

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III  
Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr.med. W. Hiddemann

**Inzidenz und Aufklärung von submikroskopischen Deletionen  
in der Bruchpunktregion bei Patienten mit AML mit t(8;21)  
mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christoph Tassilo von Manowski

aus Ingolstadt

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. C. Haferlach

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Th. Kirchner

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: \_\_\_\_\_

Dekan: Prof. Dr.med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2007

Meiner Familie,  
meinen Freunden  
und meinen Wegbegleitern  
gewidmet.

## I. Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
AMLCG	AMLCG-Studiengruppe (Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ATRA	All-Trans-Retinol-Säure
CBF	Core Binding Factor
CEP	Zentromersonde
CML	Chronische myeloische Leukämie
CR	Complete remission (komplette Remission)
<i>ETO</i>	“ <i>Eight-Twenty-One</i> ”-Gen
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HAM	Chemotherapieschema: Hochdosiertes Cytarabin, Mitoxantron
KMT	Knochenmarkstransplantation
LSI	Locus-specific probe
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
<i>MLL</i>	“ <i>Mixed lineage leukemia</i> ”-Gen, “myeloid-lymphoid leukemia”
CMPD	<i>BCR-ABL</i> negative chronische myeloproliferative Erkrankungen
MRP	Multidrug resistance protein
<i>MYH11</i>	<i>Smooth-muscle-myosin-heavy-chain</i> -Gen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
APL	Akute Promyelozytenleukämie
RAEB-T	Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung
RARA	Retinoic Acid Receptor alpha
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
TAD	Chemotherapieschema: Thioguanin, Cytarabin, Daunorubicin
WCP	Whole chromosome painting



---

	<b>Seite</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Ergebnisse der Chromosomenanalyse in Kombination mit FISH bei 77 Patientenproben mit AML mit t(8;21)/AML1-ETO</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Patienten mit Trisomie 8</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Insertion ins(21;8)(q22;q22q24)</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Verlust eines Kolokalisationssignals</b>	<b>36</b>
3.4.1 Submikroskopische Deletionen des <i>ETO</i> -Signals	36
3.4.2 Variante Translokationen mit Verlust eines <i>ETO</i> -Signals	37
<b>3.5 Typische Signalkonstellationen</b>	<b>39</b>
3.5.1 Variante Translokation mit Bruchpunkt distal des <i>ETO</i> -Gens	39
<b>4. Diskussion</b>	<b>40</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>47</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>72</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>73</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeines zu den Leukämien

Leukämien wurden erstmals 1845 von Rudolf Virchow beschrieben, der den Begriff des „weißen Blutes“ prägte, nachdem ihm die vermehrte Leukozytenansammlung (buffy coat) auf der Erythrozytensäule, nach Zentrifugation des Blutes, bei Leukämiepatienten mit sehr hohen Leukozytenzahlen aufgefallen war (Virchow 1845).

Leukämien werden nach dem klinischen Verlauf in akute oder chronische Formen eingeteilt. Die Inzidenz der einzelnen Krankheitsbilder ist sehr unterschiedlich und schwankt im Erwachsenenalter zwischen 4/100.000 Einwohner (bei der akuten myeloischen Leukämie; AML) bis zu 20/100.000 Einwohner, (bei der chronischen lymphatischen Leukämie; CLL) je nach Entität.

Ätiologisch können genetische Faktoren wie z. B. kongenitale Syndrome, virale Infektionen, organische Lösungsmittel oder ionisierende Strahlung zum Tragen kommen; jedoch bleibt in den meisten Fällen die Ursache unklar.

Leukämien entstehen durch eine maligne Transformation hämatopoetischer oder lymphatischer Stammzellen. Durch genetische Veränderungen der Stammzellen wird der normale Reifeprozess der Leukozyten unterbrochen; unreife Blutzellen vermehren sich im Knochenmark unkontrolliert und können in den peripheren Blutkreislauf übertreten.

Das klinische Bild und die Symptome sind vielfältig und unspezifisch. So findet man Infektanfälligkeit, Müdigkeit, Blutungsneigung und Fieber. Die Verdrängung der normalen Hämatopoese führt zu Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie. Weitere Beschwerden können aus der Infiltration von Organen resultieren; im Vordergrund stehen hierbei Hepato- und Splenomegalie, Lymphadenopathie und Gingivahyperplasie. Selten kommt es auch zur leukämischen Infiltration der Haut. Eine Hyperleukozytose von mehr als 100.000/ $\mu$ l Leukämiezellen im peripheren Blut kann zur Leukostase mit zentralnervöser und/oder okulärer Symptomatik führen.

Während sich die chronischen Leukämien meist langsamer entwickeln und es bis zur Diagnosestellung mitunter Jahre dauern kann, zeichnen sich akute Leukämien immer durch rasche Progredienz aus. Sie führen unbehandelt innerhalb kurzer Zeit zum

Tode. Myelodysplastische Syndrome werden auch als Präleukämien bezeichnet, da ein gewisser Anteil mit unterschiedlicher Latenzphase in eine sekundäre akute myeloische Leukämie übergeht (s-AML).

## 1.2 Akute myeloische Leukämie (AML)

Im Erwachsenenalter ist die AML wesentlich häufiger als die akute lymphatische Leukämie (ALL). Die Inzidenz der AML ist altersabhängig, sie beträgt zwischen 0.8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in der ersten Lebensdekade und über 15/100.000 um das 75. Lebensjahr (Bacher et al. 2005).

Die AML ist durch die unkontrollierte Proliferation unreifer hämatopoetischer Zellen der Myelopoese gekennzeichnet. Diese findet überwiegend im Knochenmark statt; mitunter findet man auch eine extramedulläre Lokalisation (sogenannte Chlorome). In der Mehrzahl der Fälle findet sich eine Ausschwemmung der Blasten ins periphere Blut.

## 1.3 Klassifikation der AML

Die Diagnostik und die Klassifikation der AML erfolgt anhand morphologischer, immunologischer und genetischer Merkmale der Blasten aus Knochenmark und peripherem Blut.

Anhand ihrer Ätiologie wird die AML in *de novo* AML, in die sekundäre AML (s-AML) sowie die therapieinduzierte AML (t-AML) eingeteilt. *De novo* AML heißt die Erkrankung dann, wenn sie ohne Hinweis auf eine vorherige Exposition gegenüber einer potentiell leukämogenen Noxe bzw. ohne vorherige hämatologische Erkrankung auftritt. Die s-AML entsteht aus einer primären anderen hämatopoetischen malignen Erkrankung, z.B. aus einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder aus einer chronischen myeloproliferativen Erkrankung. Dies ist bei 5-10 % aller AML der Fall (Leone et al 1999). Von einer t-AML spricht man, wenn diese im Anschluss nach Chemo- oder Strahlentherapie einer malignen Erkrankung bzw. nach immunsuppressiver Therapie nach Organtransplantation oder aufgrund von Autoimmunerkrankungen auftritt.

### 1.3.1 Zytomorphologie

Die Diagnose erfolgt im Idealfall parallel aus Knochenmark und peripherem Blut. Die Blut- oder Knochenmark-Ausstriche werden nach Pappenheim oder May-Giemsa-Grünwald gefärbt. Wichtig ist immer noch die Untersuchung anhand der Zytochemie. Zwar hat die Immunphänotypisierung mittels Multiparameterdurchflusszytometrie viele der früher verwendeten Reaktionen abgelöst, jedoch spielen Peroxidase- (MPO) und Esterase- (non-specific esterase; NSE) Färbung in der diagnostischen Routine immer noch eine große Rolle (Haferlach und Schoch 2002). Eine Unterteilung in myeloische und lymphatische Leukämien gelingt in mehr als 80% aller Fälle bereits anhand von Zytomorphologie und Zytochemie (Bain 1988).

Die erste standardisierte Klassifikation der AML erfolgte 1976 durch die French-American-British (FAB) Cooperative Group auf der Basis von Zytomorphologie und Zytochemie. Zunächst gliederte sich diese Einteilung in die Subtypen M1 bis M6 und wurde später durch die Subtypen M3v, M4eo, und die Subtypen M0 und M7 ergänzt (Bennett et al. 1976, Bennett et al. 1991). Die FAB-Klassifikation wird in Tabelle 1 dargestellt.

Die FAB-Klassifikation ist später als wesentlicher Bestandteil in die WHO-Klassifikation eingegangen, welche zusätzlich genetische und immunologische Aspekte sowie die Ätiologie der Erkrankung berücksichtigt (Jaffe et al. 2001).

Tab. 1: Klassifikation der AML nach FAB-Kriterien

<b>FAB-Subtyp der AML</b>	<b>Morphologie der Knochenmarkszellen</b>	<b>Anteil in % aller AML</b>
M0	AML ohne Ausreifung	5%
M1	AML mit minimaler Ausreifung (<10%)	16%
M2	>10% der Zellen reifen auf die Promyelozytenstufe oder darüber hinaus aus	30%
M3, M3v	Promyelozyten-Leukämie und ihre mikrogranuläre Variante (M3v)	5%
M4	Myelomonozytäre Leukämie (>20% monozytäre	20%

	Blasten)	
M4Eo	Myelomonozytäre Leukämie mit pathologischen Eosinophilen	7%
M5a	Monoblasten-Leukämie (>80% Monoblasten)	7%
M5b	Monozyten-Leukämie (>80% Promonozyten und Monozyten)	5%
M6	Erythro-Leukämie	4%
M7	Megakaryoblasten-Leukämie	1%

### 1.3.2 Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung mit Hilfe der Multiparameterdurchflusszytometrie basiert auf dem Prinzip der spezifischen Antikörper-Antigenbindung. Die Antikörper lagern sich entweder an die Zelloberfläche an, oder nach Lyse der Zellmembran auch an zytoplasmatische oder nukleäre Antigene. Diese Technik erlaubt Aufschluss über Zelllinienzugehörigkeit und Reifegrad einer Population. So kann z.B. die unreife myeloische Leukämie (AML M0), die allein auf zytomorphologischer und zytochemischer Grundlage nicht klassifiziert werden kann, mit der Immunphänotypisierung charakterisiert werden. Ähnliches gilt für den megakaryozytären FAB-Subtyp M7, welcher morphologisch nicht zu definieren ist (Haferlach et al. 1996). Insbesondere spielt diese Technik auch für die ALL eine sehr wichtige Rolle, da sie die Unterscheidung in T-Zell- und B-Zell-Leukämien ermöglicht. Die biphänotypischen akuten Leukämien zeigen gleichzeitig myeloische und lymphatische Antigenexpression und werden mit Hilfe der EGIL-Klassifikation diagnostiziert (Legrand et al. 1998, Bene et al. 1995). Ferner kann die Expression bestimmter Oberflächenantigene wichtige Hinweise für die Prognose liefern (Graf 2002).

Nach der gängigen Nomenklatur werden die Antikörper in „cluster of differentiation“ (CD) eingeteilt. Das Panel kommerziell verfügbarer Antikörper wird kontinuierlich erweitert.

### 1.3.3 Zytogenetik

Das Spektrum der Methoden in der Zytogenetik hat in den letzten 30 Jahren eine erhebliche Expansion erfahren. Den Ausgangspunkt bildete die Einführung der Chromosomenbänderungsanalyse in die hämatologische Diagnostik. Diese Methode verschafft einen raschen Überblick über den Karyotyp der Blasten, ist aber in der Auflösung begrenzt, da die Chromosomen mit dem Lichtmikroskop beurteilt werden.

Submikroskopische Mutationen können durch neuere Untersuchungen wie Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), Southern-Blot, oder der Polymerasekettenreaktion (PCR) aufgedeckt werden, welche eine wesentlich höhere Sensitivität erlauben. Die verschiedenen Methoden der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (z.B. Interphase-FISH, Metaphase-FISH, Multicolour-FISH) sind darüber hinaus bei der Analyse komplexer Chromosomenveränderungen und zur Bestätigung genetischer Befunde sehr nützlich.

Da die Chromosomenkultivierung aus dem Knochenmark höhere Erfolgsraten als aus dem peripheren Blut zeigt, wird der Untersuchung von Knochenmark stets der Vorzug gegeben.

Für eine einheitliche Benennung des Karyotyps wird das „International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ als Standard verwendet. Die normale diploide Zelle besteht aus 46 Chromosomen (zusammengesetzt aus 22 Paaren Autosomen (1-22) und zwei Geschlechts-Chromosomen). Die Chromosomen werden durch das Zentromer in zwei Arme geteilt: ein kurzer Arm „p“ (wie französisch „petit“) und ein langer Arm „q“. Das Zentromer unterteilt die Chromosomen in metazentrische, submetazentrische und akrozentrische, bei welchen der p-Arm sehr kurz ist, und nur gelegentlich Satelliten-DNA enthält. Der Zugewinn eines kompletten Chromosoms wird mit einem „Plus“-Zeichen dargestellt (z.B. 47,XX,+8), ein Verlust mit einem „Minus“-Zeichen (z.B. 45,XX,-7). Die häufigsten chromosomalen Veränderungen sind Translokationen (t), Deletionen (del), Inversionen (inv), Duplikationen (dup) und Isochromosomen (i) (Mitelman 1995).

Bei den Chromosomenanomalien wird zwischen primären und sekundären unterschieden. Die primären induzieren die Entstehung der malignen Erkrankung und stehen in der Aberrationssequenz an erster Stelle. Es handelt sich meist um balancierte Translokationen oder Inversionen. Diese können zur Aktivierung von Onkogenen führen. Die sekundären Anomalien stellen meist Verluste oder Zugewinne von Chromosomenabschnitten dar und sind oft mit dem Verlust von Tumorsuppressorgenen assoziiert (Manual Leukämien 2003).

Der zytogenetische Befund stellt bei der AML den stärksten unabhängigen Prognoseparameter dar. Je nach Karyotyp bei Ausgangsdiagnose kann das Langzeitüberleben zwischen 5% (z.B. bei komplexen Chromosomenveränderungen) und >70% (z.B. bei einigen balancierten Translokationen) variieren (Swansbury et al. 1994, Schoch et al. 1997, Bloomfield et al. 1997). Damit schafft der genetische Befund auch eine wichtige Voraussetzung für die möglichst umfassende Aufklärung des Patienten.

Am Beispiel der akuten Promyelozytenleukämie FAB M3 und ihrer Variante M3v kann aufgezeigt werden, dass der genetische Befund auch ganz wesentlich zur Wahl der richtigen Therapie sein kann: Die Diagnose des  $t(15;17)/PML-RARA$ -Fusionstranskripts ist die Voraussetzung zur Einleitung der spezifischen Therapie mit All-Trans-RetinoL-Säure (ATRA), welche zur Inaktivierung des für die Promyelozytenleukämie charakteristischen  $PML/RARA$ -Fusionstranskripts und damit zur Ausdifferenzierung in der Granulopoese führt (Grimwade et al. 1997).

Durch die Einführung dieser „targeted therapy“ wurden in Verbindung mit Chemotherapie zu 5-Jahres-Überlebensraten von 75-85% erreicht (Tallman et al. 2003). Die rasche und präzise Diagnose dieses Subtyps ist von vitaler Bedeutung, da ein rascher Therapiebeginn mit ATRA oftmals die charakteristischen lebensbedrohlichen thrombembolischen und Blutungskomplikationen verhindern kann. Ein wesentlicher Gewinn hat sich durch die Einführung der Interphase-FISH-Diagnostik bei dieser Entität ergeben, mit welcher rasch die morphologische Verdachtsdiagnose verifiziert werden kann (Schoch et al. 2002).

### 1.3.4 WHO-Klassifikation der AML

Die AML ist nach klinischen Gesichtspunkten, nach morphologischen Kriterien, und nach ihren immunologischen und genetischen Eigenschaften ein sehr heterogenes Krankheitsbild, welches zunehmend eher als Komplex verschiedener Subklassen verstanden wird denn als geschlossene Entität. Daher ist eine Aufteilung in einzelne definierte Subklassen, welche zur Klassifikation, zur Festlegung der individuellen Prognose, und zur Planung der Therapie dienen können, von größter Wichtigkeit. Die Zytogenetik und auch die Molekulargenetik haben Grundlegendes in der Verbesserung der Klassifikation dieses heterogenen Krankheitskomplexes beigetragen. Die WHO-Klassifikation von 2001 hat diese zentrale Bedeutung genetischer Veränderungen bei der AML anerkannt und als zentralen Bestandteil integriert. Ferner basiert die WHO-Klassifikation (Tabelle 2) auf dem System der FAB-Klassifikation (Jaffe et al. 2001, Harris et al. 2000).

Auch in Bezug auf die Abgrenzung zwischen MDS und AML haben sich durch die WHO-Klassifikation wesentliche Veränderungen ergeben. Die erste Hierarchie der WHO-Klassifikation umfasst vier rekurrente Subtypen mit spezifischen balancierten Translokationen. Für diese Subtypen gilt die Bezeichnung AML auch dann, wenn die Zahl der Blasten im Knochenmark 20% unterschreitet. Die Grenze zwischen MDS und AML wurde von 30% Blasten im Knochenmark auf 20 % herabgesetzt; dadurch entfällt die Kategorie RAEB-T (refraktäre Anämie mit Blastenexzess), welche einst dem Myelodysplastischen Syndrom zugeordnet wurde.

**Tabelle 2: WHO-Klassifikation der AML (WHO:Classification of Tumors, 2001):**

<p><b>1. AML mit spezifischen zytogenetischen Translokationen</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- t(8;21)(q22;q22)/<i>AML1-ETO</i></li><li>- Akute Promyelozytenleukämie AML M3/M3v mit t(15;17)(q22;q11-12)/<i>PML-RARA</i></li><li>- inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)/<i>CBFβ/MYH11</i></li><li>- 11q23/<i>MLL</i>-Rearrangements</li></ul>
<p><b>2. AML mit multilinieärer Dysplasie (2-3 Zelllinien betroffen)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- sekundär nach Myelodysplasie/Myeloproliferativem Syndrom</li><li>- ohne vorausgegangenes Myelodysplastisches Syndrom</li></ul>

**3. Therapie- induzierte AML und MDS**

- nach Alkylanzien
- nach Epipodophyllotoxin
- andere Auslöser

**4. Akute Leukämien, nicht weiter klassifiziert**

- AML ohne andere Zuordnungsmöglichkeit
- minimal differenzierte AML
- AML mit Ausreifung
- Akute myelomonozytäre Leukämie
- Akute monozytäre Leukämie
- Akute Erythro-Leukämie
- Akute Megakaryoblasten-Leukämie
- Akute Basophilen-Leukämie
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose
- Myelosarkom/Chlorom
- Akute biphänotypische Leukämie

Hier noch eine kurze Erläuterung zu der vierstufigen WHO-Klassifikation der AML, welche in Tabelle 2 aufgeführt ist.

**1. AML mit spezifischen Chromosomenveränderungen:**

Hierunter fallen die sogenannten prognostisch günstigen Translokationen t(15;17), t(8;21) und inv(16), ferner die 11q23/*MLL*-rearrangements, welche mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind und häufig in Verbindung mit einer Therapieinduktion der AML stehen.

**2. AML mit multilineärer Dysplasie:**

Auf der Basis morphologischer Kriterien. Die dysplastischen Veränderungen werden als multilineär bezeichnet, wenn 50% der Zellen im Knochenmark Dysplasien in zwei oder drei Zelllinien aufweisen. Hier werden auch s-AML nach MDS erfasst.

**3. Therapieassoziierte AML und MDS (t-AML; t-MDS):**

Diese Einteilung erfolgt nach der Ätiologie der Erkrankung. In Zusammenhang mit der vorangegangenen Therapie zeichnen sich bestimmte zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen ab (z.B. Topoisomerase-II-Inhibitor-

induzierte Veränderungen an 11q23/*MLL*)

#### 4. **Akute Leukämien, nicht weiter klassifiziert:**

Hier wird u.a. auf die morphologischen Kriterien unter Berücksichtigung der FAB-Klassifikation bzw. die immunologischen Eigenschaften zurückgegriffen.

