

Medizinische Klinik und Poliklinik III
Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
Leitung: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

Weitere Aufklärung komplex aberranter Karyotypen bei der akuten
myeloischen Leukämie mittels
Comparativer Genomischer Hybridisierung

Dissertation

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

vorgelegt von
Johanna Christodoulou

aus
München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: PD Dr. C. Schoch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Steinlein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Igo-Kemenes
Prof. Dr. B. Emmerich

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>1. Einleitung</u>	1
1.1 <u>Akute myeloische Leukämie</u>	1
1.1.1 Definition der akuten myeloischen Leukämie	1
1.1.2 Inzidenz der akuten myeloischen Leukämie	1
1.1.3 Ätiologie der Leukämie	1
1.1.4 Genetik und molekulare Pathophysiologie der Leukämien	2
1.1.4.1 Entstehung der malignen Transformation	2
1.1.4.2 Tumorsuppressorgene und Onkogene	2
1.1.4.3 Balancierte und unbalancierte Aberrationen	3
1.2 <u>Diagnostik</u>	4
1.2.1 Morphologie	4
1.2.2 Immunologische Untersuchung	5
1.2.3 Methoden zur genetischen Charakterisierung	6
1.2.3.1 Konventionelle Zytogenetik	6
1.2.3.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung	7
1.2.3.2.1 24-Farben-FISH	8
1.2.3.2.2 Comparative Genomische Hybridisierung	9
1.2.3.3 Molekulargenetik	11
1.3 <u>Klassifikation der AML</u>	12
1.3.1 FAB-Klassifikation (1976)	12
1.3.2 MIC-Klassifikation (1988)	13
1.3.3 WHO-Klassifikation (1999/2001)	13
1.4 <u>Therapie</u>	14
1.5 <u>Prognose</u>	16
1.5.1 Prätherapeutische Parameter	16
1.5.2 Zytogenetische Parameter	17
1.5.2.1 günstiger Karyotyp	18

Inhaltsverzeichnis

1.5.2.2	intermediärer Karyotyp	18
1.5.2.3	ungünstiger Karyotyp	19
1.5.2.3.1	komplex aberranter Karyotyp	19
1.5.3	Therapieabhängige Parameter	21
1.6	<u>Fragestellung dieser Studie</u>	22
<u>2. Material und Methoden</u>		23
2.1	<u>Patienten</u>	23
2.1.1	Patientengut	23
2.1.2	Charakterisierung des Patientenmaterials	25
2.2	<u>Material</u>	26
2.2.1	Geräte	26
2.2.2	Reagenzien	26
2.3	<u>Methoden</u>	27
2.3.1	Comparative Genomische Hybridisierung	27
2.3.1.1	DNA-Extraktion	27
2.3.1.2	DNA-Markierung	28
2.3.1.3	DNA-Hybridisierung	29
2.3.1.4	Auswertung	30
2.3.1.4.1	Selektion der Metaphasen	30
2.3.1.4.2	Das Fluoreszenzmikroskop	30
2.3.1.4.3	Die CCD (charge-coupled device)-Kamera	31
2.3.1.4.4	Das digitale Bildanalyse-System	31
2.3.2	Etablierung und Optimierung der Methode	33
2.3.2.1	Etablierung und Optimierung der DNA-Markierung	33
2.3.2.2	Etablierung und Optimierung der Sondenherstellung	34
2.3.2.3	Etablierung und Optimierung der DNA-Hybridisierung	34
2.3.3	Etabliertes Protokoll der Comparativen Genomischen Hybridisierung	35
2.3.3.1	Aufarbeitung der Metaphasen	35

Inhaltsverzeichnis

2.3.3.2	Vorbereitung der Objektträger	36
2.3.3.3	Ficoll Separation	36
2.3.3.4	DNA-Präparation	37
2.3.3.5	Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Photometer	38
2.3.3.6	Markierungsreaktion	38
2.3.3.7	Sondenherstellung	39
2.3.3.8	Hybridisierungsreaktion	39
3.	<u>Ergebnisse</u>	41
3.1	<u>Ergebnisse der G-Banden-, FISH-, 24-Farben-FISH- und CGH-Analysen</u>	41
3.2	<u>Vergleich eingesetzter Methoden</u>	52
3.3	<u>Häufig betroffene Chromosomen bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp</u>	55
3.3.1	Chromosom 1	55
3.3.2	Chromosom 5	55
3.3.3	Chromosom 7	57
3.3.4	Chromosom 8	59
3.3.5	Chromosom 11	60
3.3.6	Chromosom 12	61
3.3.7	Chromosom 13	62
3.3.8	Chromosom 16	63
3.3.9	Chromosom 17	64
3.3.10	Chromosom 18	66
3.3.11	Chromosom 20	66
3.3.12	Chromosom 21	67
3.3.13	Chromosom 22	68

Inhaltsverzeichnis

3.4.	<u>Gleichzeitig auftretende Aberrationen bestimmter Chromosomen bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp</u>	68
3.4.1	Chromosomen 5, 7 und 17	68
3.4.2	Chromosomen 5 und 7	68
3.4.3	Chromosomen 5 und 17	69
3.4.4	Chromosomen 5 und 11	69
3.4.5	Chromosomen 5 und 12	69
3.5.	<u>Zusammenfassung der mit CGH detektierten Aberrationen bei komplex aberrantem Karyotyp</u>	69
	<u>4. Diskussion</u>	77
	<u>5. Zusammenfassung</u>	93
	<u>6. Literaturverzeichnis</u>	95
	<u>7. Danksagung</u>	115
	<u>8. Curriculum vitae</u>	116

1. Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

1.1.1 Definition der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) stellt eine Neoplasie des hämatopoetischen Systems dar [Bonnet, D. und Dick, J. E., 1997]. Sie entsteht durch die maligne Transformation hämatopoetischer Stammzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit der Folge der klonalen Proliferation unreifer Zellen [Fialkow, P. J. et al., 1987]. Die Zellen verlieren ihre Reifungs- und Differenzierungseigenschaften und arretieren im Stadium eines Blasten. Diese Blasten können die normale Funktion reifer Zellen nicht erfüllen. Die unkontrollierte Proliferation dieser Zellen führt zusätzlich zur Verdrängung anderer Zellreihen mit dem Resultat einer Knochenmarksinsuffizienz. Aufgrund einer Störung der Erythropoese kommt es zu Anämie und Müdigkeit, aufgrund des Mangels an reifen und funktionsfähigen Granulozyten zur erhöhten Infektanfälligkeit und aufgrund einer Störung in der Thrombopoese zu Blutungen [Löwenberg, B. et al., 1999]. Zusätzlich kann eine Infiltration extramedullärer Organe, wie Lymphknoten, Leber, Milz, Haut, Zahnfleisch und weiterer innerer Organe durch die Ausschwemmung der unreifen Zellen ins periphere Blut erfolgen.

1.1.2 Inzidenz der akuten myeloischen Leukämie

Die Inzidenz der AML ist altersabhängig. Sie stellt die häufigste Leukämie im Erwachsenenalter dar. Die Inzidenz liegt bis zum 60. Lebensjahr bei 0,7- 3,9 Fällen pro 100.000 Einwohnern und bei über 60-jährigen bei 6,7 bis 19,2 Fälle pro 100.000 [Ries, L. A. et al., 2000; Schoch, C. et al., 2001b].

1.1.3 Ätiologie der Leukämie

Im Gegensatz zu den primären Leukämien, den sogenannten *de novo* Leukämien, sind die Ursachen bei den sekundären Leukämien bekannt. Ein wichtiger Faktor scheint die ionisierende Strahlung zu sein [Levine, E. G. und Bloomfield, C. D.,

Einleitung

1992]. Darauf weist die erhöhte Leukämieinzidenzrate bei bestrahlten Patienten oder bei beruflich exponierten Menschen hin. Weiterhin werden bestimmte Chemikalien wie Benzol oder Chemotherapeutika wie Zytostatika, alkylierende Agenzien oder Topoisomerase II Inhibitoren für die Entstehung von Leukämien verantwortlich gemacht [Pedersen-Bjergaard, J., 1992; Andersen, M. K. et al., 1998]. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, dass Patienten mit einer malignen Vorerkrankung eine Leukämie nach Chemotherapie entwickelten, unterstützt. In 15% aller AML-Fälle findet sich in der Vorgeschichte ein myelodysplastisches Syndrom (MDS), welches häufig in eine akute myeloische Leukämie übergeht.

1.1.4 Genetik und molekulare Pathophysiologie der Leukämien

1.1.4.1 Entstehung der malignen Transformation

Die Entstehung einer Leukämie wird auf genetische Veränderungen in den malignen Zellen zurückgeführt [Mitelman, F. und Heim, S., 1990; Varmus, H. E. und Lowell, C. A., 1994; Rowley, J. D., 2000; Knudson, A. G., 2002]. Diese Aberrationen werden an die Tochterzellen weitergegeben, so dass ein Klon genetisch veränderter Zellen entsteht. Molekulargenetische Untersuchungen leukämischer Zellen konnten zeigen, dass maligne Zellen ein verändertes Genexpressionsmuster aufweisen [Rubnitz, J. E. und Look, A. T., 1998; Schoch, C. et al., 2002b; Haferlach, T. et al., 2003a]. Die Veränderung der Genaktivität führt zu einer veränderten Expression verschiedener, den Zellzyklus beeinflussender Proteine und dadurch zur fehlerhaften Regulation des Zellzyklus auf mehreren Ebenen [Metcalf, D., 1993; Broudy, V. C., 1997]. Die Folgen sind eine Fehlregulation der Differenzierung mit der Entstehung funktionsloser Zellen, der Proliferation mit einem gesteigerten Wachstum und verringerter Apoptose mit der Folge des Überlebens dieser veränderten Zellen.

1.1.4.2 Tumorsuppressorgene und Onkogene

Während der Leukämogenese werden bestimmte Gene in ihrer Aktivität verändert. Grundsätzlich werden zwischen Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen unterschieden [Vogt, P. K., 1993; Budillon, A., 1995]. Tumorsuppressorgene verhindern im Normalzustand die übermäßige Proliferation einer Zelle.

Einleitung

Protoonkogene stellen wachstumsinduzierende Gene dar. In einer gesunden Zelle herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Aktivität dieser Gene. Bestimmte genetische Rearrangements führen durch eine Aktivierung von Protoonkogenen oder eine Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen zu einem Ungleichgewicht mit dem Resultat, dass die normale Regulation entgleist. Die Folge ist eine unkontrollierte, autonome Expansion der malignen Zellen. Voraussetzung der Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist, dass beide Allele von einer Aberration betroffen sind [Marshall, C. J., 1991]. Dies unterscheidet sich vom Pathomechanismus der Protoonkogene, bei denen die Aktivierung nur eines Allels onkogene Wirkung hat. Molekularzytogenetische Methoden ermöglichen den Nachweis bestimmter Veränderungen einzelner Gene, da die Lokalisationen einiger Tumorsuppressorgene und Protoonkogene bekannt sind. Beispiele für Tumorsuppressorgene sind das p53-Gen (17p13), das Rb-Gen (13q24), das APC-Gen (5q21) und das WT1-Gen (11p13). Protoonkogene sind beispielsweise das MYC-Gen (8q24), die RAS-Gene (H-RAS, N-RAS, K-RAS), das ABL-Gen (9q34), das BCL6-Gen (3q27) und das BCL2-Gen (18q21). Diese sind nicht leukämiespezifische Gene, sondern lassen sich bei einigen soliden Tumoren, wie beispielsweise des Gastrointestinaltraktes oder der Brust ebenfalls nachweisen.

1.1.4.3 Balancierte und unbalancierte Aberrationen

Zytogenetisch werden zwei Arten von Karyotypveränderungen unterschieden: balancierten und unbalancierten Aberrationen. Diese führen auf unterschiedlichem Wege zur malignen Transformation einer Zelle [Pedersen-Bjergaard, J. und Rowley, J. D., 1994].

Der grundlegende Effekt balancierter Aberrationen ist die Fusion von Genen [Look, A. T., 1997]. Hierbei kommt es durch einen Austausch zwischen verschiedenen Regionen unterschiedlicher Chromosomen, wie bei einer Translokation, oder durch ein Rearrangement in einem Chromosom selbst, wie bei der Inversion, zur Neuformation von Genen. Dadurch entstehen sogenannte Fusionsgene, die häufig für bestimmte Transkriptionsfaktoren kodieren, welche die Signaltransduktion in der Zelle beeinflussen [Rabbitts, T. H., 1994]. Tierexperimentelle Untersuchungen konnten das Pathogenitätspotential bestimmter Fusionsgene nachweisen [Castilla, L.

Einleitung

H. et al., 1996; Okuda, T. et al., 1998]. Mittels molekularer Methoden konnten einige Fusionsgene genauer untersucht und bestimmten AML-Subgruppen zugeordnet werden [Caligiuri, M. A. et al., 1997; Rowley, J. D., 1999]. Fusionsgene, die bei der Entstehung einer AML eine besondere Rolle spielen, sind beispielsweise das AML-1/ETO Gen und das PML-RAR α Gen [Yuan, Y. et al., 2001]. Diese entstehen durch balancierte Translokationen zwischen den Chromosomen 8 und 21 bzw. 15 und 17. Das PML-RAR α stellt das typische Fusionsgen der akuten Promyelozyten-Leukämie (AML M3/M3v) dar [Larson, R. A. et al., 1984]. Ein weiteres Beispiel für ein häufig bei der AML onkogen wirkendes Fusionsgen ist das CBF β /MYH11 Gen, welches durch eine Inversion des Chromosoms 16 entsteht [Marlton, P. et al., 1995].

Charakteristisch für unbalancierte Veränderungen sind Verluste und Zugewinne von chromosomalem Material. Hierbei kommt es zum Verlust von Tumorsuppressorgenen oder Zugewinn bestimmter Protoonkogene mit den Folgen der veränderten Zellzyklusregulierung und des ungehinderten Wachstums des malignen Zellklons [Look, A. T., 1997]. Diese unbalancierten Aberrationen werden bei der AML häufig nachgewiesen. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp Verluste von chromosomalem Material häufiger vorkommen als Zugewinne [Schoch, C. et al., 2001a; Mrozek, K. et al., 2002]. Dies führt zur Annahme, dass bei einem Teil der AML besonders der Verlust von Tumorsuppressorgenen eine große Rolle zu spielen scheint.

1.2 Diagnostik

Für die Diagnosestellung einer akuten myeloischen Leukämie und der Zuordnung zu den einzelnen Subgruppen werden heutzutage zytomorphologische, zytochemische, immunphänotypische, zyto- und molekulargenetische Methoden benötigt. Für die Diagnose ist zunächst der zytomorphologische Befund ausschlaggebend [Kern, W. et al., 2002; Haferlach, T. und Schoch, C., 2002a].

1.2.1 Morphologie

Bei der zytomorphologischen Untersuchung von Knochenmark oder peripherem Blut wird die Anzahl der Blasten bestimmt und die Zellen nach ihrem Aussehen

Einleitung

differenziert. Nach der Färbung der Knochenmark- oder Blutaussstriche nach Pappenheim wird die Form und Größe der Zellen sowie das Verhältnis zwischen Zellkern und Zytoplasma beurteilt und der entsprechenden Zellreihe und dem Reifestadium zugeordnet. Aufgrund des unterschiedlichen Gehalts der Zellen an bestimmten Enzymen, gelingt eine weitere Differenzierung mittels zytochemischer Reaktionen. Zu diesen zählen die Myeloperoxidase und die α -Naphthyl-ASD-Chlorazetat-Esterase. Die Reaktivität der verschiedenen Zellen bei den verschiedenen zytochemischen Reaktionen ist unter 1.3.1 tabellarisch dargestellt.

1.2.2 Immunologische Untersuchung

Einige AML-Subtypen können zusätzlich aufgrund unterschiedlicher immunologischer Phänotypen charakterisiert werden. Die Knochenmarkszellen tragen während der Reifephase verschiedene Merkmale (Antigene) auf ihrer Oberfläche. Diese können mittels markierter Antikörper nachgewiesen werden und dienen vor allem der Zuordnung zu einer Zellreihe und dem Differenzierungsgrad. Einige Proteinmarker sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle AML-Subtypen besitzen den Oberflächenmarker CD33. Frühe Subtypen weisen CD34, späte Subtypen CD15 auf. Die Zuteilung einer AML in die Subtypen M0 und M7 ist nur mittels immunologischer Verfahren möglich [Cheson, B. D. et al., 1990]

AML-Subgruppen	Typische Proteinmarker
M0	CD34, 33, 13
M1	CD34, 33, 13
M2	CD34, 33, 15, 13
M3	CD33, 13, (HLA-DR-)
M4	CD34, 33, 15, 14, 13
M5	CD33, 15, 14, 13
M6	CD33, Glykophorin
M7	CD33, 41

Tabelle 1: Proteinmarker der AML-Subgruppen

Vorkommen der unterschiedlichen Oberflächenmarker in den FAB-Subgruppen der AML

Einleitung

1.2.3 Methoden zur genetischen Charakterisierung

1.2.3.1 Konventionelle Zytogenetik

Die konventionelle Zytogenetik dient der Darstellung der einzelnen Bandenmuster der Chromosomen mittels spezieller Bänderungs- und Färbetechniken. Für die Chromosomenbänderungsanalyse werden sich teilende Zellen in der Metaphase durch ein Spindelgift arretiert, die Chromosomen angefärbt und nach Größe, Anfärbbarkeit und Lage des Zentromers entsprechend der „International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ [Mitelman F, 1995] in einem sogenannten Karyogramm geordnet. Mit Hilfe der konventionellen Zytogenetik lassen sich bei insgesamt 55-60% der *de novo* AML und bei über 80% der sekundären AML chromosomale Veränderungen nachweisen [Schoch, C. et al., 2003]. Mehrere Studien führten zytogenetische Untersuchungen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie durch, um das Aberrationsspektrum der AML genauer zu untersuchen [Johansson, B. et al., 1994; Grimwade, D. et al., 1998; Schoch, C. et al., 2001a; Byrd, J. C. et al., 2002]. Insgesamt 20% aller AML-Fälle weisen balancierte Veränderungen und 35-40% unbalancierte Veränderungen auf. In 40-45% aller Fälle können keine zytogenetischen Anomalien im Karyogramm detektiert werden [Pedersen-Bjergaard, J. und Rowley, J. D., 1994].

Bei den primär balancierten Aberrationen spielen die Translokationen eine wesentliche Rolle [Rowley, J. D., 1999]. Den größten Anteil bei der AML in dieser Subgruppe haben die Translokationen zwischen den Chromosomen 15 und 17 bzw. 8 und 21. Weiterhin lassen sich balancierte Aberrationen häufig am Chromosom 16 mit der *inv(16)* oder *t(16;16)* und am Chromosom 11 mit der MLL-Translokation nachweisen. In den letzten Jahren konnten zahlreiche Studien Korrelationen zwischen spezifischen chromosomalen Veränderungen und einzelnen FAB-Subtypen zeigen [Bitter, M. A. et al., 1987]. Beispiele hierfür sind die Translokation *t(8;21)*, die besonders bei der AML M2 und die *inv(16)/t(16;16)*, die fast ausschließlich bei der AML M4eo vorkommt [Le Beau, M. M. et al., 1983; Nucifora, G. et al., 1993; Haferlach, T. et al., 1996]. Die Translokation *t(15;17)* ist spezifisch für die AML M3/M3v, da diese Aberration nur bei diesem Subtyp detektiert werden konnte [Larson, R. A. et al., 1984; Schoch, C. et al., 2003]. Translokationen, die das

Einleitung

Chromosom 11 involvieren, kommen besonders bei der AML M5a vor [Haferlach, T. et al., 2002].

