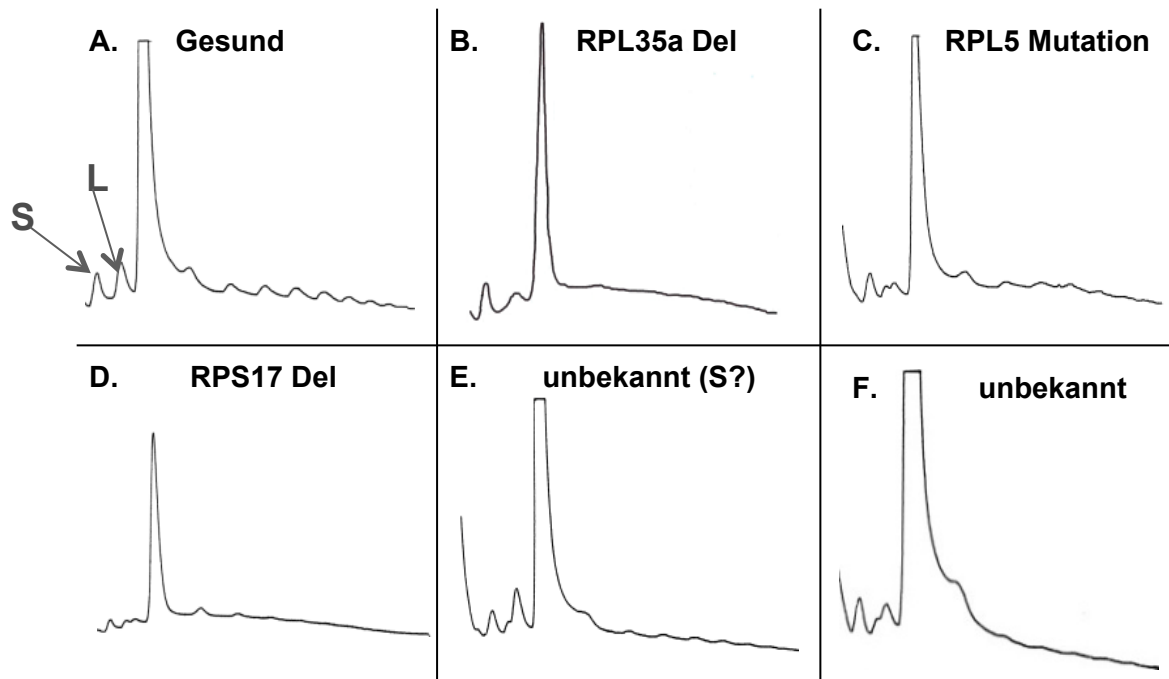
RPL35a Deletion – 202456



Blau: Mittelwert Kontrollen Rot: gDNA (4) Gelb: Taqman RNA (3)

Bestätigung des intraribosomalen Defekts

- Polysomenprofiling: funktionelle Validierung auf Ebene der Ribosomen
- EBV-immortalisierte Patientenzelllinien von DBA Patienten
- Sucrose-Gradient nach Ultrazentrifugation
- **Polysomenprofiling** als Bestätigung der Haploinsuffizienz



Ziel: Etablierung als diagnostischer Test (Entscheidungshilfe für Mutationsanalysen, Supportiver Test wie eADA?)

