



**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

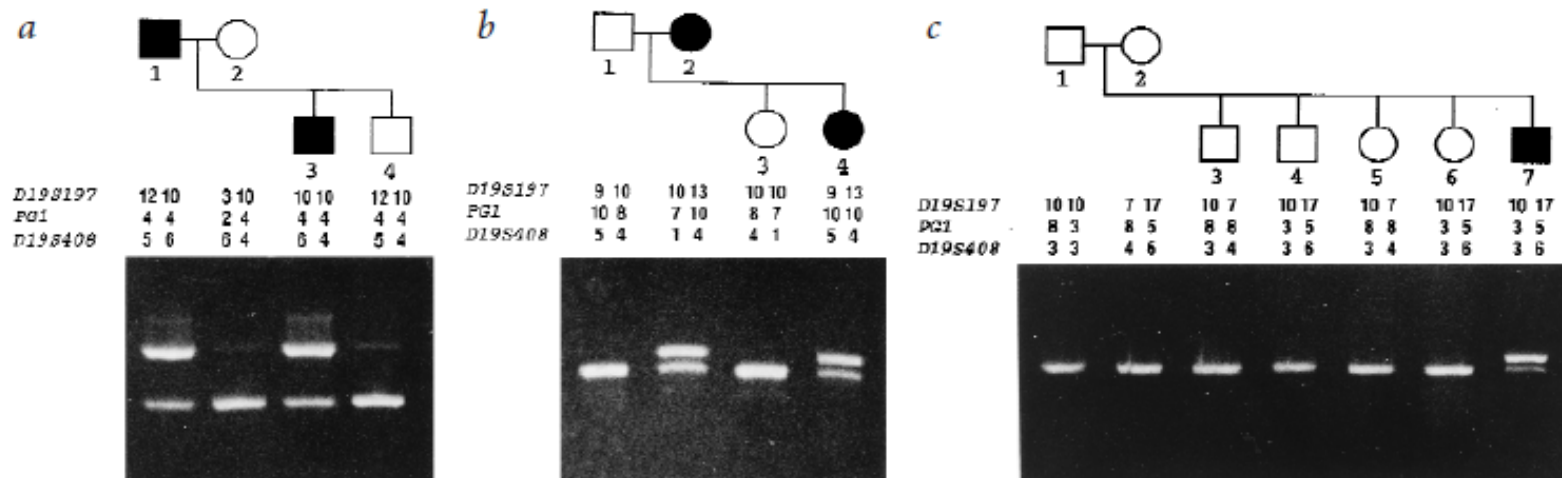
FUNKTIONELLE/ DIAGNOSTISCHE TESTS

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

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

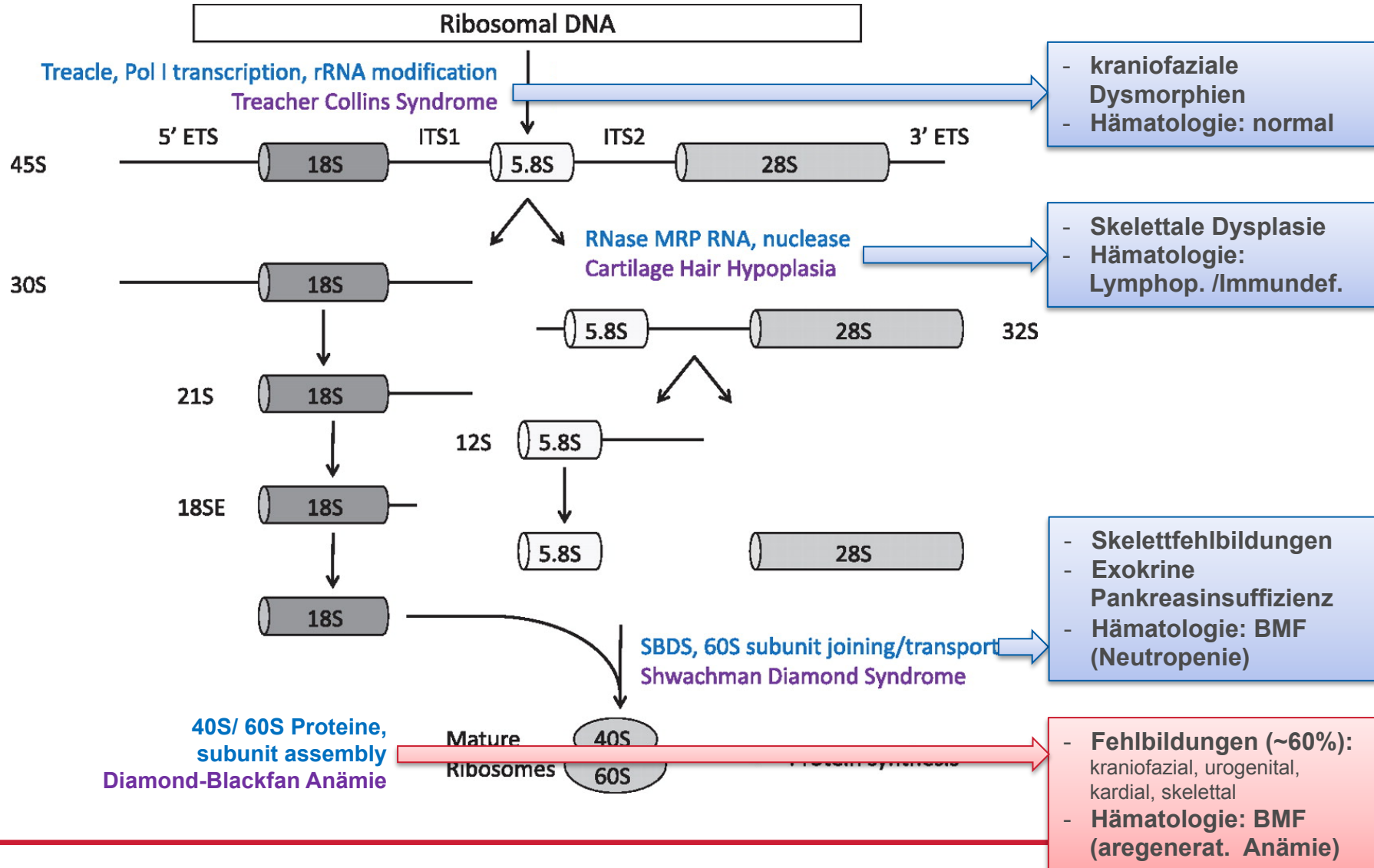
Natalia Draptchinskaia<sup>1\*</sup>, Peter Gustavsson<sup>1\*</sup>, Björn Andersson<sup>2</sup>, Monica Pettersson<sup>3</sup>, Thiébaud-Noël Willig<sup>4,5</sup>, Irma Dianzani<sup>6</sup>, Sarah Ball<sup>7</sup>, Gil Tchernia<sup>4,5</sup>, Joakim Klar<sup>1</sup>, Hans Matsson<sup>1</sup>, Dimitri Tentler<sup>1</sup>, Narla Mohandas<sup>4</sup>, Birgit Carlsson<sup>1</sup> & Niklas Dahl<sup>1</sup>  
nature genetics • volume 21 • february 1999