In der häufiger auftretenden zytogenetischen Subgruppe der unbalancierten Aberrationen werden numerische und strukturelle Aberrationen beobachtet. Verluste ganzer Chromosomen kommen bei der AML besonders bei den Chromosomen 5, 7 und den Geschlechtschromosomen vor. Häufiger als die Monosomien sind jedoch die Zugewinne ganzer Chromosomen (Trisomien). Hiervon sind besonders die Chromosomen 8, 11 und 21 betroffen. In diese Subgruppe gehören ferner strukturelle Aberrationen, bei denen es durch den Austausch verschiedener chromosomaler Regionen zu Verlusten oder Zugewinnen von chromosomalem Material kommt. Verluste von chromosomalem Material betreffen häufig 5q, 7q, 12p und 17p. Zugewinne kommen besonders in 8q, 11q und 21q vor. Der größte Anteil der Patienten mit unbalanciertem Karyotyp weist einen sogenannten komplex aberranten Karyotyp auf. Bei dieser Patientengruppe spielen strukturelle Verluste eine besondere Rolle [Schoch, C. et al., 2001a].

Patienten, die im Karyogramm keine zytogenetisch sichtbaren Veränderungen zeigen, machen den größten Anteil der AML-Patienten aus. In dieser Subgruppe lassen sich jedoch molekulargenetisch Anomalien nachweisen, die in der konventionellen Zytogenetik nicht sichtbar sind [Schnittger, S. et al., 2002].

1.2.3.2 Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung

In den 80er Jahren wurde durch die Kombination zytogenetischer und molekularbiologischer Techniken die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) etabliert [Nederlof, P. M. et al., 1990]. In einigen Studien wurden die Methoden der konventionellen Zytogenetik und der FISH am gleichen Patientenkollektiv angewandt und die Ergebnisse miteinander verglichen [Andreasson, P. et al., 1998; Frohling, S. et al., 2002; Bernasconi, P. et al., 2003]. In diesen Studien wurde gezeigt, dass mittels FISH in einigen Fällen, beispielsweise in denen keine Metaphasen für die Chromosomenanalyse gewonnen werden konnten oder variante Translokationen sowie submikroskopische Aberrationen im Karyotyp vorlagen, genetische

Einleitung

Veränderungen nachgewiesen wurden. Mit der FISH lassen sich somit in einzelnen Fällen zusätzliche Information zur konventionellen Chromosomenanalyse gewinnen.

Ein weiterer Vorteil der FISH gegenüber der konventionellen Zytogenetik liegt in der Möglichkeit der schnellen Diagnostik. Dies wird beispielsweise bei der Diagnose einer AML M3/M3v genutzt. Der schnelle Nachweis eines PML-RAR α Rearrangements mit Hilfe der FISH sichert die Diagnose und entscheidet über das therapeutische Vorgehen, welches einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose hat [Schoch, C. et al., 2002c]. Die Tatsache, dass bei der FISH durch den Einsatz verschiedener Sonden in einem Versuchsansatz nur bestimmte Aberrationen pro Ansatz detektierbar werden, stellt aufgrund der Heterogenität der genetischen Veränderungen bei der AML einen limitierenden Faktor dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die FISH-Analyse zusätzliche Information erbringen, die konventionelle Zytogenetik jedoch nicht ersetzen kann, da mit der FISH nur ein begrenzter Nachweis bestimmter vermuteter Aberrationen gelingt. Um einen Überblick über das Genom zu erhalten, ist die konventionelle Zytogenetik die Methode der Wahl.

1.2.3.2.1 24-Farben-FISH

Mit der Einführung der 24-Farben-FISH ist ein wichtiger Fortschritt zur Aufklärung besonders komplexer Rearrangements gelungen. Mit Hilfe der 24-Farben-FISH wurde es erstmals möglich, alle 24 verschiedenen Chromosomen gleichzeitig in einer Hybridisierung in verschiedenen Farben darzustellen. Hierzu werden fünf verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet sowie eine Gegenfärbung mit DAPI durchgeführt, die unspezifisch alle Chromosomen färbt. Durch eine kombinatorische Markierung der 24 verschiedenen Chromosomen wird anhand der Kombination der einzelnen Fluoreszenz-Farbstoffe eine eindeutige Identifizierung der Chromosomen möglich. Als besonders hilfreich erweist sich diese Methode bei der Auflösung komplex aberranter Karyotypen, bei denen mehrere Veränderungen vorliegen [Veldman, T. et al., 1997; Mohr, B. et al., 2000; Odero, M. D. et al., 2001; Schoch, C. et al., 2002a].

Einleitung

In einer Studie von Limbergen et al. wurden bei 23 AML- und 13 MDS-Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp 24-Farben-FISH eingesetzt, nachdem die Untersuchung mittels der konventionellen Zytogenetik keine vollständige Aufklärung des Karyotyps erbrachte. Die Ergebnisse zeigten, dass die 24-Farben-FISH-Analyse zusätzliches Material unbekannter Herkunft identifizieren konnte. Insgesamt konnten 82 Markerchromosome, 51 Additionen und drei dizentrische Veränderungen den zugehörigen Chromosomen zugeordnet werden [Van Limbergen, H. et al., 2002]. Mrozek et al. untersuchten insgesamt 29 Patienten mit AML und komplex aberrantem Karyotyp nach konventioneller Zytogenetik mittels Spektral Karyotyping (SKY) [Mrozek, K. et al., 2002]. Hierbei konnte die Methode ebenfalls der Detektion der Herkunft von Ring- und Markerchromosomen dienen. Weiterhin ließen sich in allen Fällen unbekanntes Material, welches an unbalancierten Translokationen beteiligt war, nachweisen. Mittels SKY wurden neun vorerst unbekannte balancierte Aberrationen detektiert und drei Aberrationen neu interpretiert. Insgesamt 11 von 32 mittels G-Banden-Analyse detektierten unbalancierten Aberrationen konnten als kryptische Translokationen oder Insertionen definiert werden. Weiterhin konnte mittels SKY gezeigt werden, dass 63 von 92 mittels G-Banden-Analyse nachgewiesenen chromosomalen Verlusten in strukturellen Aberrationen involviert vorlagen. Vorerst unbekannte Zugewinne ließen sich besonders in den Chromosomen 21q in 8, 11q in 7 und 22q in 7 Fällen nachweisen.

In einer weiteren Studie von Schoch et al. wurden 125 AML-Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp mit konventioneller Zytogenetik, FISH und 24-Farben-FISH untersucht [Schoch, C. et al., 2001a]. Strukturelle Veränderungen lagen häufiger vor als numerische Veränderungen. Hierbei waren besonders Verluste von chromosomalem Material in 5q, 12p, 17p und Vermehrungen besonders in 8q, 11q und 21q nachgewiesen worden. Auch in dieser Studie konnte mittels 24-Farben-FISH neue Information in bezug auf die Herkunft bestimmter Rearrangements gewonnen werden.

1.2.3.2.2 Comparative Genomische Hybridisierung

1992 wurde an der Universität von Kalifornien in San Francisco (USA) eine neue molekularzytogenetische Methode namens Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) beschrieben [Kallioniemi, A. et al., 1992]. Diese, auf der in situ Suppressions-

Einleitung

Hybridisierung basierende Methode, gibt die Möglichkeit, einen Überblick über genetische Veränderungen eines Tumors auf chromosomaler Bandenebene zu erhalten [du Manoir, S. et al., 1993; James, L. A., 1999]. Die CGH ist eine Methode, die das gesamte Genom einer Tumorzelle in einem Versuchsansatz auf unbalancierte Chromosomenaberrationen untersucht [Weiss, M. M. et al., 1999]. Der Unterschied zur klassischen FISH-Methode besteht darin, dass bei der CGH nicht spezifische Sonden auf die Tumorzellen des Patienten hybridisiert werden, sondern die Tumor-DNA selbst als Sonde verwendet wird. Somit wird zwischen der DNA des Tumors und einer Kontroll-DNA, welche unterschiedlich markiert und gemeinsam auf gesunde Metaphasen hybridisiert werden, verglichen. Verluste und Zugewinne von chromosomalem Material in der Tumor-DNA können mit dieser Methode nachgewiesen werden. Die Auswertung komplex aberranter Karyotypen wird hierdurch erleichtert, da chromosomale Veränderungen den einzelnen Chromosomenbanden genauer zugeordnet werden können. Ein weiterer Vorteil gegenüber den oben genannten zytogenetischen Untersuchungsmethoden liegt darin, dass der mit häufigen Problemen assoziierter Zellkulturvorgang bei der CGH nicht erforderlich ist, da die Metaphasen-Chromosomen von gesunden Spendern stammen. Weiterhin wird nur eine geringe Menge an Tumor-DNA benötigt [Hermsen, M. A. et al., 1996]. Die Sensitivität der Methode hängt von der Art und Größe der Aberrationen und von der Kontamination des Tumormaterials mit normalen Zellen ab. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, sollte der Anteil der Tumorzellen mindestens 50% sein [Kallioniemi, O. P. et al., 1994]. Die durchschnittliche Erkennungsgröße mit der CGH beträgt ca. 3-10 Megabasen (Mb) [Bentz, M. et al., 1998; Weiss, M. M. et al., 1999]. Das Auflösungsvermögen der CGH ist auf chromosomale Bandenebene begrenzt, so dass Aussagen über beispielsweise Punktmutationen hiermit nicht möglich sind. Ein Nachteil der Comparativen Genomischen Hybridisierung ist, dass balancierte Chromosomenanomalien nicht identifiziert werden können. Diese Tatsachen machen deutlich, dass es sich bei der CGH nicht um eine ersetzende, sondern um eine ergänzende Methode handelt, die zusätzliche Information zu den anderen Methoden liefern kann.

1.2.3.3 Molekulargenetik

Mittels molekulargenetischer Methoden, wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es unter anderem möglich bestimmte Fusionstranskripte, die durch balancierte Veränderungen entstehen, nachzuweisen. Dies dient der Bestätigung zytogenetischer Ergebnisse und kann zusätzlich im Verlauf der Erkrankung zur Bestimmung von minimaler Resterkrankung (MRD) mittels quantitativer Messung bekannter Fusionstranskripte verwendet werden [Schnittger, S. et al., 2003]. Die Bestimmung der MRD ermöglicht, ein Rezidiv frühzeitig zu erkennen und dadurch ein schnelleres therapeutisches Vorgehen zu veranlassen [Miller, W. H., Jr. et al., 1993; Koller, E. et al., 1995; Burnett, A. K. et al., 1999]. Schnittger et al. konnten weiterhin zeigen, dass die mittels PCR ermittelte Höhe des Expressionslevels der verschiedenen Fusionstranskripte mit der Prognose der AML assoziiert ist [Schnittger, S. et al., 2003].

Die Molekulargenetik kann zusätzlich zur Charakterisierung der AML eingesetzt werden. Dies ist besonders bei zytogenetisch unauffälligem Karyotyp von großer Bedeutung. In einigen molekulargenetischen Studien konnten bei AML-Patienten ohne Veränderungen im Karyotyp Aberrationen im Bereich von Tyrosinkinase-rezeptoren detektiert werden [Appelbaum, F. R. et al., 2001]. In ca. 40% aller Fälle mit normalem Karyotyp wurde eine Längenmutation und in 15% eine Punktmutation im Flt3 Rezeptor nachgewiesen. Die genetischen Veränderungen führen zu unkontrollierter Aktivierung des Rezeptors und somit zu zytokinunabhängigem Zellwachstum [Hayakawa, F. et al., 2000; Schnittger, S. et al., 2002]. Weitere molekulare Veränderungen, die in der Patientengruppe mit normalem Karyotyp detektiert wurden, sind MLL-Tandem-Duplikationen und Veränderungen im NRAS-Gen [Schnittger, S. et al., 2000]. Genetische Aberrationen, welche die Gene der RAS-Familie betreffen, führen ebenfalls zu einem Verlust der Regulation der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose [Appelbaum, F. R. et al., 2001].

1.3 Klassifikation der AML

1.3.1 FAB-Klassifikation

Die akute myeloische Leukämie stellt eine heterogene Erkrankung mit unterschiedlicher Morphologie und klinischem Verlauf dar. Aufgrund dieser Heterogenität wurde die AML 1976 nach der französisch-amerikanisch-britischen (FAB) Klassifikation in verschiedene Subgruppen zytomorphologisch und zytochemisch eingeteilt [Bennett, J. M. et al., 1976]. Im Laufe der Jahre wurde diese erweitert, so dass die AML in 11 verschiedene Subgruppen unterteilt werden konnte (Tabelle 2). Die Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie wird nach dieser Klassifikation bei einem Blastenanteil von $\geq 30\%$ gestellt. Da diese Klassifikation die Immunphänotypisierung, die Zytogenetik und die molekulare Genetik nur zum Teil einbezieht, wurden weitere Klassifikationen notwendig [Keating, M. J. et al., 1987].

Subtypen	Morphologie	Peroxidase	Esterase	Häufigkeit in %
M0	Blastär-undifferenziert	-	-	3
M1	Myeloblastär-undifferenziert	+/-	+/-	20
M2	Myeloblastär-Differenziert	+++	+/-	25
M3	Promyelozytär-hypergranulär	+++	-	10
M3 v	Promyelozytär-mikrogranulär			
M4	Myelomonozytär	+	+++	20
M4 Eo	Myelomonozytär mit pathologischen Eosinophilen	+	+++	
M5 a	Monoblastär	-	+++	20
M5 b	Promonozytär-monozytär	-	+++	
M6	Erythroblastär-myeloblastär	+/-	-	5
M7	Megakaryoblastär	-	+/-	5

Tabelle 2: FAB-Klassifikation und Häufigkeit der AML-Subgruppen

[Isselbacher K J et al., 1995]

Zytomorphologische und zytochemische Einteilung der FAB-Subgruppen der AML

1.3.2 MIC-Klassifikation (1988)

Die Grundlagen dieser Einteilung liegt in der Berücksichtigung von morphologischen (M), immunzytologischen (I) und zytogenetischen (C) Daten [Second MIC Cooperative Study Group, 1988]. Diese Einteilung konnte sich jedoch nicht durchsetzen, da sie im Laufe der Jahre nicht überarbeitet und dem neuesten Kenntnisstand angepasst wurde [Löffler H und Haferlach, T., 2000]

1.3.3 WHO-Klassifikation (1999/2001)

Seit der Erstellung der FAB-Klassifikation 1976 wurden viele Fortschritte in der Leukämiediagnostik erzielt. Hierzu trug besonders die Entwicklung zytogenetischer und molekularer Methoden bei. Viele Studien konnten die Relevanz und Vorteile dieser Untersuchungen verdeutlichen, da häufig ein direkter Zusammenhang zwischen der zytogenetischen Analyse, der AML-Subgruppe und der Prognose beobachtet wurde. Diese Daten führten 1999 zu einer neuen Klassifikation, wobei sowohl zytomorphologische, als auch zytogenetische, immunphänotypische und ätiologische Aspekte aufgenommen wurden [Harris, N. L. et al., 1999; World Health Organization Classification of Tumors, 2001; Haferlach, T. und Schoch, C., 2002b]. In dem Klassifikationsvorschlag der World-Health-Organization (WHO) zur AML werden in einem ersten Schritt spezifische chromosomale Translokationen als Klassifikationsmerkmal verwendet. Weiterhin geht die Anamnese in diese Klassifikation ein, so dass nun zwischen AML nach MDS und therapie-assoziiertes AML unterschieden wird. Eine weitere Subgruppe stellt die AML mit multilinearer Dysplasien dar, wobei dysplastische Veränderungen in mehreren Zelllinien nachzuweisen sind. Eine akute Leukämie besteht nach dieser Klassifikation schon bei einem Blastenanteil von $\geq 20\%$. Einen Überblick über die Einteilung nach der WHO gibt die nachfolgende Tabelle.

Einleitung

AML mit genetischen Aberrationen	AML mit multilinearer Dysplasie
AML mit t(8;21)(q22;q22), (AML-1/ETO)	Mit vorausgegangenem MDS
AML mit abnormen KM-Eosinophilen und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11)	Ohne vorausgegangenem MDS, jedoch mit Dysplasie in mindestens 50% der Zellen in 2 oder mehr Zellreihen
Akute Promyelozyten-Leukämie mit t(15;17)(q22;q12), PML/RARα und Varianten	
AML mit 11q23 (MLL)-Anomalien	
Therapiebedingte AML/MDS	AML klassifiziert als:
Nach Alkylantien-/ Strahlentherapie Nach Topoisomerase II-Inhibitoren Andere Auslöser	AML minimal differenziert - mit Ausreifung - ohne Ausreifung Akute myelo-monozytäre Leukämie Akute monoblastisch/-zytäre Leukämie Akute erythrozytäre Leukämie Akute megakaryoblastäre Leukämie Akute basophile Leukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose Akute biphänotypische Leukämie

Tabelle 3: Klassifikation der AML nach WHO

[Vardiman, J. W. et al., 2002]

Einteilung der AML-Subgruppen anhand morphologischer, zytogenetischer und ursachenbedingter Kriterien

1.4 Therapie

Die Behandlung der AML beginnt mit einer Induktionstherapie, welche als Ziel die komplette Remission hat. Diese ist erreicht, wenn der Blastenanteil im Knochenmark unter 5% liegt [Cheson, B. D. et al., 1990]. Anschließend folgt die Konsolidierungstherapie, deren Ziel es ist, residuale leukämische Zellen zu eliminieren, um ein Rezidiv zu verhindern. Die Induktionstherapie für alle Formen der AML - ausgenommen der AML M3/M3v - besteht aus der Gabe eines Antimetaboliten, wie Cytosinarabinosid (ARA-C) und 6-Thioguanin und eines Anthracyclins, wie Daunorubicin, welches durch Mitoxantron, einem weiteren zytotoxisch wirksamen Antibiotikums, ersetzt werden kann. Anschließend an die Induktionstherapie folgen die Konsolidierungs- und Postremissionstherapie, die sich

Einleitung

je nach der prognostischen Gruppe unterscheiden. Patienten mit zytogenetisch günstiger Prognose, wie mit t(8;21) oder einer inv(16), erhalten je nach Studie eine Hochdosistherapie mit ARA-C [Bloomfield, C. D. et al., 1998]. Patienten mit intermediären zytogenetischen Befund, die nicht älter als 60 Jahre sind, sollten eine Knochenmarkstransplantation erhalten [Appelbaum, F. R. et al., 2001]. Ist dies aufgrund eines fehlenden HLA-identischen Spenders nicht möglich, werden diese Patienten ebenfalls mit einer hoch dosierten ARA-C Chemotherapie behandelt. Das Behandlungsschema bei Patienten mit einem prognostisch ungünstigen Karyotyp, wie einem komplex aberrantem Karyotyp bei älteren Patienten oder bei sekundären Leukämien, ist derzeit Gegenstand vieler Studien und wird kontrovers diskutiert [Hiddemann, W. et al., 1999; Buchner, T. et al., 2001].

Bei der AML M3/M3v entsteht durch die Translokation zwischen dem Chromosom 15 und 17 das Fusionsgen PML-RAR α , welches die retininsäureinduzierte Gentranskription und Zelldifferenzierung hemmt [Rousselot, P. et al., 1994]. Dieser Mechanismus wird für die Therapie der AML M3 genutzt. Wird eine akute Promyelozyten-Leukämie (M3 oder M3v) diagnostiziert, erfolgt eine Therapie mit all-trans Retinolsäure (ATRA) als Induktionstherapie, da hohe Retinsäuredosen zur Ausdifferenzierung der leukämischen Zellen führen und somit die Rate der kompletten Remission erheblich gesteigert werden kann. Anschließend sollte eine Konsolidierungstherapie der AML M3 mit Anthracyclinen und Cytarabin durchgeführt werden, um die Remissionsdauer zu verlängern. Die therapeutischen Ergebnisse sind in dieser AML-Subgruppe sehr zufriedenstellend, da eine Langzeitremission in über 80% der Patienten erreicht wird [Lengfelder, E. et al., 2000].