### 1.4 Prognosegruppen der AML

Die FAB-Klassifikation hat sich im diagnostischen Alltag zur Einteilung der AML bewährt (Bennett et al. 1976; Bennett et al. 1985). Dennoch waren auf ihrer Basis nur sehr begrenzte Aussagen in Bezug auf Therapieansprechen und Prognose bei der AML möglich. Eine wesentliche Verbesserung hat sich durch die Einteilung der AML in prognostisch relevante Subgruppen auf der Basis rekurrenter klonaler Chromosomenaberrationen ergeben (Swansbury et al. 1994; Bloomfield et al. 1997; Schoch, Kern et al. 2004). Damit können 55% aller *de novo* AML-Patienten definierten Prognosegruppen zugeordnet werden. Dies erlaubt eine Anpassung der therapeutischen Strategien an das individuelle Risiko des Patienten. Ein Problem stellen die 45% aller Patienten mit *de novo* AML mit normalem Karyotyp dar. Diese können aber inzwischen zu ca. 80% aber auf molekularer Ebene weiter charakterisiert werden.

Im Folgenden sollen die drei prognostischen Subgruppen auf der Basis des Karyotyps mit der Einteilung in eine günstige, ungünstige oder intermediäre Prognose genauer dargestellt werden.

#### 1.4.1 Günstige Prognose

Zu der Gruppe mit günstiger Prognose zählen die balancierten Translokationen *t(8;21)/AML1-ETO*, *t(15;17)/PML-RARA* und die *inv(16)/CBFB-MYH11*. Diese gehören zur ersten Hierarchie der AML nach der WHO-Klassifikation, wie dies zuvor dargestellt wurde. Sie sind relativ gesehen im jüngeren Lebensalter häufiger und betreffen etwa 20% der unter 60-jährigen Patienten (Löwenberg et al. 1999).

Bei Patienten mit *t(8;21)* sind komplette Remissionen in 90% und ein rezidivfreies Überleben von 60% nach Ablauf von 2 Jahren zu verzeichnen (Haferlach et al.

1996). Patienten mit  $t(15;17)/PML-RARA$  erreichen in 80-90% der Fälle eine komplette Remission mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 70% (Lengfelder et al. 2000). Auch die  $inv(16)/CBFB$  zeigt eine komplette Remissionsrate von >85% mit einer 5-Jahres Überlebensrate von >40% (Dastugue et al. 1995). Aufgrund dieser günstigen Verläufe gehört die allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation nicht mehr zur primären Therapiestrategie bei diesen Mutationen. Ferner wurde die RT-PCR als sehr sensitiver Parameter in der minimal-residual-disease-Diagnostik (MRD) für diese Entitäten etabliert, was eine wesentliche Verbesserung in der Verlaufsbeurteilung der residuellen Leukämieast darstellte (Schnittger et al. 2003).

#### 1.4.2 Ungünstige Prognose

Die Gruppe der Patienten mit einer ungünstigen Prognose zeigt im Gegensatz dazu ein Langzeitüberleben von unter 10%. Hiervon sind ca. 15 % der AML-Patienten betroffen. Der Anteil älterer Patienten ist in dieser Prognosegruppe relativ hoch.

Zu dieser ungünstigen Prognosegruppe gehören  $-5/del(5q)$ ,  $-7/del(7q)$ , die Inversion  $inv(3)/t(3;3)/t(1;3)$ , komplex aberrante Karyotypen und  $11q23/MLL$ -Anomalien. Die Definition der komplex aberranten Karyotypen ist noch nicht einheitlich. Voraussetzung ist aber in den meisten Studien ein Auftreten von mehr als drei Aberrationen, ausgenommen die balancierten Translokationen  $t(8;21)$ ,  $inv(16)$  und  $t(15;17)$  (Schoch et al. 2001). Die mittlere Überlebensrate bei Patienten mit komplexen Karyotypen beträgt nur zwischen 4.5 und 7 Monaten (Schoch et al. 2001). Die Prognose ist auch bei Anwendung intensivierter Therapiekonzepte und auch nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) wie in erster kompletter Remission als sehr ungünstig zu betrachten.

#### 1.4.3 Intermediäre Prognose

Diese Gruppe ist sehr heterogen, da sie unter anderem die Patienten mit normalem Karyotyp und Patienten mit seltenen chromosomalen Veränderungen beinhaltet, deren prognostische Bedeutung noch nicht geklärt ist. In diese Prognosegruppe gehen auch alle Patienten ein, welche ein oder zwei strukturelle oder numerische

Aberrationen, aber keinen komplexen Karyotyp aufweisen, und ferner sind für die Translokationen t(8;21), inv(16), t(15;17), und für Veränderungen an 5q, 3q, -5 und Chromosom 7 negativ sind.

Die häufigste chromosomale Aberration in dieser Prognosegruppe ist die Trisomie 8, deren Prognose in Abhängigkeit von zusätzlichen chromosomalen Aberrationen variabel ist. Eine alleinige Trisomie 8 erreicht Remissionsraten von ~70% und wird bei ~4 % der Erwachsenen mit *de novo* AML gefunden. Bei Fällen mit zusätzlichen chromosomalen Aberrationen wird sie in ca. 7% beobachtet. Tritt sie als Sekundäraberration bei prognostisch günstigen Anomalien wie t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21) und inv(16)(p13q22) auf, ist sie mit einer guten Prognose und Remissionsraten von 90% assoziiert. Wird sie allerdings von anderen chromosomalen Anomalien begleitet, z.B. im Rahmen komplexer Karyotypveränderungen, ist die Prognose viel ungünstiger (Schoch et al. 1997, Mrozek et al. 2001).

## 1.5 Therapie der AML

Die Behandlung der AML muss umgehend nach Diagnosestellung beginnen. Ohne Therapie beträgt die Lebenserwartung nach der Diagnose in der Regel nur wenige Monate. Die Therapie sollte immer in hämatologischen Zentren mit viel Erfahrung in der Behandlung dieser seltenen Krankheitsbilder erfolgen. Wünschenswert ist ferner ein Einschluss der Patienten in wissenschaftliche Studien mit dem Ziel der Optimierung der Therapiekonzepte.

Das Ziel der Therapie ist das Erreichen einer kompletten Remission (CR). Nach zytomorphologischen Kriterien bedeutet das einen Blastenanteil von weniger als 5% Blasten im Knochenmark. Die hämatologische CR verlangt >1000/ $\mu$ l Granulozyten und >100.000/ $\mu$ l Thrombozyten im peripheren Blut über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen (Cheson et al. 2003).

Die Rate kompletter hämatologischer und morphologischer Remissionen nach Applikation vergleichbarer Standardtherapieschemata liegt bei der AML über 60%. Nach einem Zeitraum von 4-5 Jahren beträgt die Rate anhaltender Remissionen aber nur noch knapp über 20%; ein erheblicher Anteil der Patienten erleidet in den folgenden Jahren ein Rezidiv (Büchner und Hiddemann 2002). Daher ist eine

Erweiterung des Begriffs der kompletten Remission notwendig (Cheson et al. 2003). Als sensitivere Parameter zur Definition der Remissionskriterien und zur Etablierung von Parametern zur minimal-residual-disease-Diagnostik (MRD) eignen sich vor allem die neueren Methoden der Leukämiediagnostik: die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), die PCR, und die Immunphänotypisierung mit der Multiparameterdurchflusszytometrie (MFC). Anhand der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungstechniken können bestimmte genetische Veränderungen im Verlauf nach entsprechender Sondenauswahl verfolgt werden (Bacher et al. 2006). Mit Hilfe der MFC werden sogenannte Leukämie-assoziierte Immunphänotypen (LAIP) definiert (Kern et al. 2004). Die PCR weist beispielsweise reziproke Fusionstranskripte oder Mutationen in Tyrosinkinase nach, welche dann ebenfalls quantitativ im follow-up verfolgt werden können (Schnittger et al. 2003; Schnittger et al. 2004, Fonatsch et al. 2003).

Die Behandlung der AML gliedert sich in eine Induktions- und eine Konsolidierungsphase: Die Induktionstherapie verfolgt das Ziel einer kompletten Remission. Im Falle einer akuten Promyelozytenleukämie wird die Behandlung durch All-Trans-Retinsäure (ATRA) ergänzt, wodurch der Differenzierungsstopp in der Granulopoese überwunden werden kann. Auch klinisch grenzt sich diese Entität durch die schweren Koagulopathien mit thrombembolischen Komplikationen wie z.B. Lungenembolien ab, welche die hohe Frühmortalität bedingen.

Die wichtigsten prognostischen Faktoren für das Erreichen einer CR sind Zytogenetik, Alter, Allgemeinzustand („Performance“) und Leukozytenzahl (Slovak et al 2000). Die Wahrscheinlichkeit einer CR sinkt mit steigendem Lebensalter. Mehrere Faktoren scheinen hier eine Rolle zu spielen: die reduzierte Toleranz gegenüber der Toxizität von Chemotherapeutika, die Häufung von Begleiterkrankungen und die steigende Inzidenz von prognostisch ungünstigen Karyotypen. Ferner sind in diesem Alter sekundäre oder therapieassoziierte AML häufiger. Sekundäre AML nach MDS oder nach CMPD sind häufiger komplex aberrant und zeigen häufig Resistenzen gegenüber antileukämischen Substanzen (Karp et al. 1997).

Diese Kriterien haben daher die Gestaltung der Therapieprotokolle maßgeblich beeinflusst. Die AMLCG-Therapiestudie beispielsweise gibt unterschiedliche Richtlinien je nach Alter der Patienten vor: Patienten unter 60 Jahren werden mit einer Doppelinduktion nach dem „TAD“-Regime (Thioguanin, Cytarabin,

Daunorubicin) und „HAM“-Schema (Hochdosiertes Cytarabin, Mitoxantron) behandelt. Bei Patienten über 60 Jahren entfällt die HAM-Therapie aufgrund der höheren Toxizität. Diese Therapieprotokolle gewähren komplette Remission in mehr als 60% der Fälle (Bishop 1997). Die Konsolidierungsphase dient der weiteren Eliminierung von residualen Leukämiezellen in der kompletten Remission.

Nach der Konsolidierung erfolgt im Rahmen der AMLCG-Protokolle fakultativ eine dreijährige Erhaltungstherapie. Je nach individueller Prognose, Vorhandensein eines kompatiblen Spenders, und „Transplantationstauglichkeit“ des Patienten wird die Indikation zur allogenen Knochenmark- oder Stammzelltransplantation in der ersten kompletten Remission abgewogen. Die Entwicklung der dosisreduzierten Konditionierung, welche die Frühmortalität bei der allogenen Transplantation reduziert, und die Toxizität der Konditionierungsschemata vermindert, hat die obere Altersgrenze für die Transplantation erheblich nach oben verschoben (Gorin et al. 2006).

Nicht zu unterschätzen ist immer noch das Problem der therapiebedingten Mortalität: Diese beträgt bei jungen Patienten derzeit um 5%, bei älteren Patienten sogar 20-30% (Øystein et al. 2001). Zwar sind Fortschritte bei der supportiven Therapie erzielt worden, z.B. durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF und GM-CSF), welcher die Dauer der Neutropenien und damit die Rate von Infektionen reduzieren. Jedoch hat sich leider keine Verminderung der Mortalität durch diese Maßnahme gezeigt (Löwenberg 1999, Witz et al. 1998, Link et al. 2000). Verbessert haben sich ferner die Möglichkeiten in der Transfusionsmedizin und in der antiinfektiösen Behandlung. Hier sind vor allem die Neuentwicklungen im Bereich der antimykotischen Therapie zu nennen, z.B. die Expansion des Spektrums von Azolen und auch die verbesserten serologischen Tests z.B. zum Nachweis von Aspergillen.

## **1.6 Pathogenese der AML**

Die normale Blutbildung nimmt ihren Ausgang im Knochenmark von pluripotenten Stammzellen, welche frühen sehr undifferenzierten Zellen entsprechen. Sie differenzieren in die verschiedenen Zellreihen wie Granulopoese, Erythropoese, und Megakaryopoese aus.

Bei der AML kommt es zur vermehrten Proliferation unreifer hämatologischer Vorläuferzellen, deren Differenzierungsfähigkeit gestört ist. Zum Verständnis der Leukämogenese hat das Two-Hit-Modell von Gilliland *et al.* wesentlich beigetragen. Dieses Modell impliziert, dass sich zwei verschiedene Mutationstypen ergänzen bzw. kooperieren: Sogenannte Klasse-I-Mutationen führen zu gesteigerter Proliferation. Hierunter fallen z.B. Mutationen in den *NRAS*-Onkogenen oder auch Mutationen von Genen, welche für Tyrosinkinase kodieren, wie *FLT3*. Klasse-II-Mutationen führen zu einem Differenzierungsstopp in der Granulopoese. Hier können Genfusionen wie die *t(8;21)/AML1-ETO* angeführt werden, welche direkt oder indirekt zur Beeinträchtigung der Transkription führen (Gilliland 2001, Knudson 2001). Letztere soll im Weiteren näher beschrieben werden.

### 1.7 Die Translokation *t(8;21)(q22;q22)/AML1-ETO*

Eine Translokation der Chromosomen 8q22 und 21q22 findet sich bei 6-8% aller akuten myeloischen Leukämien und in 20-30% aller FAB M2-Fälle. Sie gehört mit der *inv(16)/CBFB-MYH11* zu den sogenannten core-binding-Faktor (CBF)-Leukämien. Über 90% aller *t(8;21)* sind mit dem FAB-Subtyp M2 assoziiert; ferner finden charakteristische lange Auerstäbchen. Deutlich seltener findet man diese Translokation auch bei den FAB-Subtypen M1 und M4 (Lo Coco *et al.* 1997).

Die Translokation resultiert aus einer Fusion vom 5'-Anteil des *AML1*-Gens (auf 21q22) mit einem Grossteil des *ETO*-Gens (auf 8q22), wodurch das *AML1-ETO*-Fusionsgen entsteht. Im *AML1-ETO*-Fusionsgen fehlt die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne des *AML1*-Gens, die durch *ETO* ersetzt ist. Das normale *AML1*-Gen verschlüsselt die DNA-bindende Untereinheit des Transkriptionskomplexes *AML1-CBFB*, welcher für die normale Hämatopoese essentiell ist (Löwenberg *et al.* 1999).

Leukämiezellen mit einer *t(8;21)* haben in der Regel ein Allel, bei dem das *AML1*-Gen mit dem *ETO*-Gen fusioniert ist, und ein Allel mit einem normalen *AML1*-Gen (Zhang *et al.* 2001).

Um den Pathomechanismus des *AML1-ETO*-Fusionsproteins genauer zu klären, wurden transgene Mäuse untersucht, die dieses Protein in ihren myeloischen Zellen exprimieren. Das „knocking-in“ des *AML1-ETO*-Fusionsgens in den *AML1*-Lokus

führt zur Letalität in der Embryonalphase und zu einer Verminderung der hämatopoetischen Ausreifung. Mäuse, denen das *AML1*-Gen fehlt, zeigen die gleichen Phänomene. Dies zeigt, dass *AML1-ETO* ein dominierender Inhibitor der normalen *AML1*-*CBFB*-Funktion während der frühen Hämatopoese ist. Allerdings lässt sich durch Expression von *AML1-ETO* allein bei ausgewachsenen Mäusen keine Leukämie-Entstehung nachweisen. Erst durch Exposition mit anderen Mutagenen entstanden leukämieähnliche Erkrankungen (Yuan et al. 2001, Okuda et al. 1998, Zhang et al. 2001). Dies konnte durch weitere tierexperimentelle Studien belegt werden, die zeigten, dass *AML1-ETO* im Tiermodell zu Dysplasien in der Granulopoese und zum Ausreifungsstopp führt (Rhoades et al. 2000).

Offenbar ist die *t(8;21)* als ein initiales Ereignis zu sehen, welches in der Interaktion mit zusätzlichen Mutationen, die die Apoptose hemmen und die Zellproliferation stimulieren, zur Entstehung einer AML führt.

Die Expression von *AML1-ETO* behindert ferner die Expression anderer Gene, welche in die Transkription involviert sind, z.B. von *CEBPA*, welches den Transkriptionsfaktor C/EBPA kodiert (Pabst et al. 2001).

### **1.8 Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)**

Die FISH-Technik ist eine molekularbiologische Untersuchungsmethode, welche aus der hämatologischen Diagnostik nicht mehr wegzudenken ist. Sie erlaubt die Darstellung struktureller und numerischer chromosomaler Aberrationen und ist insbesondere sehr hilfreich auch bei der Analyse komplexer Chromosomenveränderungen, die allein auf der Basis der Chromosomenbänderungsanalyse nicht aufzuschlüsseln sind (Fuchs et al. 2006).

Die Technik basiert stets auf dem Prinzip der komplementären Basenpaarung.

Die Sonden-DNA wird entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Seltener werden bestimmte Markermoleküle (z.B. Biotin oder Digoxigenin) verwendet, welche anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gekoppelt und im Sinne der indirekten Markierung sichtbar gemacht werden. Eine Amplifizierung der Signale kann durch einen gegen den ersten Antikörper gerichteten Zweit-Antikörper erreicht werden („Sandwichmethode“).

Die Ziel-DNA aus der Patientenprobe, die im Präparat erkannt werden soll, muss als

Einzelstrang vorliegen. Dies wird durch Hitzedenaturierung erreicht. Im folgenden Renaturierungsschritt vereinen sich Ziel-DNA aus der Patientenprobe und Sonden-DNA zu einem Doppelstrang. Die entsprechend markierte DNA wird unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

DNA-Sequenzen werden gewöhnlich mit markierten DNA-Sonden nachgewiesen. Eine optimale Länge ist dabei wichtig: Kürzere Sonden bilden Nukleinsäurepaare geringer Stabilität, längere Sonden dringen dagegen oft nur schlecht in die Zellen ein. Mit Hilfe gentechnischer Methoden lässt sich prinzipiell jede DNA-Sequenz klonieren, isolieren und als Sonde verwenden.

Mit der FISH-Technik kann man auch ganze Chromosomen unter Einsatz von sogenannten Painting-Sonden abbilden. Alternativ kann man auch das Zentromer eines bestimmten Chromosoms oder aller Chromosomen anhand von Zentromersonden bzw. panzentromerischen Zentromersonden darstellen. Auch die isolierte Abbildung von Chromosomenenden ist möglich; hierbei werden sogenannte Telomersonden verwendet. Schließlich können einzelne Abschnitte auf einem Chromosom mit den entsprechenden Gensonden lokalisiert werden.

## **1.9 Fragestellung der Arbeit**

Bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) ließen sich bruchpunktnahe submikroskopische Deletionen bei 9%-16% aller Patienten in Interphase-FISH-Untersuchungen feststellen. Diese Deletionen umfassen mehrere hundert Kilobasen DNA. Es konnte gezeigt werden, dass diese bei der CML mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert sind (Sinclair et al. 2000; Huntly et al. 2001; Kolomietz et al. 2001). Ursächlich für die schlechtere Prognose dieser Patienten könnte ein Verlust von Tumorsuppressorgenen infolge der Deletionen sein (Huntly, Reid et al. 2001). Ferner wurde spekuliert, dass die submikroskopischen Deletionen Zeichen einer genetischen Instabilität sein könnten (Huntly et al. 2001).

Einige Studiengruppen untersuchten dies Phänomen auch bei AML und ALL mit balancierten Translokationen und fanden derartige submikroskopische Deletionen in ähnlicher Frequenz wie bei der CML. Die submikroskopischen Deletionen sind also möglicherweise unspezifische Ereignisse, die sich bei verschiedenen leukämogenen Fusionstranskripten nachweisen lassen (Martinet et al. 1997; Mathew et al. 1999;

---

Kolomietz et al. 2001). Da die bisherigen Studien zu submikroskopischen Deletionen bei den akuten Leukämien jeweils nur kleine Fallzahlen umfassen, bedarf dieser Aspekt weiterer Abklärung. Wir intendierten in dieser Arbeit die Untersuchung dieses Sachverhalts bei 77 Patienten mit AML mit t(8;21)/*AML1-ETO*.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patienten

In diese Arbeit wurden 77 erwachsene Patienten mit AML mit t(8;21)/*AML1-ETO* eingeschlossen. In 75 Fällen handelte es sich um eine Erstdiagnose, in zwei Fällen um einen Verlauf oder ein Rezidiv. Von 77 Patienten hatten 72 eine *de novo*-AML. In fünf Fällen trat die AML in Assoziation zu früherer Chemo- bzw. Strahlentherapie im Rahmen malignen Erkrankungen auf. Das Durchschnittsalter der 77 untersuchten Patienten lag bei 43.21 Jahren (range: 2-84 Jahre). 29 Patienten waren weiblich, 48 männlich.