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

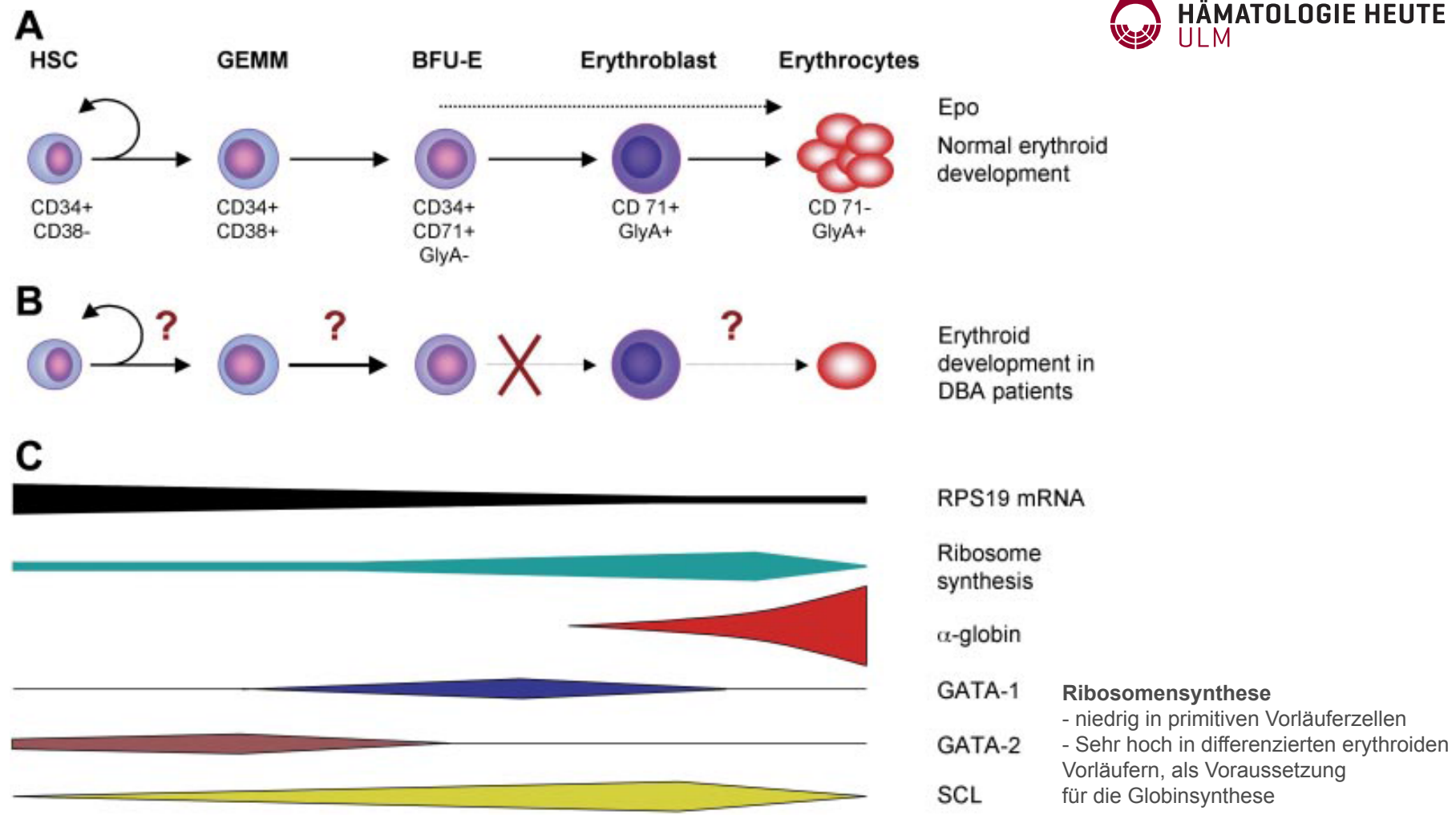


# Was ist eine Ribosomopathie?

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

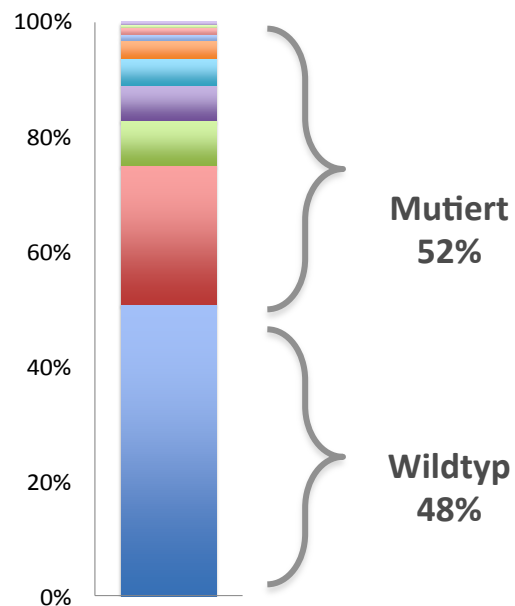
RPS7

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



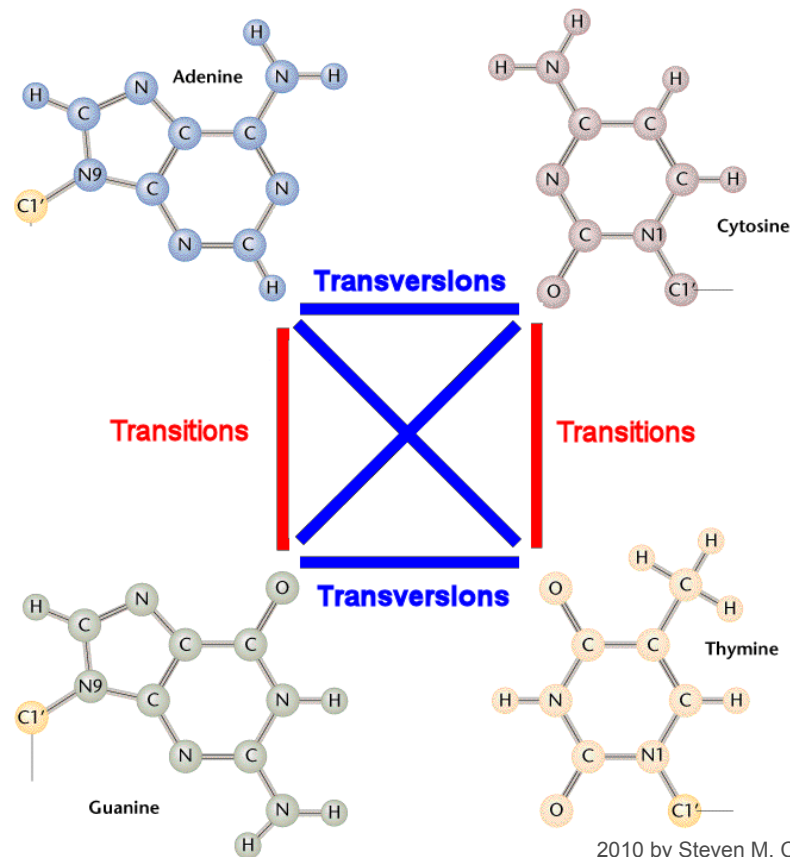
Gen	Freq.	Neu / Bekannt
<i>RPS7</i>	0.5%	0 / 1
<i>RPS10</i>	0.5%	0 / 1
<i>RPS24</i>	1.1%	2 / 0
<i>RPS17</i>	1.1%	2 / 0
<b><i>RPL35α</i></b>	<b>3.1%</b>	<b>5 / 1</b>
<b><i>RPL11</i></b>	<b>4.7%</b>	<b>6 / 3</b>
<b><i>RPS26</i></b>	<b>6.3%</b>	<b>6 / 6</b>