Ältere Patienten mit AML, die über 60 Jahre sind, zeigen ein ungünstiges Ansprechen auf die Chemotherapie und einen progredienten Verlauf der AML. Drei Gründe können hierfür verantwortlich gemacht werden: zum einen finden sich in dieser Patientengruppe häufig komplex aberrante Karyotypen, die eine ungünstige Prognose aufweisen [Schoch, C. et al., 2001b]. Weiterhin konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber der zytostatischen Therapie nachgewiesen werden, welche wahrscheinlich auf molekulargenetischen Mechanismen beruht [Campos, L. et al., 1992; Leith, C. P. et al., 1999]. Ein weiterer Grund für den ungünstigen Verlauf bei älteren Patienten mit AML liegt in der reduzierten Toleranz gegenüber zytotoxischen

Einleitung

Effekten der Therapie mit der Folge der Panzytopenie und des Versterbens der Patienten während der Induktionstherapie. Diese Tatsache wird in Therapieansätzen beachtet, in denen eine Dosisreduktion vorgeschlagen wird. Jedoch sind die Ergebnisse des Erreichens einer kompletten Remission hierbei nicht zufriedenstellend. Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp profitieren möglicherweise von einer Intensivierung der Induktionstherapie [Buchner, T. et al., 2001]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz in dieser Subgruppe stellt die Behandlung mit wachstumsstimulierenden Substanzen, wie Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktoren (G-CSF) und Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierenden Faktoren (GM-CSF), dar. Studien konnten zeigen, dass maligne Zellen mit komplex aberrantem Karyotyp eine verlangsamte Proliferation aufweisen und dadurch der Chemotherapie, bei der besonders Zellen mit schnellem Wachstum geschädigt werden, eventuell entgehen [Jahns-Streubel, G. et al., 2001]. Die Gabe von G-CSF oder GM-CSF vor Verabreichung der zytostatischen Therapie könnte somit gerade in dieser AML-Subgruppe zu einer Erhöhung der Wirksamkeit der zytostatischen Therapie führen, indem die malignen Zellen durch das G- bzw. GM-CSF in die Proliferationsphase gebracht werden (sogenanntes Priming-Konzept). Dieses Behandlungsverfahren wird derzeit in einigen Studien überprüft [Löwenberg, B. et al., 2003].

Da das mediane Alter bei der AML derzeit über dem 60igsten Lebensjahr liegt, komplex aberrante Karyotypen eine große Subgruppe der AML-Patienten darstellen und bisherige therapeutische Ansätze die Prognose in dieser Subgruppe nicht erheblich verbessern konnten, stellt die Entwicklung angemessener therapeutischer Verfahren eine große Herausforderung gegenwärtiger Studien dar. Ziel ist es, risikoadaptierte Therapiestrategien für die verschiedenen Leukämie-Subtypen zu etablieren.

1.5 Prognose

1.5.1 Prätherapeutische Parameter

Faktoren, die Einfluss auf die Prognose der akuten myeloischen Leukämie haben, sind klinische Laborparameter, wie die Leukozytenanzahl und LDH und der

Einleitung

zytogenetische Befund (s. 1.5.2) [Ventura, G. J. et al., 1988; Ferrara, F. und Mirto, S., 1996; Bloomfield, C. D., 2002]. Zytomorphologisch lassen sich ebenfalls prognostische Aussagen treffen. Mit einer eher günstigen Prognose geht der Nachweis von Auerstäbchen sowie eine positive Myeloperoxidasereaktion einher. Dysplasien, die alle drei Zellreihen gleichzeitig betreffen, scheinen mit einem prognostisch ungünstigen Karyotyp assoziiert zu sein [Haferlach, T. et al., 2003b]. Einen weiteren prognostischen Faktor stellt das Alter bei Erstdiagnose dar. Löwenberg et al. konnten in einer Studie zeigen, dass Patienten unter 60 Jahren eine komplette Remission in 75% und eine 5-Jahres-Überlebensrate von 35-40% haben. Patienten, die über 60 Jahre waren, zeigten eine komplette Remission in nur 45-55% und eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 10% [Löwenberg, B. et al., 1999].

1.5.2 Zytogenetische Parameter

Zusätzlich zu diagnostischen und klassifizierenden Aspekten spielt die Zytogenetik eine entscheidende und unabhängige Rolle hinsichtlich der prognostischen Einschätzung der AML [Arthur, D. C. et al., 1989; Mitelman, F. und Heim, S., 1992; Swansbury, G. J. et al., 1994; Mrozek, K. et al., 1997; Grimwade, D., 2001; Bloomfield, C. D., 2002; Schoch, C. und Haferlach, T., 2002]. Es konnte eine Assoziation zwischen genetischen Aberrationen und dem prognostischen Verlauf hinsichtlich der Remissionsrate und -dauer hergestellt werden, welche eine Einteilung der unterschiedlichen Karyotypen in drei prognostische Gruppen erlaubt [Yunis, J. J. et al., 1984; Grimwade, D. et al., 1998]. Hierbei werden zwischen chromosomalen Veränderungen mit günstiger, intermediärer und ungünstiger Prognose unterschieden. Diese werden je nach Studie etwas unterschiedlich definiert (Tabelle 4). Ergebnisse der AMLCG Studie zeigten, dass das Erreichen einer kompletten Remission bei 83% in der Gruppe mit günstigem Karyotyp, bei 69,5% in der Gruppe mit intermediärem Karyotyp und bei nur 48,6% bei Patienten mit ungünstigem Karyotyp liegt. Ähnliche Ergebnisse konnten in der CALGB Studie gezeigt werden [Byrd, J. C. et al., 2002]. Einen Überblick über die Prognose bietet die Abbildung 1, in der die einzelnen Überlebenskurven der jeweiligen prognostischen Subgruppen dargestellt sind [Haferlach, T. et al., 2003b].

1.5.2.1 Günstiger Karyotyp

Dieser Subgruppe mit günstiger Prognose gehören Patienten mit balancierten Veränderungen, wie der t(8;21), der t(15;17) oder inv(16) an [Larson, R. A. et al., 1986; Dastugue, N. et al., 1995]. Insgesamt wurden diese balancierten Veränderungen häufiger bei Patienten, die unter 55 Jahre sind, detektiert [Mauritzson, N. et al., 1999]. In einer Studie von Haferlach et al. wurde bei Patienten mit t(8;21) eine komplette Remission in 90% und in 60% der Fälle ein rezidiv-freies Überleben von 2 Jahren erreicht [Haferlach, T. et al., 1996]. Patienten mit einer Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17 zeigen eine komplette Remission in 80-90% mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 70% der Fälle [Lengfelder, E. et al., 2000]. Karyotypen, die eine inv(16) beinhalten, zeigen eine komplette Remission in 88% mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 43% der Fälle [Dastugue, N. et al., 1995].

1.5.2.2 Intermediärer Karyotyp

Patienten, die keine Veränderung im Karyotyp aufweisen oder seltene Aberrationen zeigen, werden der Subgruppe mit intermediärer Prognose zugeordnet. Je nach Studie wird diese Subgruppe unterschiedlich definiert (s. Tabelle 4). Einige Studien konnten zeigen, dass die Trisomie 8 als einzige zytogenetische Aberration eine intermediäre Prognose mit einer kompletten Remission von 70% der Fälle und einem rezidiv-freien Überleben von 3 Jahre in 37,5% hat [Schoch, C. et al., 1997]. Liegen jedoch zusätzliche Aberrationen vor, verändert sich die Prognose. In einer Studie von Schoch et al. konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Trisomie 8 und einer prognostisch günstigen Aberration, wie t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21) oder inv(16)(p13q22), mit einer kompletten Remission von 90% der Fälle und einem rezidiv-freien Überleben von 3 Jahren in 55% der Fälle eine günstige Prognose haben. Patienten mit einer Trisomie 8 und einem prognostisch ungünstigen Karyotyp, wie einem komplex aberrantem Karyotyp, zeigten mit einem rezidiv-freiem Überleben von 3 Jahren in nur 9% der Fälle eine sehr ungünstige Prognose. In einigen zytogenetischen Studien konnten weitere Aberrationen, die Einfluss auf die Prognose haben, detektiert werden. So zeigte die Studie von Grimwade et al., dass Veränderungen in 11q23, Trisomien der Chromosomen 8, 21 und 22 und Verluste in

9q und 7q mit einer intermediären Prognose einhergehen [Grimwade, D. et al., 1998]. In anderen Studien wurden einige dieser Aberrationen als ungünstig eingestuft, so dass hier Diskrepanzen in der prognostischen Einschätzung der verschiedenen Aberrationen vorliegen [Slovak, M. L. et al., 2000; Schoch, C. et al., 2003].

1.5.2.3 Ungünstiger Karyotyp

In dieser Subgruppe finden sich überwiegend Karyotypen mit unbalancierten Veränderungen. Der Verlust oder Zugewinn von chromosomalem Material korreliert mit niedrigen Remissionsraten und kurzem rezidiv-freien Überleben. Genetische Aberrationen wie $-5/5q$, $-7/7q$ und komplex aberrante Karyotypen sind mit einer ungünstigen Prognose assoziiert [Fenaux, P. et al., 1989; Dastugue, N. et al., 1995]. Van Limberg et al. zeigte in einer Studie, dass das gleichzeitige Auftreten eines Verlustes in 5q und ein Zugewinn in 11q eine besonders ungünstige Prognose aufweist [Van Limbergen, H. et al., 2002]. Weiterhin werden je nach Studie die Monosomie 7, die $inv(3)/t(3;3)$ sowie 11q23/MLL-Rearrangements dieser Gruppe zugeordnet. Nach der Induktionstherapie liegt das Erreichen einer kompletten Remission bei den Patienten mit ungünstigen Aberrationen bei nur 55-58% [Grimwade, D. et al., 1998]. Die Patienten dieser prognostisch ungünstigen Subgruppe sind häufig über 60 Jahre alt [Schoch, C. et al., 2001b]. Eine besondere Subgruppe der Patienten mit ungünstiger Prognose stellen die mit komplex aberranten Karyotypen dar (s. 1.5.2.3.1).

1.5.2.3.1 Komplex aberranter Karyotyp

In 10% -15% der *de novo* AML und in bis zu 50% der sekundären akuten Leukämien lassen sich komplex aberrante Karyotypen nachweisen. Die Definition dieses Karyotyps variiert in unterschiedlichen Studien. In einigen Studien wird der komplex aberrante Karyotyp definiert als das Vorliegen von mindestens drei numerischen und/oder strukturellen Aberrationen [Schoch, C. et al., 2001a]. Aus dieser Definition wurden bestimmte Veränderungen, wie $t(15;17)$, $t(8;21)$ und $inv(16)$, die mit einer guten Prognose einhergehen, ausgeschlossen. Grimwade et al. definieren diesen Karyotyp, wenn mehr als fünf Chromosomenaberrationen in einem malignen Klon nachweisbar sind [Grimwade, D. et al., 1998]. Patienten mit einem komplex

Einleitung

aberranten Karyotyp zeigen eine besonders ungünstige Prognose mit Remissionsraten von nur 45% [Arthur, D. C. et al., 1989; Swansbury, G. J. et al., 1994; Schoch, C. et al., 2001a].

Der sehr ungünstige klinische Verlauf lässt vermuten, dass die AML mit komplex aberrantem Karyotyp einer pathogenetisch unterschiedlichen Leukämogenese unterliegt als die anderen Subgruppen. Besonders unbalancierte Veränderungen der Chromosomen 5, 7 und 17 sind typische Veränderungen der AML mit komplex aberrantem Karyotyp. Verluste, die durch strukturelle Aberrationen entstehen, sind hierbei sehr häufig repräsentiert [Schoch, C. et al., 2001a]. Die Pathogenese der komplex aberranten Karyotypen ist weiterhin unklar.

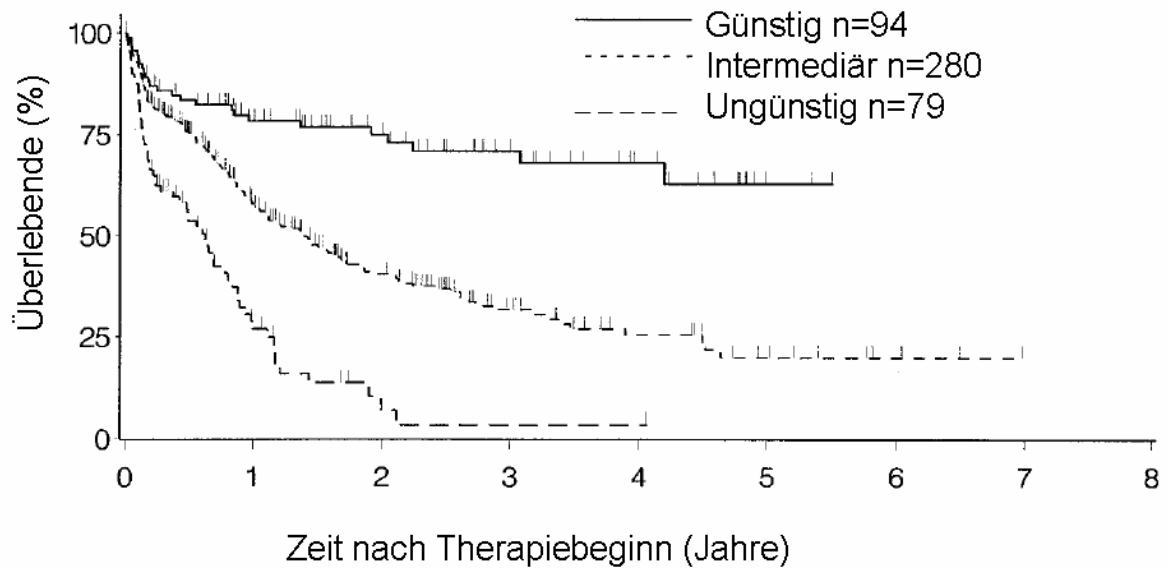
Studie	Günstiger Karyotyp	Intermediärer Karyotyp	Ungünstiger Karyotyp
AMLCG ¹	t(8;21), t(15;17), inv(16), t(16;16)	normal, andere Aberrationen	-5/5q-, -7/7q-, inv(3), 11q23, 12p, 17p, komplex aberranter Karyotyp
CALGB ²	t(8;21), inv(16), t(16;16), del(16)	normal	andere Aberrationen
MRC ³	t(8;21), t(15;17), inv(16)	normal, del(7q), +8, del(9q), 11q23, +21, +22, andere Aberrationen	-5/5q-, -7/7q-, 3q, komplex aberranter Karyotyp

Tabelle 4: Prognostische Einteilung der chromosomalen Veränderungen je nach Studie

¹ AMLCG [Schoch, C. et al., 2001a], ² CALGB [Byrd, J. C. et al., 2002],

³ MRC [Grimwade, D. et al., 1998]

Einleitung



$p < 0.0001$

Abbildung 1: Überlebenskurven der zytogenetisch determinierten AML- Subgruppen

[Haferlach, T. et al., 2003b]

Darstellung der 5-Jahres Überlebensraten der Patienten mit prognostisch günstigem, intermediärem und ungünstigem Karyotyp (AML-CG-Studie).

1.5.3 Therapieabhängige Parameter

Ein weiterer Prognosefaktor für das Ansprechen auf die Therapie scheint die mittels Morphologie oder Immunphänotypisierung ermittelte Blastenzahl im Knochenmark nach Beginn der Induktionstherapie zu sein [San Miguel, J. F. et al., 2001; Estey, E. H., 2003; Kern, W. et al., 2003]. Kern und Haferlach et al. zeigen in einer Studie, dass das Erreichen einer kompletten Remission mit einem morphologischen Blastenanteil von unter 5% am Tag 16 mit einer günstigeren Prognose korreliert [Kern, W. et al., 2003]. Weiterhin scheint die mittels Real-Time PCR (RT-PCR) gemessene Expressionshöhe bestimmter Fusionsgene sowohl bei Erstdiagnose als auch nach erfolgter Therapie prognostische Aussagekraft zu haben [Schnittger, S. et al., 2003].

1.6. Fragestellung dieser Studie

Die AML mit komplex aberrantem Karyotyp stellt eine große Subgruppe dar, die mit einer besonders ungünstigen Prognose einhergeht. Aufgrund des unterschiedlichen Aberrationsmusters und des schlechten Ansprechens auf die Therapie dieser Subgruppe wird vermutet, dass es sich hierbei um eine eigene biologische Entität handelt. Über den genauen Pathomechanismus des komplex aberranten Karyotyps ist noch wenig bekannt. Zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen von Patienten mit komplexen Aberrationen konnten zeigen, dass unbalancierte Chromosomenaberrationen bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp eine besondere Rolle spielen. Eine vollständige Aufklärung dieser komplexen Rearrangements mittels unterschiedlicher Methoden ist notwendig, um einen besseren Einblick in die Biologie dieser Subgruppe zu erhalten. Mit dem Einsatz der 24-Farben-FISH konnten Fortschritte bei der Auflösung der komplexen Veränderungen erzielt werden, da eine Zuordnung von unbekanntem Material einzelner Rearrangements zu den Chromosomen ermöglicht wird. Eine genaue Zuordnung des Materials zu den chromosomalen Banden ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit 44 AML-Patienten, die in der Routinediagnostik einen komplex aberranten Karyotyp zeigten, zusätzlich mit der Comparativen Genomischen Hybridisierung untersucht, um Verluste und Zugewinne von chromosomalem Material genauer einzugrenzen. Die Identifizierung häufig betroffener Regionen bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp mittels CGH kann die Suche nach relevanten Genen, die in der Pathogenese eine Rolle spielen, eingrenzen. Eine vollständige Aufklärung der genetischen Veränderungen und dem Pathomechanismus der komplex aberranten Karyotypen dient der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientengut

Insgesamt wurden 41 Patienten bei Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie und weitere 3 Patienten bei Erstdiagnose eines MDS untersucht. Die Untersuchungen wurden mit Knochenmarkszellen oder peripheren Blut der Patienten durchgeführt. Das mediane Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 67,5 Jahren mit einer Spannweite von 22 bis 82. 17 Patienten waren weiblich und 27 männlich. Bei vier der Patienten lag ein MDS in der Vorgeschichte vor, bei drei weiteren Patienten wurde ein *de novo* MDS diagnostiziert. Bei vier Patienten lag eine therapie-assoziierte AML (t-AML) vor. Bei diesen Patienten war in der Vorgeschichte eine Chemotherapie wegen eines anderen malignen Tumors durchgeführt worden. In Abbildung 2 ist die Verteilung der FAB-Subtypen dieses Patientenkollektivs dargestellt. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der Patientendaten.

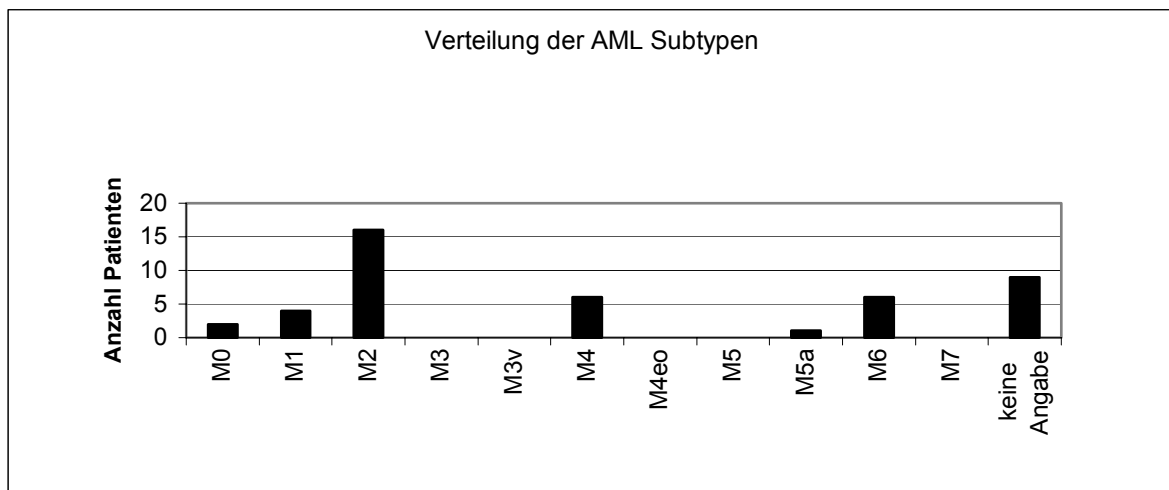


Abbildung 2: Verteilung der AML-Subtypen

Die AML-Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp zeigten ein unterschiedlich häufiges Auftreten der FAB-Subtypen. In 36% der Fälle lag eine AML M2 vor, welche somit am häufigsten in dieser Gruppe diagnostiziert wurde.