Die klinischen Daten der 77 Patienten sind in der Tabelle 3 unter 3.1 zusammengefasst.

Von allen Patienten war Knochenmark und/oder peripheres Blut im Zeitraum von Juli 1996 bis Juni 2001 in das Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik im Klinikum Großhadern gesandt worden.

Alle Patienten wurden mit Hilfe einer Kombination von Zytomorphologie, Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie, Zytogenetik in Verbindung mit Interphase-FISH sowie Molekulargenetik, welche individuell auf den Einzelfall abgestimmt wurde (Haferlach et al. 2003; Schnittger et al. 2003; Kern et al. 2004; Schoch et al. 2004). Die zytomorphologische Klassifikation der AML folgte den FAB-Kriterien (Bennett et al. 1976; Bennett et al. 1985).

### 2.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

#### 2.2.1 Sonden

Die hier verwendeten lokusspezifischen Sonden können sowohl in der Interphase als auch in der Metaphase eingesetzt werden; chromosomenspezifische Sonden hingegen nur an Metaphasenchromosomen, da diese in der Interphase nicht sichtbar sind.

Der Nachweis mit lokusspezifischen Sonden während der Interphase ergibt pro Allel ein punktförmiges Signal. Es resultieren also bei normalem Chromosomensatz und

homologen Allelen zwei Signale pro lokusspezifischer Sonde. In der Metaphase besteht jedes Chromosom aus zwei Chromatiden. Somit liegen zwei Signale pro Chromosom vor; bei normalem Chromosomensatz bedeutet das für eine lokusspezifische Sonde insgesamt vier Signale (Leitch 1994).

Hier wurden direkt markierte Sonden der Firma VYSIS (Stuttgart) verwendet. Diese sind direkt mit den Farbstoffen „Spektrum Orange“ und „Spektrum Grün“ gekoppelt.

### 2.2.1.1 Lokusspezifische Sonden (LSI)

Die lokusspezifischen DNA-Sonden der Firma VYSIS stellen eine komplementäre Basensequenz zur Region 21q22 des Chromosoms 21 mit ca. 1,3 Megabasen dar (LSI AML1 Spektrum Grün) und überdeckt somit das ca. 250 Kilobasen große *AML1*-Gen.

Das ca. 87 Kilobasen große *ETO*-Gen auf Chromosom 8 wird von der Spektrum Orange-*ETO*-DNA-Sonde, die ca. 480 Kilobasen überspannt, gefärbt. In einer normalen Zelle ohne *AML1-ETO*-Fusionsgen entstehen zwei grüne Signale (Kopien der *AML1*-Gene auf den Chromosomen 21) und zwei orange Signale (Kopien der *ETO*-Gene auf den Chromosomen 8) (2G2O).

Bei der t(8;21) entstehen somit ein grünes (normales Chromosom 21 mit *AML1*), ein oranges (normales Chromosom 8 mit *ETO*), und zwei gelbe Signale (1G1O2Y). Die zwei gelben Signale resultieren aus der durch die Translokation entstandenen Juxtaposition von *AML1* und *ETO* auf der(8) und der(21).

(Siehe Anhang, Abb. 1a, b, c, d: FISH mit LSI-Sonde in einer Inter- und Metaphase, schematische Darstellung der Sonden und graphische Darstellung einer t(8;21)(q22;q22))

### 2.2.1.2 Chromosomenspezifische Sonden

Die chromosomenspezifischen DNA-Sonden enthalten die komplementäre Basensequenz für ein komplettes Chromosom. Sie hybridisieren bis auf wenige Ausnahmen am kurzen und am langen Arm.

- WCP 8 Spektrum Orange
- WCP 8 Spektrum Grün
- WCP 20 Spektrum Orange
- WCP 21 Spektrum Grün: Diese Sonde hybridisiert am Chromosom 21 (q-Arm).
- WCP 9 Spektrum Gelb: eine Mischsonde aus WCP 9 Spektrum Orange und WCP 9 Spektrum Grün.
- WCP 8 Spektrum Gelb: eine Mischsonde aus WCP 8 Spektrum Orange und WCP 8 Spektrum Grün.
- WCP 17 Spektrum Grün
- WCP 21 Spektrum Orange: Diese Sonde hybridisiert am Chromosom 21 (q-Arm).
- WCP 11 Spektrum Grün

Zu den lokusspezifischen Sonden gehören auch die Zentromersonden (CEP). Sie werden zum Nachweis einer Monosomie oder Trisomie eingesetzt. Für diese Arbeit wurde eine Zentromer-Sonde für das Chromosom 8 eingesetzt. Diese Sonde bindet im Chromosom an die Basensequenz im Zentomer 8p11.1-q11.1 und ist mit Spektrum Orange markiert.

## **2.2.2 FISH-Protokoll**

### **2.2.2.1 Material**

Im Folgenden werden die Lösungen und Geräte aufgeführt, die bei dieser Arbeit Gebrauch fanden.

#### **Verwendete Lösungen:**

##### **20x SSC Stammlösung, pH=7,0:**

350,7 g Natriumchlorid (NaCl) (MERCK, Darmstadt) + 176,4 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ ) (MERCK) ad 2000 ml Aqua bidest. (FRESENIUS, Bad Homburg)

**0,4x SSC, pH=7,0:**

10 ml 20x SSC + 490 ml Aqua bidest.

**2x SSC/0,1% Triton-X 100, pH=7,0:**

50 ml 20x SSC + 450 ml Aqua bidest. + 500 µl Triton-X 100 (MERCK)

**Mcllvaine`s Puffer, pH=7,0:**

1,26 g Zitronensäure (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) (MERCK) + 12,38 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (MERCK) ad 1000 ml Aqua bidest.

**DAPI-Standard:**

5 µg DAPI (SIGMA, Deisenhofen) + 10 ml 2x SSC

**DAPI-Gebrauchslösung:**

1,5 ml Mcllvaine`s Puffer + 4 µl DAPI-Standard

**Anti-Fade:**

50 µl 10x Dulbecco PBS + 5 mg p-Phenylendiamin (SIGMA), pH=8,0 einstellen + 450 ml Aqua bidest. + 4,5 ml Glycerin (SIGMA)

**Dapi-Antifade:**

1,5 ml Antifade + 4 Mikroliter DAPI-Standard

**Ethanol:**

100 %ig, gebrauchsfertig (MERCK)

**Carnoy`s Fixativ:**

Methanol (100%ig, gebrauchsfertig (MERCK)) + Eisessig (100%ig, gebrauchsfertig, Firma MERCK) im Verhältnis 3 : 1

**Fixogum:**

Klebstoff (MARABU, Tamm)

**Verwendete Geräte:****Zentrifuge:**

Eppendorf 5415C, Eppendorf AG, Hamburg

**Mikroskop:**

Lichtmikroskop + Fluoreszenzmikroskop (ZEISS Axiophot, Jena)

Filter:           - UV-Anregungsfilter für DAPI (blau)  
                  - Dualband-Anregungsfilter für FITC (grün)/TexasRed (rot)  
                  - Tripleband-Anregungsfilter für DAPI (blau)/ FITC (grün)/ TexasRed

**Chromosomenaufnahme und -bearbeitung:**

Soft- und Hardware inklusive CCD (Charge Coupled Device)-Kamera (ISIS-Metasystems, Altlußheim)

**Hybrite<sup>R</sup>:**

Hybridisierungsöfen (VYSIS, Stuttgart)

**Wasserbad:**

GFL 1092, Göttingen

**Laminar Air Flow:**

sterile Werkbank

**Trockenblock:**

Schleicher und Schnuell, MicroScience, Dassel

**2.2.2.2 Vorbereitung der Objektträger**

Die Probenröhrchen mit den in Carnoy's-Fixativ fixierten Zellen aus Knochenmark oder Blut werden aus dem Gefrierschrank entnommen und kurz aufgeschüttelt. Mit einer Pipette werden 5-12 Tropfen, je nach Trübung, aus dem Röhrchen entnommen und gleichmäßig aus ca. 30 cm Höhe auf einen entfetteten, auf 4°C vorgekühlten,

nassen (Aqua bidest.-) Objektträger aufgetropft. Dies geschieht unter streng sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank. Die Präparate verbleiben über eine Minute in einer feuchten Kammer und werden anschließend luftgetrocknet. Die Zelldichte wird im Phasenkontrastmikroskop beurteilt und eine geeignete Stelle mit ca. 100 Zellen im Blickfeld auf dem Objektträger markiert.

### 2.2.2.3 Protokoll für FISH mit der lokusspezifischen Sonde (LSI) *AML1-ETO*

**1. Schritt:** Herstellung der Lokusspezifischen Sonde: Es handelt sich um eine Mischung aus LSI ETO-Spektrum Orange- und LSI AML1-Spektrum Grün-markierter Sonden-DNA. Die Sonde wird im Verhältnis 7 (Puffer) zu 2 (Aqua bidest.) zu 1 (Sonde) hergestellt. Die Sonden dürfen nur kurz Lichteinfluss ausgesetzt werden.

**2. Schritt:** Der zu hybridisierende Objektträger wird in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 1 min dehydriert (70%, 80%, 90%, 100%-iges Ethanol) und dann luftgetrocknet.

**3. Schritt:** Auf die markierte Stelle des Objektträgers wird nun mit einer Pipette 1.5µl Sondengemisch aufgetragen, mit einem Deckglas versehen und mit Fixogum abgedichtet.

**4. Schritt:** In den Hybrite<sup>R</sup> wird zusätzlich zum Objektträger ein feuchter Streifen eingelegt, um ein feuchtes Milieu aufrecht zu erhalten. Das Präparat wird bei 76°C für 3 min denaturiert und bei einer Temperatur von 37°C anschließend für mindestens 12 Stunden hybridisiert.

**5. Schritt:** Nach Beendigung der Inkubation wird der Objektträger dem Hybrite<sup>R</sup> entnommen, das Deckglas verworfen, und der Objektträger für 2 min in eine im Wasserbad auf 75 °C vorgewärmte 0,4%ige SSC-Lösung gestellt. Anschließend wird das Präparat in eine vorbereitete 2xSSC/0,1 % Triton-X 100 Lösung gestellt, und nach 2 min wieder entnommen.

**6. Schritt:** Der noch feuchte Objektträger wird mit ca. 2 Tropfen DAPI und Antifade

versehen, mit einem Deckglas bedeckt, und mit einem Trockenblock trocken gestrichen.

**7. Schritt:** Bis zum Mikroskopieren wird das Präparat in eine trockene Kammer gelegt und vor Licht geschützt.

#### **2.2.2.4 Auswertung der FISH-Präparate**

Das Präparat wird unter einem Mikroskop mit Epifluoreszenz und CCD-Kamera ausgewertet. Bei der Interphasen-FISH-Analyse werden im Präparat 100 Zellkerne ausgezählt und – soweit vorhanden - zusätzlich Metaphasen beurteilt.

Für die FISH-Analyse wurden drei verschiedene Filtersysteme verwendet: UV-Anregungsfilter (DAPI), Dualband-Anregungsfilter (FITC/Texas Red) und Tripleband-Anregungsfilter (DAPI/FITC/Texas Red).

Alle relevanten Inter- bzw. Metaphasen wurden zur Dokumentation digital gespeichert (ISIS-Metasystems).

#### **2.2.2.5 Whole chromosome painting (FISH)**

Die Anfärbung ganzer Chromosoms in der Metaphase wurde mittels WCP-Sonden (whole chromosome painting) durchgeführt. Diese erfolgt nach Abschluss der Hybridisierung und der Auswertung mit lokusspezifischen Sonden (siehe dazu Kapitel 2.2.2.3). Hier sind nun die entsprechenden Schritte des whole chromosome paintings aufgeführt:

**1. Schritt:** Nach Auswertung der Interphasen unter dem Mikroskop wird das Deckglas vom Präparat entfernt und 10 min. in 2xSSC 0,1% Triton-X 100 Lösung gestellt. Danach wird das Präparat luftgetrocknet.

**2. Schritt:** Der zu hybridisierende Objektträger wird in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 1 min dehydriert (70%, 80%, 90%, 100% iges Ethanol).

**3. Schritt:** Nun wird mit einer Pipette 10l WCP-Sonde (7µl Puffer, 2µl Wasser, 1µl Sonde) entsprechend der zu untersuchenden Chromosomen auf die markierte Stelle des Objektträgers aufgetragen.

**4. Schritt:** Das Präparat wird nun zusammen mit einem feuchten Streifen in den Hybrite eingelegt, bei 70°C denaturiert und anschließend bei 37°C für mindestens 12 Stunden hybridisiert.

**5. Schritt:** entsprechend Kapitel 2.2.2.3. 5.

### **2.2.2.6 Auswertung**

(Vergleiche Kapitel 2.2.2.4)

Die relevanten Metaphasen können durch die genau dokumentierte Lokalisation auf dem Objektträger durch vorangegangene Speicherung mit dem ISIS-Metasytem, wieder aufgefunden werden.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Ergebnisse der Chromosomenanalyse in Kombination mit FISH bei 77 Patientenproben mit AML mit t(8;21)/AML1-ETO**

Es wurden Knochenmark- und/oder Blutproben von 77 Patientenproben mit AML mit t(8;21)/AML1-ETO mit Hilfe der FISH-Technik bezüglich möglicher Deletion in der Bruchpunktregion der Translokation untersucht. Das Material war bis auf zwei Ausnahmen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose entnommen worden. Tabelle 3 zeigt Alter der Patienten, die Diagnose, den Zeitpunkt der Untersuchung (Erstdiagnose, Verlauf, Rezidiv) und den Karyotyp. In den folgenden Abschnitten sollen außerdem Fälle mit Besonderheiten des Karyotyps genetisch weiter charakterisiert werden.

**Tabelle 3:** Alter, Diagnose, Untersuchungszeitpunkt, Karyotyp von 77 Patienten mit AML mit t(8;21) (m: male; f: female; ZP: Untersuchungszeitpunkt; ED: Erstdiagnose; V: Verlauf; R: Rezidiv; CTX: Chemotherapie)

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	ZP	Karyotyp
1	m	76	AML	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [1],45, X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [1], 45, X,-Y,add(2)(q35),t(8;21)(q22;q22) [18]
2	w	77	AML	ED	45, X,-X,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [22]
3	w	5	t-AML, Z.n. PNET	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [1], 46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [9],46,XX [13]
4	w	78	t-AML, Z.n. Magen-Ca	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [15]
5	w	79	AML M2	ED	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [19]
6	m	7	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [21]
7	w	65	AML M2	ED	46,XX,t(8;18;21)(q22;p11;q22) [25]
8	w	34	AML	ED	46,XX,add(7)(q32),t(8;21)(q22;q22) [16],46,XX [1]
9	w	61	t-AML M2, Z.n. Radiatio und CTX bei Mamma-Ca	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[4],45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [13],46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [2],46,XX [2]
10	m	2	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]
11	m	53	AML M1	ED	47,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22),+del(9)(q22) [18],46,XY [2]
12	m	80	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),t(11;16)(q13;p13.1) [23],46,XY [6]
13	w	46	AML M2	ED	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [20]
14	m	19	AML	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]
15	m	31	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	ZP	Karyotyp
16	w	20	AML	ED	46,XX,t(5;14)(p13;q11)c,t(8;21)(q22;q22) [19], 46,XX,t(5;14)(p13;q11)c [1]
17	m	48	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [18],46,XY [2]
18	m	43	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [19],46,XY [1]
19	w	39	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [1], 45,X,-X,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [2]
20	w	41	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [1], 46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [14], 45,X,-X,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [4],46,XX [1]
21	m	8	AML	ED	46,X,-Y,+8,t(8;21)(q22;q22),t(15;20)(q15;p13) [15],46,XY [5]
22	w	27	AML M2	ED	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [20]
23	w	42	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [12],45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [3], 46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22q34) [3],46,XX [2]
24	w	24	AML M2	ED	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [25]
25	m	64	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [18],46,XY [2]
26	w	44	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [16],46,XX [4]
27	m	9	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [8],45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [11], 46,XY [1]
28	m	70	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [25]
29	m	63	AML	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	ZP	Karyotyp
30	w	62	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [1],47,XX,+8,t(8;21)(q22;q22) [2],47,XX,+8,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [13]
31	w	66	AML M2	ED	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [10], 45,X,-X,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q13) [8],46,XX [2]
32	m	3	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]
33	m	52	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [11]
34	m	30	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [18],46,XY [2]
35	w	50	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [20]
36	m	67	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [19],46,XY [1]
37	w	59	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [20]
38	m	35	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [20]
39	m	68	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [1], 46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [12], 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [4]
40	m	28	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [16],46,X,-Y,+4,t(8;21)(q22;q22) [3], 46,XY [1]
41	m	54	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [4], 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [4], 46,X,-Y,+8,t(8;21)(q22;q22) [12]
42	w	29	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [20]
43	m	37	t-AML M2, Z.n. Colon-Ca, Z.n. M. Hodgkin	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	ZP	Karyotyp
44	m	23	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]
45	w	40	AML M2	ED	45,X,-X,t(8;17;21)(q22;q25;q22) [7], 46,XX [1]
46	m	17	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [4], 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [11], 46,XY [1]
47	w	36	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [19], 46,XX [1]
48	m	60	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [1], 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [19]
49	w	6	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [6],45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [10], 45,X,-X,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [4]
50	m	26	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]
51	m	25	AML M2	ED	46,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),+der(21)t(8;21)(q22;q22).
52	m	11	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]
53	m	56	AML M4	ED	47,XY,+8,t(8;21)(q22;q22) [15]
54	m	15	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [18], 46,XY [2]
55	m	4	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]
56	m	49	AML M2, DysG	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [20]
57	m	81	AML M2	ED	46,X,-Y,+8,der(9)t(9;13)(q34;q14),ins(21;8)(q22;q22q24) [20]

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	ZP	Karyotyp
58	m	21	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [9], 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [6]
59	w	59	Rezidiv der AML, jetzt M1	1.R	46,XX,del(7)(q22q32),t(8;21)(q22;q22) [6],46,XX,der(1)t(1;15)(p36;q22),t(8;21)(q22;q22),t(10;18)(q22;q12) [10], 46,XX,inv(1)(p35q21),t(1;7)(p34;q35),t(8;21)(q22;q22) [2],46,XX, t(5;17)(q22;p13),del(6)(q23),t(8;21)(q22;q22), dup(15)(q11q26),der(16)t(5;16)(?;p13.1) [2]
60	m	69	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [19], 46,XY [1]
61	w	18	AML M1, Grenzbefund M2	ED	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [10]
62	m	32	t-AML M2 nach Glioblastom	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [6], 46,XY [14]
63	m	55	AML M2	ED	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [5], 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [10], 46,XY [5]
64	w	36	AML M2	V	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [9], 46,XX [11]
65	m	57	AML M2	ED	46,XY,t(8;20;21)(q22;q11;q22),del(9)(q22)[10], 45,X,-Y,t(8;20;21)(q22;q11;q22),del(9)(q22)[9],46,XY [2]
66	m	47	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [19], 46,XY [2]
67	m	72	AML M2	ED	47,XY,+8,t(8;21)(q22;q22) [10], 46,XY [10]
68	w	22	AML	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [5]
69	m	74	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [6], 45,idem,del(9)(q13q32) [2], 46,idem,del(9)(q13q32),+del(9)(q13q32) [6],46,XY [7]
70	m	83	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [23]
71	w	84	AML M2	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [19], 46,XX [1]

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	ZP	Karyotyp
72	m	51	AML	ED	92,XXYY,t(8;21)(q22;q22)x2[3], 46,XY,t(8;21)(q22;q22) [17]
73	w	81	AML M2	ED	46,XX,der(8)t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22),der(21)t(8;21)(q22;q22) ins(21;9)(q22;q22q34) [10],- 46,XX [11]
74	m	32	AML	ED	46,X,-Y,+6,t(8;21)(q22;q22) [21]
75	m	15	AML	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [20]
76	m	23	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [15]
77	m	52	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;11;21)(q22;p15;q22) [20]

### 3.2 Patienten mit Trisomie 8

32 von 77 Patienten (42%) hatten eine isolierte t(8;21). Bei 7 von 77 Patienten (9%) fand sich zusätzlich zur t(8;21) eine Trisomie 8. Diese konnte in allen Fällen durch die FISH-Untersuchung bestätigt werden, welche dann jeweils ein zusätzliches oranges Signal zeigte (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Übersicht über 8 Patienten mit t(8;21) und +8

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Karyotyp
21	m	8	AML	46,X,Y,+8,t(8;21)(q22;q22), t(15;20)(q15;p13) [15], 46,XY [5]
30	w	62	AML2	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [1], 47,XX,+8,t(8;21)(q22;q22) [2], 47,XX,+8,t(8;21)(q22;q22), del(9)(q22) [13]
41	m	54	AML M2	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [4], 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [4], 46,X,-Y,+8,t(8;21)(q22;q22) [12]
51	w	25	AML M2	46,X,Y,t(8;21)(q22;q22),+der(21)t(8;21) (q22;q22).
53	m	56	AML M4	47,XY,+8,t(8;21)(q22;q22) [15]
57	m	81	AML M2	46,X,Y,+8,der(9)t(9;13)(q34;q14), ins(21;8)(q22;q22q24) [20]
67	m	72	AML M2	47,XY,+8,t(8;21)(q22;q22) [10], 46,XY [10]

#### Patient Nr. 21:

**Karyotyp:** 46,X,Y,+8,t(8;21)(q22;q22),t(15;20)(q15;p13) [15], 46,XY [5]

**Auswertung:** 90 von 97 Interphasen (93%) zeigten ein grünes, zwei orange, und zwei gelbe Signale (1G2O2Y). Dies bestätigte die Translokation t(8;21) mit einem numerischen Zugewinn von Chromosom 8. Vier Zellen (4%) zeigten ein grünes, ein oranges, sowie zwei gelbe Fusionssignale (1G1O2Y), somit die t(8;21) ohne Nachweis der Trisomie 8. Drei Zellen (3%) zeigten die Konstellation zwei grüne und zwei orange Signale (2G2O) ohne Nachweis einer Translokation, also die normale Signalkonstellation.

**Patient Nr. 30:**

**Karyotyp:** 46,XX,t(8;21)(q22;q22) [1], 47,XX,+8,t(8;21)(q22;q22) [2],  
47,XX,+8,t(8;21)(q22;q22), del(9)(q22) [13]

**Auswertung:** Ausgezählt wurden 97 Interphasen, wobei sich in 93 Fällen (96%) die Signalkonstellation ein grünes, zwei orange und zwei gelbe Signale (1G2O2Y) zeigte, einer t(8;21) mit Trisomie 8 entsprechend. Vier Interphasen (4%) zeigten ein grünes, ein oranges und zwei gelbe Fusionssignale (1G1O1Y), gemäß der t(8;21) ohne zusätzliche Aberrationen.

**Patient Nr. 41:**

**Karyotyp:** 46,XY,t(8;21)(q22;q22) [4], 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [4],  
46,X,-Y,+8,t(8;21)(q22;q22) [12]

**Auswertung:** Ausgezählt wurden 103 Interphasen. Dabei fand sich in 94 Fällen (91%) die Konstellation ein grünes, zwei orange und zwei gelbe Signale (1G2O2Y), entsprechend t(8;21) mit Trisomie 8. Des Weiteren fanden sich vier Interphasen (4%) mit zwei grünen und zwei orangen Signalen (2G2O), somit ohne Translokation. Außerdem fanden sich fünf Interphasen mit Translokation t(8;21) (1G1O2Y).

**Patient Nr. 51:**

**Karyotyp:** 46,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),+der(21)t(8;21)(q22;q22).

**Auswertung:** Es fanden sich in 96 von 108 Interphasen (89%) die Signalkonstellation ein grünes, ein oranges und zwei gelbe Signale (1G1O2Y), entsprechend der t(8;21). 12 Zellen (11%) zeigten die Konstellation ein grünes, ein oranges und drei gelbe Signale (1G1O3Y). Im WCP-Painting zeigte sich ein zusätzliches derivatives Chromosom 21. Somit entsprach dies dem Karyotyp 46,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),+der(21)t(8;21)(q22;q22).

**Patient Nr. 53:**

**Karyotyp:** 47,XY,+8,t(8;21)(q22;q22) [15]

**Auswertung:**

Es zeigte sich in 93 von 102 untersuchten Interphasekernen (91%) die Konstellation ein grünes, zwei rote, und zwei gelbe Signale (1G2O2Y), entsprechend einer t(8;21) mit zusätzlicher Trisomie 8. In neun Fällen (9%) entsprach der Befund einer t(8;21) mit einem grünen, einem orangen, und zwei gelben Signalen (1G1O2Y).

**Patient Nr. 57:**

**Karyotyp:** 46,X,Y,+8,der(9)t(9;13)(q34;q14), ins(21;8)(q22;q22q24) [20]

**Auswertung:** Von 91 Interphasekernen zeigte sich in 84 Fällen (92%) ein grünes, drei orange und ein gelbes Signal (1G3O1Y), entsprechend der t(8;21) mit Trisomie 8. In sieben Zellen (8%) konnte keine Translokation nachgewiesen werden, hier fanden sich zwei grüne und zwei gelbe Signale (2G2Y).

**Patient Nr. 67:**

**Karyotyp:** 47,XY,+8,t(8;21)(q22;q22) [10], 46,XY [10]

**Auswertung:** Es wurden 118 Interphasen untersucht. In 90 Fällen (76%) zeigte sich mit der Konstellation ein grünes, zwei orange und zwei gelbe Signale (1G2O2Y), die t(8;21) mit zusätzlicher Trisomie 8. In 20 Fällen (17%) zeigte sich keine Translokation mit zwei grünen und zwei orangen Signalen (2G2O). In acht Fällen (7%) konnte die Translokation t(8;21) nachgewiesen werden (1G1O2Y).

### 3.3 Insertion ins(21;8)(q22;q22q24)

Einer der Patienten zeigte eine Insertion ins(21;8). Dies soll näher beschrieben werden:

**Patient 57:**

**Karyotyp:** 46,X,-Y,+8,der(9)t(9;13)(q34;q14), ins(21;8)(q22;q22q24) [20]

**Auswertung:** Bei sieben von 91 Interphasekernen (8%) war in der IP-FISH-Analyse keine Translokation t(8;21) zu finden, 84 Kerne (92%) zeigten jedoch die Konstellation ein grünes, drei orange und ein gelbes Signal (1G3O1Y). Die Painting-Untersuchung zeigte eine Trisomie des Chromosoms 8 und eine Insertion durch den Chromosomenabschnitt 8q22-q24 in das Chromosom 21q22 (siehe Anhang, Abb. 5a - d).

### 3.4 Verlust eines Kolokalisationssignals

Bei sieben von 77 Patientenproben fand sich eine ungewöhnliche Signalkonstellation (9%) mit dem Verlust eines Kolokalisationssignals. In vier Fällen, d.h. in 5% aller Patienten, ließ sich dies auf submikroskopische Deletionen zurückführen, in drei Fällen (4%) auf variante Translokationen.

#### 3.4.1 Submikroskopische Deletionen des *ETO*-Signals

Zunächst sollen die vier Patienten (5%) mit submikroskopischen Deletionen beschrieben werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Patienten mit submikroskopischen Deletionen

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	ZP	Karyotyp
60	m	69	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [19], 46,XY [1]
68	w	22	AML	ED	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[5]
76	m	23	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[15]
73	w	81	AML M2	ED	46,XX,der(8)t(8;21)(q22;q22), del(9)(q22),der(21)t(8;21)(q22;q22) ins(21;9)(q22;q22q34) [10], 46,XX [11]

#### Patient Nr. 60:

**Karyotyp:** 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22) [19], 46,XY [1]

**Auswertung:** Bei der lokusspezifischen IP-FISH-Untersuchung zur Detektion von t(8;21) zeigten sich in 94/101 (93%) Interphase-Nuklei ein Signalverlust des zweiten gelben Signals mit der Konstellation ein oranges, zwei grüne und ein gelbes Signal (1O2G1Y). In 7/101 Zellen (7%) der Zellen zeigte sich eine normale Signalkonstellation (2G2O) ohne Nachweis der Translokation. Anhand von WCP-FISH für die Chromosomen 8 und 21 wurde die Translokation t(8;21) bestätigt (Abb. 2a, b, e).

**Patient Nr. 68:****Karyotyp:** 46,XX,t(8;21)(q22;q22)[5]**Auswertung:** Wie bei Patient Nr. 60 zeigte sich mit IP-FISH ein Verlust des zweiten gelben Signals. Von ausgewerteten 75 Interphase-Kernen waren 65 betroffen (87%). Auch hier ließ sich die t(8;21) mit WCP bestätigen.**Patient Nr. 76:****Karyotyp:** 45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[15]**Auswertung:** Bei 80 von 100 Interphase-Kernen (80%) zeigte sich eine Deletion des *ETO*-Signals. WCP-FISH zeigte das Koloaliationssignal auf der(8) (Abb. 2b, c).**Patient Nr. 73:****Karyotyp:** 46,XX,der(8)t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22),der(21)t(8;21)(q22;q22)ins(21;9)(q22;q22q34) [10], 46,XX [11]**Auswertung:** Bei diesem Fall handelt es sich um eine Deletion des *ETO*-Anteils auf Chromosom 21q+ mit zusätzlicher Insertion des Chromosomenstücks 9q22-q34 in 21q22. Es ergab sich die Konstellation zwei grüne, zwei orange und ein gelbes Signal (2G2O1Y). Die WCP-Hybridisierung von Chromosomen 9 (grün+orange), 21 (grün) und 8 (orange) zeigt die t(8;21) und bestätigte die Insertion (Abb. 4a, b, c, d).**3.4.2 Variante Translokationen mit Verlust eines *ETO*-Signals**In 4/77 Fällen fanden sich variante Translokationen (5%). Diese führten in drei Fällen (4%) zu dem Verlust eines *ETO*-Signals, bei einem Patienten (Nr. 65) war der Bruchpunkt distal zum *ETO*-Gen, so dass beide *ETO*-Gene erhalten blieben.Tabelle 5: Patienten mit varianten Translokationen und Verlust eines *ETO*-Signals

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	ZP	Karyotyp
7	w	65	AML M2	ED	46,XX,t(8;18;21)(q22;p11;q22) [25]
45	w	40	AML M2	ED	45,X,-X,t(8;17;21)(q22;q25;q22) [7], 46,XX [1]
76	m	52	AML M2	ED	45,X,-Y,t(8;11;21)(q22;p15;q22)[20]

**Patient Nr. 7:****Karyotyp:** 46,XX,t(8;18;21)(q22;p11;q22) [25]**Auswertung:** 11/102 Interphase-Kerne (11%) waren ohne Nachweis der Translokation t(8;21). 91/102 (89%) zeigten die Konstellation eines grünen, zwei oranger und eines gelben Signals (1G2O1Y).

In Kombination mit der Zytogenetik bzw. durch die Darstellung einer Metaphase im IP-FISH-Präparat handelte es sich hier um eine variante Translokation. Diese resultiert aus zwei Translokationsschritten: Nach der Translokation der Chromosomen 8 und 21 findet eine weitere Translokation zwischen Chromosom 21 und 18p11 statt. Dadurch transloziert der *ETO*-Anteil von Chromosom 21 auf Chromosom 18 (Abb. 3a, b).

**Patient Nr. 45:****Karyotyp:** 45,X,-X,t(8;17;21)(q22;q25;q22) [7], 46,XX [1]**Auswertung:** Auch hier findet nach Translokation t(8;21) eine weitere Translokation statt, die den *ETO*-Anteil auf ein drittes, in diesem Fall Chromosom 17, transloziert. 4/90 Interphasen (4%) zeigten keine Translokation. 86/90 (96%) wiesen die Konstellation zwei grüne, zwei orange und ein gelbes Signal auf (2G2O1Y). WCP-FISH bestätigte eine variante Drei-Wege-Translokation (Abb. 3b, c).**Patient Nr. 76:****Karyotyp:** 45,X,-Y,t(8;11;21)(q22;p15;q22)[20]**Auswertung:** Bei 93 von 100 Interphasekernen (93%) fand sich die Signalkonstellation zwei grüne, zwei orange und ein gelbes Signal (2G2O1Y). Die WCP-Hybridisierung bestätigte eine Drei-Wege-Translokation mit den Chromosomen 8, 11 und 21. Das *AML1-ETO*-Rearrangement befand sich auf Chromosom 8, der *ETO*-Anteil translozierte von Chromosom 21q22 auf das Chromosom 11p15 (Abb. 3b).

### 3.5 Variante Translokation mit Bruchpunkt distal des *ETO*-Gens

Bei einem Patienten (Nr. 65) fand sich eine variante Translokation mit einem Bruchpunkt distal des *ETO*-Gens.

**Patient Nr. 65:**

**Karyotyp:** 46,XY,t(8;20;21)(q22;q11;q22),del(9)(q22) [10],

45,X,Y,t(8;20;21)(q22;q11;q22),del(9)(q22) [9],46,XY [2]

**Auswertung:** Bei 90 von 99 IP- Kernen (91%) fand sich die Signalkonstellation ein grünes, ein oranges und zwei gelbe Signale (1G1O2Y). Die Translokation der Chromosomen 20q11 und 21q22 erfolgte distal oder proximal des *AML1-ETO* Fusionsgens. Durch eine Painting-Untersuchung der Chromosomen 20 und 21 konnte geklärt werden, dass sich das Fusionsignal auf Chromosom 21 befand, die sekundäre Translokation also folglich distal des *AML1-ETO*-Fusionsgens stattfinden musste. In der WCP-Untersuchung der Chromosomen 8, 20 und 21 zeigte sich ein Stück des Chromosoms auf Chromosom 20 (siehe Anhang, Abb. 6a, b).

## 4. Diskussion

Reziproke Translokationen mit der Folge pathologischer Genfusionen sind ein häufiger Mechanismus bei der AML.

Am häufigsten sind die  $t(8;21)/AML1-ETO$ , die  $t(15;17)/PML-RARA$ , die  $inv(16)/CBFB-MYH11$ , die mit einer relativ guten Prognose einhergehen, sowie die  $11q23/MLL$ -rearrangements, welche prognostisch sehr ungünstig sind und häufig in Verbindung mit früherer Chemo- und Strahlentherapie stehen (Schoch et al. 2003). Diese Subentitäten repräsentieren die erste Hierarchie der WHO-Klassifikation der AML (Jaffe et al. 2001).

Die  $t(8;21)/AML1-ETO$  zeigt bei der AML eine Inzidenz von 6-12% aller Fälle und damit die höchste Frequenz unter all diesen genannten reziproken Rearrangements. Sie gehört mit der  $inv(16)/CBFB-MYH11$  zu den so genannten CBF-Leukämien, welche durch Interaktion mit dem CBF-AML1-Komplex mit der Transkription interferieren. Dieser Komplex besteht aus den CBFA- und CBFB-Proteinen, welche durch die *AML1*- und *CBFB*-Gene kodiert werden.

Bei der  $t(8;21)$  kommt es zur Fusion des *AML1*-Gens (bzw. *CBFA*) auf 21q22 mit dem *ETO*-Gen auf 8q22, wodurch die Bildung eines *AML1-ETO*-Fusionsproteins induziert wird. Dadurch wird zum einen die Bildung des normalen core binding factor-Komplexes verhindert. Ferner fungiert das chimäre *AML1-ETO*-Protein als dominanter Inhibitor der Aktivierung der Transkription durch das *AML1-CBFA*-Wildtypprotein. Als Resultat der Genfusion wird also die Transkription supprimiert (Kundu et al. 2002).

Die hohe Koinzidenzrate von Mutationen in der Klasse-III-Rezeptortyrosinkinase *KIT* mit  $t(8;21)(q22;q22)/AML1-ETO$  spricht dafür, dass beide Mutationen in der Leukämogenese kooperieren. Es konnte ferner gezeigt werden, dass *KIT*-Mutationen einen ungünstigen prognostischen Einfluss in der Subgruppe mit *AML1-ETO* haben (Kuchenbauer 2006; Paschka et al. 2006; Schnittger et al. 2006; Shimada et al. 2006).

Ein selteneres Beispiel für eine CBF-Leukämie mit Involvierung des *AML1*-Gens wird durch die  $t(3;21)(q26;q22)$  mit dem Fusionstranskript *AML1-EVI* repräsentiert, welche selten bei *de-novo*-AML, häufiger aber im Zusammenhang mit einer Induktion durch Chemo- und Strahlentherapie gefunden wird. Ferner ließ sich diese Translokation als

Zusatzaberration bei Blastenkrisen einer CML nachweisen (Izutsu et al. 2002; Mitani 2004). Die t(3;21) ist prognostisch ungünstig im Gegensatz zur t(8;21).

Die t(8;21) kann bereits vorgeburtlich entstehen. Dies wurde durch die retrospektive Untersuchung von Guthriekarten von Kindern, die im Alter von wenigen Jahren eine AML mit t(8;21) entwickelt hatten, bei denen sich retrospektiv das entsprechende *AML1-ETO*-Fusionstranskript bereits zum Zeitpunkt der Geburt nachweisen ließ, festgestellt (Wiemels et al. 2002). Ähnliches wurde auch bei anderen akuten Leukämien mit reziproken Fusionstranskripten belegt, und zwar vor allem bei akuten lymphatischen Leukämien der B-Reihe und auch der T-Reihe (Fasching et al. 2000; McHale et al. 2003). Die lange Latenzzeit bis zum Leukämieausbruch – bei einigen dieser Patienten mehr als zehn Jahre – ist ein Hinweis darauf, dass zusätzliche genetische Ereignisse notwendig sind, um eine Leukämie schließlich zu induzieren (Wiemels et al. 2002). Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass sich *AML1-ETO*-Genfusionen 100x häufiger bei Neugeborenen nachweisen lassen, als das entsprechende Risiko beträgt, irgendwann im späteren Leben eine AML mit t(8;21) zu entwickeln (Mori et al. 2002). Die t(8;21) mag also ein gutes Beispiel für eine Mutation sein, welche in der Mutations-Sequenz in der der AML-Entwicklung an initialer Stelle steht.

Die Prognose von Patienten mit t(8;21) ist im allgemeinen gut. 90%-98% der Patienten zeigen eine komplette Remission nach Therapie; ca. 60% der Patienten zeigen disease-free-survival nach 2 Jahren (Haferlach et al. 1996; Grimwade et al. 1998). Dennoch wäre eine Kenntnis weiterer prognostischer Faktoren wünschenswert, um eine detaillierter Einstufung auch innerhalb dieser Subgruppe vornehmen zu können.

Zum einen lässt sich diese durch eine Analyse der Zusatzaberrationen erreichen. Beispielsweise scheint der Verlust eines Geschlechtschromosoms mit einer besseren Prognose zu korrelieren (Haferlach et al. 1996).

Eine weitere Möglichkeit, die Subgruppe mit t(8;21) zu charakterisieren, ergibt sich durch die Analyse der *AML1-ETO*-Bruchpunktregion.

Bei ca. 9% aller CML- und auch der Philadelphia-positiven ALL-Fälle ließen sich submikroskopische Deletionen im Bereich der *BCR-ABL*-Bruchpunktregion nachweisen, welche zumindest bei der CML mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren. Diese Deletionen betrafen sowohl die 5' *ABL*-Region, mit einer

variablen Größe von 400 KB bis zu 1.3 MB als auch die 3'BCR-Region mit Deletionen zwischen wenigen KB bis zu einer MB (Kolomietz 2001).

Die Bedeutung dieses Phänomens ist noch nicht geklärt. Möglicherweise ist die verschlechterte Prognose bei Patienten mit Deletionen bei einer CML auf den Verlust von Tumorsuppressorgenen zurückzuführen. Die limitierte Zahl bisher analysierter Fälle gestaltet definitive Aussagen jedoch noch problematisch (Specchia et al. 2003).

Auch bei der AML mit (inv16)(p13q22), welche mit der t(8;21) zu den häufigsten CBF-Leukämien zählt, wurden charakteristische Deletionen von einer Größe zwischen 150 und 350 KB in der Bruchpunktregion beschrieben. Durch die inv(16)(p13q22) entstehen zwei Fusionsgene: 5'-CBF $\beta$ /MYH11-3' und 5'-MYH11/CBFB-3' auf dem Chromosomenabschnitt 16q. Die beschriebenen Deletionen betrafen die 5'-Region des MYH11-Genabschnittes oder proximale Regionen. Das 5'-CBFB/MYH11-3'-Fusionsgen war hingegen bei allen bislang untersuchten Patienten intakt. Die Frage einer eventuellen prognostischen Bedeutung dieser Deletionen wird derzeit noch diskutiert (Kuss et al. 1996, Martinet et al. 1997, Marlton et al. 1995).

Ziel dieser Arbeit war es, die Inzidenz von submikroskopischen Deletionen bei AML mit t(8;21)(q22;q22)/AML1-ETO zu klären und diese Deletionen besser zu charakterisieren. Insgesamt untersuchten wir 77 Patienten mit einer AML mit t(8;21) mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und fanden dabei eine Frequenz von 5% submikroskopischen Deletionen (4/77). Die Deletion betraf in allen Fällen den 5' Anteil von ETO. In einem der vier Fälle von 5'ETO-Deletionen fand sich zusätzlich eine Insertion von Material des langen Arms von Chromosom 9 in 21q statt. Die klinische Bedeutung der submikroskopischen Deletionen bei der t(8;21) kann bislang noch nicht abgeschätzt werden, da entsprechende größere Verlaufsstudien fehlen. In einer Untersuchung an Patienten mit einer Deletion des 5'ETO-Anteils bei t(8;21) zeigte sich in vier von sechs Fällen vier Jahre nach Therapiebeginn eine stabile Remission (Godon et al. 2002). Aufgrund der geringen Inzidenz submikroskopischer Deletionen werden nur Multicenterstudien oder Metaanalysen die Frage einer prognostischen Bedeutung klären können.

Ferner fanden wir eine Inzidenz von 5% (4/77) varianter Translokationen. Diese führten in drei von vier Fällen zu einem Verlust eines *ETO*-Signals, welche durch die Translokation von 5'*ETO* auf das dritte Partnerchromosom im Sinne einer Drei-Wege-Translokation bedingt war. Der 5'-Anteil des *ETO*-Gens war hier also nicht deletiert, sondern auf ein drittes Partnerchromosom transloziert. Im Detail fanden wir die varianten Translokationen t(8;18;21)(q22;p11;q22, t(8;17;21)(q22;q25;q22), und t(8,11,21)(q22,p15,q22).

Die Aufklärung dieser komplexen Aberrationen war nur möglich durch eine Kombination von Chromosomenbänderungsanalyse, Interphase-FISH und whole chromosome painting (WCP): Der 3'*ETO*-Anteil des Chromosoms 8 fusioniert mit dem 5'*AML1*-Anteil von Chromosom 21. Es kommt dabei zeitgleich oder anschließend zu einer weiteren Translokation mit einem der genannten dritten Partnerchromosomen am Bruchpunkt 21q22. Dies führt dazu, dass der 5'*ETO*-Anteil auf dieses dritte Chromosom transloziert. Das *AML1-ETO*-Fusionstranskript auf dem Chromosom 8 bleibt erhalten.

Es werden zwei verschiedene Hypothesen zur Entstehung dieser komplexen Varianten diskutiert, ein Ein-Stufen- und ein Zwei-Stufen-Modell. Das Ein-Stufen-Modell geht davon aus, dass das komplexe Rearrangement ein einzelnes Ereignis darstellt. Hierbei kommt es zeitgleich zum Bruch verschiedener Chromosomenregionen und anschließend zu einer Fehlvereinigung der Bruchstücke. Das Zwei-Stufen-Modell impliziert hingegen, dass aus einer primären t(8;21) durch ein weiteres Ereignis ein komplexeres Rearrangement entsteht. Bei dieser Theorie sollten dabei beide Zellklone aufzufinden sein, einer davon mit klassischer t(8;21). Ferner würde dies bedeuten, dass gleiche Genregionen aufeinander folgend bei Translokationen beteiligt wären (Aurich et al 1997).

Bezüglich der prognostischen Bedeutung solcher varianter Translokationen bei t(8;21) ist die Datenlage noch widersprüchlich. In einigen Studien wurde ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie beschrieben (Ishida et al. 2002). Andere Studien zeigten allerdings keine veränderte Prognose im Vergleich zur klassischen Translokation (Ishida et al. 2002).

Bei einem weiteren Patienten mit einer varianter Translokation t(8;20;21) war der Bruchpunkt distal von *ETO* gelegen; am ehesten im Sinne einer sekundären Translokation nach der t(8;21) mit dem Chromosom 20, wobei die Bruchpunktregion distal der Region 8q22 liegt und daher das Fusionstranskript vollständig erhalten

bleibt.

Ferner sind kryptische *AML1-ETO*-Rearrangements beschrieben worden, bei denen es durch Rearrangements der Regionen 8q22 und 21q22 zur Entstehung des *AML1-ETO*-Fusionstransskripts kommt, welche aber mit der Chromosomenbänderungsanalyse nicht entdeckt werden können. Die Häufigkeit liegt bei AML-Patienten weit unter der klassischen Translokation. Diese entgehen ohne RT-PCR oder FISH-Untersuchungen der Diagnosestellung. Nur die Kombination aus klassischer Zytogenetik, FISH und RT-PCR kann bei Fällen, bei denen zytomorphologisch der V.a. eine t(8;21) geäußert wird, zur Detektion dieser Fälle verhelfen (Rowe et al. 2000).

Ferner fanden wir einen Fall mit einer Insertion von 8q22-q24 in die Region 21q22, welche zu einem Rearrangement von *AML1-ETO* führte (46,X,-Y,+8,der(9)t(9;13)(q34;q14), ins(21;8)(q22;q22q24). Bei Insertionen wie in diesem Fall kann von einem Ein-Stufen-Modell ausgegangen werden, da nur zwei Bruchpunkte aufgedeckt wurden, einer in 21q22 und ein weiterer in 8q22 (Aurich et al. 1997). Auf Grund der geringen Fallzahlen können keine Aussagen zur Prognose getroffen werden.

Daneben sind *AML1-ETO*-Rearrangements auch bei Patienten mit ins(8;21) beschrieben, welche aber seltener als die ins(21;8) sind (Specchia et al. 2004).

Generell werden derartige Insertionen sehr selten beschrieben, was aber auch technisch bedingt sein könnte. Auch hier gilt die Empfehlung, bei Verdacht auf eine Beteiligung der Genregionen 8q22 und 21q22 die Zytogenetik durch PCR- und FISH-Untersuchungen zu ergänzen (Gamerding et al. 2003). Nur so lassen sich diese Veränderungen endgültig aufklären.

Abschließend soll noch auf die Trisomie 8 eingegangen werden, welche häufig als Zusatzaberration zur t(8;21) auftritt. Die Trisomie 8 tritt isoliert oder in Assoziation zu anderen zytogenetischen Aberrationen auf. Sie ist die häufigste chromosomale Aberration bei einer Vielzahl hämatologischer Erkrankungen, z.B. beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) und bei den chronischen myeloproliferativen Erkrankungen (CMPD).

Trotz der hohen Inzidenz ist über den Pathomechanismus dieser chromosomalen Aberration wenig bekannt (Paulsson et al. 2003). Im Rahmen einer Gen-Dosis-

Hypothese wäre es zu diskutieren, dass das Fortschreiten der Tumorerkrankung negativ durch den numerischen Zugewinn beeinflusst werden könnte, da einige Studien eine schlechtere Prognose bei Patienten mit Tetrasomie 8 beschreiben (Heller et al. 2003).

## 5. Zusammenfassung

Die Translokation  $t(8;21)(q22;q22)/AML1-ETO$  tritt in 7-12% aller AML-Fälle bzw. bei 10-40 % aller FAB M2-Subtypen auf und ist mit einer günstigen Prognose vergesellschaftet. In den meisten Fällen kann die Translokation durch Chromosomenbänderungsanalysen identifiziert werden. Kryptische *AML1-ETO*-Rearrangements entstehen meist bei komplexen Translokationen, Inversionen oder Insertionen und treten in ca. 4% der Fälle auf.

Ziel dieser Arbeit war die weitere Aufklärung der Struktur der  $t(8;21)$  mittels einer Kombination von Chromosomenbänderungsanalysen, Interphase-FISH und WCP-FISH bei 77 Patienten mit  $t(8;21)/AML1-ETO$ . Dabei zeigte sich ein erheblicher Anteil von Patienten mit chromosomalen Aberrationsmustern, welche nicht der „klassischen“  $t(8;21)$  entsprachen: 5% der Patienten wiesen submikroskopische Deletionen am *ETO*-Gen auf, und 5% zeigten variante Translokationen, in der überwiegenden Zahl in Folge von Drei-Schritt-Translokationen. Insertionen, welche in einer *AML1-ETO*-Genfusion resultierten, fanden wir in weiteren 1%.

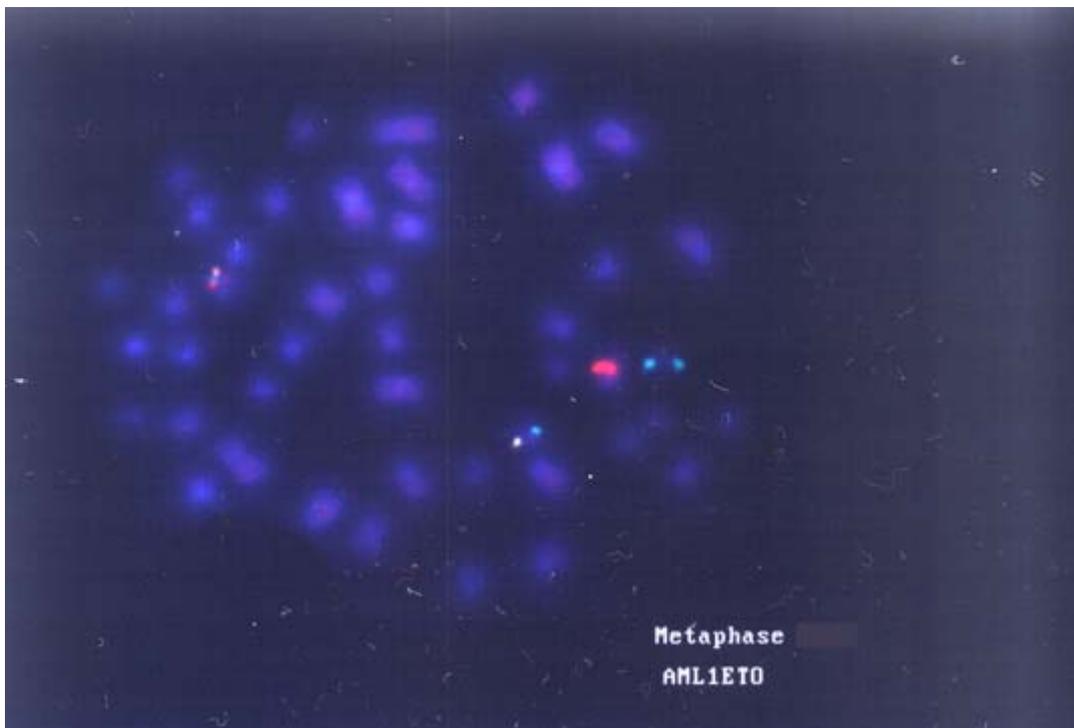
Die prognostische Bedeutung der submikroskopischen Deletionen und der varianten Translokationen ist noch unklar. Jedoch ist es von größter Bedeutung, alle Fälle mit einem Verdacht auf eine Involvierung der entsprechenden Bruchpunkte als Resultat der zytomorphologischen oder der zytogenetischen Analysen sorgfältig abzuklären, z.B. mittels einer Kombination Interphase-FISH bzw. WCP-FISH, ergänzt durch RT-PCR für das entsprechende Fusionstranskript. Natürlich können im Zweifelsfall auch weitere Methoden hinzugezogen werden, z.B. 24-colour-FISH.

Nur durch sorgfältige Aufklärung all dieser Fälle bzw. der Evaluation des klinischen Verlaufs dieser Patienten kann mehr Klarheit in die pathogenetische und prognostische Bedeutung der Strukturvarianten der  $t(8;21)$  gebracht werden und die Frage geklärt werden, ob diese strukturellen Details künftig bei therapeutischen Fragestellungen berücksichtigt werden sollen.

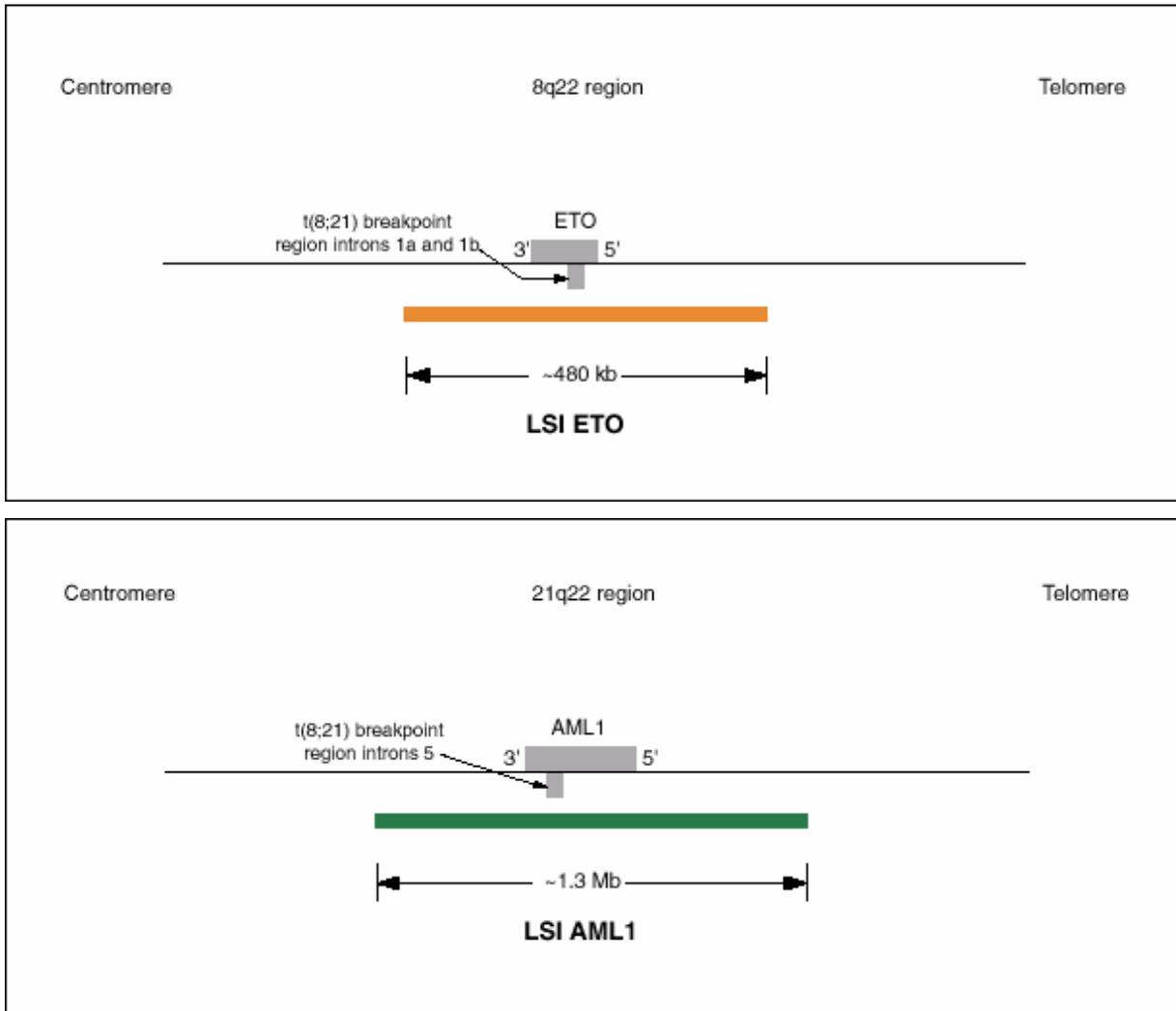
## 6. Anhang:



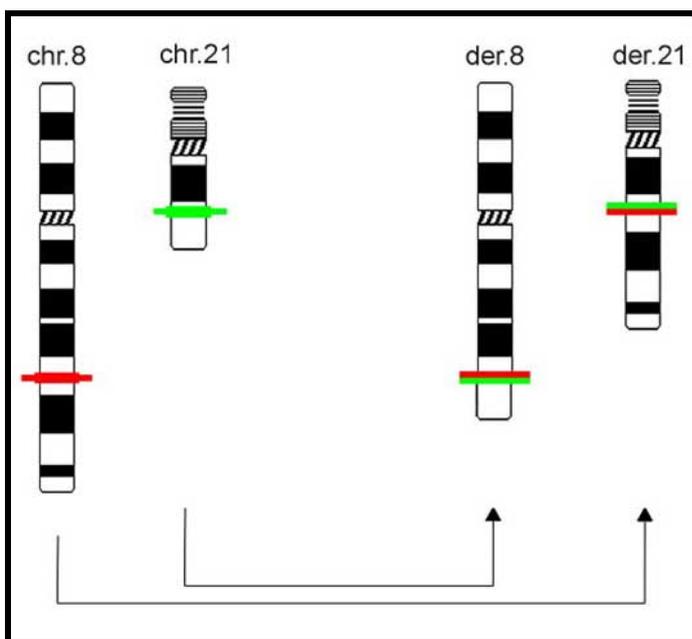
**Abb. 1a:** IP-FISH Signalkonstellation mit LSI-Sonden für ETO-Gen auf Chromosom 8 Spektrum orange und AML1-Gen Spektrum grün auf Chromosom 21.



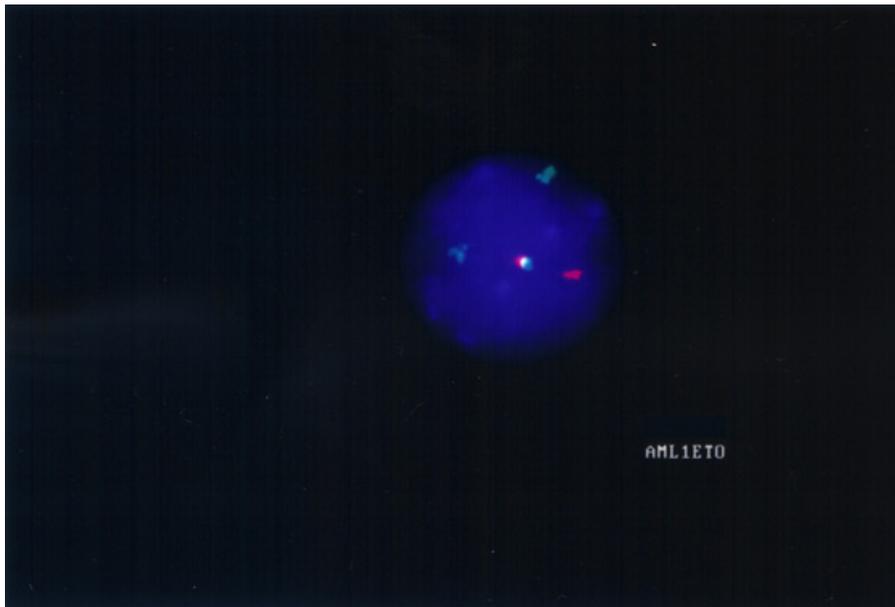
**Abb. 1b:** FISH Signalkonstellation einer Metaphase zur Darstellung einer Translokation  $t(8;21)$ . Normales Chromosom 8 Orange, normales Chromosom 21 Grün und zwei gelbe Signale (grün+ orange) für die Derivate 8 und 21.



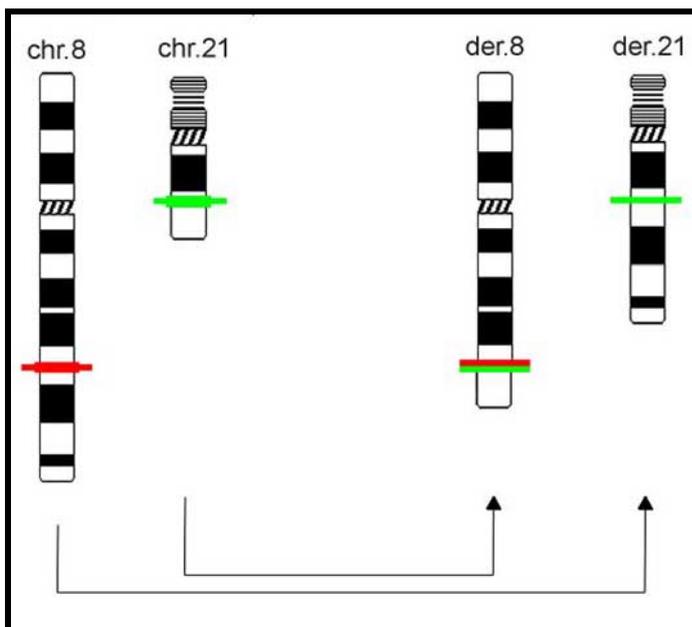
**Abb. 1c:** Schematische Darstellung der lokusspezifischen Sonden für AML1 und ETO (Firma Vysis).



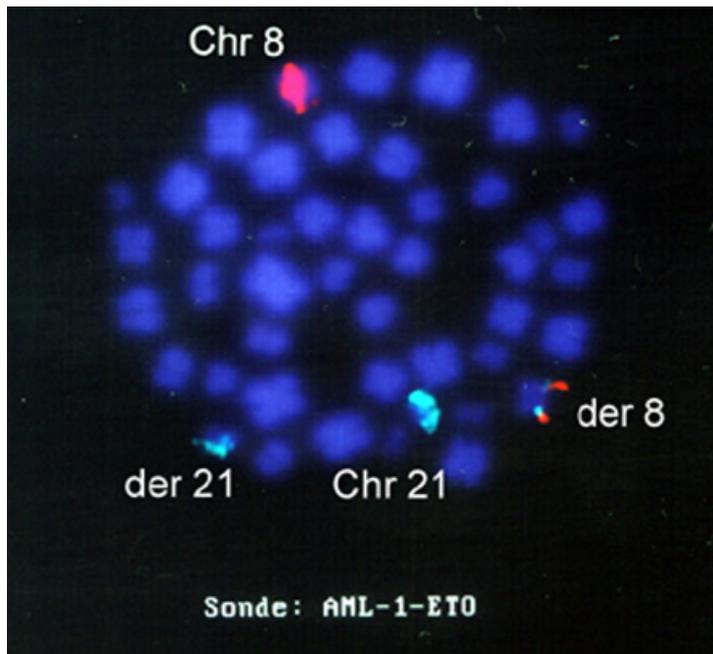
**Abb. 1d:** Die Translokation t(8;21)(q22;q22) graphisch dargestellt.



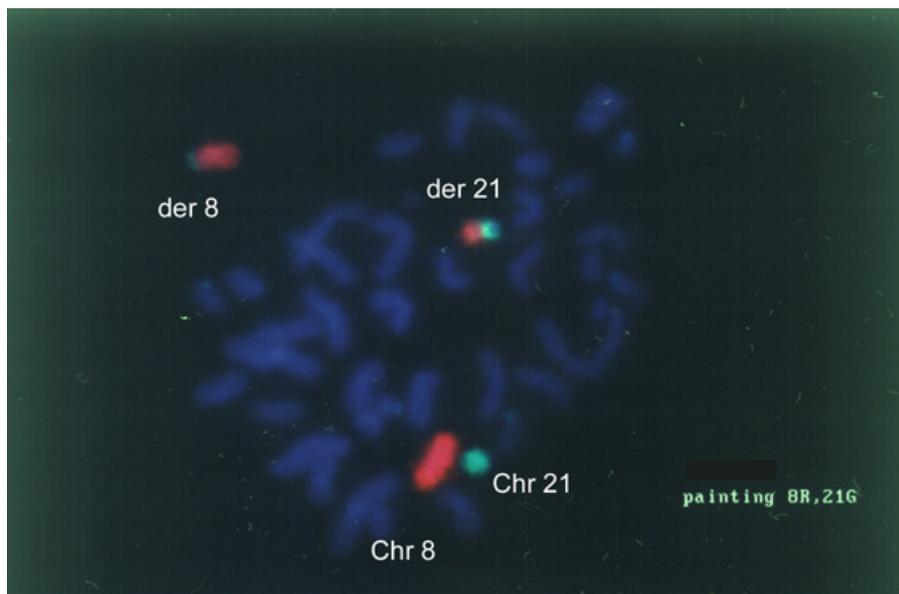
**Abb. 2a:** IP- FISH zur Darstellung von  $t(8;21)(q22;q22)$  mit Deletion des 5'ETO-Anteils auf Chromosom 21 (Patient 1).



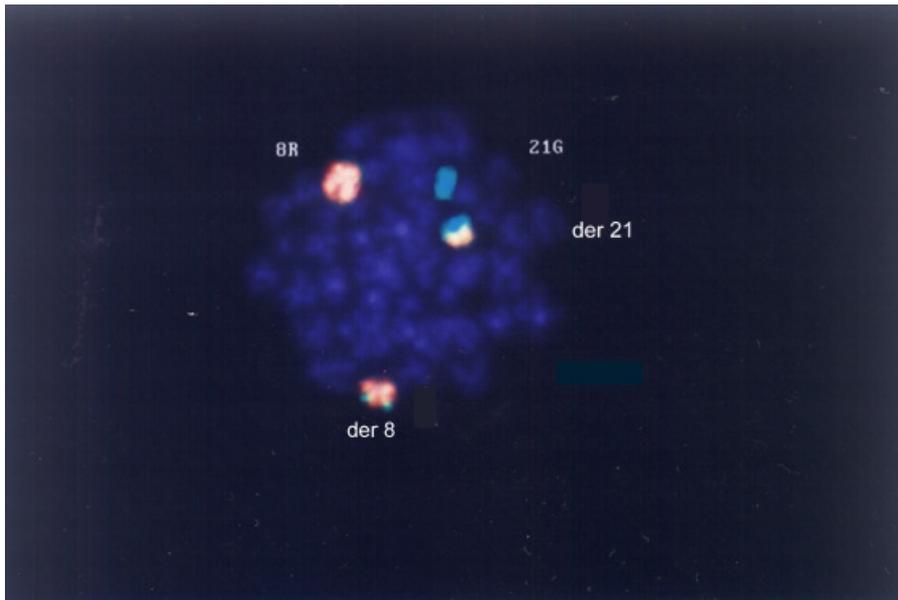
**Abb. 2b:** Graphische Darstellung einer Translokation  $t(8;21)(q22;q22)$  mit Deletion der 5'Region des ETO-Gens (fehlen des roten Signals auf Derivat 21).



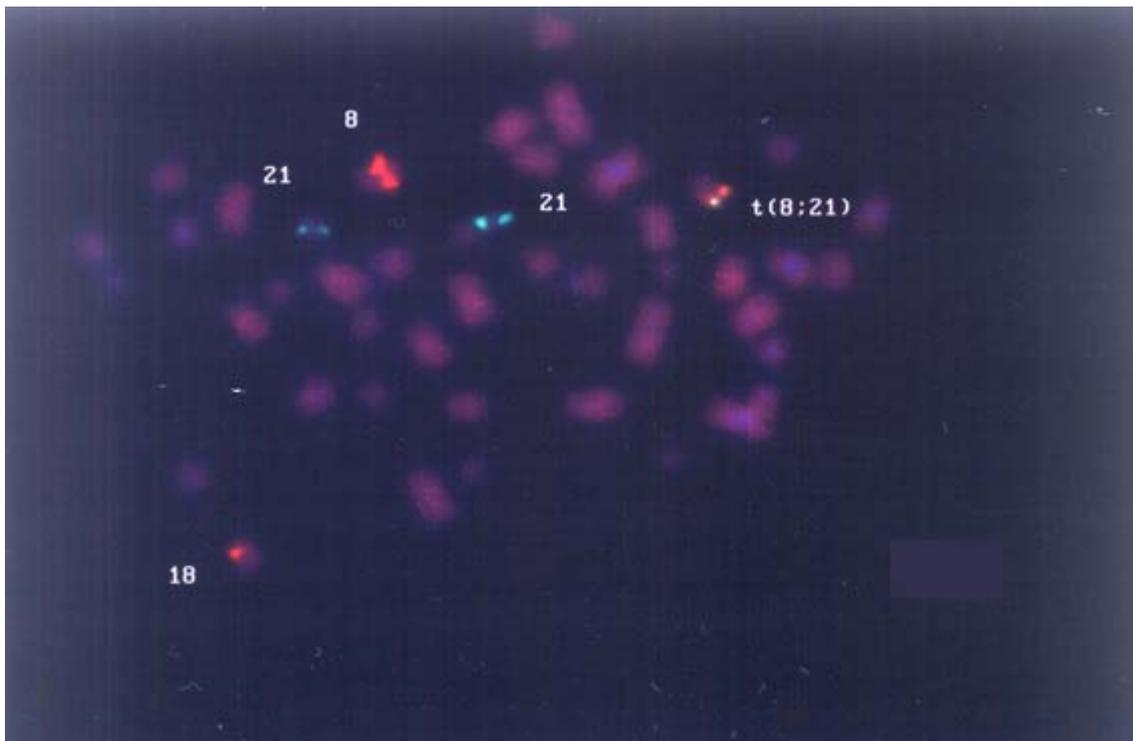
**Abb. 2c:** Signalkonstellation bei IP-FISH bei Patient mit  $t(8;21)(q22;q22)$  in einer Metaphase. Deletion des ETO-Anteils auf Chromosoms 21 (Patient 76).



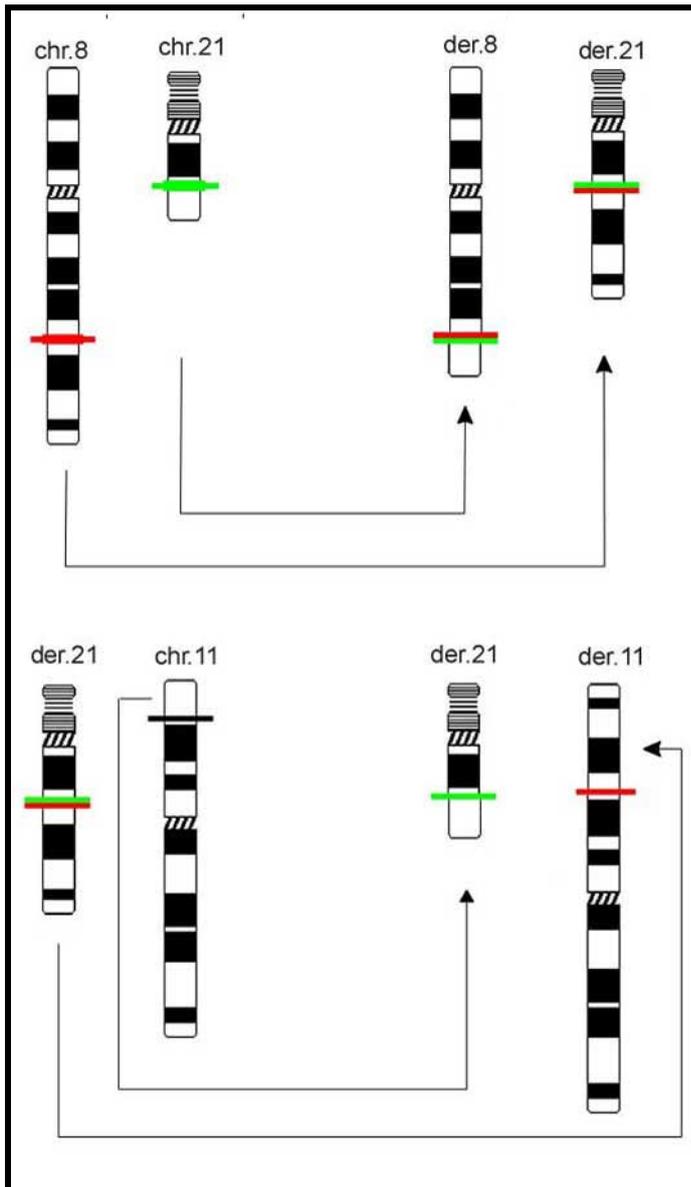
**Abb. 2d:** Whole-chromosome-painting der Chromosomen 8 und 21 in einer Metaphase bei Translokation  $t(8;21)$  mit Deletion des ETO-Anteils (nicht sichtbar) (Patient 76).



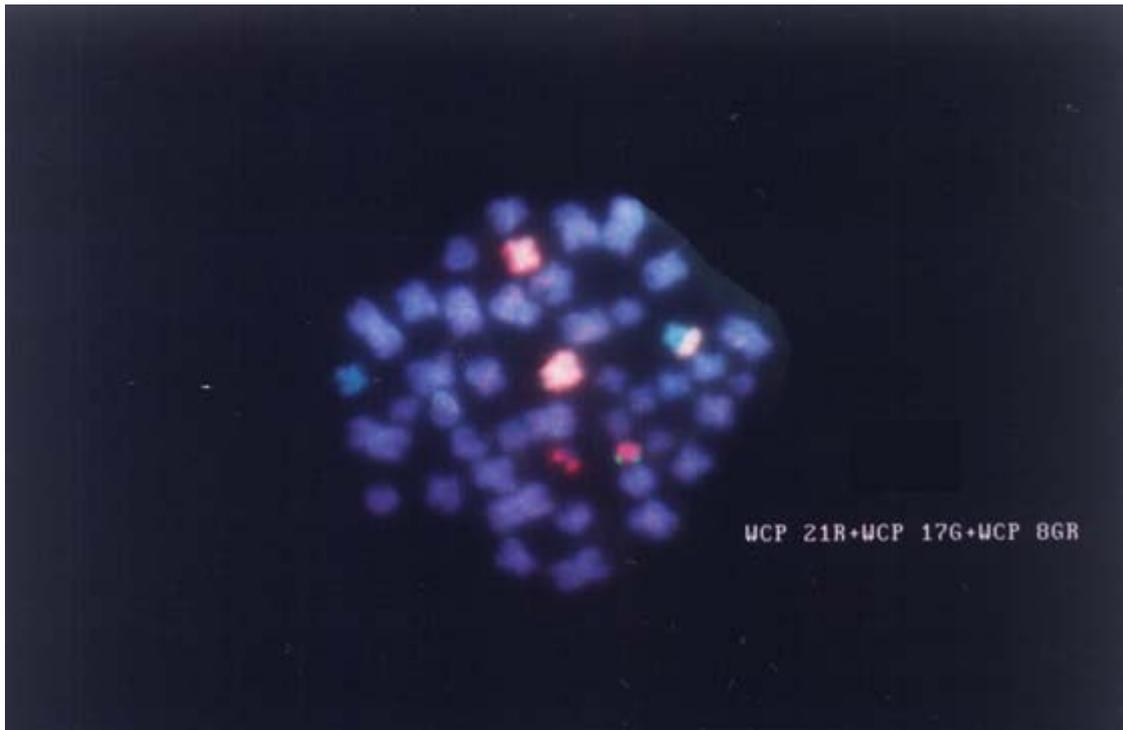
**Abb. 2e:** WCP der Chromosomen 8 (Orange) und 21 (Grün) in einer Metaphase mit Translokation  $t(8;21)$  und Deletion des ETO-Anteils (nicht sichtbar) (Patient 60).



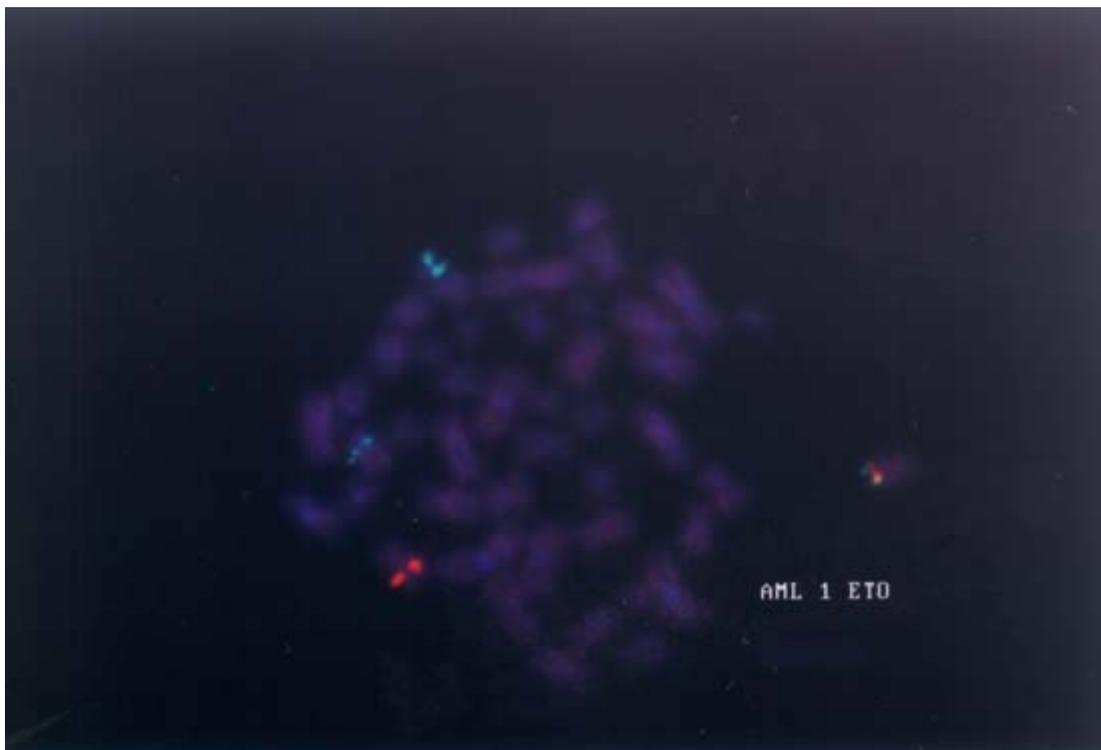
**Abb. 3a:** Klassische Drei-Wege-Translokation der Chromosomen 8, 18 und 21. Der 5'ETO-Anteil befindet sich mehr auf Chromosom 21, sondern auf Chromosom 18 (Patient 7).



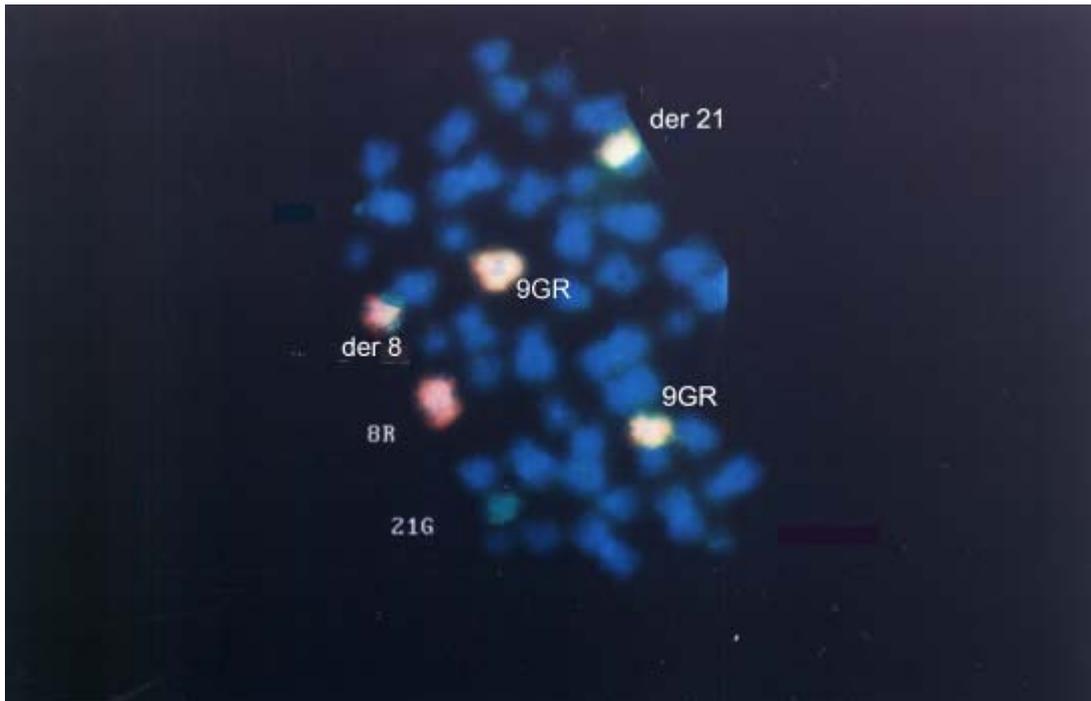
**Abb. 3b:** Klassische Drei-Wege-Translokation am Beispiel der Translokation  $t(8;11;21)(q22;p15;q22)$ , graphische Darstellung. Die erste Abbildung zeigt die Translokation  $t(8;21)(q22;q22)$ . Darauf folgend oder zeitgleich kommt es zur Translokation der Chromosomen 11p15 und 21q22 am selben Bruchpunkt. Der 5'ETO- Anteil wandert auf Chromosom 11.



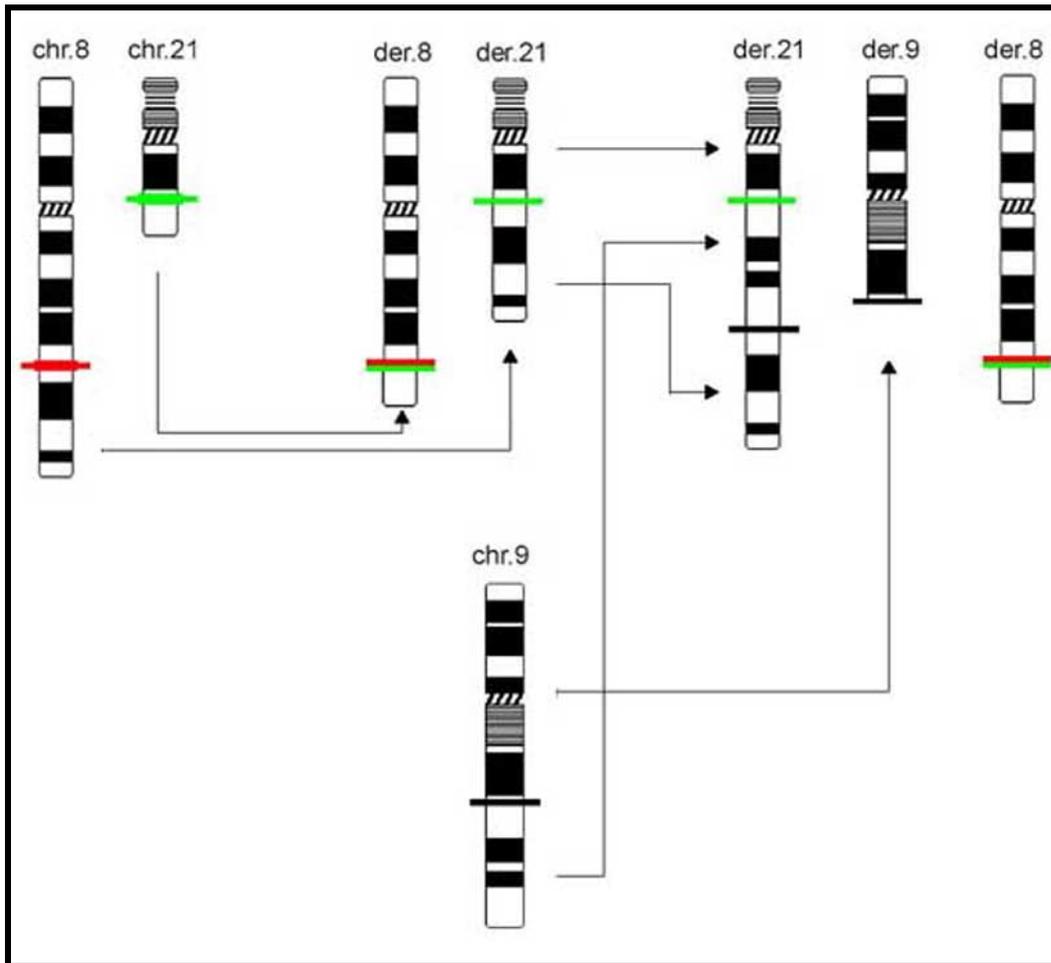
**Abb. 3c:** (Patient 45): WCP der Chromosomen 21 (rot), 17 (grün) und 8 (rot + grün) zum Nachweis der Drei-Wege-Translokation  $t(8;17;21)(q22;q25;q22)$ .



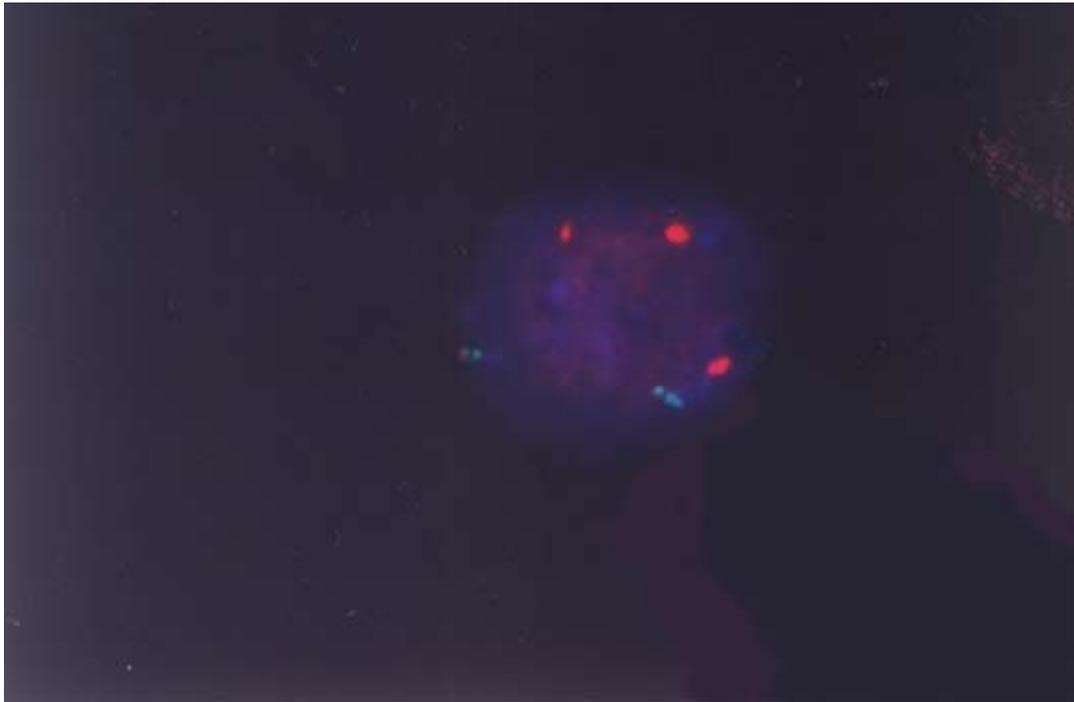
**Abb. 4a:** Patient 73 mit Deletion des 5'ETO- Anteils auf Chromosom 21 mit zusätzlicher Insertion des Chromosomenstücks q22-q34 vom langen Arm des Chromosoms 9. Hier gezeigt eine Metaphase bei IP-FISH.



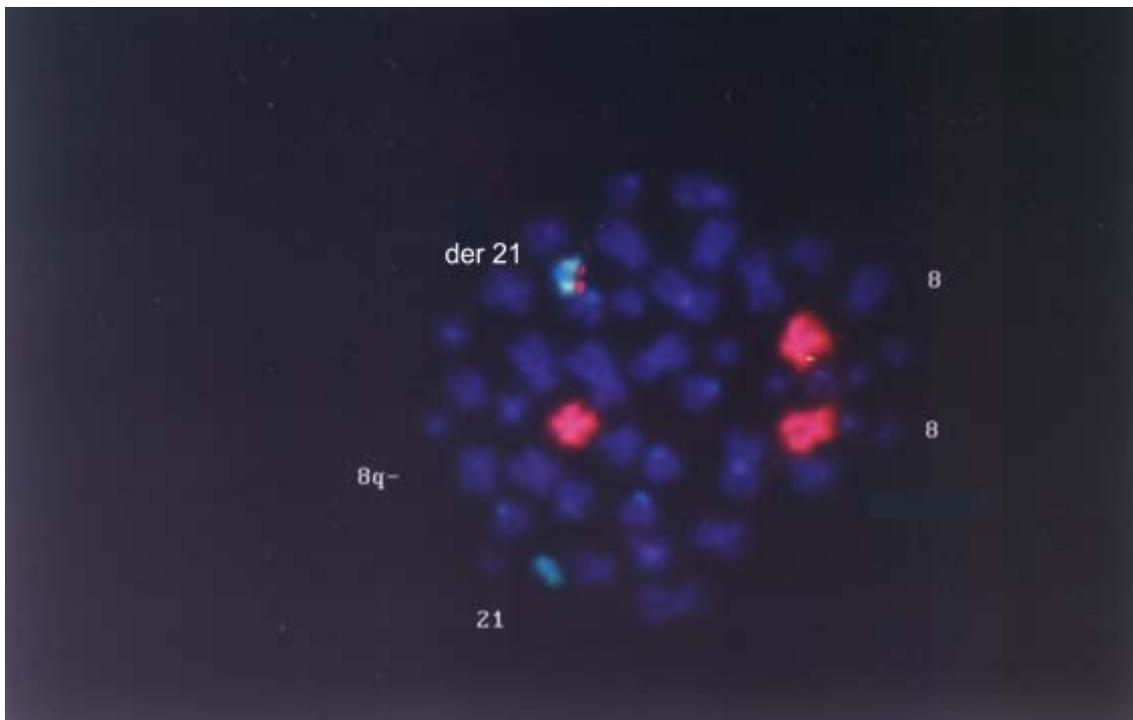
**Abb. 4b:** WCP der Chromosome n 9 (grün+ rot), 21 (grün) und 8 (rot). Es zeigen sich die normalen Chromosome 8 und 21, das Derivat 8 mit dem Fusionsignal AML1ETO und ein normales Chromosom 9. Am Derivat 21 fehlt das rote ETO-Signal, hier ist jedoch ein Stück des Chromosoms 9 inseriert.



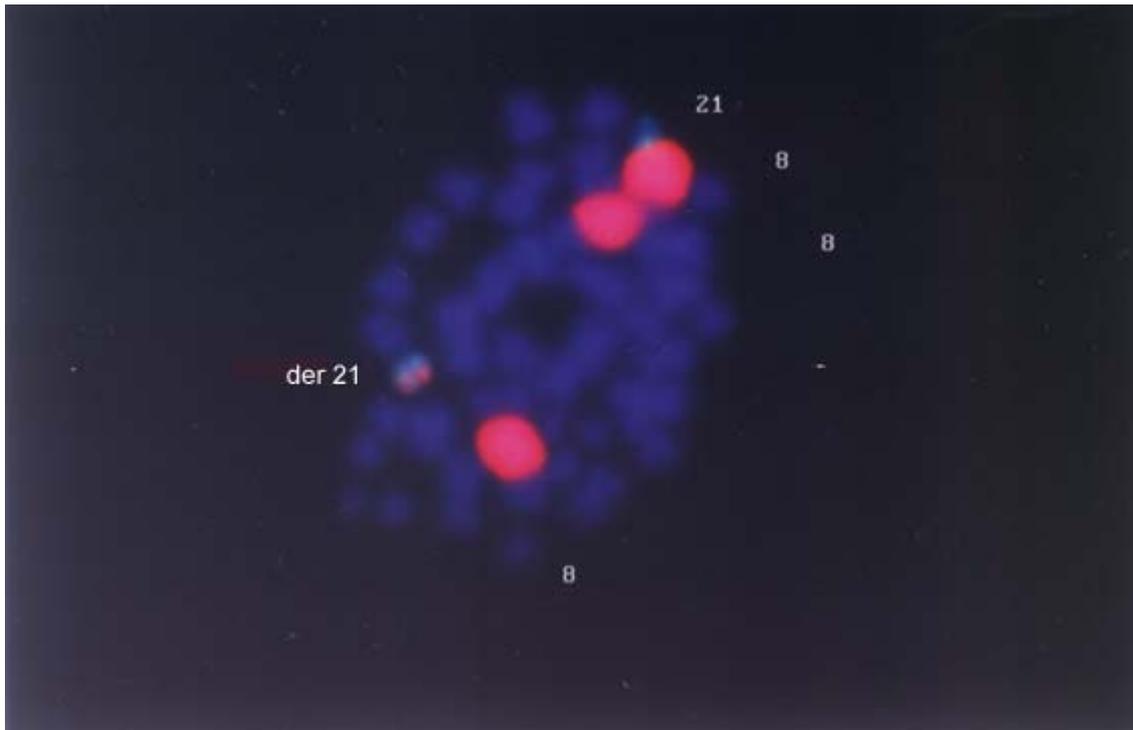
**Abb. 4c:** Graphische Darstellung: Deletion des 5'ETO- Anteils auf Chromosom 21 und Insertion des Chromosomenstücks q22-q34 des Chromosoms 9 in die Region q22 des Chromosoms 21.



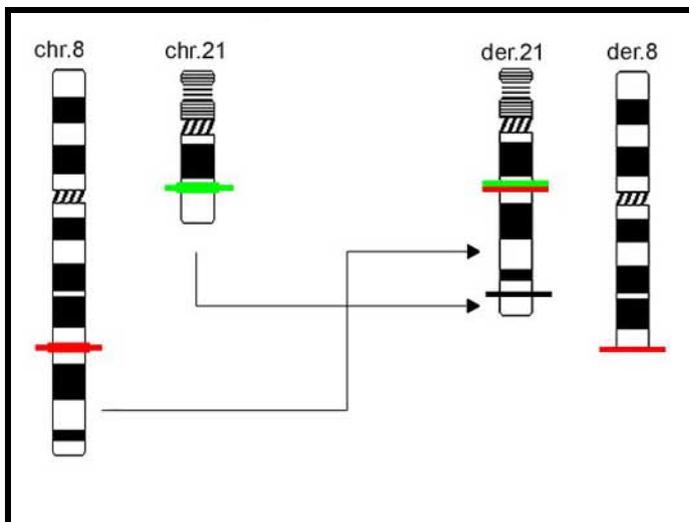
**Abb. 5a:** IP-FISH bei einem Patienten mit Trisomie 8 und Insertion (21;8)(q22;q22q24). Das AML1ETO-Fusionstranskript entsteht durch Insertion des Chromosomenstücks q22 bis q24 von Chromosom 8 in die Region q22 des Chromosoms 21 (siehe 3.3) (Patient 57).



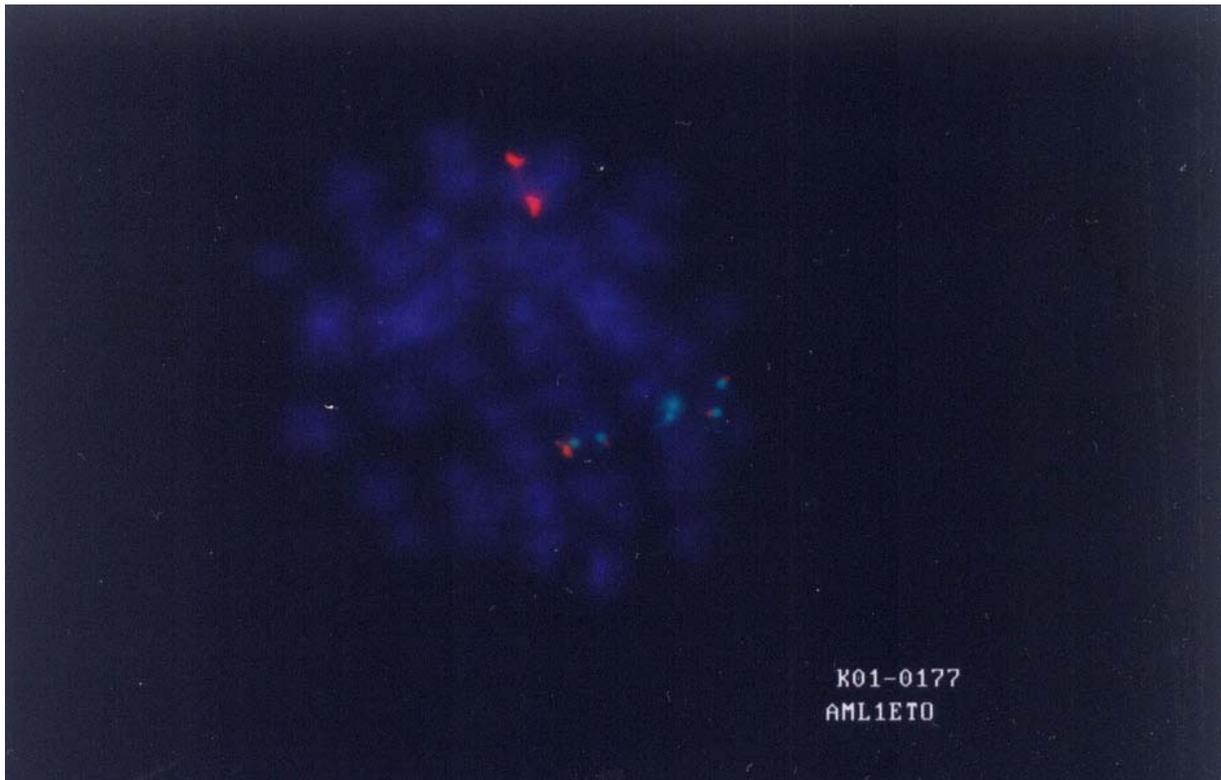
**Abb. 5b:** Metaphase FISH mit Trisomie 8 und Insertion (21;8)(q22;q22q24).



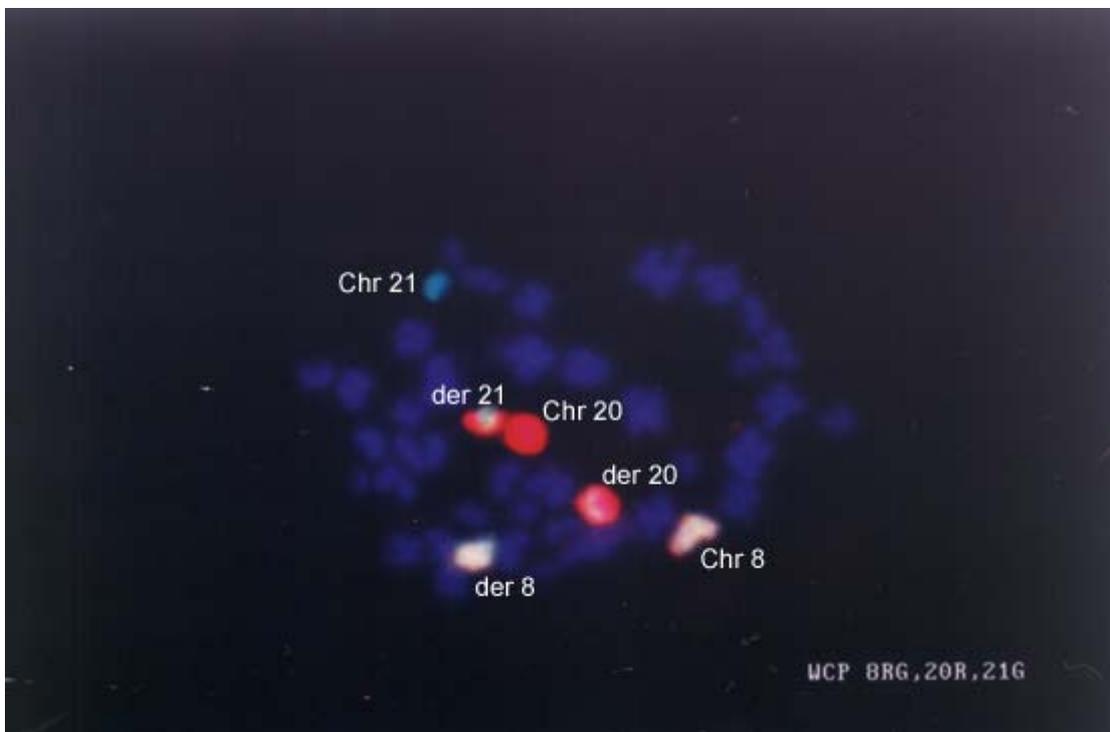
**Abb. 5c:** WCP der Chromosomen 8 und 21 bei einem Patienten mit Trisomie 8 und Insertion (21;8)(q22;q22q24). Ein Fusionssignal entsteht auf Chromosom 21.



**Abb. 5d:** Graphik der Insertion (21;8)(q22;q22q24). Das Chromosomenstück q22 bis q24 des langen Armes des Chromosoms 8 inseriert in die Region q22 des langen Armes des Chromosoms 21, ein gelbes Fusionssignal entsteht.



**Abb. 6a:** IP-FISH einer Metaphase des Patienten mit varianter Drei-Wege-Translokation der Chromosomen 8, 20, 21 (siehe 3.5).



**Abb. 6b:** WCP der Chromosomen 8 (rot + grün), 20 (rot) und 21 (grün).

## 7. Literaturverzeichnis

Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J et al. (2001): Acute Myeloid Leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 62-86.

Aurich J, Dastugue N, Duchayne E et al. (1997): Location of the *BCR-ABL* fusion gene on the 9q34 band in two cases of Ph-positive chronic myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer 20(2):148-54.

Bacher U, Kern W, Schnittger S et al. (2005): Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukaemia. Haematologica 90(11):1502-10.

Bacher U, Kern W, Schoch C et al. (2006): Evaluation of complete disease remission in acute myeloid leukemia: a prospective study based on cytomorphology, interphase fluorescence *in situ* hybridization, and immunophenotyping during follow-up in patients with acute myeloid leukaemia. Cancer 106(4): 839-47.

Bain JB: Leukemia diagnosis. Guide to the FAB-Classification. Wolfe, London, 1998.

Bene MC, Castoldi G, Knapp W et al. (1995): Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 9(10): 1783-6.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 33(4): 451-8.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med 103(4): 620-5.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. (1991): Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML M0).

Br J Haematolog. 78: 325-329.

Bishop JF (1997): The treatment of adult acute myeloid leukaemia.

Semin Oncol 24: 57-69.

Bloomfield CD und Shuma C (1997): Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia: a third follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Cancer 80 (11 Suppl):2191-8.

Büchner T und Hiddemann W (2002): Therapeutic strategies in acute myeloid leukemia. Internist (43): 1203-1211.

Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ et al. (2003): International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 15;21(24): 4642-9.

Cheson BD, Bennett JM Kopecky KJ et al. (2003): Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol 21(24): 4642-9.

Dastugue N, Payen C, Lafage-Pochitaloff M et al. (1995): Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group.

Leukemia 9(9): 1491-8.

Fasching K, Panzer S, Haas OA et al. (2000): Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukaemia. Blood 95(8): 2722-4.

Fonatsch C, Schwarzingler I, Mitterbauer G et al.: Akute myeloische Leukämien, Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Ganten/ Ruckpaul, 2003.

Fuchs R Manual Mikroskopierkurs Hämatologie, Nora-Verlag GmbH, Auf der Höhe 40a, 52223 Stolberg, 2006.

Gamerding U, Teigler-Schlegel A, Pils S et al. (2003): Cryptic chromosomal aberrations leading to an *AML1/ETO* rearrangement are frequently caused by small insertions. *Genes Chromosomes Cancer* 36(3): 261-72.

Gilliland DG (2001): Hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 8(4): 189-91.

Gorin NC, Labopin M, Boiron GM et al. (2006): Results of genotypical hemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning for acute myelocytic leukemia: higher doses of stem cells infused benefit patients receiving transplants in second remission or beyond--the Acute Leukemia Working Party of the European Cooperative Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* 24(24): 3959-66.

Graf M (2002): Expression von Zytokinrezeptoren, Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen und deren klinischer Relevanz bei der akuten myeloischen Leukämie. Dissertation an der LMU München.

Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. (1998): The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92(7): 2322-33.

Grimwade D, Gorman P, Duprez E et al. (1997): Characterization of Cryptic Rearrangements and Variant Translocations in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 90(12): 4876-4885.

Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. (1998): The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1;92(7): 2322-33.

Haferlach T, Bennett JM, Löffler H et al. (1996): Acute myeloid leukemia with translocation (8;21). Cytomorphology, dysplasia and prognostic factors in 41 cases. AML Cooperative Group and ECOG. *Leuk Lymphoma* 23(3-4): 227-34.

Haferlach T und Löffler H (1996): Akute myeloische Leukämien, Klinik und Diagnostik. *MTA* (11).

Haferlach T, Bennett JM, Löffler H et al. (1996): Acute myeloid leukemia with translocation (8;21). Cytomorphology, dysplasia and prognostic factors in 41 cases. AML Cooperative Group and ECOG. *Leuk Lymphoma* 23(3-4): 227-34.

Haferlach T und Schoch C (2002): WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien (AML) und der myelodysplastischen Syndrome (MDS). *Dtsch Med Wochenschr* 127: 447-450.

Haferlach, T und Schoch C (2002). Modern techniques in leukemia diagnosis. *Internist* 43(10): 1190, 1193-6, 1199-202.

Haferlach T, Schoch C, Löffler H et al. (2003): Morphologic dysplasia in *de novo* acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol* 21(2): 256-65.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. (2000): The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting; Airlie House, Virginia, 1997. *Hematol J* 1(1): 53-66.

Harrisons Innere Medizin: 16. Auflage, deutsche Ausgabe,  
ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Kurfürstendamm 57, 10707 Berlin, 2005.

Heller A, Brecevic L, Glaser M, et al. (2003): Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a comprehensive molecular cytogenetic analysis reveals no cryptic aberrations. *Cancer Genet Cytogenet* 146(1):81-3.

Herold G: Innere Medizin, Dr. med. Gerd Herold, Köln, 2003.

Hiorns LR, Swansbury GJ, Mehta J et al. (1996): Additional chromosome abnormalities confer worse prognosis in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 96: 314-321.

Huntly BJ, Reid AG, Bench AJ et al. (2001): Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 98(6): 1732-8.

Ishida F, Ueno M, Tanaka H et al. (2002): t(8;21;14)(q22;q22;q24) is a novel variant of t(8;21) with chimeric transcripts of *AML1-ETO* in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 15; 132(2): 133-5.

Izutsu KM, Kurokawa M, Imai Y et al. (2002): The t(3;21) fusion product, *AML1/Evi-1* blocks *AML1*-induced transactivation by recruiting *CtBP*. *Oncogene* 21(17): 2695-703.

Jaffe ES, Harris NL et al.: World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, IARC Press, 2001.

Karp JE und Smith MA (1997): The molecular pathogenesis of treatment-induced (secondary) leukemias: foundations for treatment and. *Semin Oncol* 24: 103-113.

Kern W, Büchner B, Wörmann J et al. (1999): VIII. Internationales Symposium Acute Leukemias, Münster, 27.2-3.3.1999, Prognostische Faktoren und Therapiestrategien. Der Internist 40(9): 983-986.

Kern W, Behre Ch, v. Schilling Ch et al.: Akute myeloische Leukämie (AML) beim Erwachsenen, Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome. Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag München, 2003.

Kern W, Voskova D, Schoch C et al. (2004). Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. Blood 104(10): 3078-85.

Kern W, Voskova D, Schoch C et al. (2004): Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. Haematologica 89(5): 528-40.

Klaus M, Haferlach T, Schnittger S et al. (2004): Cytogenetic profile in *de novo* acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1, and M2: a study based on 652 cases analyzed with morphology, cytogenetics, and fluorescence *in situ* hybridization. Cancer Genet Cytogenet 155(1):47-56.

Knudson AG (2001): Two genetic hits (more or less) to cancer. Nat Rev Cancer 1(2): 157-62.

Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S et al. (2001): Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. Blood 97(11):3581-8.

Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S et al. (2001): Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. Blood 97(11): 3581-8.

Kuchenbauer F, Schnittger S; Look T et al. (2006): Identification of additional cytogenetic and molecular genetic abnormalities in acute myeloid leukemia with t(8;21)/AML1-ETO. *British Journal of Haematology*, in press.

Kundu M, Chen A, Anderson S et al. (2002): Role of *Cbfb* in hematopoiesis and perturbations resulting from expression of the leukemogenic fusion gene *Cbfb-MYH11*. *Blood* 100(7): 2449-56.

Kuss BJ, Deeley RG, Cole SP et al.(1996): The biological significance of the multidrug resistance gene MRP in inversion 16 leukemias. *Leuk Lymphoma* 20(5-6): 357-64.

Legrand O, Perrot JY, Simonin G et al. (1998): Adult biphenotypic acute leukaemia: an entity with poor prognosis which is related to unfavourable cytogenetics and P-glycoprotein over-expression. *Br J Haematol* 100: 147-155.

Leitch AR: *In-situ*-Hybridisierung.

Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994.

Lengfelder E, Reichert A, Schoch C et al. (2000): Double induction strategy including high dose cytarabine in combination with all-trans retinoic acid: effects in patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. German AML Cooperative Group. *Leukemia* 14: 1362-70.

Leone G, Mele L, Pulsoni A et al. (1999): The incidence of secondary leukemias. *Haematologica* 84: 937-945.

Link H, Hess CF, Albers P et al. (2000): Rationale Therapie mit den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF. Arbeitskreis Supportive Maßnahmen der Onkologie der dt. Krebsgesellschaft, Prof. Dr. med. Hartmut Link, Kaiserslautern.

Löffler H und Haferlach T (2000): Die neue WHO-Klassifikation von akuten myeloischen Leukämien und myelodysplastischen Syndromen. Hämatologie, F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH: 329/21.

Lowenberg B, Downing JR, Burnett A (1999): Medical Progress: Acute Myeloid Leukemia. The New England Journal of Medicine 341(30): 1052-62.

Lo Coco F, Pisegna S, Diverio D (1997): The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. Haematologica, 82(3): 364-70.

Manual Leukämien (2003): Myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome, Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag München.

Marlton P, Claxton DF, Liu P et al. (1995): Molecular characterization of 16p deletions associated with inversion 16 defines the critical fusion for leukemogenesis. Blood 85(3):772-9.

Marshall CJ (1991): Tumor suppressor genes. Cell 64: 313-326.

Martinet D, Muhlematter D, Leeman M et al. (1997): Detection of 16 p deletions by FISH in patients with inv(16) or t(16;16) and acute myeloid leukemia (AML). Leukemia 11(7):964-70.

Mathew S, Behm F Dalton J et al. (1999): Comparison of cytogenetics, Southern blotting, and fluorescence *in situ* hybridization as methods for detecting MLL gene rearrangements in children with acute leukemia and with 11q23 abnormalities. Leukemia 13(11): 1713-20.

McHale CM, Wiemels JL Zhang L et al. (2003): Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal rearrangements t(15;17) and inv(16). Blood 101(11): 4640-1.

Mitani K (2004): "Molecular mechanisms of leukemogenesis by *AML1/EVI-1*.  
*Oncogene* 23(24): 4263-9.

Mitelman F: *ISCN Guidelines for Cancer Cytogenetics, Supplement to:  
An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1995.*

Mori H, Colman SM, Xiao Z et al. (2002): Chromosome translocations and covert  
leukemic clones are generated during normal fetal development.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 99(12): 8242-7.

Mrozek K, Heinonen K, Blomfield CD(2001): Clinical importance of cytogenetics in  
acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(1): 19-47.

Okuda T, Cai Z, Yang S et al. (1998): Expression of a knocked-in *AML1-ETO*  
leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and  
directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 91(9): 3134-43.

Øystein B, Øystein W (2001): Biological treatment in acute myelogenous leukaemia:  
how should T-cell targeting immunotherapy be combined with intensive  
chemotherapy? *Expert Opin Biol Ther* (6): 1005-16.

Pabst T, Mueller BU, Harakawa N et al. (2001): *AML1-ETO* downregulates the  
granulocytic differentiation factor *C/EBP $\alpha$*  in t(8;21) myeloid leukaemia.  
*Nature Medicine* (4):444-51.

Paulsson K, Sall T, Fioretos T et al.(2001): The incidence of trisomy 8 as a sole  
chromosomal aberration in myeloid malignancies varies in relation to gender, age,  
prior iatrogenic genotoxic exposure, and morphology.  
*Cancer Genet Cytogenet* 130(2): 160-5.

Paulsson K, Fioretos T, Strombeck B et al. (2003): Trisomy 8 as the sole  
chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a multicolor and locus-specific  
fluorescence in situ hybridization study.  
*Cancer Genet Cytogenet* 140(1): 66-9.

Paschka PG, Marcucci G, Ruppert AS et al. (2006): Adverse prognostic significance of *KIT* mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 24(24): 3904-11.

Rege K, Swansbury GJ, Atrra AA et al. (2000): Disease features in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). Influence of age, secondary karyotype abnormalities, CD19 status, and extramedullary leukemia on survival. *Leuk Lymphoma* 40(1-2): 67-77.

Rhoades KL, Hetherington CJ, Harakawa N et al. (2000): Analysis of the role of *AML1-ETO* in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood* 96(6): 2108-15.

Rowe D, Cotterill SJ, Ross FM et al. (2000): Cytogenetically cryptic *AML1-ETO* and *CBF beta-MYH11* gene rearrangements: incidence in 412 cases of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 111(4): 1051-6.

Sauter G, Holger Moch (1998): Molekulare Pathologie: Genetische Veränderungen in Tumorzellen. *Wissenschaftsmagazin der Universität Basel* 81: 147-63.

Schnittger S, Weisser M, Schoch C et al. (2003): New score predicting for prognosis in *PML-RARA+*, *AML1-ETO+*, or *CBFBMYH11+* acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 102(8): 2746-55.

Schnittger S, Schoch C, Kern W et al. (2004): "*FLT3* length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia", *Acta Haematol* 112(1-2): 68-78.

Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T et al. (2006): *KIT-D816* mutations in *AML1-ETO*-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* 107(5): 1791-9.

Schoch C, Haase D, Fonatsch C et al. (1997): The significance of trisomy 8 in *de novo* acute myeloid leukaemia: The accompanying chromosome aberrations determine the prognosis. *Br J Haematol* 99(3): 605-611.

Schoch C, Haferlach T, Haase D et al.(2001): German AML Cooperative Study Group: Patients with *de novo* acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol* 112: 118-126.

Schoch C, Schnittger S Kern W et al. (2002): Rapid diagnostic approach to *PML-RARalpha*-positive acute promyelocytic leukaemia. *Hematol J* 3(5): 259-63.

Schoch C, Schnittger S et al. (2003). AML with 11q23/*MLL* abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 102(7): 2395-402.

Schoch C, Kern W, Schnittger S et al. (2004): Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with *de novo* AML. *Leukemia* 18(1): 120-5.

Shimada A, Taki T, Tabuchi K et al. (2006): *KIT* mutations, and not *FLT3* internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Blood* 107(5): 1806-9.

Sinclair PB., Nacheva EP, Leversha M et al. (2000): Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 95(3): 738-43.

Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA et al. (2000): Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96(13):4075-83.

Specchia G, Albano F, Anelli L et al. (2003): Deletions on der(9) chromosome in adult Ph-positive acute lymphoblastic leukemia occur with a frequency similar to that observed in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 17(3):528-31.

Specchia G, Albano F, Anelli L et al. (2004): Insertions generating the 5'*RUNX1*/3'*CBFA2T1* gene in acute myeloid leukemia cases show variable breakpoints. *Genes Chromosomes Cancer* 41(1): 86-91.

Speck NA, Stacy T, Wang Q et al. (1999): Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia. *Cancer Res* 59 (7 Suppl): 1789-1793.

Swansbury GJ, Lawler SD et al (1994): Long-term survival in acute myelogenous leukemia: a second follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 73(1): 1-7.

Tallman MS, Rowe JM (2003): Long-term follow-up and potential for cure in acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 16(3): 535-43.

Thalhammer F, Geissler K, Jager U, et al. (1996): Duration of second complete remission in patients with acute myeloid leukemia treated with chemotherapy: a retrospective single-center study. *Ann Hematol* 72(4): 216-22.

Virchow RL (1845): Weisses Blut, Froriep's Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde 36: 151-156.

Wiemels JL, Xiao Z, Buffler PA et al. (2002): In utero origin of t(8;21) *AML1-ETO* translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 99(10): 3801-5.

Witz F, Sadoun A, Perrin MC et al. (1998): A placebo-controlled study of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administered during and after induction treatment for de novo acute myelogenous leukemia in elderly patients. Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM). *Blood* 91(8): 2722-30.

Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T et al. (2001): *AML1-ETO* expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (18): 10398-403.

Zhang DE, Burel S, Zhou L et al. (2001): *AML1* and AML1 Fusion Protein AML1-ETO in Myeloid Gene Regulation and Leukemogenesis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 27(2): 368-376.

## 8. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Frau PD Dr.med. Claudia Haferlach und Herrn Prof. Dr.med. Dr.phil. Torsten Haferlach für die exzellente und engagierte Anleitung bei dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Sabina Bursch für ihre Hilfe beim Erlernen der Methodik und der technischen Durchführung, sowie allen Mitarbeitern des Labors für Leukämiediagnostik im Klinikum Großhadern, die mich bei dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ferner gilt mein Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann, Leiter des Labors für Leukämiediagnostik in der Medizinischen Klinik III der Ludwig-Maximilians-Universität München. In diesem Zusammenhang sind auch die AMLCG-Studiengruppe bzw. alle Einsender und Patienten zu nennen, ohne deren Beitrag diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt seien hier auch Herr J. Tiller, der mir bei den graphischen Darstellungen geholfen hat, Herr M. Gutzmann sowie Herr R. Zumschlinge genannt.

Meiner Familie gilt mein ganz besonderer Dank für die große Unterstützung während der gesamten letzten Jahre.

## 9. Lebenslauf

Ich wurde am 11.08.1977 in Ingolstadt als drittes Kind von Waltraud von Manowski, geborene Wolf, und Dr. Rainer von Manowski, geboren. Mit 15 Jahren verbrachte ich ein Schuljahr in Indiana, USA. Ich schloss meine Schulausbildung am Apian-Gymnasium, Ingolstadt, mit der allgemeinen Hochschulreife ab. Den Zivildienst absolvierte ich an der Privatklinik Dr. Maul, Ingolstadt.

Das Studium der Humanmedizin begann ich im Herbst 1997 an der Ludwig-Maximilians-Universität München und wechselte nach dem vorklinischen Abschnitt an die Technische Universität München. Dort absolvierte ich am 21.10.2004 das dritte Staatsexamen und erhielt am 10.10.2004 die Approbation als Arzt.

Von Januar 2005 bis März 2007 arbeitete ich als Assistenzarzt in der Inneren Medizin im Hause Trostberg der Kreiskliniken Traunstein/Trostberg.

Seit April 2007 lebe und arbeite ich in Albertville, Frankreich.