<b><i>RPL5</i></b>	<b>7.9%</b>	<b>11 / 4</b>
<b><i>RPS19</i></b>	<b>24.1%</b>	<b>3 / 44</b>

Keine Mutationen in  
*RPL9, RPL19, RPL26, GATA1, KLF1*

# Arten von RP-Genmutationen

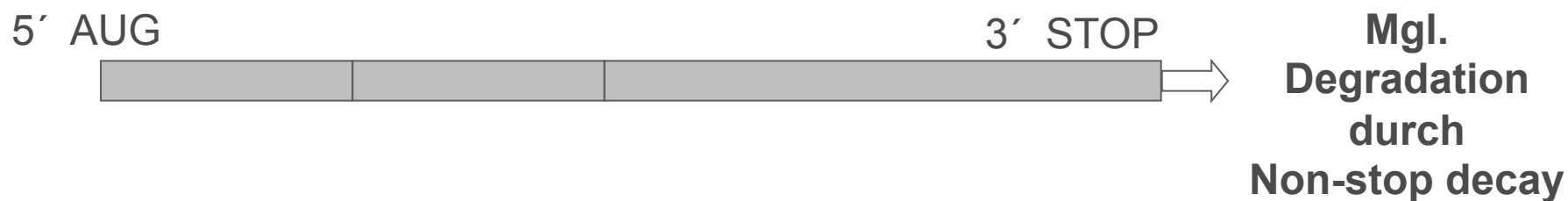
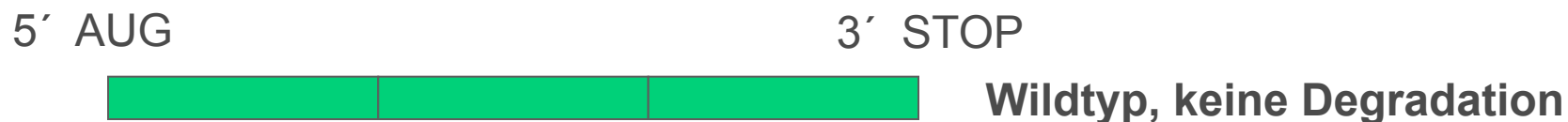
## 1. Transitionen vs. Transversionen

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
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>16</b>



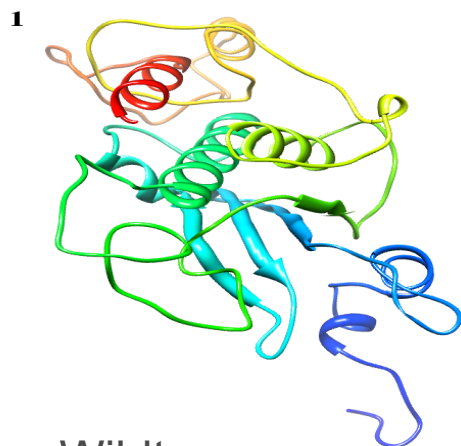
Wie erwartet, die meisten Veränderungen sind:  
**Transitionen und Indels (Deletionen häufiger)**