Material und Methoden

Patient	Alter	Geschlecht	FAB-Subtyp	Krankheitsstatus
1	46	M	M1	de novo AML
2	82	W	M2	de novo AML
3	70	M	?	AML nach MDS
4	74	M	?	de novo AML
5	66	W	M2	de novo AML
6	71	M	M2	de novo AML
7	76	M	M1	de novo AML
8	64	M	M4	de novo AML
9	35	M	?	t-AML nach Anal-Ca
10	56	W	M5a	de novo AML
11	73	M	?	de novo AML
12	74	W	M2	de novo AML
13	71	W	M2	de novo AML
14	76	M	M2	de novo AML
15	59	W	M4	de novo AML
16	71	M	M2	AML nach MDS
17	68	W	M4/M5	t-AML nach Plasmozytom
18	73	M	M6	de novo AML
19	71	M	M2	AML nach MDS
20	77	M	M1/M2	de novo AML
21	72	M	M2	de novo AML
22	65	M	M2	de novo AML
23	54	M	M2	de novo AML
24	67	M	?	de novo AML
25	22	M	M0	de novo AML
26	77	W	M2	de novo AML
27	81	W	M6	de novo AML
28	58	M	M1	de novo AML
29	65	M	M4	de novo AML
30	61	M	M4	de novo MDS (RAEB)
31	27	W	?	de novo MDS (RAEB)
32	52	W	?	t-AML nach Endoxantherapie bei M. Wegener
33	48	W	M6	de novo AML
34	74	W	M2	de novo AML
35	52	W	M6	de novo AML
36	73	W	M2	de novo AML
37	82	M	?	de novo AML
38	52	M	M2	t-AML nach MPS
39	54	W	M6	de novo AML
40	59	M	M6	de novo AML
41	37	W	M2	de novo AML
42	53	M	?	de novo MDS
43	70	M	M0	de novo AML
44	68	M	M4	AML nach MDS

Tabelle 5: Patientendaten

Einteilung der 44 Patienten nach Alter, Geschlecht, FAB-Subtyp und Krankheitsstatus. Patienten, für die keine Daten zum FAB-Subtyp vorlagen sind mit einem Fragezeichen markiert.

Material und Methoden

2.1.2 Charakterisierung des Patientenmaterials

Für die zytogenetische Charakterisierung des Patientenmaterials wurden im Rahmen der Diagnostik die Methoden der G-Banden-Analyse, der FISH an Interphase-Kernen und der 24-Farben-FISH eingesetzt. Die bei den Patienten eingesetzten FISH-Sonden wurden nach den Veränderungen in den G-Banden ausgewählt. Die einzelnen Sonden sind in Tabelle 6 aufgelistet. Im Rahmen der Untersuchungen mit der Interphasen-FISH wurden je 100 Interphase-Zellkerne pro Sonde ausgewertet. Für eine 24-Farben-FISH-Analyse wurden jeweils mindestens 5 Metaphasen ausgewertet.

Sonde	Lokalisation
D5S23	5p15.2
EGR-1	5q31
D7S522	7q31
ETO	8q22
C-MYC	8q24
MLL	11q23
TEL	12p13
Rb-1	13q14
CBF β	16q22
p53	17p13
AML1	21q22

Tabelle 6: Interphase-FISH-Sonden und ihre Lokalisation

Material und Methoden

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Gerät	Firma
Zentrifuge:	HERAEUS Megafuge 1.0R
Eppendorf- Zentrifuge:	5415 C von Eppendorf
Kühlzentrifuge:	Sorvall super T 21, Du Pont
Lichtmikroskop:	Zeiss Axioplan
Fluoreszenzmikroskop:	Zeiss Axioplan
Computer: Soft- und Hardware inkl. CCD- Kamera	ISIS-Metasystems
Vortex:	Vortex Genie 2, scientific Industries
Wasserbad:	GFL
Hybrite™:	Hybridisierungssofen, Vysis, Stuttgart

Tabelle 7: Aufzählung verwendeter Geräte für die CGH

2.2.2 Reagenzien

Reagenz	Herstellung/ Inhalt	Firma
10x Dulbecco PBS (Phosphatpufferlösung)	1 g Kaliumchlorid (KCL) + 1 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) + 40 g Natriumchlorid (NaCL) + 10,8 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) ad 500 ml Aqua bidest.	MERCK
Türks-Lösung	gebrauchsfertig	MERCK
SE-Puffer	50 mM NaCL, 75 mM EDTA 2,5 ml NaCL Stocklösung + 15 ml EDTA Stocklösung ad 100 ml Aqua dest.	MERCK
SDS-Puffer (sodium dodecyl sulfate)	Laurylsulfat 10%	Sigma
1 mM Spectrum-orange/green dUTP:	Pulver ad 50 µl Aqua dest. (Ampuwa); bei -20°C aufbewahren	Vysis
0,2 mM Spectrum Orange/ Green dUTP:	10 µl 1mM Spectrum Orange dUTP + 40 µl nuclease-freies Wasser	Vysis
CGH nick translation kit:	dTTP, dATP, dCTP, dGTP Nuclease-freies Wasser Nick Translations Puffer Nick Translations Enzym	Vysis

Material und Methoden

0,1 mM dTTP:	10 µl 0,3 mM dTTP + 20 µl nuclease-freies Wasser	Vysis
0,1 mM dNTP:	10 µl 0,3 mM dATP + 10 µl 0,3 mM dCTP + 10 µl 0,3 mM dGTP	Vysis
Hybridisierungspuffer	gebrauchsfertig	Vysis
Human Cot-1 DNA	gebrauchsfertig	Vysis
Ethanol: 100%ig	gebrauchsfertig	MERCK
DAPI	gebrauchsfertig	Sigma
Anti-Fade	50µl 10x PBS + 5 mg p-Phenylendiamin, pH=8,0; + 450 ml Aqua bidet. + 4,5 ml Glycerin	Sigma
20x SSC Stammlösung, pH=7,0	175,35 g NaCl + 88,2 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat ad 1000 ml Aqua dest.	MERCK
2x SSC, pH=7,0	50 ml 20x SSC + 450 ml Aqua dest. (bei 4°C lagern)	MERCK
0,4x SSC, pH=7,0	10 ml 20x SSC + 490 ml Aqua dest.	MERCK
0,1x SSC, pH=7,0	2,5 ml 20x SSC + 497,5 ml Aqua dest. (bei 4°C lagern)	MERCK
2x SSC /0,1% Triton-X 100, pH=7,0	50 ml 20x SSC + 450 ml Aqua dest. + 500 µl Triton X 100 (NP 40)	MERCK
Natronlauge (NaOH)	70 ml 1 molare Natronlauge (NaOH) + 30 ml Aqua dest.	MERCK
3 molare Natriumacetat-Trihydrat, pH=5,6	20,4 g + ca. 45 ml Aqua dest. ad 50 ml Aqua dest., pH mit 2 mol Salzsäure (HCL) einstellen	MERCK
0,5 molare EDTA Stocklösung, pH= 8,0	186,1 g EDTA + 800 ml ad Aqua dest. 3 EL Natronlauge (NaOH- Plättchen) ad 1000 ml Aqua dest.	MERCK
CGH-Target Slides		Vysis

Tabelle 8: Aufzählung verwendeter Reagenzien für die CGH

2.3. Methoden

2.3.1 Comparative Genomische Hybridisierung

Die Methode der Comparativen Genomische Hybridisierung lässt sich in vier wesentliche Schritte aufteilen. Sie wurde für diese Arbeit im Labor neu etabliert. Die folgende Darstellung bezieht sich auf die Anwendung bei Leukämien.

2.3.1.1 DNA-Extraktion

Zu Beginn der DNA-Extraktion werden aus dem Knochenmark oder Blut des Patienten die Leukämiezellen isoliert. Die Isolierung erfolgt mittels einer Dichtegradientenzentrifugation, deren Dichte zum Boden des Röhrchens hin

Material und Methoden

zunimmt. Das in einem Puffer gelöste Patientenmaterial wird zu Beginn der Zentrifugation vorsichtig auf die Lösung (z.B. Ficoll) geschichtet. Während der Zentrifugation wandern nun die einzelnen Bestandteile so weit in die Gradientenlösung, bis diese die Zone mit der gleichen Dichte erreichen. Die dadurch isolierten Leukozyten, werden vorsichtig entnommen und anschließend die vorhandene Zellzahl mittels einer Zählkammer bestimmt (s. 2.3.3.3). Dem nach wiederholter Zentrifugation entstandenem Leukozyten-Pellet wird SE-Puffer hinzugegeben. Da die DNA in einem Proteinkomplex vorliegt wird zur Reinigung Proteinase K und SDS-Puffer hinzugefügt. Zelluläre DNasen, welche Anteile der DNA abbauen, werden durch die Proteinase K inaktiviert. Die enzymatischen Reaktionen an der DNA finden in Pufferlösungen statt, da die Enzyme auf pH-Veränderungen sehr empfindlich reagieren. Durch wiederholte Zentrifugation werden die ausgefallenen Proteine entfernt. Der entstandene Überstand wird zu 100% Ethanol zur Ausfällung der in dieser Lösung unlöslichen DNA gegeben. Anschließend wird die DNA in Wasser gelöst (s. 2.3.3.4). Die Konzentration der in Wasser gelösten DNA wird photometrisch bestimmt, wobei diese für die CGH 1 µg/µl betragen soll (s. 2.3.3.5). Die extrahierte DNA des Patienten kann bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

2.3.1.2 DNA-Markierung

Um bei den In situ Hybridisierungsmethoden die Patienten-DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop darzustellen, wird diese mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Markierung kann auf direktem oder indirektem Weg erfolgen. Bei der hier verwendeten direkten Markierung binden die mit Fluoreszenz-Farbstoffen direkt markierte Nukleotide an die komplementären Basensequenzen der DNA. Die indirekte Methode ist durch das Zwischenschalten eines Antikörpers und Haptens (z.B. Biotin oder Digoxigenin) gekennzeichnet. Die Untersuchungen zum Vergleich zwischen indirekter und direkter Markierung von du Manoir et al. und Piper et al. ergaben, dass eine höhere Qualität der Hybridisierung mit direkter Markierung erreicht werden kann. Die homogeneren Hybridisierungssignale und die geringere Bindung an den Hintergrund waren hier ausschlaggebend [Piper, J. et al., 1995; du Manoir, S. et al., 1995]. In den vorliegenden Versuchen haben wir die Methode der direkten Markierung mit

Material und Methoden

Spectrum-green dUTP für die Tumor-DNA und Spectrum-orange dUTP für die Referenz-DNA, welche von Zellen einer gesunden weiblichen Spenderin isoliert wurde, gewählt. Die Markierungsreaktion der extrahierten DNA des Patienten und der Kontrollperson wird mit Hilfe der Nick-Translation durchgeführt (s. 2.3.3.6). Hierbei werden zwei Enzyme, die DNase I und die DNA-Polymerase, benötigt. Die DNase-I fügt eine geeignete Anzahl von Einzelstrangbrüchen in die DNA ein, welche durch die DNA-Polymerase I unter der Verwendung markierter Nukleotidtriphosphaten in einer In-vitro-Reparaturreaktion wieder aufgefüllt werden. An den durch die Einzelstrangbrüche entstandenen freien 3'-Enden werden die Nukleotiden aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I entfernt und gleichzeitig in 5'-3'-Richtung durch markierte Nukleotide ausgetauscht [Leitch, A. R. et al., 1994].

2.3.1.3 DNA-Hybridisierung

Die unterschiedlich markierte Tumor- und Referenz-DNA werden nun gemeinsam auf einen Objektträger mit normalen Metaphasenchromosomen hybridisiert. Diese Metaphasenchromosomen stammen von einem gesunden männlichen Spender. Bei der Hybridisierung wird zu der markierten Tumor- und Kontroll-DNA zusätzlich eine nicht markierte menschliche Cot-1-DNA hinzugegeben, welche repetitive Sequenzen am Zentromer und heterochromatischen Stellen der Chromosomen blockiert (s. 2.3.3.7). Das Sondengemisch wird auf einen Objektträger pipettiert und anschließend auf eine beheizbare Wärmeplatte mit feuchter Kammer über drei Tage mit einer Temperatur von 37°C gelegt (siehe 2.3.3.8). Während der Hybridisierung binden Tumor- und Referenz-DNA an homologe Bindungsstellen auf den Metaphasen-Chromosomen. Nach erfolgter Hybridisierung wird der Objektträger in Lösungen gewaschen, um die Anteile der markierten DNAs, die nicht an die Metaphasen-Chromosomen während der Hybridisierung gebunden haben, zu entfernen. Zum Abschluss wird auf die Objektträger DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) in Antifade-Lösung gegeben, um alle Chromosomen zu färben und das Ausbleichen der Fluoreszenz-Signale zu reduzieren.

2.3.1.4 Auswertung

2.3.1.4.1 Selektion der Metaphasen

Eine Metaphase ist dann gut auswertbar, wenn die Chromosomen gut verteilt und keine Chromosomenüberlappungen vorliegen [du Manoir, S. et al., 1993]. Die einzelnen Chromosomen können durch die durchgeführte DAPI-Färbung identifiziert werden. Das Hybridisierungssignal entlang der einzelnen Chromosomen sollte homogen sein. Als Zeichen einer erfolgreichen Blockierung repetitiver Sequenzen, sollte nur ein geringer Anteil der markierten DNA am Zentromer oder an den heterochromatiden Stellen der Chromosomen gebunden haben.

2.3.1.4.2 Das Fluoreszenzmikroskop

Die Aufnahme der Metaphasen erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop, welches mit einer Quecksilberlampe und drei Filtern für je einen Fluoreszenzfarbstoff ausgestattet ist. Jeder dieser Filter lässt nur Photonen mit bestimmten Längenwellen durch, welche Elektronen in den einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen anregen. Dieser Zustand der angeregten Elektronen ist instabil, so dass diese wieder in ihren Grundzustand zurückfallen und dabei Energie in Form von Licht aussenden [Leitch, A. R. et al., 1994]. Das Anregungsmaximum des DAPI-Filter liegt bei 355 nm, für den FITC (fluorescein isothiocyanate)-Filter bei 495 nm und für den TRITC-Filter bei 575 nm. Als Ergebnis der verschiedenen Aufnahmen erhält man ein computerermitteltes Gesamtbild der Metaphase mit den unterschiedlichen Anteilen an Tumor- und Referenz-DNA (Abbildung 3). Pro Versuchsansatz bzw. Objektträger wurden mindestens 10 Metaphasen aufgenommen und anschließend karyotypisiert. Für die Auswertung ist das Verhältnis, in welchem beide DNAs an die normalen Chromosomen binden, wesentlich. Dies hängt von den jeweils vorhandenen Mengen der Basensequenzen der Tumor- und der gesunden Referenz-DNA ab. Im Fluoreszenzmikroskop werden die durch die unterschiedlichen Bindungen entstandenen Farbintensitäten und deren Verhältnis zueinander sichtbar gemacht. Liegt in der Tumor-DNA kein Zugewinn oder Verlust von chromosomalem Material vor, enthält sie die gleiche Mengenverteilung wie die Referenz-DNA, so dass beide im gleichen Verhältnis an die Metaphasenchromosomen binden und eine Mischfarbe

resultiert. Im Falle eines Zugewinns in einer bestimmten Region der Tumor-DNA, bindet dieser Abschnitt im Gegensatz zur Referenz-DNA verstärkt an die entsprechende Chromosomenregion. In der Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop stellt sich dieser Abschnitt verstärkt in der Farbe der Tumor-DNA (grün) dar. Im Gegensatz dazu weist eine überwiegend rot leuchtende Stelle an den Metaphasenchromosomen auf eine Deletion dieser Chromosomenregion in der Tumor-DNA hin, da in diesem Bereich die normale DNA überrepräsentiert vorliegt.

2.3.1.4.3 CCD (charge-coupled device)-Kamera

Die CCD-Kamera stellt ein sehr empfindliches Aufnahmesystem mit ladungsgekoppeltem Bildsensor dar. Diese ist in der Lage Photonen über einen weiten Bereich des Spektrums zu absorbieren. Die einzelnen Belichtungszeiten hängen von der Intensität der Fluoreszenzsignale ab. Die Belichtungszeit variiert bei den Aufnahmen zwischen 10 Sekunden und 2 Minuten. Die Aufnahme wird anschließend mit Hilfe einer speziellen Software (ISIS[®], Metasystems) gespeichert und auf dem Bildschirm dargestellt.

2.3.1.4.4 Digitales Bildanalyse-System

Mit Hilfe einer Software werden unspezifische Signale der gespeicherten Aufnahme reduziert, um für die Karyotypisierung das Hintergrundrauschen zu vermindern. Anschließend werden die einzelnen Chromosomen in einem Karyogramm angeordnet. Die Karyotypisierung erfolgt im invertierten DAPI, welches die Chromosomen ähnlich wie in der Giemsa-Färbung darstellt. Insgesamt wurden zwischen 10-15 Metaphasen pro Fall karyotypisiert. Zur Quantifizierung der Ergebnisse errechnet der Computer mittels eines digitalen Bildanalyse-Systems eine sog. Fluoreszenz-Ratio. Diese wird aus dem Quotienten zwischen den FITC- und Spektrum-orange-Intensitäten, nachdem die Hintergrundsignale entfernt wurden, bestimmt [du Manoir, S. et al., 1995]. Das System misst somit die Fluoreszenzintensitäten und -verteilungen beider Fluorochrome für jedes Chromosom und dessen einzelne Abschnitte. Entlang der Achse jedes Chromosoms wird das genaue Verhältnis zwischen der grünen und roten Fluoreszenzintensität dargestellt (Abbildung 4). Das Ausmaß der seitlichen Ablenkung des

Material und Methoden

Fluoreszenzratioprofil reflektiert die relative Kopienzahl des entsprechenden chromosomalen Abschnittes. Eine Fluoreszenzratio mit dem Wert 1,0 bedeutet ein gleiches Verhältnis der unterschiedlich markierten DNAs. Liegt die Fluoreszenzratio bei 1,5 bzw. 0,5 weist dies auf eine Trisomie bzw. Monosomie hin [Storkel, S. et al., 1996]. Sind nur 50% der vorhandenen Zellen von einer Veränderung des Erbguts betroffen, liegt der Wert bei 1,25 für eine Trisomie oder bei 0,75 für einer Monosomie [Barth, T. F. et al., 2000]. Abschließend erhält man nach der Auswertung mehrerer Metaphasen einen Überblick über alle Fluoreszenzratioprofile der einzelnen Chromosomen, wodurch die Zuordnung verschiedener Veränderungen zu den Chromosomen und deren Banden ermöglicht wird.

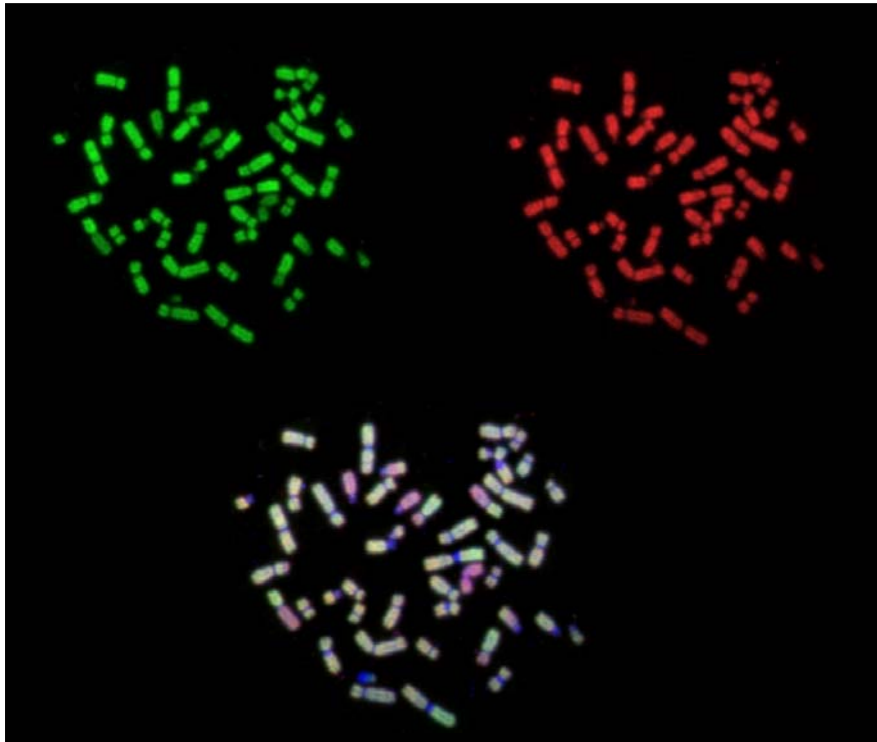


Abbildung 3: Darstellung einer Metaphase nach der Aufnahme mittels FITC (oben links), TRITC-Filter (oben rechts) und das Gesamtbild (unten)

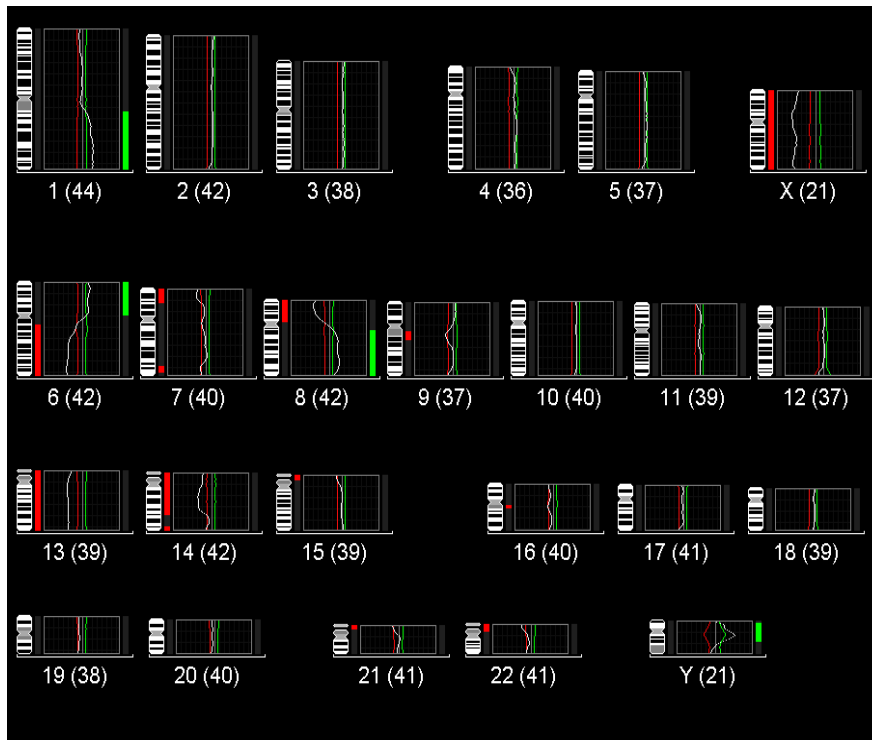


Abbildung 4: Darstellung der ermittelten Fluoreszenzintensitäten entlang der einzelnen Chromosomen (Zelllinie)

Zugewinne liegen in 1q, 6p und 8q vor, Verluste liegen in 6q, 7p/q, 8p, 13 und 14 vor.

2.3.2 Etablierung und Optimierung der Methode

2.3.2.1 Etablierung und Optimierung der DNA-Markierung

Variation der Inkubationszeit im Kühlwasserbad

Es wurden mehrere parallele Ansätze durchgeführt, die sich in der Inkubationszeit für die Nick-Translation unterschieden. Die verschiedenen Zeiten lagen bei 2 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h und 20 h. Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit 2 h bis 16 h waren alle auswertbar. Die intensivsten und homogensten Ergebnisse erhielten wir bei einer Inkubation von 12 h, so dass wir diese Zeit für alle nachfolgenden Untersuchungen verwendeten.

2.3.2.2 Etablierung und Optimierung der Sondenherstellung

Variation der Verhältnisse zwischen Tumor- und Referenz-DNA

Um unterschiedliche Signalintensitäten der verschiedenen Fluorochrome auszuschließen, wurden unterschiedliche Verhältnisse der Tumor- zur Referenz-DNA in einem parallelen Ansatz angesetzt. Unsere Ergebnisse ließen keinen wesentlichen Unterschied erkennen, so dass wir für unsere Analysen ein Verhältnis von 1:1 zwischen der Tumor- und Referenz-DNA bei der Sondenherstellung einsetzten.

Variation der eingesetzten DNA-Mengen

Es wurden in parallelen Ansätzen die Mengen der Tumor- und Referenz-DNA für die Sondenherstellung variiert und die verschiedenen Ansätze mit der 3-fachen, der 2-fachen und 1-fachen Menge der Tumor- und Referenz-DNA verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Hybridisierung bei Nutzung der dreifachen DNA-Mengen am besten gelang.

2.3.2.3 Etablierung und Optimierung der DNA-Hybridisierung

Variation der Hybridisierungszeit

Es wurden parallele Ansätze bei einer Hybridisierungszeit von 48 h und 72 h verglichen. Die Hybridisierungszeit von 72 h erwies sich als optimal.

Variation des Anteils der Tumorzellen im Ausgangsmaterial

In diesem Versuchsansatz wurde überprüft, wie hoch der Mindestanteil an Tumorzellen im Material sein muss, um eine chromosomale Anomalie zu entdecken. Dazu wurde die DNA von drei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie bei bekannten chromosomalen Veränderungen aus dem peripheren Blut extrahiert. Die Inkubationszeit im Kühlwasserbad betrug jeweils 12 h, für die Herstellung der Sonden wurden die einfachen Mengen der Tumor- und Referenz-DNA eingesetzt. Die Hybridisierungszeit lag für alle Versuchsansätze bei 72 h. Bei den Auswertungen

Material und Methoden

der einzelnen Untersuchungen wurden bei Patient Nr.1 eine Deletion am Chromosom 11, bei Patient Nr.2 eine 13q-Deletion und bei Patient Nr.3 eine Trisomie 12 sichtbar. Um den Tumorzellanteil in den Patienten-Materialien nun zu verringern, wurden Verdünnungsreihen durch Zugabe von gesunder DNA durchgeführt (Tabelle 9).

Patienten	Ausgangsmaterial	Verdünnungen
Nr.1	90%	85%, 75%, 60%, 50%
Nr.2	80-98%	75%, 60%
Nr.3	60%	50%, 40%

Tabelle 9: Verdünnungsreihen

Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit einem Tumoranteil von 90% bis 40% waren alle auswertbar. Je höher die Verdünnung angesetzt wurde bzw. je niedriger der Tumorzellanteil im Patientenmaterial war, desto inhomogener waren die Ergebnisse. Trotzdem ließen sich die Aberrationen der Patienten mit CGH auch bei den Ansätzen mit einem Tumorzellanteil von unter 50% nachweisen.

2.3.3 Etabliertes Protokoll der Comparativen Genomischen Hybridisierung

2.3.3.1 Aufarbeitung der Metaphasen

1. Schritt: Von 10 ml heparinisiertem peripherem Blut eines männlichen gesunden Spenders werden je 14 bis 18 Tropfen in geeignete Röhrchen gegeben, mit 100 µl Phytohämagglutinin und 5 ml RPMI-Medium 20% foetales Kalbsserum aufgefüllt und über 72 h in eine Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2. Schritt: Nach 72 h werden in jedes einzelne Röhrchen 150 µl Colcemid (Spindelgift) hinzugegeben, um den Zellteilungsvorgang in der Metaphase zu stoppen.

3. Schritt: Nach 2 h erfolgt die Zentrifugation in einer Megafuge bei 1000 U/min für 7 min bei 20°C. Anschließend wird der Überstand abgenommen und das Röhrchen mit dem verbliebenen Pellet mit 0,5 molarem KCL aufgefüllt. Nach 20 min Inkubation erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 800 U/min für 10 min. Der Überstand wird

Material und Methoden

wieder entfernt und auf das Pellet Carnoy's-Fixativ gegeben, welches ca. 30 min lang einwirken sollte. Anschließend wird bei 1000 U/min 7 min lang zentrifugiert und der Überstand wieder abgesaugt. Dieser, zuletzt beschriebener Vorgang wird insgesamt 3 x wiederholt, bis die Lösung klar ist.

4. Schritt: Das verbliebene Pellet wird mit der Lösung in geeignete Behälter gegeben und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Nachdem kommerziell erhältlichen Metaphasen-Präparaten (Vysis) bessere Ergebnisse erzielten, wurden jene in dieser Arbeit eingesetzt.

2.3.3.2 Vorbereitung der Objektträger

1. Schritt: Die bei -20°C gelagerten, kommerziell erhältlichen Objektträger werden an der Luft getrocknet und unter dem Mikroskop nach der Anzahl und dem Aussehen der Metaphasen beurteilt.

2. Schritt: Die Objektträger (OT) mit den aufgetropften Metaphasen werden in absteigender Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, 50%, 30%) für jeweils 1 min zum Dehydrieren geben.

3. Schritt: OT für 1 min in 0,1 x SSC bei Raumtemperatur.

4. Schritt: OT für 30 min in 2 x SSC im Wasserbad bei 70°C .

5. Schritt: OT ca. 20 min abkühlen lassen (bis auf 37°C).

6. Schritt: OT für jeweils 1 min in 0,1 x SSC, NaOH (0,7 mol/l), 0,1 x SSC, und 2 x SSC geben.

7. Schritt: Für jeweils 1 min OT in aufsteigende Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) zum Fixieren geben und anschließend an der Luft gut trocknen lassen.

2.3.3.3 Ficoll-Separation

1. Schritt: Es wird je nach Menge des erhaltenen Patientenmaterials (Blut oder Knochenmark) die gleiche Menge an PBS hinzugegeben und mit einer Glaspipette vermischt. Anschließend wird in ein Falcon-Röhrchen die doppelte Menge der Ausgangsmenge des Patientenmaterials Ficoll gegeben und das mit PBS versehene Material vorsichtig darauf geschichtet.

Material und Methoden

2. Schritt: Das Falcon-Röhrchen mit den aufeinander geschichteten Lösungen wird 20 min lang in der Megafuge bei 2400 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wird mit einer Glaspipette der Ring, der zwischen den beiden Schichten entstand vorsichtig (von oben) abgenommen. Dieser Ring besteht aus den für die DNA-Extraktion relevanten isolierten Leukämiezellen.

3. Schritt: Um die Zellzahl in dieser Probe zu bestimmen werden 10 µl aus der Probe mit 90 µl Türks-Lösung verdünnt (1:10 Verdünnung). Von diesem verdünnten Gemisch werden 10 µl in eine Zählkammer gegeben und 4x4 Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Zum Berechnen der Zellzahl wird die gezählte Zellzahl mit dem Faktor der Verdünnung, dem Volumen der Zählkammer und zusätzlich mit dem Gesamtvolumen der Ausgangsprobe multipliziert.

4. Schritt: Die im zweiten Schritt entstandene Probe wird nun in einer Zentrifuge bei 1500 U/min mit Bremse 10 min lang zentrifugiert und der Überstand wieder entfernt, so dass nur das Leukozyten-Pellet übrig bleibt.

2.3.3.4 DNA-Präparation

1. Schritt: Je nach der im oberen Abschnitt berechneten Zellzahl (1×10^7 bis 1×10^8 , $<1 \times 10^7$, $> 1 \times 10^8$) wird eine bestimmte Menge an SE-Puffer (1 ml, 5 ml, 10 ml) auf das entstandene Leukozyten-Pellet in ein Falcon-Röhrchen hinzugegeben. Das Gemisch wird anschließend kurz vermischt und zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

2. Schritt: Je nach Ansatz mit 1 ml, 5 ml oder 10 ml werden Proteinase K (20 mg/ml) und Laurylsulfat 10% zur Reinigung hinzupipettiert. Bei einem Ansatz von 5 ml werden 25 µl Proteinase K und 500 µl Laurylsulfat 10% benötigt und anschließend über Nacht bei 50°C im Wasserbad inkubiert.

3. Schritt: Bei einem Ansatz von 5 ml werden 2 ml 6 molare NaCl-Lösung zugegeben, gut vermischt und anschließend in einer Megafuge bei 4300 U/min in Raumtemperatur 20 min lang zentrifugiert.

4. Schritt: Der entstandene Überstand wird anschließend in ein mit dreifacher Volumenmenge an Ethanol 100% gefüllten Falcon-Röhrchen gegeben und das Pellet verworfen. Dieses dann für ca. 30 min stehen lassen, ohne das Röhrchen zu schütteln bis die DNA ausfällt.

5. Schritt: Um restliche Salzreste auszuwaschen wird zusätzlich 1 ml frisch angesetztes Ethanol 75% zur DNA pipettiert und bei 13000 U/min 5 min lang in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend abgenommen und der ganze Vorgang noch einmal wiederholt.

6. Schritt: Die für ca. 30-60 min an der Luft getrockneten DNA, wird je nach berechneter Zellzahl (1×10^7 , 1×10^8) in einer bestimmten Menge Aqua dest. (100 μ l, 1000 μ l) aufgenommen. Damit sich die DNA schneller löst, wird diese über Nacht in ein Wasserbad bei 56°C inkubiert.

2.3.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Photometer

Für die photometrische Messung der DNA-Konzentration werden fünf parallele Ansätze angefertigt, wobei 1-2 μ l DNA in 1 ml Aqua dest. verdünnt werden. Zur Eichung des Photometers wird eine Messung mit 1 ml reinem Aqua (Ampuwa) durchgeführt. Die DNA-Konzentration wird in μ g/ml angegeben und bei einer Wellenlänge von 260 nm, die Proteine bei 280 nm und die Salzreste bzw. Verunreinigungen bei 320 nm gemessen. Ein aussagekräftiges Ergebnis liegt vor, wenn die DNA-Konzentration doppelt so hoch wie die der Proteine ist oder der berechnete Ratio-Wert, welche das Verhältnis zwischen der DNA- und der Proteinkonzentration angibt, größer als 1,6 ist. Nur wenn alle fünf Ansätze ähnliche Werte ergeben, liegt die DNA gut gelöst vor. Bei zu unterschiedlichen Werten wird die DNA erneut nach einer Inkubation in 56°C warmen Wasserbad gemessen.

2.3.3.6 Markierungsreaktion

1. Schritt: Folgendes in ein auf Eis gelegtes Eppendorfgefäß pipettieren und anschließend auf einem Vortex durchmischen:

17,5 – X μ l	nuclease-freies H ₂ O
X μ l	DNA (Gesamtmenge 1 μ g)
2,5 μ l	0,2 mM Spectrum-green dUTP (Tumor-DNA) oder 0,2 mM Spectrum-orange dUTP (Kontroll-DNA)
5 μ l	0,1 mM dTTP
10 μ l	0,1 mM dNTP
5 μ l	10 x Nick Translations Puffer

Material und Methoden

10 µl Nick Translations Enzym
(50µl Gesamtvolumen)

2. Schritt: Für 12 h in einem Kühlwasserbad bei 15°C inkubieren.

3. Schritt: Zum Stoppen der Reaktion 2 µl 0,5 molares EDTA (pH 8.0) pipettieren.

4. Schritt: Für 10 min in 70°C Wasserbad stellen und anschließend für 5 min auf Eis. Bis zur weiteren Verwendung kann das Gemisch bei –20°C aufbewahrt werden.

2.3.3.7 Sondenherstellung

1. Schritt: Zentrifugentaugliche Eppendorfgefäße auf Eis stellen und die folgenden Mengen pipettieren: 30 µl Spectrum-green markierte Tumor-DNA + 30 µl Spectrum-orange markierte Referenz-DNA + 30 µl Cot-1-DNA (90 µl Gesamtvolumen).

2. Schritt: Insgesamt 10 % des Gesamtvolumens 3 M Natriumacetat zufügen, danach das 2,5fache des Gesamtvolumens 100% Ethanol zugeben (Beispiel: 90 µl DNA + 9,0 µl 3 M Natriumacetat + 250 µl 100 % Ethanol), anschließend vortexen und für ca. 15 min auf Eis legen.

3. Schritt: Für 30 min bei 12000 U/min in der Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugieren.

4. Schritt: Anschließend den Überstand abpipettieren und das Pellet für 1-2 min im Inkubator bei 50 °C trocknen lassen.

5. Schritt: Pellet in 2 µl H₂O und 8 µl Hybridisierungspuffer resuspendieren und ca. 60 min einwirken lassen.

6. Schritt: Probenmix für 5 min bei 75°C im Wasserbad denaturieren.

7. Schritt: Probenmix für ca. 15-30 min bei 37°C Wasserbad aufbewahren.

2.3.3.8 Hybridisierungsreaktion

1. Schritt: Jeweils 10 µl der Sonde auf den vorbereiteten OT (siehe 2.3.3.2) geben, mit einem 18 x 18 mm Deckglas abdecken. Dabei entstandene Luftblasen sollten entfernt werden. Anschließend das Deckglas mit Fixogum abdichten.

2. Schritt: Eine beheizbare Wärmeplatte mit feuchter Kammer (Hybrite™) anschalten, geeignetes Programm wählen (37°C), feuchtes Papier hinzugeben und OT hineingeben.

3. Schritt: Nach 72 h den OT entnehmen und für 2 min in 0,4 x SSC im Wasserbad bei 75°C und 1 min in 2 x SSC + NP40 bei Raumtemperatur waschen.

Material und Methoden

4. Schritt: DAPI mit Glaspipette aufsaugen, ca. einen Tropfen auf das hybridisierte Areal geben und mit einem 24 x 55 mm Deckglas abdecken. Dabei entstandene Luftblasen sollten mit einem Trockenblatt entfernen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der G-Banden, FISH, 24-Farben-FISH und CGH Analysen

Es wurden 41 Patienten mit der Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie und 3 Patienten mit der Erstdiagnose eines MDS, welche in der G-Banden-Analyse einen komplex aberranten Karyotyp aufwiesen, zur detaillierten Charakterisierung der verschiedenen genetischen Veränderungen mittels FISH, 24-Farben-FISH und CGH analysiert. Die einzelnen Ergebnisse wurden miteinander verglichen und der Karyotyp in Zusammenschau aller Ergebnisse aktualisiert. Die hier angewandte Nomenklatur der einzelnen Aberrationen basiert auf der ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) [Mitelman F, 1995]. Der Karyotyp nach CGH wird am Anfang der Formel mit rev ish (Reverse in situ Hybridisierung) gekennzeichnet. Je nachdem, welche Aberrationen vorliegen, werden diese mit enh (enhanced) für Zugewinne, dim (diminished) für Verluste und amp für Amplifikationen bezeichnet. Die Karyotypformel nach der konventionellen Zytogenetik beinhaltet die gesamte Chromosomenanzahl der Zelle, gefolgt von den Geschlechtschromosomen und den beteiligten Aberrationen. Hierbei werden folgende Abkürzungen für strukturelle Aberrationen verwendet: t für Translokationen, der (derivativ) für das Chromosom, an welches fremdes Material transloziert ist, inv für Inversion, ins für Insertion, dic für ein dizentrisches Chromosom, welches zwei Zentromere besitzt, i für Isochromosom, welches aus zwei identischen Chromosomenarmen besteht, add für Addition, del für Deletion und mar für ein Markerchromosom unbekannter Herkunft. Numerische Aberrationen werden mit + für eine Trisomie und – für eine Monosomie vor dem betroffenen Chromosom gekennzeichnet. In der folgenden Tabelle sind der Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH, der Karyotyp nach CGH und die endgültige Karyotypformel dargestellt. Veränderungen im Karyotyp, die erst durch die Untersuchung mit CGH nachgewiesen wurden, sind durch die Fettmarkierung hervorgehoben.

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
1	48,XY,der(4)t(4;21)(q35;q?),+5,del(5)(q13q33),der(6)(6pter->6q11::17?->17?::21?->21?::6q11->6qter),der(8)t(8;21)(p23;q?),+der(11),+r(11),-17,der(21)t(17;21)(?;q11.2) [15]	Rev ish enh (5q11q12,5q31.3q34,11q11q13.3,21q11.1) dim (5q13q31.3,11q14q21,17p11p13,21q21q22) amp (11q22q24)	48,XY,der(4)t(4;21)(q35; q11)del(21)t(17;21),+5,del(5)(q13q33),der(6)(6pter->6q11::17 q11 ->17 q23 ::21 q11 ->21 q21 ::6q11->6qter),der(8)t(8;21)(p23; q11)del(21)(q21),+der(11),+r(11)(p11q24del11(q14q21)amp(q22q24)),-17,der(21)t(17;21)(q23 ;q11.2)
2	49,XX,+X,der(4)t(4;18)(q24;q?),+der(4)t(4;18)(q24;q?),del(5)(q13q31),-7,+8,+10,der(12)t(4;12)(q24;p13),der(16)t(11;16)(?;q21),der(18)del(18)(p11)del(18)(q11) [15]	Rev ish enh (4p16q23,8,10,11q11q25,18q11q21,X) dim (4q23q31,5q13.2q32,7,11p11p15,16q11q24,18p11.3,18q21q22)	49,XX,+X,der(4)t(4;18)(q23;q11)del(18)(q21),+der(4)t(4;18)(q23;q11)del(18)(q21),del(5)(q13.2q32),-7,+8,+10,der(12)t(4;12)(q31 ;p13),der(16)t(11;16)(q11 ;q11),der(18)del(18)(p11.3)del(18)(q11).
3	44,XY,der(11)t(11;17)(p13;q21),dic(15;20)(p11;q11),dup(16)(p11p13),-17,der(18)t(17;18)(?;q22) [20]	Rev ish enh (17q21.1q25) dim (11p13p15,17p13q21.1,20q11.2q13.3)	44,XY,der(11)t(11;17)(p13; q21.1),dic(15;20)(p11; q11.2), der(16)t(16;18)(p13;q21) ,-17,der(18)t(17;18)(q21 ;q22)
4	44-45,XY,del(X)(q26),del(5)(q13),-7,+8,del(10)(q22),der(11)t(11;15)(q23;q22),-15,der(16)del(16)(p11)del(16)(q11),-17,der(20)t(9;20)(q?;p13)t(9;?)(q?;?),+der(?)(?;7)(?;p11)t(?;10)(?;q22) [cp16]	Rev ish enh (8,9p22p24,20p) dim (5q11q35,7p15.3q36,12p13.1p13.3,15q11.1q15,16q13q24,17,19p11p13.3,19q11q13.4)	44,Y,del(X)(q26),del(5)(q11),-7,+8,del(10)(q22),der(11)t(11;15)(q25 ;q22), del(12)(p12) ,-15,der(16)t(7;16)(p15.3;q13) t(10;16)(q22;p13.3) ,-17, der(19)del(19)(p11) del(19)(q11) ,der(20) dup(20)(p11p13)t(9;20)(p22;p13)t(9;15)(p24;q15)t(X;15)(q26;q22)
5	45,XX,der(2)t(2;13)(p13;q?),der(2)t(2;5)(q13;p11),dic(3;16)(p21;q22),del(3)(q11),-5,der(6)t(6;15)(q27;q15),+del(11)(p11),del(12)(p12),der(15)t(2;15)(q13;q15),-18,+22 [20]	Rev ish enh (11p14q25,22) dim (2q24.3q37.3,3p26q25.1,5q13q31.3,15q12q14,16q21q24,18)	45,XX,der(2)t(2;3)(p21 ;?), dic(2;15)(q24;q12) ,dic(3;16)(p21;q21), der(3) , der(5)del(5)(q13q13.3) t(2;5)(p21;p15),der(6)t(6;15)(q27;q15),+del(11)(p11),der(15)t(2;15)(q13;q15),-18,+22

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
6	46-47,XY,+der(1),der(5)t(5;7)(q13;?), der(7)t(7;11)(p11;q21)del(7)(q22q32), +del(9)(q22),del(11)(q21),-13,der(17)t(13;17) (q14;p11) [cp15]	Rev ish enh (9p,21q11q22) dim (5q13.2q35,7p11p22,7q11q35, 9q12q22.2,11q12.5q23.1, 16,17p12p13,20q)	46-47,XY,+der(1), del(5)(q13.2) ,der(7)t(7;11) (q11;q23)del(7)(p22,der(7)t(7;20)(q11;p11)), del(9)(q12q22.2) ,+del(9)(q11),del(11)(q13),-13, -16,der(17)t(13;17)(q11;p12),-20,i(21)(q10) [cp]
7	44,X,-Y,der(1)t(1;10)(p35;?) t(1;10)(q25;?),der(5)t(5;9)(q13;?), der(5)t(5;11)(p11;?), der(10)t(1;10)(q21;q24),-17 [20]	Rev ish enh (1p33p36,10q21q26, 11q14.3q24) dim (Y,5p14p15.3,5q13q31.3,17)	44,XY,-Y,der(1)t(1;10)(p36;q?)t(1;10)(q25;q?), der(5)del(5)(q13q31.3)t(5;9)(q31.3;?), der(5)t(5;11)(p14;q14.3) der(10)t(1;10)(p33;q26)t(1;1)(p36.3;q25),-17
8	42,XY,der(5)del(5)(p15)del(5)(q13), -7,i(11)(q10),der(12)t(12;16)(p11;p11), ins(12;5)(p13;q?q?)-16,-18, der(22;22)(p10;p10) [15] 42,XY,t(1;11)(p36;p11) der(5)del(5)(p15)del(5)(q13), -7,der(12;16)(p13;q13), der(12)ins(12;5)(p11.2;q?q?) del(12)(p11.3p13.1),-18, der(22;22)(p10;p10) [4] 46,XY [1]	Rev ish enh (11q) Rev ish dim (5p14p15.3,5q14q33.1,7,11p, 12p11.2p13.1,16q13q24,18)	42,XY,der(5)del(5)(p14p15.3)del(5)(q14), -7,i(11)(q10),der(12)t(12;16)(p11;p11), ins(12;5)(p13; q33.1q35),-16,-18, der(22;22)(p10;p10)
9	46,XY,del(7)(p11),der(7)t(7;17) (q22;q23),del(11)(q21) [14] der(17)t(11;17)(q21;q23) del(11)(q22) 46,XY [1]	Rev ish enh (17q23q25) dim (7p11p22,7q31q35,11q22q25)	46,XY,del(7)(p11), der(7)t(7;17)(q31;q23),del(11)(q21), der(17)t(11;17)(q21;q23)del(11)(q22)

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
10	47,XX,del(5)(q13q33), der(11)dup(11)(p11q23) t(11;22)(q23;q11),+der(11)dup(11) (p11q23) t(11;22)(q23;q11), +r(11) (p?13q?21),der(17)t(1;17)(?;p11), -22 [8] 48,idem,+r(11)(p15q25) [7]	Rev ish enh (1p33p36.3,11,22) dim (2q34q37, 5q13.2q33,17p11p13) amp (11q12q25)	47,XX, del(2)(q34q37) , del(5)(q13q33),der(11)? dup(11)(p11q23)t(11;22)(q23;q11),+der(11)? dup(11)(p11q23)t(11;22)(q23;q11), +r(11) (p 15 q21)?,der(17)t(1;17)(p33 ;p11),-22
11	41,XY,der(5)t(5;18)(q11;q11),-6, -7,der(16)t(16;21)(p12;q11),-17, -18,der(20)t(6;20)(p12;p13), der(21),-21,-22,+mar [cp18] 46,XY [4]	Rev ish dim (5q13.1q35, 6q11q27,7p15.2q35, 16,17p13q24,18q21q23, 20q11q13.3, 22q11.2q13)	41,XY, dic(5;18)(q13.1;q12) , der(6;20)(p10;p10) -7,- 16 ,-17, der(21)t(21;22)(q22;q12) t(18;22)(q12;q22)t(7;18)(p15.2;q21) , der(21)t(17;21) (q24;q22),del(22)(q12) ,-22, +mar
12	41-43,XX,der(2)t(2;3)(q21;?), der(2)t(2;3)(p23;p21),-3, der(4)inv(4)(p?16q31) t(4;6)(?;?),der(4)inv(4)(p?16q31) t(4;6)(q31;?)t(4;21)(?;?),del(5)(q13q31),-5, dic(6;15)(p23;q22)t(6;9)(q21;q?),del(6)(p21), -7,der(9)t(3;9)(?;q11),der(11)t(8;11) (q13;p15),ins(16;3)(p13;??),-17,-18 [cp20]	Rev ish enh (4q27q32,6p21.3p23,8q11q24, 11q22.2q25,12q22q24,15q22.2q26, 19,20,22) dim (2p23p25.3,2q31q35,3q11q23, 5q11.1q35,6q15q27,7, 9q13q22.1,13q14.1q33, 17,18)	41-43,XX,der(2)t(2;3)(q 31 ;?), der(2)t(2;3)(p23;p21),-3, der(4)t(4;16)(q32;p13) , der(4)t(4;4)(p16;q27) , del(4)(q32)t(1;4) (p33;q32) , der(4)t(4;4) (p16;q27)del(4)(q32)t(1;4)(p33;q32) t(4;21)(q35;q21),del(5)(q13q31)?,-5, dic(6;15)(p23;q22)t(6;9)(q21;q?),del(6)(p21),-7, der(9)t(3;9)(? q13),der(11)t(8;11)(q 11 ;p15), del(13)(q14.1q34) ,ins(16;3)(p13;??),-17,-18.
13	43,X,-X,der(5)t(5;7)(p11;q32) del(5)(q13q31),der(7)t(5;7) (p11;q32),qdp(11)(q23q25),-17,-18 [19] 46,XX [1]	Rev ish enh (11q14.1q25) dim (Xp22q28,5q13.3q31.2, 17p13q25,18p11.3q23)	43,X,-X,der(5)t(5;7)(p11;q32) del(5)(q13;q31),der(7)t(5;7)(p11;q32), trp(11)(q14.1q25),-17,-18

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
14	44,XY,t(3;11)(q26;q11),der(5)t(5;7)(q13;?) t(7;16)(?;p12),-7, dic(12;17)(p13;p11),del(16)(p12) [16]	Rev ish dim (5q12q33.3/q35, 7p12q35,12p11p13.2, 17p10p13)	44,XY,t(3;11)(q26;q11),der(5)t(5;7) (q12;p21)t(7;16)(p22;p12),-7,dic(12;17) (p13;p11),del(16)(p12)
15	46,XX,del(5)(q13q33) [5] 46,XX,del(5)(q13q33),der(11) t(11;17)(p15;q21),+r(11)(p11q25), -17 [10] 48,XX,del(5)(q13q33),der(11) t(11;17)(p15;q21),+der(11)r(11;11) (p11q25;p11q25),+13,-17,+22 [5]	Rev ish enh (11q11.1q25,13q11q34, 16p10p13.3,22q11q13) dim (5q13q32,11p14p15, 16q11q24,17p) amp (11q11q21,11q23q25)	48,XX,del(5)(q13q32), der(11)t(11;17)(p14;q11.1), r(11;11)(p11q25;p11q25),+13, i(16)(p10),-17,+22
16	45,XY,del(5)(q13q33),der(7)t(7;11)(q32;?), ins(11;5)(q11;??),der(13)t(12;13)(?;q32), der(17)t(17;20)(p11;p11),-18 [5] 46,XY [2]	Rev ish enh (11q23q25) dim (5q23.2q32, 11q13.4q21,17p11p13, 18q11.2q23,20q11.2q13.1)	45,XY,del(5)(q13q32),der(7)t(7;11) (q32;q23),ins(11;5)(q13.4;q13q23.2) del(11)(q13.4q21),dic(13;18)(q34;q11.2), der(17)t(17;20)(p11;q13.1),del(20)(q11.2)
17	46,XX,der(5)ins(5;11)(q11;??) del(5)(q11q31),der(17)t(8;17) (q13;p13) [20]	Rev ish enh (8q11.2q24.3) dim (5q14q31) amp (11q14q25)	46,XX,der(5)ins(5;11)(q11;q14q25) del(5)(q14q31) amp(11q14q25), der(17)t(8;17)(q11.2;p13)
18	60-77,XY,+1,der(2)del(2)(p13) ins(2;18)(q31;??),+der(2)ins(2;18)(p?14;??) ins(2;18)(q31;??),+3,-4,del(5)(q13q31), der(6)t(3;6)(?;q27),+der(6)t(3;6)(?;q27),+8,+10, der(11)t(11;13)(p13;q?),12,der(13)t(9;13)(?;q14), +der(13)t(9;13)(?;q14),+14,-17,-18,+21,+22 [cp8]	Rev ish enh (1,10,22) dim (4,5q11q31.1, 11p13p15.1,12,17,18)	60-77,XY,+1,der(2)del(2)(p13)ins(2;18) (q31;??),+der(2)ins(2;18)(p?14;??)ins(2;18) (q31;??),+3,-4,del(5)(q11q31),der(6)t(3;6) (?;q27),+der(6)t(3;6)(?;q27),+8,+10, der(11)t(11;13)(p13;q?)-12,der(13)t(9;13) (?;q14),+der(13)t(9;13)(?;q14),+14,-17, -18,+21,+22

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
19	48-51,XY,+8,del(9)(q22),+1-4mar [cp17] 46,XY [6]	Rev ish enh (8) dim (9q13q22.3) amp (21q11.2q22.2)	48-51,XY,+8,del(9)(q13q22.3), +der(21)x1-4
20	43,XY,del(5)(q11),-17,-18, der(19)t(1;19)(p11;q13) [16] 42,idem,-7,der(10)t(7;10)(q21;p15) [4]	Rev ish enh (1p) dim (5p14p15.2,5q12q32,7p22q21.2, 17,18)	43,XY, der(5)del(5)(p14p15.2) , -17,-18, der(19)t(1;19)(p11;q13.4) [16] 42,idem,-7,der(10)t(7;10) (q21.2;p15) [4]
21	45,XY,dic(5;11)(q13;p15),del(13) (q13),-17,+der(21)t(8;21)(?:p10) t(21;22)(q22;q11),del(22)(q11) [8] 44,idem,dic(15;18)(p11;p11)[7]	Rev ish enh (8q22.3q24.3,13q22q31) dim (5q13.1q35, 13q11q21.2,17)	45,XY,dic(5;11)(q13;p15),del(13)(q11q22), +der(13)del13(q11q22)del(13)(q31) , -17, del(21)(q21),der(22)t(21;22)(q22;p10) t(8;21)(q22.3;q22),der(22)t(21;22)(q21;p10) t(8;21)(q22.3;q22) [8]
22	47,XY,del(5)(q13q33),del(7)(q22), der(12)del(12)(p12)del(12) (q15q22),-13,-18,+3xr(13;18)[cp15] 46,XY [1]	Rev ish enh (13q11q12, 18q12.1q12.3) dim (5q13.3q33.2,7q31q36,12p13, 12q13q21,13q12q34,18p,18q21q23)	47,XY,del(5)(q13q33),del(7)(q22),der(12)del(12) (p12 p13)del(12)(q13q21),-13,-18, +3xr(13)(p10q12)ins(13;18)(q12.1q12.3)
23	43,XY,del(3)(q13),-5,der(5)del5(p15.3) t(5;17)(q11;q11),-7,dup(8)(q11q24), +9,-12,der(16)t(12;16)(q11;q11), dic(17;21)(p11;p11) [cp14] 46,XY [1]	Rev ish enh (9) dim (3p11p21.3, 3q11q25.1, 5p15.1p15.3,5q7,12p,16q,17p)	43,XY, der(3)del(3)(p11p21.3)del(3)(q11q25.2) , -5,der(5)del5(p15.3)t(5;17)(q11;q11),-7, dup(8)(q13q24.3),+9,-12,der(16)t(12;16) (q11;q11.2),dic(17;21)(p11;p11)
24	44,X,del(Y)(q11),der(5)t(5;13)(q12;q14), del(7)(q11q32),dic(12;21)(p13;q22), der(15)t(15;17)(p10;?) t(Y;17)(q11;?) ins(15;17)(q23;??),-17 [19] 46,XY [1]	Rev ish enh (13q22q34) dim (5q13.3q35,7q21.1q35)	44,X,del(Y)(q11),der(5)t(5;13)(q13.3;q22), del(7)(q21.1),dic(12;21)(p13;q22), der(15)t(15;17)(p10; p11)t(Y;17)(q11; p13) ins(15;17)(q23; q11q25),-17

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
25	47,XY,dup(1)(q21q44),del(5)(q13q31),del(8)(p21),+del(8)(p21),der(10)t(10;11)(p12;q13),der(11)t(10;11)(p12;p13)del(11)(q13),del(12)(p11.2p13) [12] 46,XY [3]	Rev ish enh (1p31.2p36.1) dim (1p36.1p36.3, 5q15q35.1,7q32q36, 8p12.8p23.1,11p13p15,12p11.2p13.2)	47,XY, <u>der(1)del(1)(p36.1)ins(1;1)(q23;p31.2p36.1)</u> ,del(5)(q15), <u>del(7)(q32)</u> ,del(8)(p12q23.1),+del(8)(p12p23.1),der(10)t(10;11)(p12;q13),der(11)t(10;11)(p12;p13)del(11)(p13),del(12)(p11.2p13.2)
26	45,XX,t(3;6)(q26;p25),del(5)(q13q33),-7,t(7;21)(q22;q22),der(13)t(1;13)(q32;p10) [cp14] 46,XX [1]	Rev ish enh (1p32.1p36.3) dim (5q13.3q31.3,7)	45,XX,t(3;6)(q26;p25),del(5)(q13.3q31.3),-7,t(7;21)(q22;q22),der(13)t(1;13)(p32;p10)
27	44,XX,inv(1)(p32q32),der(3)t(3;12)(p21;?)t(12;16)t(15;16)(q12;?),del(5)(q13q31),der(6)del(6)(p11p21)ins(6;15)(p11;q11q12)t(5;6)(?;q27)del(6)(q14q21),-12,15,del(16)(p11),der(17)ins(17;17)(q11;q21q25),der(17)ins(17;17)(q11;q21q25)t(17;21)(p11;q22),der(21)t(17;21)(p11;q22) [15]	Rev ish dim (3p23p26,5q14q33,6p11p21.1, 6q11q21,6q24q27, 12p11p12.3,12q13.2q24,15q10q11.2, 16q13q24)	44,XX,inv(1)(p32q32), <u>der(3;12)dic(3;12)(p23;p13)del(12)(p11;p12.3)</u> t(12;16)(q13.2;q11.2)t(15;16)(q12; q13),del(5)(q14),der(6)del(6)(p11p21)ins(6;15)(p11;q11q12)t(5;6)(q34;q24)del(6)(q11q21),-12,15,del(16)(q11.2),der(17)ins(17;17)(q11;q21q25),der(17)ins(17;17)(q11;q21q25)t(17;21)(p11;q22),der(21)t(17;21)(p11;q22)
28	47-49,XY,-2,dic(5;17)(q11;p11),der(7)t(2;7)(q11;q11)t(2;12)(q37;q12),+8,+r(11)x3,der(12)t(2;12)(?;q12),+13 [cp15]	Rev ish enh (8,11p11q13) dim (2q33q37,5q, 7q11.2q36,17p12p13) Rev ish amp (11p15.1p15.5,11q13q25)	47-49,XY, <u>der(2;7)dic(2;7)(p23;q11.2)t(2;12)(q33;q11)</u> ,dic(5;17)(q11; p12),+8,+r(11)x3,der(12)t(2;12)(p23; q11),+13

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
29	47,XY,del(5)(q13q31),del(7)(q22),+15,del(15)(q15),der(15)t(1;15)(p34;q15),der(16)t(15;16)(q23;q12) [14] 47,idem,dic(12;15)(p12;q13) [5] 48,idem,+13 [2]	Rev ish enh (1p32.1p36.3) dim (3p22p25,5p14p15.1,5q21q34,6p25,7q21.3q36,8q22.3q24.1,16q11.2q24,17p11.2p13,20p11.2p13)	47,XY, <u>del(3)(p22p25)</u> ,del(5)(q21q34)? <u>del(5)(p14p15.1)</u> , <u>del(6)(p25)</u> ,del(7)(q22),+15,del(15)(q15),der(15)t(1;15)(p32;q15),der(16)t(15;16)(q15;q11.2), <u>del(17)(p11.2)?</u> , <u>del(20)(p11.2)</u>
30	42,XY,dic(7;12)(q11;p11),-11,der(17;20)(p11;q12),-18,der(22)t(11;22)(?:p10) [4] 44,idem,+8,+dup(11)(q11q24) [5] 44,trc(8;7;12)(q24;p22q11;p11),dup(11)(q11q24),der(17;20)(p11;q12),-18,der(22)t(11;22)(?:p10) [2] 87,idemx2,-2,-3,-9,-9,-10,-12,-15,-15,-17,-21,-21 [3] 46,XY [9]	Rev ish dim (7q21q36,12p,17p,18) amp (11q21q25)	42,XY,dic(7;12)(q21;p11), der(11)amp(11)(q21q25) ,der(17;20)(p11;q12),-18,der(22)t(11;22)(q25;p10) amp(11)(q21q25) [4]
31	40,XX,-2,-3,-5,der(6;16)dic(6;16)(q16;p13)t(2;16)(?:q24),r(7)(p12q11.2),i(11)(q10)der(12)t(12;21)(p12;q?)t(3;21)(p22;?),-13,der(15)t(3;15)(q21;p10),der(17)t(13;17)(q11;p12),der(21;22)(q10;q10) [14] 46,XX [2]	Rev ish enh (11q) dim (2p11p13,2p22p25.3,2q14.2q23.3,2q33q37,3p11p14,3q11q23.5,6q21q23,6q24q26,7p21p22,7q11.2q36,11p,12p12.2p13.3,16p13.3,16q21q24,17p13)	40,XX,-2,-3,-5,der(6;16)dic(6;16)(q24;p13) del(6)(q21q23.1)t(2;16)(?:q21) ,r(7)(p15q11.2),i(11)(q10)der(12)t(12;21)(p12.2;q11.1)t(3;21)(p21;q11.2),-13,der(15)t(3;15)(q24;p10),der(17)t(13;17)(q11;p12), -21,der(22)t(21;22)(q11.2;q10)
32	42-43,XX,-4,der(5)i(5)(p10)ins(5;21)(q11;q11q22),i(8)(q10),-9,-17,-18,der(20)t(9;20)(q11;q11),der(21)t(5;21)(q11;q22) [cp16]	Rev ish enh (5p,8q) dim (4,5q11q11.2,5q13.3q35,8p,17,18), amp (8q22.3q24.3,21q11q22)	42-43,XX,-4,der(5)i(5)(p10)ins(5;21)(p11;q11q22),i(8)(q10),-9,-17,-18,der(20)t(9;20)(q11;q11), der(5;21)dic(5;21)(q13;p11)del(5)(q11.1q11.2),trp(21)(q21q22)

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
33	44,XX,del(5)(q13q31),der(6)t(6;12)(p12;p11),+der(6),der(7)t(7;13)(q11;q?),-12,der(13)t(12;13)(q11;q13)t(12;21)(q24;q11),-18,-21 [10] 44,XX,del(5)(q13q31),der(6)t(6;12)(p12;p11),+der(6),der(7)del(7)(p12)del(7)(q11),der(9)ins(9;7)(q21;??),der(9)t(9;13)(q13;?)del(9)(p12),-12,der(13)t(12;13)(q11;q13)t(12;21)(q24;q11),der(16)t(9;16)(q11;q24),-18,-21 [5]	Rev ish dim (5q13.3q31.3,7q21q36,12p11p13.2,13q11q21.1,18)	44,XX,del(5)(q13.3q31.3),der(6)t(6;12)(p12; p13), der(7)t(7;13)(q21;q21.1) ,der(7)del(7)(p12)del(7)(q11),der(9)ins(9;7)(q21; q11q21),der(9)t(9;13)(q13; 21.1)del(9)(p12)-12,der(13)t(12;13)(q11;q11)t(12;21)(q24;q11),der(16)t(9;16)(q11;q24),-18, der(21)t(6;21)(p12;q11)
34	42,XX,-3,dic(5;15)(q12;q13),-7,dic(12;16)(p11;q12),der(17)t(15;17)(q?p11) [cp18] 46,XX [2]	Rev ish dim (3,5q12q35,7,12p,16q)	42,XX,-3,dic(5;15)(q12;q13),-7,dic(12;16)(p11;q12),der(17)t(15;17)(q11 ;p11)del(15)(q13)
35	45,XX,del(5)(q31),der(7)t(7;13)(p11;q?),-13,der(16)t(2;16)(?;q22),der(18)t(13;18)(?;q12) [22] 46,XX [1]	Rev ish enh (1p32.1p36.3,2p13p25.3) dim (5q14q34,7p,13q11q31,16q22q24,18q11.2q23)	45,XX,del(5)(q14q34),der(7)t(7;13)(p11; q33), der(11)t(1;11)(p32.1;p15) ,-13,der(16)t(2;16)(p13 ;q22),der(18)t(13;18)(q32 ;q11.2) del(13)(q33)
36	44,X,r(X)(p12q11),der(1)t(1;5)(p36;?),-5,der(7)t(X;7)(q11;p22),der(9)t(9;9)(q34;q22),der(9)t(5;9)(p13;q11),der(9)t(5;9)(p13;q11)ins(9;17)(q11;??),-13,del(13)(q21),der(16)t(9;16)(?;p13),-17,del(20)(q11),der(21)t(13;21)(q?p10),+der(21)t(13;21)(q?p10),del(22)(q11) [cp20]	Rev ish enh (9p21p24) dim (Xp11.4p22.1,5q,9q21q31,13q11q14,16p12p13,17q21q24,20q)	44,X,r(X)(p22.3q11) del(X)(p11.4p22.1) ,der(1)t(1;5)(p36; p11) del(5)(p13) ,-5,der(7)t(X;7)(q11;p22),der(9)t(9;9)(q34; q11), del(9)(q21q34) ,der(9)t(5;9)(p13;q11),der(9)t(5;9)(p13;q11)ins(9;17)(q11;??),-13,del(13)(q11q21),der(16)t(9;16)(p21 ;p12),-17,del(20)(q11),der(21)t(13;21)(q?p10),+der(21)t(13;21)(q21 ;p10),del(22)(q11)

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
37	44,XY,der(5)t(5;13)(q11;q14),del(7)(q22),der(8)t(5;8)(q?;q24),i(11)(q10),der(13)t(13;16)(q14;q?),der(16)t(5;16)(q?,q22)t(5;8)(q?;q24),-17,-18,der(21)t(1;21)(?;p10) [25]	Rev ish enh (1p32.1p36.3,11q) dim (5q31.1q33.3, 7q22.7q36,11p,17,18)	44,XY,der(5)t(5;13)(q11;q14),del(7)(q22),der(8)t(5;8)(q?;q24),i(11)(q10),der(13)t(13;16)(q14; q22),der(16)t(5;16)(q?,q22)t(5;8)(q?;q24),-17,-18,der(21)t(1;21)(p32.1 ;p10) [25]
38	45-46,XY,der(3)t(3;13)(q12;q?),+der(3)t(3;22)(p12;q11),der(5)t(3;5)(?;q12),der(7)t(7;17)(q11;q11),del(13)(q12),-17 [cp12] 46,XY [1]	Rev ish dim (3p12p21,5q13q35, 7p15.3p21,7q21q36, 13q14.3q34,17p12p13)	45-46,XY,der(3)t(3;13)(p12; q12) del(13)(q14.3) ,+der(3)t(3;22)(p12;q11),der(5)t(3;5)(p21 ;q13),der(7)t(7;17)(q21 ;q11) del(7)(p15.3p21) ,del(13)(q12),-17
39	45,XX,der(4;21),del(5)(q13q31),der(9)t(9;13)(q34;q22),del(13)(q14),-14,der(17)t(17;21)(p11;q11)del(17)(q23),der(19)t(14;19)t(19;19) [cp19] 46,XX [1]	Rev ish enh (19p,21q22.2q22.3) dim (4q21.1q35,5q12q33.3,13q13q22, 14q21q31, 17p11p12)	45,XX,der(4)t(4;21)(q21.1;q22.2),del(5)(q12q33.3),der(9)t(9;13)(q34;q22),del(13)(q13),-14,der(17)t(17;21)(p11;q11)del(17)(q23),der(19) dup(19)(p11p13)t(14;19)(q31;p13)
40	44,XY,der(5;22)(q35;q10)del(5)(q13q31),-7,der(13)t(11;13)(q11;p10),der(15;17)(q10;q10),der(19)t(17;19)(p11;p13)t(17;21)(p13;q?) [cp20]	Rev ish enh (19p,21q22.1q22.3) dim (5q14q35,7, 13q12.3q14.3,16p13)	44,XY,der(5;22)(q14 ;q10),-7,der(13)t(11;13)(q11;p10),der(15;17)(q10;q10), dic(16;?)(p12;?) ,der(19) dup(19)(p11p13.3)t(17;19)(p11;p13)t(17;21)(p13;q22.1)
41	40-44,XX,der(2;5)dic(2;5)(p21;p15)t(5;7)(q13;p11),-7,der(12)ins(12;15)(p11;q11q14),del(12)(p12),dic(12;13)(p12;p10),der(13)t(13;15)(p10;q?),der(15)t(15;16)(p10;?),-16,der(17)t(5;17)(?;p13),der(18)t(18;21)(p11.3;q11),amp(21q),der(20)t(11;20)(?;q13) [cp19] 46,XX [1]	Rev ish enh (11q23q25,21q21q22) dim (2p12p14,2p16p25.3, 5q11.2q13.2,5q14q35, 7q,12p11.2p13.1, 15q11.1q21.1,16q)	40-44,XX,der(2;7)dic(2;7)(p16;p11) ins(2;5)(p12;q13q14)del(2)(p12p14) ,-7,der(12)ins(12;15)(p11; q21q22),del(12)(p11.2p13.1),dic(12;13)(p13 ;p10),der(13)t(13;15)(p10; q22),der(15)t(15;16)(p10, p10),-16,der(17)t(5;17)(p11 ;p13),der(18)t(18;21)(p11.3;q11)amp(21)(q21q22),der(20)t(11;20)(q23 ;q13.3)

Ergebnisse

Pat.	Karyotyp nach G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH	CGH	Endgültiger Karyotyp
42	46,XY,dic(5;17)(q15;p12),+8, der(19)t(19;20)(q13;p11),-20,+22 [17] 46,XY,dic(5;17)(q15;p12),+8, der(11)t(6;11)(p23;q25), der(14)t(11;14)(?;p10),der(19) t(19;20)(q13;p11),-20,+22 [7] 46,XY [2]	Rev ish enh (8,11q23.3q25,19p,22) dim (5q14q34,17p12p13, 20q12q13.1)	46,XY,dic(5;17)(q35 ;p12) del(5)(q14q34) ,+8, der(14)t(11;14)(q23 ;p10)amp(11q23.3q25), der(19) dup(19)(p11p13) t(19;20)(p13;p11), -20,+22
43	43,XY,-3,der(3)t(3;7)(q11;q11),-5, der(7)t(5;7)(p11;q11),der(12)t(12;15)(p13;q22), -15,der(17)t(3;17)(q11;p13) [9] 42,idem,-18 [7]	Rev ish dim (3p,3q11q24,5q,7q11q22,12p, 15q11q15,17p12p13,18)	42,XY,-3,der(3)t(3;7)(q26;q22) del(3)(q11q24) , dic(5;7)(q11;q11) ,der(12)t(12;15)(p11;q15), -15,der(17)t(3;17)(q11; p12),-18
44	45,Y,der(X)t(X;5)(q22;?), del(4)(q31),-5,der(7)del(7)(p12) t(X;7)(q22;q11),der(10)t(1;10) (p11;q26),der(17)t(5;17)(?;p11) t(5;7)(?;?) [10] 45,idem,t(4;17)(q11;q11),r(18)(p11q11) [4] 46,XY [1]	Rev ish enh (1p21p36.3,5q34q35.3) dim (4q24q31.1,5q22q33.1,7q21q35, 17p)	45,Y, dic(X;5)(q22;q22) ,del(4)(q24 q31.1), t(4;17)(q11;q11),-5, der(7)del(7)(p12)t(X;7)(q22; q21), der(10)t(1;10)(p21 ;q26), der(17)t(5;17)(q33 ;p11) dup(5)(q33q35) t(5;7)(q35;p12),r(18)(p11q11)

Tabelle 10: Patientendaten

Einteilung der Karyotypen der Patienten nach klassischer Zytogenetik, FISH und 24-Farben-FISH, nach CGH und endgültiger Karyotyp.
Fettgedrucktes entspricht den Veränderungen, die durch CGH genauer charakterisiert wurden,
Fettunterstrichenes entspricht neuen Erkenntnissen, die erst durch CGH detektiert wurden.

3.2 Vergleich eingesetzter Methoden

In allen untersuchten Fällen konnte CGH neue Informationen erbringen und zur weiteren Aufklärung der komplex aberranten Karyotypen beitragen. Besonders die genaue Zuordnung von Verlusten und Vermehrungen des chromosomalen Materials zu den einzelnen Banden der Chromosomen und die genaue Identifikation der Bruchpunkte waren hierbei ausschlaggebend. Die CGH-Ergebnisse häufig betroffener Regionen wurden mittels Interphasen-FISH (IP-FISH) validiert. In allen Fällen ließen sich die Bruchpunkte verschiedener Aberrationen mit CGH genauer bestimmen. In 37 Fällen konnte chromosomales Material, welches an unterschiedlichen Rearrangements beteiligt war, erst durch die CGH-Analyse den chromosomalen Banden zugeordnet werden. Weiterhin ließen sich nach der CGH-Analyse bestimmte Aberrationen neu interpretieren. Hierbei handelte es sich um den Nachweis von Duplikationen (n=5) (Nr. 4, 39, 40, 42, 44), Ausschluss vorerst angenommener Duplikation (n=3) (Nr. 3, 25, 30) und Aufdeckung eines Isochromosoms (n=2) (Nr. 6, 15). In 9 Fällen stellten sich die vorerst angenommenen unbalancierten Translokationen durch die Ergebnisse der CGH als dizentrische Veränderungen heraus (Nr. 5, 11, 16, 27, 28, 32, 40, 43, 44). In einem weiteren Fall konnte eine dizentrische Veränderung den richtigen Chromosomen zugeordnet werden (Nr. 41). Zusätzlich war es mit CGH bei sechs Patienten möglich, Amplifikationen einem größeren Bereich des langen Arms von Chromosom 11 zuzuordnen. Bei einem dieser Patienten, konnte mittels FISH eine Beteiligung des MLL-Gens ausgeschlossen werden (Nr. 17). Weiterhin wurden unter Berücksichtigung aller Ergebnisse der eingesetzten Methoden eine vorerst angenommene Inversion ausgeschlossen (Nr. 12) und in drei Fällen eine Insertion neu detektiert (Nr. 22, 25, 41). In insgesamt 27 der 44 Fälle konnten die in der G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH nachgewiesenen Veränderungen in CGH vollständig detektiert werden. In den restlichen 18 Fällen konnten einzelne Aberrationen mit CGH nicht erkannt werden (Nr. 6, 13, 15, 21, 23, 24, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44). Gründe hierfür waren in den meisten Fällen, dass die nicht erkannte Aberration nur in einem Subklon vorlag oder die Größe der Deletion unter der Erkennungsschwelle von CGH im Vergleich zur IP-FISH lag. In drei Fällen konnte eine Deletion in 17p mit CGH nicht eindeutig erkannt werden (Nr. 34, 36, 40). Patient Nr. 40 zeigte diese Aberration nur in einem Subklon, wobei diese Aberration

Ergebnisse

weder in CGH noch in der IP-FISH und nur mittels 24-Farben-FISH und Metaphasen-FISH nachgewiesen werden konnte. Bei den zwei anderen Patienten ist der CGH Befund unklar, da eigentlich eine hohe Anzahl der Zellen, die diese Aberration in der IP-FISH zeigten, vorlag.

Um die Bedeutung der CGH bei den komplexen Aberrationen im Vergleich zu der 24-Farben-FISH zu verdeutlichen, sind in den Abbildungen 5 und 6 beide Analysen eines Falles dargestellt (Nr. 17). Während aus der 24-Farben-FISH-Untersuchung hervorgeht, dass eine unbalancierte Insertion von Material von Chromosom 11 in den langen Arm von Chromosom 5 stattgefunden hat, lässt sich mittels der CGH-Analyse die verlorengangene Region im langen Arm von Chromosom 5 auf die Chromosomenbanden 5q13 bis 5q31 eingrenzen. Daneben kam es zu einer massiven Vervielfachung der Chromosomenbanden 11q23 bis 11q25. Ferner zeigt sich in der CGH-Analyse, dass bei der Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 17 kein Material des kurzen Armes von Chromosom 17 verloren gegangen ist. Dieses Beispiel zeigt, wie sich diese beiden Methoden ergänzen und deshalb besonders bei der Aufklärung komplexer Rearrangements eine große Bereicherung darstellen.