2013 Empfehlung

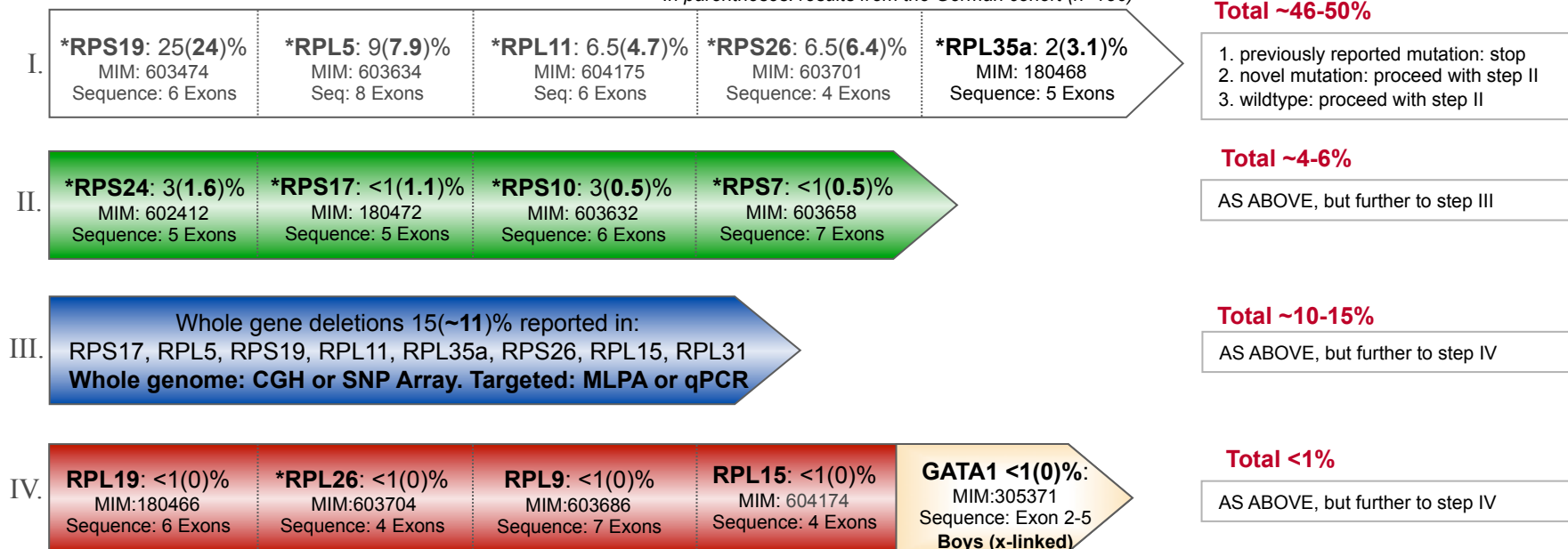
Genetische Diagnostik bei DBA

- ~50-55% have heterozygous mutations (~ 50-60% *de novo*), silent carriers
- ~10-15% heterozygous whole gene deletions (almost all *de novo*)

SEQUENTIAL MUTATION AND DELETION SCREENING:

Setup EBV-line for polysome profiling

In parentheses: results from the German cohort (n=186)



Novel reported at ASH 2012: RPS27, RPS29 and RPL27 <1%

Zusammenfassung

- Mutationen:** - 96 (**52%**) Patienten, in 9 RP-Genen, **45% vererbt**
- keine Mutationen in GATA1
- Deletionen:** - 20 (**10%**) Patienten, in 5 RP-Genen, **10% vererbt**
- Fehlbildungen häufiger
- Unbekannt:** - 72 (**38%**) Patienten ohne bekannte Ursache,
mehr spontane Remissionen

Weitere Ziele (im Rahmen von ERA-NET Projekt EURO-DBA)

1. Polysomenprofiling aller Negativpatienten:

Suche nach neuen unbekannten ribosomalen Defekten

(ribosomal vs. extraribosomal), Etablierung als diagnostischer Test

2. Whole Transcriptome / Genome Sequenzierung der Familien ohne bekannten Gendefekt



VIELEN DANK!

S. Hirabayashi
Postdoc

S. Urbaniak
BTA

G. Ruzaike
BSc

V. Pastor
BSc

T. Farkas
cand med

Behandelnde Ärzte

Ch. Kratz, Hannover
G. Strauss, Berlin
T. Simon, Köln
S. Eber, München
G. Escherich, R. Grosse, Hamburg
H. Müller, Oldenburg
UND VIELE WEITERE...

Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Uniklinik Freiburg:

Charlotte Niemeyer
Jörg Meerpohl
Friedrich Kapp
Ina Hainmann

Alexandra Fischer
Mutlu Kartal
Brigitte Strahm
Udo Kontny
Annamaria Cseh
Christian Flotho
Ayami Yoshimi
Thomas Vraetz
Jochen Rößler
Miriam Erlacher
Miriam Van Buiren

ALLEN PATIENTEN UND IHREN FAMILIEN

Utrecht Hubrecht Institute
Alyson MacInnes

Pädiatrische Genetik, Uniklinik Freiburg
Ekkehart Lausch (AG Zabel)

Förderung:

