

Samenvatting en discussie

De drie belangrijkste stadia bij de behandeling van leukemie zijn 1) diagnose, 2) remissie-inductie en 3) eliminatie van residuele leukemiecellen. De diagnose van leukemie wordt mede gesteld aan de hand van cytogenetische analyse. In een aantal leukemieën zijn afwijkende genproducten of veranderde genproductienivo's direct gecorreleerd aan het biologisch gedrag. Derhalve kunnen de cytogenetische afwijkingen die gevonden worden in leukemie eveneens een bijdrage leveren wanneer het gaat om behandelstrategieën en prognose. In dit proefschrift worden aberrante chromosoom patronen gebruikt in de context van detectie van lage aantallen leukemiecellen in bloed en beenmerg van leukemiepatiënten.

De meest voor de hand liggende manier om cytogenetische informatie te verkrijgen is door middel van kijken naar chromosomen door het microscoop. Deze methode heeft zijn effectiviteit bewezen en is toepasbaar voor het herkennen van afwijkingen van verschillende aard. De visuele component is de kracht van de analyse met het microscoop; het letterlijk waarnemen van een translocatie in een metafase is het sterkste bewijs voor een afwijkend karyotype bij leukemie. Deze techniek is derhalve veel gebruikt en algemeen geaccepteerd.

In dit proefschrift worden twee technieken besproken die een andere benadering bieden om chromosomen te bestuderen. Deze technieken zijn flow-karyotypering en fluorescente in situ hybridisatie met chromosoomspecifieke alpha satelliet DNA probes. Ten opzichte van de 'microscoop benadering' hebben beide technieken duidelijke voordelen, maar er zijn ook tekortkomingen.

Flow-karyotypering biedt de mogelijkheid tot het analyseren van signalen die representatief zijn voor de chromosomen. Deze signalen zijn indicatief voor DNA inhoud per chromosoom (gerelateerd aan de lengte van het chromosoom) en de basepaarsamenstelling. De som van deze signalen vormt het 'flow-karyogram', welke net zo representatief is voor het karyotype van een individu of celtype, als de metafase informatie verkregen door middel van microscoop analyse (Hoofdstuk 1).

Model studies laten zien dat chromosomen, geschikt voor flow-karyotypering, verkregen kunnen worden van cellijnen zowel als van ex-vivo verkregen leukemiecellen. In zulk materiaal laat de clusterconfiguratie van het flow-karyogram duidelijk zien dat er afwijkende chromosomen aanwezig zijn. Kwantitatieve analyse van de clusters, wat met redelijke nauwkeurigheid kan worden uitgevoerd, laat zien welke chromosomen bij (reciproke) translocaties betrokken zijn of welke chromosomen over- of ondervertegenwoordigd zijn (Hoofdstuk 3). Om in staat te

zijn afwijkende clusterpatronen in het flow-karyogram aan te wijzen moet het normale patroon goed bekend zijn. Het normale menselijke bivariate flow-karyogram is uitvoerig vastgelegd en de positie van ieder chromosoom in het clusterpatroon is bepaald. Derhalve worden afwijkingen in dit patroon snel herkend. In Hoofdstuk 4 is een serie CML patiënten bestudeerd waarvan het cytogenetische kenmerk (het Philadelphia chromosoom) duidelijk onderscheiden kan worden.

De chromosomen die nodig zijn voor flow-karyotypering kunnen alleen verkregen worden van de delende fractie van de cellen. Of cellen groeien hangt af van de juiste stimulus (o. a. groeifactoren). Flow-karyotypering geeft daarom geen volledig inzicht in het absolute aantal leukemiecellen in het oorspronkelijke beenmerg of bloed monster. In Hoofdstuk 5 wordt dit duidelijk aangetoond. Beenmerg- of bloedmonsters werden gekweekt in twee fracties onder verschillende stimulerende condities. In theorie houdt specifieke groeistimulatie van leukemiecellen in dat uit kleine aantallen cellen voldoende nakomelingen gekweekt kunnen worden voor chromosoomanalyse door middel van flow-karyotypering. In dat geval zou de detectie van MRD kwalitatieve in plaats van kwantitatieve resultaten opleveren. Het probleem is echter dat er a) geen groeifactoren bestaan waarop uitsluiten de leukemiecellen reageren en b) er geen groeifactoren zijn waarop elke leukemiecél reageert. Daarom is het in zeer waarschijnlijk dat van de beenmergmonsters uit MRD situaties in de in-vitro cultures de normale beenmergcellen de leukemie zullen overgroeien.

Aan de andere kant biedt flow-karyotypering een aantal voordelen ten opzichte van analyse per microscoop. Het aantal chromosomen dat geanalyseerd kan worden is vele malen hoger. Verder is het mogelijk om tot een objectieve interpretatie te komen van de clusterpositie in het bivariate flow-karyogram. Een derde aspect dat flow-karyotyping een aantrekkelijke techniek maakt is de mogelijkheid om chromosomen met een hoge graad van zuiverheid uit te sorteren. Alhoewel niet geïmplementeerd in dit proefschrift, wordt het sorteren van chromosomen met succes toegepast voor verschillende doeleinden. De mogelijkheid om chromosomen te sorteren zal in de toekomst één van de belangrijkste toepassingen van flow-karyotyperings zijn. Met name de introductie van de polymerase-ketting-reactie (PCR) heeft bijgedragen aan dit toekomstperspectief. Een veelvoud aan mogelijkheden ligt in het verschiet of wordt reeds toegepast. Bijvoorbeeld:

- Sorteren van niet of moeilijk te definieëren chromosomen, DNA amplificatie en omgekeerde 'painting' op normale metafase chromosomen voor gedetailleerde markeranalyse.
- Sorteren van chromosomen welke bij een translocatie betrokken zijn en de respectievelijke normale chromosomen met als doel differentieële clonering van de verschillen tussen normaal en afwijkend DNA met breukpunt analyse als doel.

- In flow-karyogrammen met hoge resolutie zijn soms de homologe chromosomen apart te sorteren. Deze mogelijkheid opent de weg om in meer detail aspecten te bestuderen die te maken hebben met paternale of maternale overerving (imprinting).

Door de kwantitatieve beperking van flow-karyotypering werd aanvullende informatie gezocht door het gebruik van z. g. interfase cytogenetica technieken. Het directe gebruik van interfase cellen uit bloed of beenmerg houdt in dat er geen selectieve groei in vitro heeft plaatsgevonden van subpopulaties van cellen en dat elke individuele cel bestudeerd wordt. Voor dit doel werd met succes fluorescente in situ hybridisatie (FISH) toegepast. De flow-karyotypes geven een aanwijzing voor de aan- of afwezigheid van leukemie terwijl FISH de informatie verstrekt over het werkelijke aantal leukemiecellen in het beenmerg (Hoofdstuk 5). De benadering met interfase cytogenetica levert een krachtige mogelijkheid om grote aantallen cellen in een relatief korte periode te bekijken met behoud van het eerder genoemde voordeel om een kwantitatief oordeel te kunnen geven over het oorspronkelijke aantal leukemiecellen. FISH is eenvoudig toepasbaar voor de detectie van cellen met numerieke afwijkingen. Wanneer chromosoomspecifieke DNA probes worden gebruikt, is het aantal signalen dat per kern zichtbaar wordt representatief voor het aantal kopieën van het betreffende chromosoom per cel (Hoofdstuk 6). Het uitgangspunt is de informatie afkomstig van conventionele cytogenetisch onderzoek. Nadat een bepaalde leukemie eenmaal gekarakteriseerd is met numerieke afwijkingen kan een patiënt op relatief eenvoudige wijze gevolgd worden door bestudering van ten minste een tienvoud hoger aantal cellen dan bij conventionele cytogenetica. Hoewel FISH uitermate geschikt is voor dit doel zijn er ook tekortkomingen. Eén ervan is dat conventionele cytogenetica noodzakelijk is als uitgangspunt. Door het kleine aantal metafases dat daarmee bestudeerd wordt kunnen sommige afwijkingen onopgemerkt blijven. Verder blijft FISH op interfase cellen voor het hier beschreven doel hoofdzakelijk beperkt tot numerieke afwijkingen. De analyse van structurele afwijkingen in interfase met behulp van FISH is beperkt tot een beperkt aantal duidelijk gedefinieerde translocaties waarvan de breukpunten gevisualiseerd kunnen worden door middel van geschikte probe combinaties. Dit probleem zou opgelost kunnen worden als interfase cytogenetica zodanig uitgebreid zou kunnen worden dat afzonderlijke chromosomen zichtbaar gemaakt kunnen worden in G1/G0 cellen. Een techniek die dit toestaat is 'premature chromosoom condensatie' (PCC). In aanvulling hierop zou FISH dan gebruikt kunnen worden op de prematuur gecondenseerde chromosomen. Dit zou inzicht kunnen verschaffen in de aanwezigheid van numerieke zowel als structurele afwijkingen in interfase cellen, inclusief de cellen die zelden of nooit in celcyclus zouden komen als ze voor metafase studies gekweekt zouden worden. Zowel FISH als PCC zijn als afzonderlijke technieken veelvuldig beschreven. De combinatie van beide technieken bleek echter moeilijk te realiseren (Y. L. Lu and G. J. A. Arkesteijn, ongepubliceerd). Te veel (onbekende) factoren verhinderen een routinematig

gebruik. Slechts weinig is over de ontwikkeling van deze combinatie gepubliceerd (Brown et al. 1992, Brown et al. 1993, Pandita et al. 1994) en tot nu toe zijn er weinig publicaties die routinematig gebruik beschrijven voor experimentele of klinische toepassing.

In dit proefschrift is FISH gebruikt voor de analyse van cellen in leukemie monsters met numerieke afwijkingen. De laagste detectiegrens die met FISH te bereiken is wordt bepaald door het voorkomen van numeriek aberrante FISH patronen in normale cellen van gezonde individuen. Wanneer de meest gebruikte DNA probes in ogenschouw worden genomen, ligt die grens tussen 0.1 en 5%. De meest optimistische schatting zou FISH dus een log onder het detectienivo brengen van morfologische beenmerganalyse. De FISH methode is daarentege uitermate geschikt voor vervolgstudies van patiënten in verschillende stadia van leukemie. Op deze manier kan FISH informatie verschaffen over efficiëntie van behandeling, regressie of teruggroei van leukemie.

Om tot een verbetering van het detectienivo te komen is een tweede, onafhankelijke parameter nodig. Een tweede hybridisatie met een andere chromosoomspecifieke probe is slechts mogelijk als meerdere numerieke afwijkingen aanwezig zijn. In de groep patiënten die een zg. sex-mismatched beenmergtransplantaat hebben ontvangen bestaat een eenduidige relatie tussen de aan- of afwezigheid van één van beide geslachtchromosomen. Dat maakt deze doelgroep bij uitstek geschikt voor dubbel-hybridisaties met X en Y chromosoomspecifieke probes. Het resulterende detectienivo is dan het product van detectienivo's van de afzonderlijke probes (vooropgesteld dat beide hybridisaties in één cel onafhankelijk van elkaar plaats vinden). Theoretisch kan dit de onderste detectiegrens verlagen tot 1 cel per 100,000. Er blijven echter nog twee obstakels over. De ene is dat er dan nog steeds vastgesteld moet worden of een gastheercel wel of geen leukemiecél is. De andere is dat voor het waarnemen van 1 cel per 100.000 ten minste een veelvoud van 100.000 cellen geanalyseerd dient te worden.

Op dit punt komt de flow-cytometrie-ervaring, eerder opgedaan in dit onderzoeksprogramma, van pas. Met flow-cytometrie kunnen grote aantallen cellen in een korte periode geanalyseerd worden. Verder kunnen celpopulaties selectief verrijkt worden door ze uit te sorteren. Om FISH met behulp van flow-cytometrie te kunnen meten moeten cellen in suspensie gehybridiseerd kunnen worden. Deze techniek werd met succes ontwikkeld (Hoofdstuk 7). Mengsels van mannelijke en vrouwelijke cellen werden gehybridiseerd in suspensie met een Y chromosoomspecifieke probe. Met behulp van flow-cytometrie konden positieve en negatieve signalen van respectievelijk de mannelijke en vrouwelijk kernen onderscheiden worden. Voor chimerisme studies werden dubbelhybridisaties uitgevoerd met Y- en X chromosoomspecifieke probes. Het laagst haalbare detectienivo werd nu bepaald door het aantal cellen met een mannelijk hybridisatiepatroon in een monster bestaande uit 100% vrouwelijk cellen of vice

versa na twee opeenvolgende selectiestappen. Eén selectiestap wordt gevormd door het aantal cellen dat als vals positief of negatief verschijnt in het uit te sorteren gebied en de tweede is de FISH analyse van de gesorteerde fractie op de aanwezigheid van valse hybridisatie signalen met behulp van de tweede probe. In een monster dat bijvoorbeeld voor 100% bestaat uit vrouwelijke cellen, wordt het gebied uitgesorteerd waar de Y positieve cellen zouden verschijnen. De spaarzaam aanwezige cellen die in dit gebied voorkomen worden vervolgens met behulp van FISH en microscopie geanalyseerd op de aanwezigheid van 1 X chromosoom (indicatief voor mannelijke cellen). Dit houdt in dat een selectie van een selectie is gemaakt wat een corresponderende reductie van het detectienivo tot gevolg heeft. De mogelijkheid om sex-verschillen te kunnen meten is hoogst relevant bij patiënten die een zg. 'sex-mismatched' beenmergtransplantatie hebben ondergaan. Echter, kleine aantallen ontvanger cellen komen vaak voor in beenmerg van dergelijke patiënten zonder dat er tekenen zijn van een recidief. Om nu in staat te zijn deze cellen verder te klassificeren als zijnde leukemisch of niet kunnen andere leukemie-geassocieerde merkers na sortering geanalyseerd worden. Het is bijvoorbeeld mogelijk om hybridisatie met de Y chromosoomspecifieke probe te combineren met een probe die specifiek is voor een bepaalde numerieke chromosomale afwijking in de leukemiecellen. Op basis van aan- of afwezigheid van het Y hybridisatiesignaal kunnen cellen gesorteerd worden waarna analyse op de aanwezigheid van numerieke afwijkingen in de gesorteerde fractie de mogelijkheid biedt tot classificatie als leukemiecél of niet. In dit proefschrift wordt aangetoond dat op deze wijze een theoretisch detectienivo rond de 1 op 250.000 kan worden bereikt.

Het laagste detectienivo dat met zowel flow-karyotypering als interfase cytogenetica met FISH bereikt kan worden beperkt zich tot ca. 1%. Vanuit dit oogpunt verschillen deze technieken niet veel van conventionele cytogenetica en Southern blot analyse. De combinatie van flow-cytometrie, sorteren en in situ hybridisatie resulteert in een detectienivo rond de 0,001% (Fig. 8. 1). Elk van de in figuur 8. 1 genoemde methodes kan toegepast worden op een beperkte groep leukemiepatiënten die voldoet aan specifieke kenmerken (ofwel immunologisch, genetisch of cytogenetisch)

Leukemiecellen worden vaak gekarakteriseerd door cytogenetische afwijkingen welke als merkers voor hun aanwezigheid kunnen fungeren.

De experimentele studies die beschreven zijn in dit proefschrift dragen bij aan de kennis omtrent theoretische en praktische detectienivo's met deze merkers. Hopelijk zal de opgedane kennis een bijdrage leveren aan de toepassing van detectie van leukemie. Het vormt zeker de basis voor verder experimenteel onderzoek waarvan de contouren zich reeds aftekenen; nl. flow-karyotypering en sorteren van merker chromosomen, vermeerdering met behulp van PCR van het gesorteerde DNA en analyse van de merkers door middel van omgekeerde 'painting' op normale metafasen.

De combinatie van conventionele cytogenetica, interfase cytogenetica, flow-karyotypering en in-situ hybridisatie zal bijdragen aan een verfijning van de analyse van de tumor cytogenetica, wat uiteindelijk zal resulteren in een beter kennis van het biologische gedrag van leukemiecellen.