# Frameshift-Mutationen in DBA

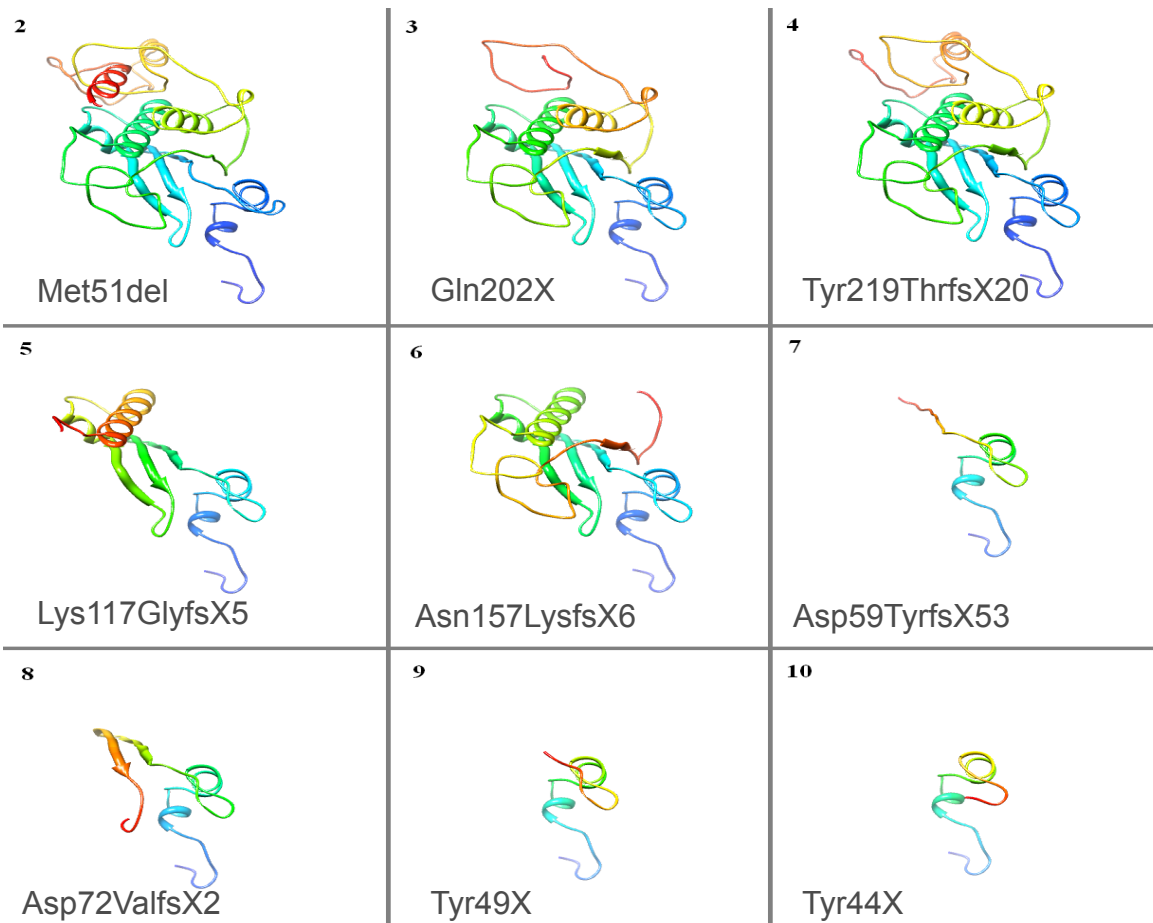


*RNA degradation in DBA:  
Andrew Chatr, Human Mutation 2004*

# Auswirkung der Mutationen auf Protein-Struktur



Wildtyp  
Tyr210Cys  
Ala218 Ser



*in silico 3 D modeling*

The background of the slide is a dense grid of small, circular spots in various colors (yellow, green, red, orange) on a dark background, resembling a microarray or DNA chip.

PATHOPHYSIOLOGIE

GENETIK 1: Mutationen

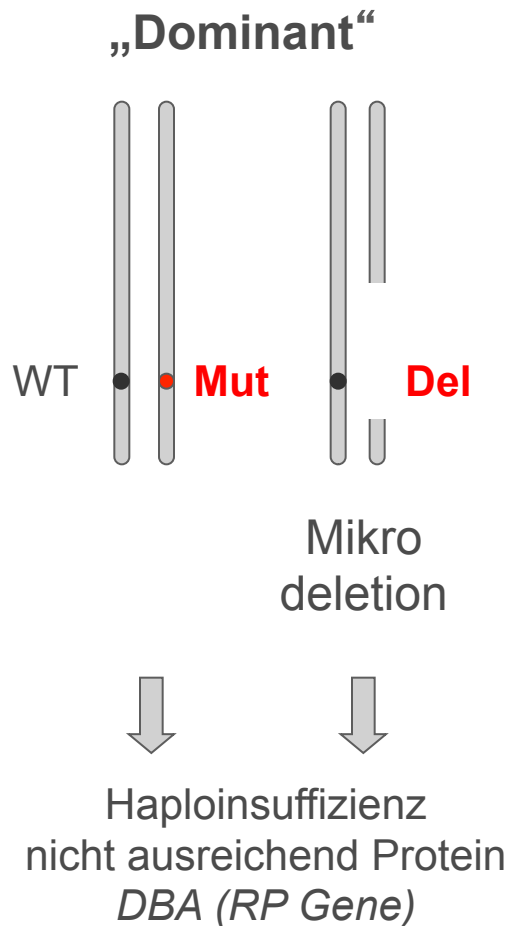
**GENETIK 2: Mikrodeletionen**

VERERBUNGSMODI BEI DBA

GENOTYP-PHÄNOTYP KORRELATION

FUNKTIONELLE/ DIAGNOSTISCHE TESTS

# Mechanismen der Haploinsuffizienz



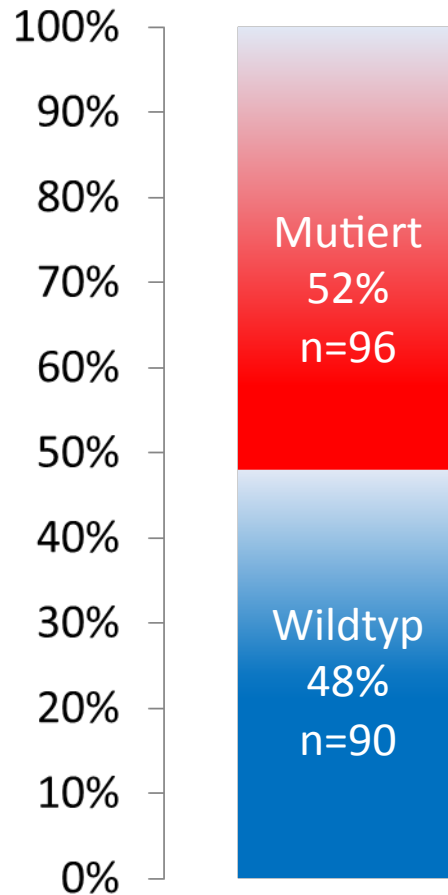
Haploinsuffizienz ist der Hauptmechanismus der Pathogenese von autosomal dominanten Erkrankungen

## FRAGESTELLUNG:

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



# Ganzgenom-Analyse: große Mikrodeletionen



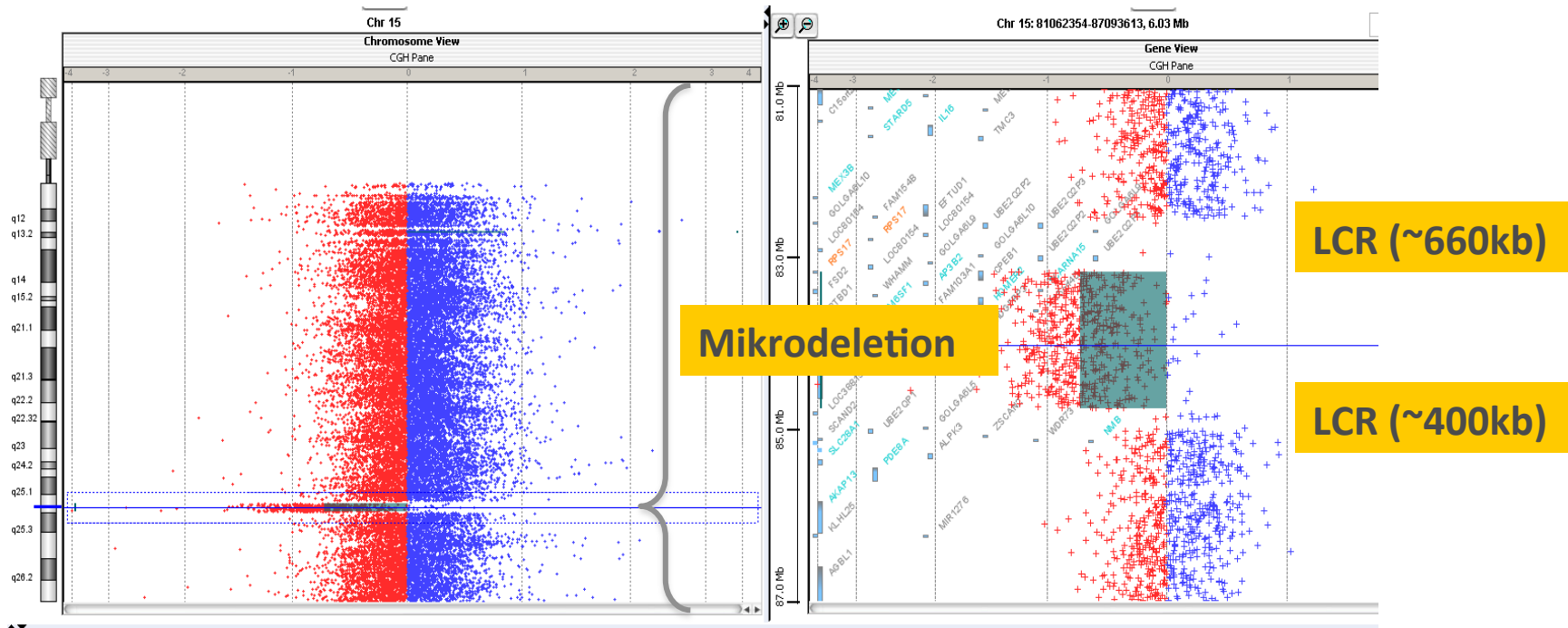
SNP Array Affymetrix 6.0  
~ 2 Millionen Marker

**36 Patienten untersucht**  
Bias: mehr Patienten mit Fehlbildungen

**11 / 36 Patienten:**  
monoallelische Mikrodeletionen,  
RP-Gene betroffen

# Bestätigung der Gendeletionen mittels HR-CGH

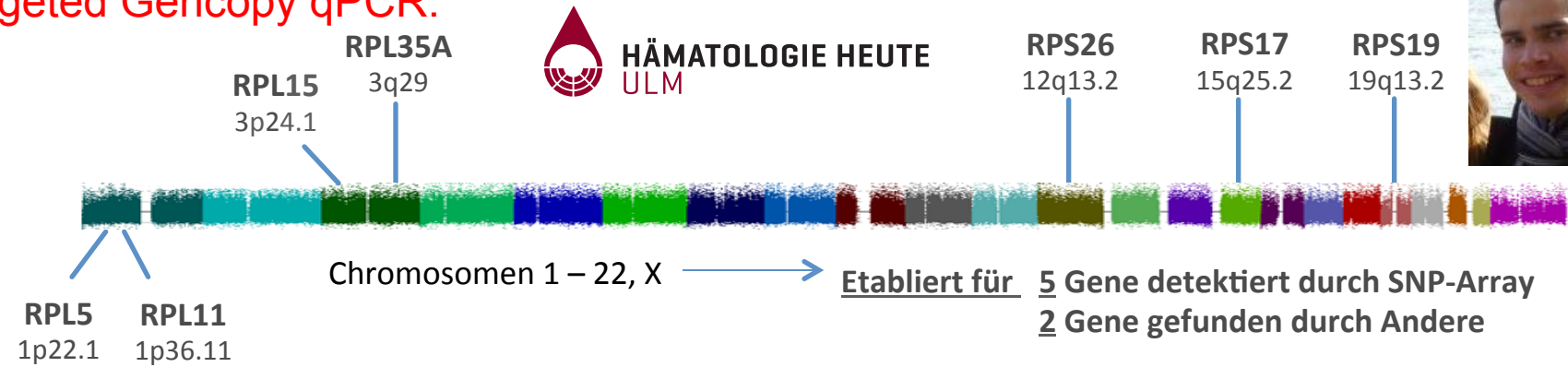
- In 3 Patienten mit RPS17-Mikrodeletion (Chr. 15):



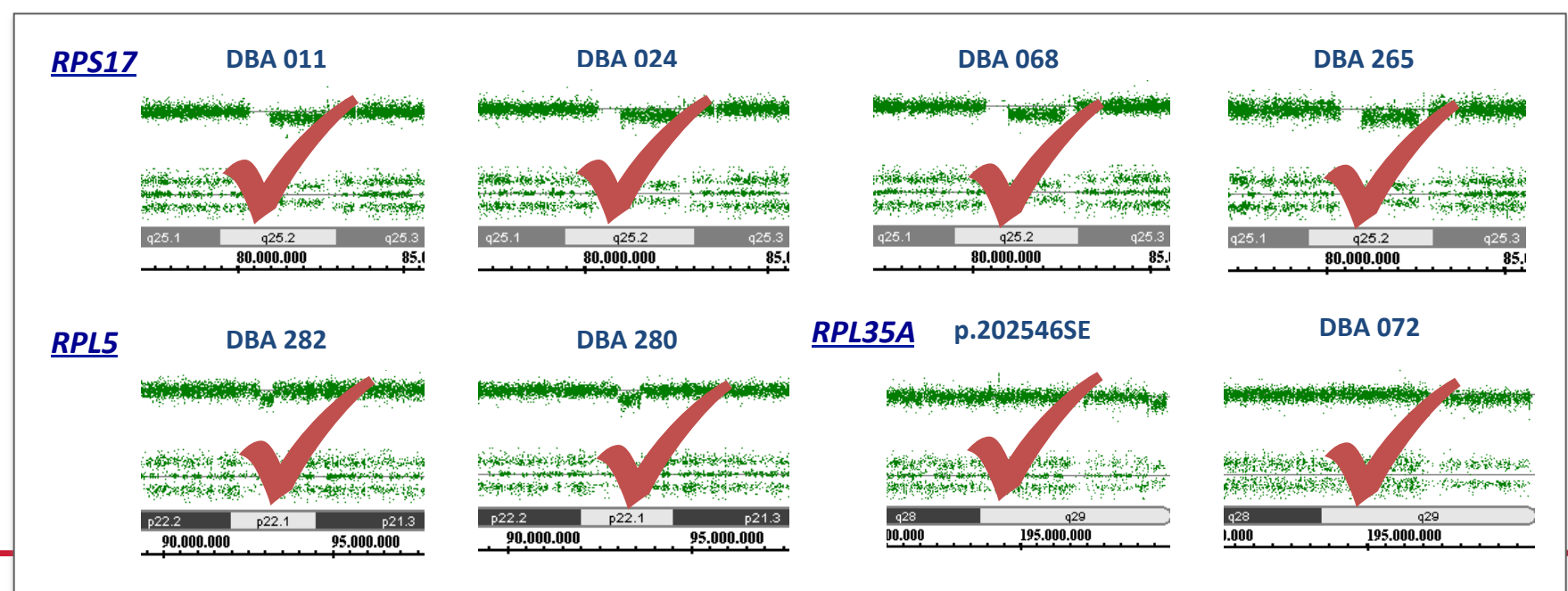
- Mikrodeletionen nicht zufällig -> lokalisiert zwischen Regionen mit low copy repeats (LCR)/ segmentalen Duplikationen (instabile Genombereiche, begünstigen Bildung von Doppelstrangbrüchen durch NHAR)

# Systematische Suche nach Gendeletionen

Targeted Gencopy qPCR:



Validierung der SNP-Genomarrays mittels qPCR:

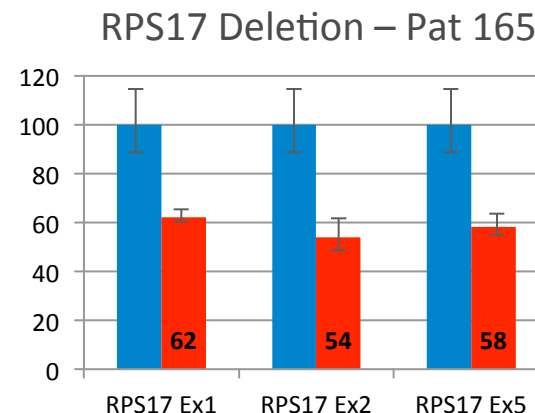
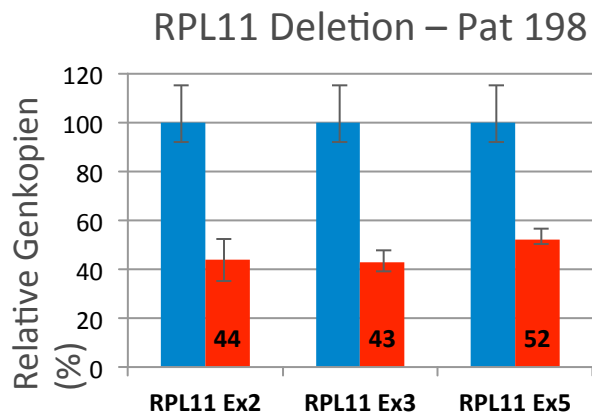


# Systematische Suche nach Gendeletionen

Untersuchung von 80 Patienten ohne Mutation / Deletion



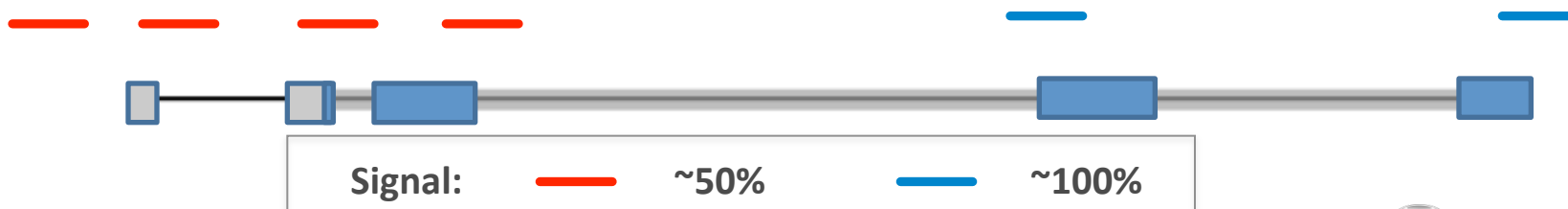
## Deletionen gesamter Gene (n=6)



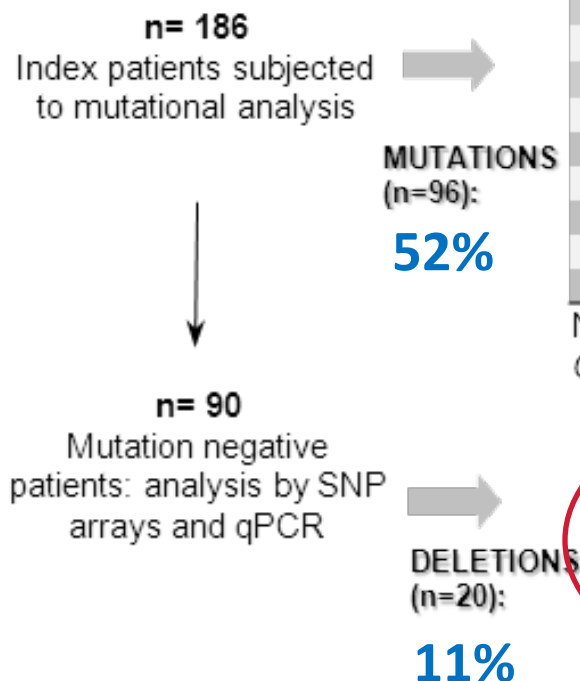
Blau: Mittelwert gesunde Referenz (n= 5 - 10)    Rot: Patienten

## Intragenische Deletionen (n=3)

RPL35A Ex1-Ex3 Deletion- Pat HA186184



# Zusammenfassung: Mutationen und Mikrodeletionen



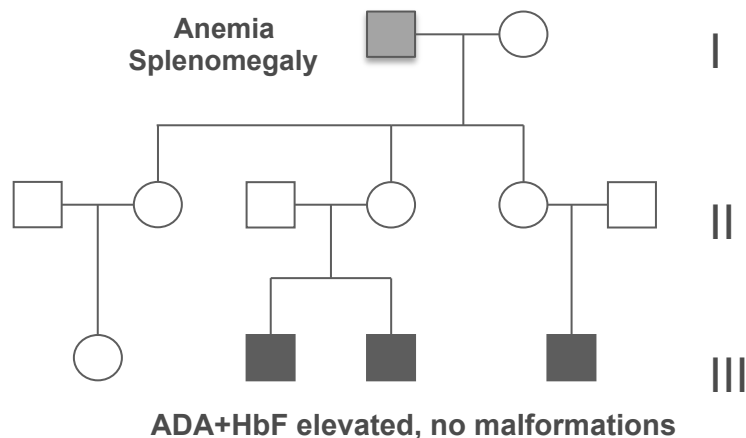
Gene	Patients	Reported Mutations	Novel Mutations
<i>RPS19</i>	47 (24.1%)	44	3
<i>RPL5</i>	15 (7.9%)	4	11
<i>RPS26</i>	13 (6.9%)	6	7
<i>RPL11</i>	9 (4.7%)	6	7
<i>RPL35a</i>	6 (3.1%)	1	5
<i>RPS17</i>	2 (1.1%)	0	2
<i>RPS24</i>	2 (1.1%)	0	2
<i>RPS10</i>	1 (0.5%)	1	0
<i>RPS7</i>	1 (0.5%)	1	0

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

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

A background image of a microarray with a grid of small, circular spots in various colors (yellow, green, red, orange) on a dark background.

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**

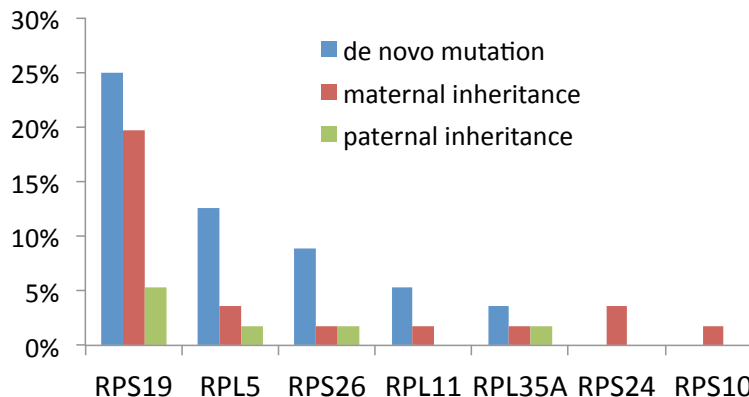
**55% de novo**



Jessica Mötter



keine Gen-Korrelation:



## 2. DELETIONEN vererbt:

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

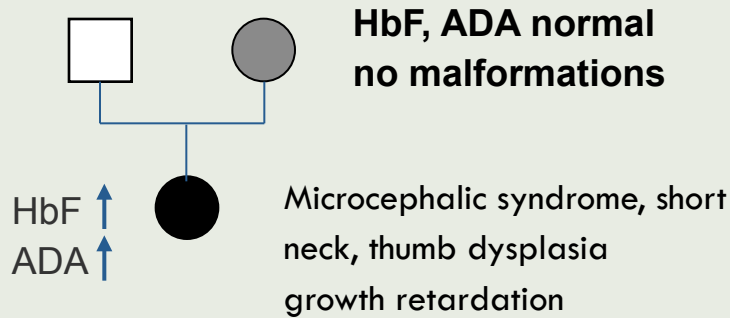
**9/10 Familien:** DE NOVO



# Silenter Phänotyp / inkomplette Penetranz

## RPL5, Ex6:

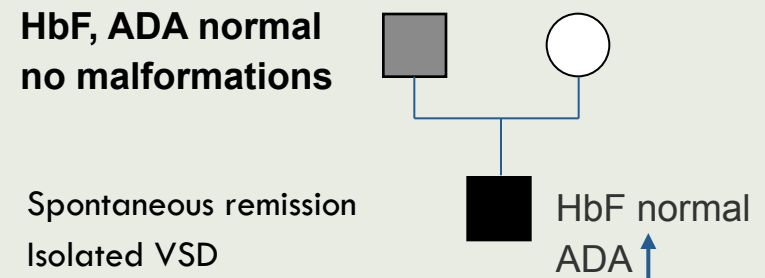
c.625C>T (p.R209C), novel



HÄMATOLOGIE HEUTE  
ULM

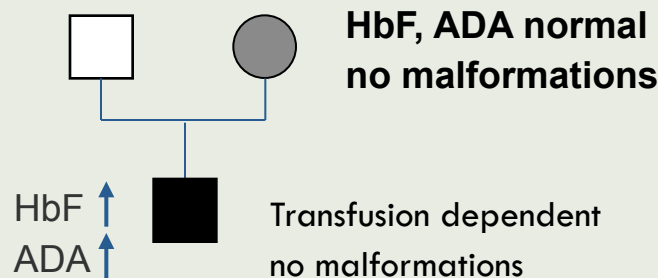
## RPL5, Ex1:

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



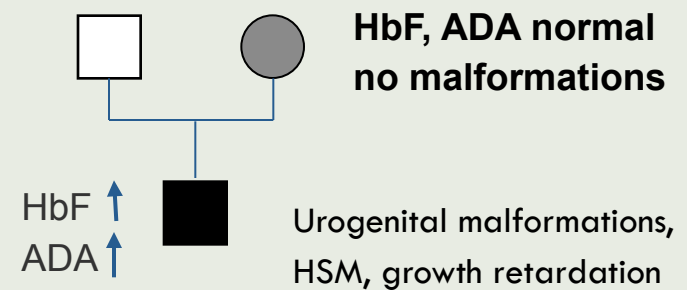
## RPS10, Ex2:

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:

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



**Statistische Antizipation (klinische Bias)**



PATHOPHYSIOLOGIE

GENETIK 1: Mutationen

GENETIK 2: Mikrodeletionen

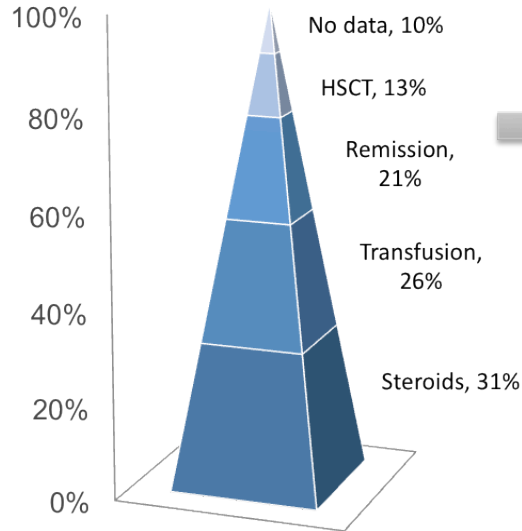
VERERBUNGSMODI BEI DBA

**GENOTYP-PHÄNOTYP KORRELATION**

FUNKTIONELLE / DIAGNOSTISCHE TESTS

# Mutationen und klinischer Phänotyp

## Therapieregime



## 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*):

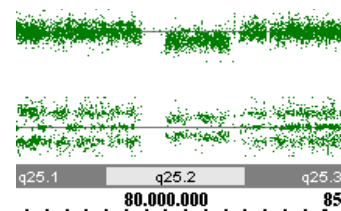
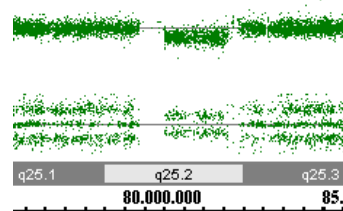
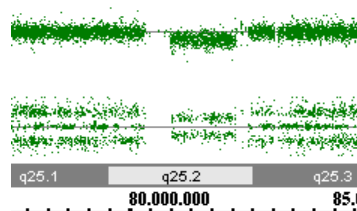
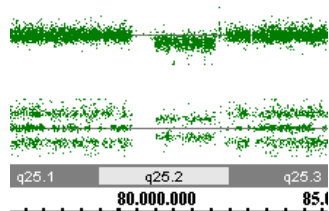


DBA 011

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

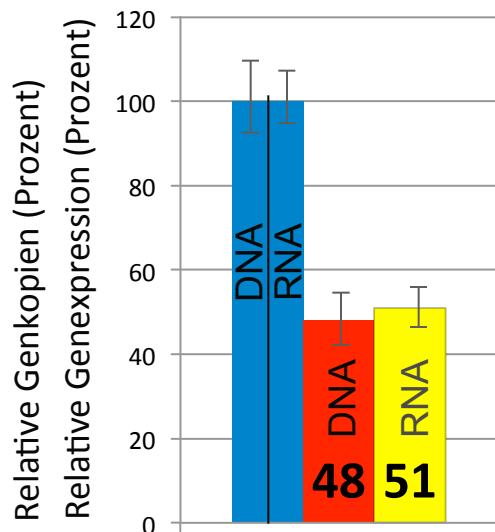


# Erniedrigte RP RNA-Expression als Ausdruck der Haploinsuffizienz

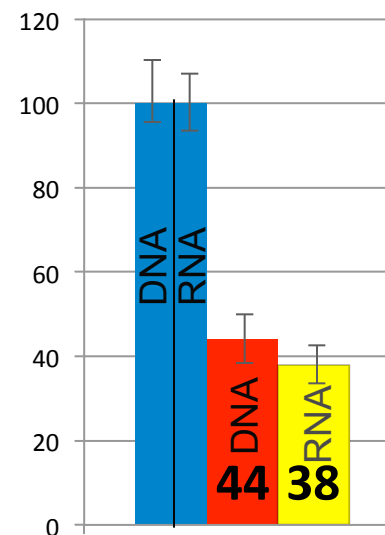


- Bestätigung der Haploinsuffizienz auf **RNA-Level (RPL5, RPL35a)**

RPL5 Deletion – DBA224



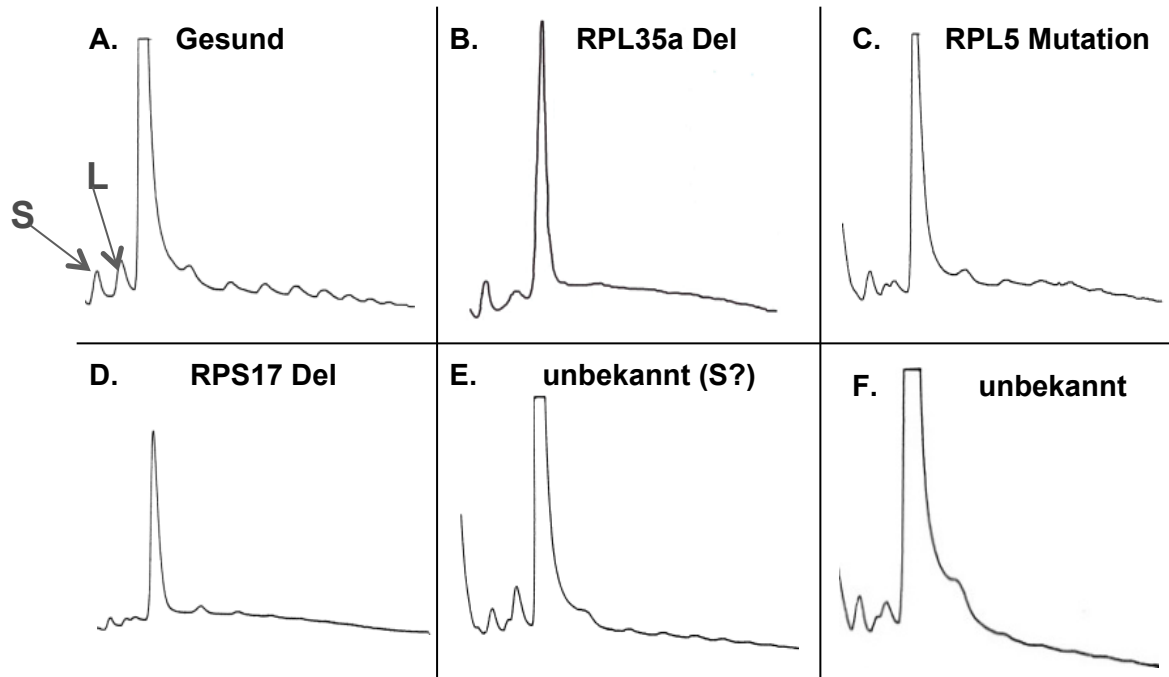
RPL35a Deletion – 202456



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

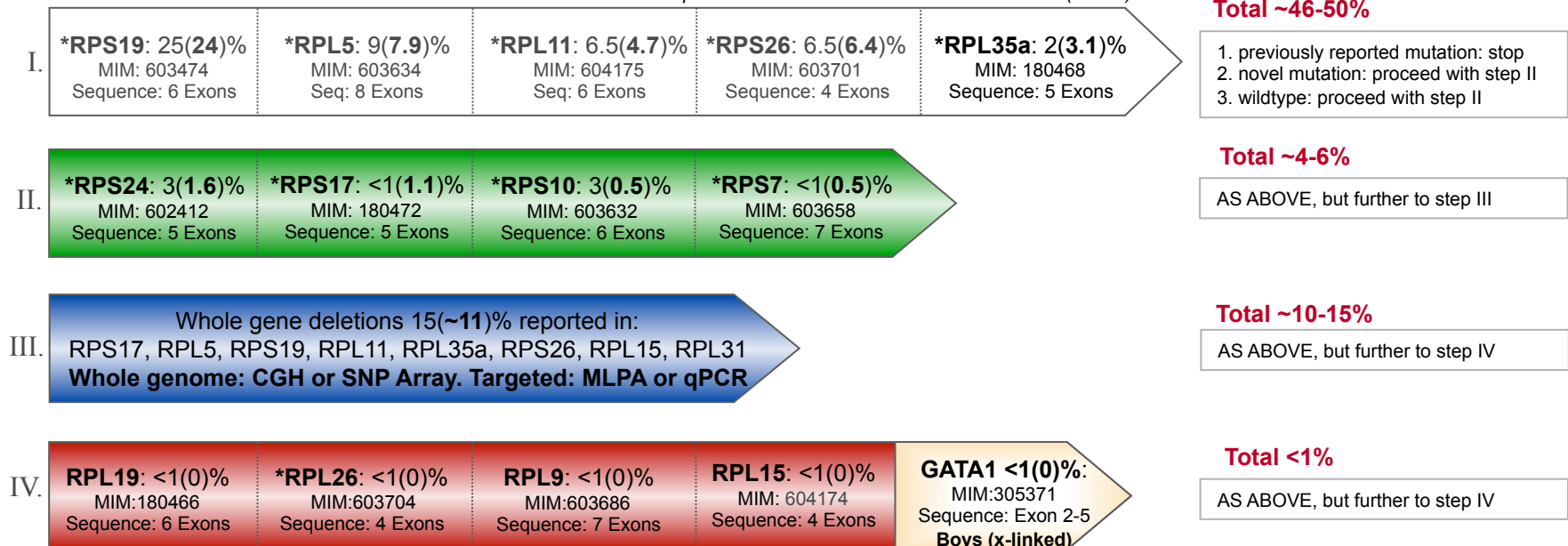
## Genetische Diagnostik bei DBA

- ~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 unbekanntem 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:**