Ergebnisse

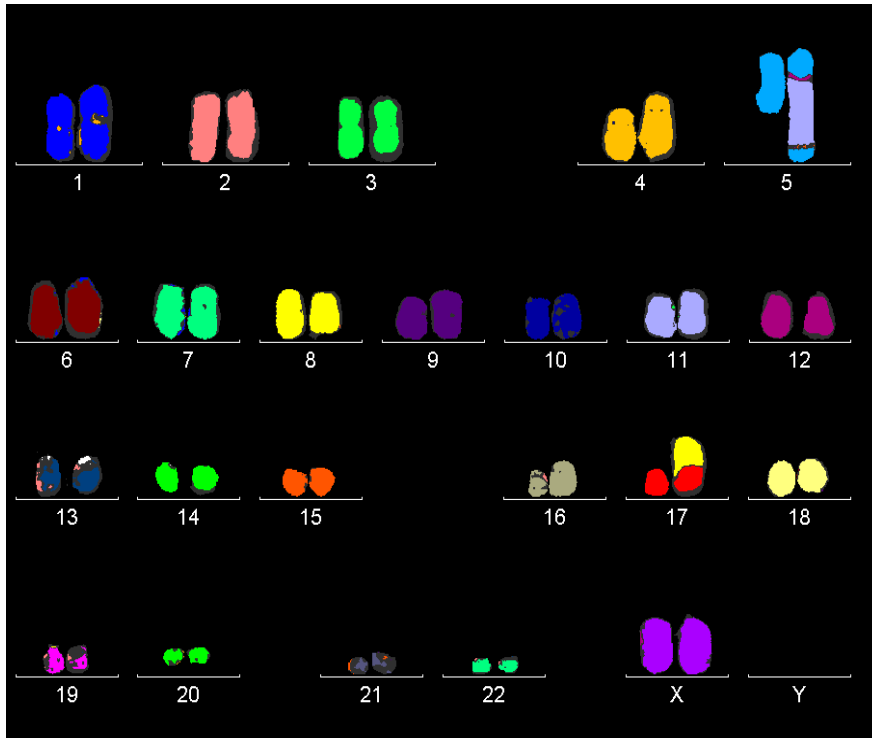


Abbildung 5: 24-Farben-FISH Analyse (Nr. 17) mit Nachweis einer unbalancierten Insertion zwischen Chromosom 11 und dem langen Arm von Chromosom 5 und einer Translokation zwischen Chromosom 8 und 17

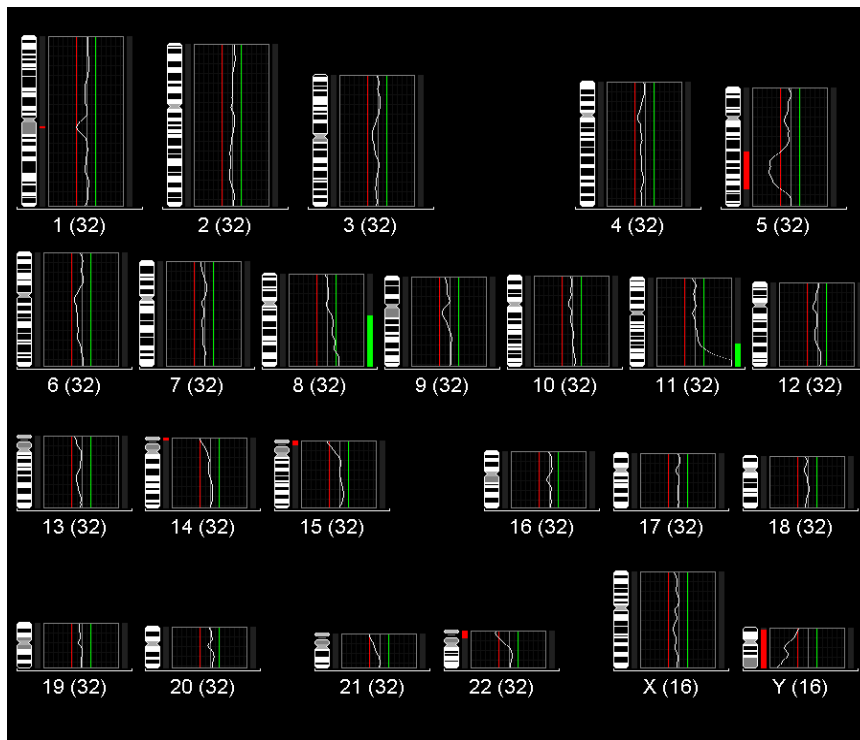


Abbildung 6: CGH-Analyse (Nr. 17) mit Nachweis einer Deletion in 5q13q31, eines Zugewinns in 8q11q24 und einer 11q23q25-Amplifikation

3.3 Häufig betroffene Chromosomen bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp

3.3.1 Chromosom 1

Bei 23% der Patienten (n=10) konnte mit CGH eine Vermehrung im kurzen Arm von Chromosom 1 detektiert werden (Nr. 7, 10, 18, 20, 25, 26, 29, 35, 37, 44). Hierbei waren die Banden 1p33.1 bis 1p36.1 bei allen Patienten mitbetroffen. Bei einem Patient lag eine vollständige Vermehrung des ganzen Chromosom 1 vor (Nr.18). Bei einem weiteren dieser Patienten wurde zusätzlich ein Verlust im Bereich 1p36.2p36.3 detektiert (Nr. 25). Bei Patient Nr. 25 wurde nach Auswertung der 24-Farben-FISH ein Zugewinn von Teilen des langen Armes angenommen. Mit CGH ließ sich jedoch zeigen, dass tatsächlich Material des kurzen Armes von Chromosom 1 hinzugewonnen war.

3.3.2 Chromosom 5

Insgesamt konnten in 40 Fällen eine Deletion im langen Arm von Chromosom 5 mit der konventionellen Zytogenetik, FISH und 24-Farben-FISH nachgewiesen werden. In all diesen Fällen konnte diese Aberration mit CGH bestätigt werden, so dass bei insgesamt 90,9% der Patienten eine Deletion in 5q vorlag (Nr. 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44). Somit stellt die 5q-Deletion die häufigste strukturelle Aberration dar. Bei 39 der 40 Patienten mit Verlusten in 5q lag eine Deletion im Bereich 5q23q31.3 vor. CGH konnte zusätzlich zeigen, dass Deletionen im langen Arm meist größere Regionen beinhalten. Bei 92% dieser Fälle beinhaltete die Deletion zusätzlich die Banden 5q14 bis 5q31 und bei 72% zusätzlich die Bande 5q13. Sechs Patienten zeigten in CGH einen kompletten Verlust des langen Arms und ein weiterer Patient (Nr. 31) wies eine Monosomie des Chromosoms vor. Verluste im kurzen Arm konnten mit CGH in 6 Fällen nachgewiesen werden (Nr. 7, 8, 20, 23, 29, 31), die ebenfalls einem Verlust im langen Arm von Chromosom 5 zeigten. Hierbei war die Bande 5p15 immer von der Deletion betroffen. Patient Nr. 23 zeigte in der konventionellen Zytogenetik eine Monosomie 5 und eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 5 und 17 in einem Subklon. Interessanterweise ließ sich dies in CGH nachweisen, da bestimmtes Material im

Ergebnisse

kurzen Arm von Chromosom 5 als noch vorhanden identifiziert wurde. In einem Fall konnte die in CGH nachgewiesene Deletion in 5p in FISH nicht detektiert werden (Nr. 20). Zugewinne konnten in 2 Fällen in 5q34 (Nr. 1, 44) und in einem Fall in 5p nachgewiesen werden (Nr. 32). Patient Nr. 32 zeigte in CGH einen einfachen Zugewinn in 5p, wobei der Bereich 5p14p15.3 mehr als 2-fach vermehrt schien. In der FISH-Untersuchung lagen für eine 5p15.2-Sonde 4 Signale vor. Die einzelnen CGH- und Interphase-FISH-Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Patienten-Nr.	5q31- Verlust in CGH	5p15.2- Verlust in CGH	5q31- Verlust in FISH	5p15.2- Verlust in FISH
1	X		X	
2	X		X	
4	X		X	
5	X		X	
6	X		X	
7	X	X	X	X
8	X	X	X	X
10	X		X	
11	X		X	
12	X		X	
13	X		X	
14	X		X	
15	X		X	
16	X		X	
17	X		X	
18	X		X	
20	X	X	X	-
21	X		X	
22	X		X	
23	X	X	X	X
24	X		X	
25	X		X	
26	X		X	
27	X		X	
28	X		X	

Ergebnisse

Patienten-Nr.	5q31- Verlust in CGH	5p15.2- Verlust in CGH	5q31- Verlust in FISH	5p15.2- Verlust in FISH
29	X	X(5p15.1)	X	(-)
31	X	X	X	X
32	X		X	
33	X		X	
34	X		X	
35	X		X	
36	X		X	
37	X		X	
38	X		X	
39	X		X	
40	X		X	
41	X		X	
42	X		X	
43	X		X	
44	X		X	

Tabelle 11: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 5

Die in Klammern gesetzten Patientennummern zeigten in CGH eine Deletion, die außerhalb der mittels FISH detektierbaren Region lag. Das Zeichen - bedeutet: keine Veränderung detektiert.

3.3.3 Chromosom 7

In CGH konnten insgesamt bei 36,4% der Patienten (n=16) eine Deletion im kurzen Arm (Nr. 2, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 20, 23, 26, 31, 34, 35, 38, 40) und in 59% der Fälle (n= 26) Verluste im langen Arm von Chromosom 7 detektiert werden (Nr. 2, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 37, 38, 40, 41, 43, 44). 15 der 16 Patienten mit Verlusten im kurzen Arm zeigten gleichzeitig im langen Arm eine Deletion, wobei in 7 Fällen ein kompletter Verlust des ganzen Chromosoms 7 nachgewiesen wurde (Nr. 2, 8, 12, 23, 26, 34, 40). Diese Ergebnisse stimmten mit den Untersuchungen der G-Banden, FISH und 24-Farben-FISH überein. Regionen, die bei den einzelnen Verlusten häufig vorkamen, waren im Bereich des kurzen Arms

Ergebnisse

die Bande 7p21 in 13 von 16 Fällen und im Bereich des langen Arms besonders die Banden 7q31 bis q35 bei 24 der 26 Patienten. Zugewinne im Chromosom 7 lagen nicht vor. Die CGH und die Interphase-FISH Ergebnisse sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Patienten-Nr.	7q31q32- Verlust in CGH	7q31- Verlust in FISH
2	X	X
4	X	X
6	X	X
8	X	X
9	X	X
11	X	X
12	X	X
14	X	X
20	X	X
22	X	X
23	X	X
24	X	X
(25)	X (7q32q36)	-
26	X	X
28	X	X
29	X	X
30	X	X
31	X	X
33	X	X
34	X	X
37	X	X
38	X	X
40	X	X
41	X	X
(43)	X (7q11q22)	-
44	X	X

Tabelle 12: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 7

Die in Klammern gesetzten Patientennummern zeigten in CGH eine Deletion, die außerhalb der mittels FISH detektierbaren Region lag. Das Zeichen - bedeutet: keine Veränderung detektiert.

Ergebnisse

3.3.4 Chromosom 8

Insgesamt zeigten 20,5% der Patienten (n=9) eine Vermehrung in 8q, wobei 5 Patienten eine komplette Trisomie des Chromosoms 8 (Nr. 2, 4, 19, 28, 42) und 4 Patienten einen Zugewinn im langen Arm (Nr. 12, 17, 21, 32) aufwiesen. Bei Patient Nr. 32 zeigte sich in CGH zusätzlich eine Amplifikation im Bereich der Chromosomenbanden 8q22.3q24.3. Die FISH Analyse ergab einen einfachen Zugewinn des in dieser Region befindlichen C-MYC Gens, so dass dieses Gen bei diesem Patienten nicht im amplifizierten Bereich liegt. Die Region, die bei allen Patienten betroffen war, konnte auf die Banden 8q22 bis 8q24 begrenzt werden. Verluste ließen sich mit CGH in 8q bei einem Patienten (Nr. 29) und in 8p bei 2 Patienten nachweisen (Nr. 25, 32). Hierbei waren immer die Banden 8p12p23 betroffen. Bei einem Patienten (Nr. 32) lag ein i(8q) nach der konventionellen Zytogenetik vor. CGH zeigte ein Gewinn vom ganzen langen Arm und ein Verlust des kurzen Arms und konnte somit diese Aberration bestätigen. Die CGH und die Interphase-FISH Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Patienten-Nr.	8q23q24- Zugewinn in CGH	8q24 (C-MYC)- Zugewinn in FISH
2	X	X
4	X	X
12	X	X
17	X	X
19	X	X
21	X	X
28	X	X
32	X	X
42	X	X

Tabelle 13: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 8

Ergebnisse

3.3.5 Chromosom 11

Im Bereich des Chromosoms 11 lagen besonders Vermehrungen in 11q vor. Insgesamt konnten mit CGH bei 38,6% der Patienten (n=17) ein Zugewinn in diesem Bereich detektiert werden (Nr. 1, 2, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 28, 30, 31, 37, 41, 42). Bei 15 von diesen 17 Patienten waren die Banden 11q23q25 betroffen. Dabei handelte es sich bei einem Patienten um eine Trisomie 11 (Nr. 10), bei vier Patienten um eine zusätzliche Amplifikation (Nr. 1, 10, 15, 28) und bei zwei weiteren Patienten um eine reine Amplifikation im Bereich 11q22q24 (Nr. 17, 30). Bei vier dieser Patienten lagen mehrere Banden ab 11q11 bis 11q24 amplifiziert vor (Nr. 10, 15, 17, 28). In fünf der mit CGH detektierten Fälle mit Amplifikationen lagen Ringchromosomen vor (Nr. 1, 10, 15, 28, 30). Mittels FISH konnte mit einer Sonde für das MLL-Gen in 5 von 6 Fällen das MLL-Gen in der amplifizierten Region nachgewiesen werden. Bei Patient Nr. 17 war das MLL-Gen nicht von der Amplifikation betroffen. Patient Nr. 42 zeigte einen einfachen Gewinn von 11q23.3q25 in der CGH. In IP-FISH wurde eine Beteiligung des MLL-Gens mittels der MLL-Sonde ausgeschlossen. Zugewinne im kurzen Arm des Chromosoms 11 kamen in drei Fällen vor (Nr. 5, 10, 28). Dabei handelte es sich um eine Trisomie 11 (Nr. 10), einen einfachen Zugewinn in 11p (Nr. 5) und bei Patient Nr. 28 um einen einfachen Gewinn in 11p mit einer zusätzlichen Amplifikation in 11p15. Die Bande 11p15 lag bei jedem der drei Fälle vermehrt vor. Verluste von chromosomalem Material in 11 konnten insgesamt in 8 Fällen dem kurzen Arm (Nr. 2, 3, 8, 15, 18, 25, 31, 37) und in 4 Fällen dem langen Arm mit CGH zugeordnet werden (Nr. 1, 6, 9, 16). Fünf Patienten mit Verlusten in 11p (Nr. 2, 8, 15, 31, 37) und 2 Patienten mit Verlusten in 11q (Nr. 1, 16) zeigten zusätzlich eine Vermehrung oder Amplifikation in 11q. Die CGH und die Interphase-FISH Ergebnisse sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Ergebnisse

Patienten-Nr.	11q23- Zugewinn in CGH	11q23 (MLL)- Zugewinn in FISH
1	X ++	X ++
2	X	X
5	X	X
7	X	X
8	X	X
10	X++	X++
12	X	X
13	X	X++
15	X++	X++
16	X	X
17	X++	-
28	X++	X++
30	X++	X++
31	X	X
37	X	X
41	X	X
42	X	-

Tabelle 14: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 11

Die Zeichen ++ entsprechen Amplifikationen, das Zeichen - bedeutet: keine Veränderung detektiert

3.3.6 Chromosom 12

31,8% der Patienten (n=14) zeigten einen Verlust im kurzen Arm des Chromosoms 12 (Nr. 4, 8, 14, 18, 22, 23, 25, 27, 30, 31, 33, 34, 41, 43). Mit CGH konnte gezeigt werden, dass bei 14 der 14 Patienten die Region 12p13 deletiert vorlag. Dabei handelt es sich bei 4 Patienten um eine Deletion in dieser Bande (Nr. 4, 8, 22, 31), bei weiteren neun Patienten um einen Verlust des ganzen kurzen Armes (Nr. 14, 23, 25, 27, 30, 33, 34, 41, 43) und bei einem Patienten um eine komplette Monosomie 12 (Nr.18). Weiterhin fanden sich bei drei dieser Patienten Verluste im langen Arm von Chromosom 12 (Nr. 18, 22, 27), wobei die Banden 12q13q21 immer betroffen

Ergebnisse

waren. Vermehrungen im Bereich des Chromosoms 12 konnten nicht detektiert werden. Die CGH und die Interphase-FISH Ergebnisse sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Patienten-Nr.	12p13- Verlust in CGH	12p13 (TEL)- Verlust in FISH
4	X	X
8	X	X
14	X	X
18	X	X
22	X	X
23	X	X
25	X	X
27	X	X
30	X	X
31	X	X
33	X	X
34	X	X
41	X	X
43	X	?

Tabelle 15: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 12

Das Zeichen ? bedeutet, dass eine retrospektive FISH-Analyse in diesem Fall wegen unzureichendem Material nicht mehr möglich war

3.3.7 Chromosom 13

In 20,5% der Fälle (n=9) wurden mit CGH Deletionen im Bereich des langen Armes von Chromosom 13 nachgewiesen (Nr. 12, 21, 22, 33, 35, 36, 38, 39, 40). Hierbei war die Bande 13q14 bei jedem dieser Patienten betroffen. Mit der FISH-Analyse konnten in 8 von 8 Fällen eine Deletion des Rb-Gens detektiert werden. In vier Fällen zeigte die CGH-Analyse Vermehrungen im Bereich des langen Arms (Nr. 15, 21, 22, 24). Zwei dieser Patienten hatten gleichzeitig einen Verlust in 13q angezeigt (Nr. 21, 22). Die CGH und die Interphase-FISH Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Ergebnisse

Patienten-Nr.	13q14- Verlust in CGH	13q14 (Rb)- Verlust in FISH
12	X	X
21	X	X
22	X	X
33	X	X
35	X	X
36	X	X
38	X	?
39	X	X
40	X	X

Tabelle 16: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 13

Das Zeichen ? bedeutet, dass eine retrospektive FISH-Analyse in diesem Fall wegen unzureichendem Material nicht mehr möglich war

3.3.8 Chromosom 16

In 31,8% der Fälle (n=14) lag eine Deletion im Bereich des langen Arms in Chromosom 16 vor (Nr. 2, 4, 5, 6, 8, 11, 15, 23, 27, 29, 31, 34, 35, 41). Die Banden 16q22q24 lagen bei jedem dieser Patienten deletiert vor. Zwei Patienten zeigten einen vollständigen Verlust des ganzen Chromosoms 16 (Nr. 6, 11). Bei 6 der 14 Patienten ist der ganze lange Arm verloren gegangen (Nr. 2, 15, 23, 29, 34, 41). Die mit einer auf 16q22 lokalisierten CBF β -Sonde durchgeführte FISH-Analyse ergab eine Deletion in 13 von 14 Fällen. Bei Patient Nr. 5 lag das Gen nicht deletiert vor. Verluste im kurzen Arm konnten bei insgesamt 5 Patienten nachgewiesen werden (Nr. 6, 11, 31, 36, 40). Diese Deletionen beinhalteten immer die Bande 16p13. In einem Fall konnte mittels CGH eine Vermehrung in 16p nachgewiesen werden (Nr. 15). Die CGH und die Interphase-FISH Ergebnisse sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Ergebnisse

Patienten-Nr.	16q22- Verlust in CGH	CBFβ (16q22)- Verlust in FISH
2	X	X
4	X	X
5	X	-
6	X	X
8	X	X
11	X	X
15	X	X
23	X	X
27	X	X
29	X	X
31	X	X
34	X	X
35	X	X
41	X	X

Tabelle 17: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 16

Das Zeichen – bedeutet: keine Veränderung detektiert

3.3.9 Chromosom 17

Insgesamt zeigten 61,4% der Patienten (n=27) eine Deletion im kurzen Arm des Chromosoms 17 (Nr. 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 23, 28, 29, 30, 31, 32, 37, 38, 39, 42, 43, 44). Hierbei lag bei 9 Patienten ein kompletter Verlust des Chromosoms (Nr. 4, 7, 12, 13, 18, 20, 21, 32, 37) und bei 12 Patienten ein Verlust des ganzen kurzen Arms vor. Bei insgesamt 27 der 27 Patienten beinhaltete die Deletion die Banden 17p12p13. Bei jedem dieser Patienten konnte die Deletion von 17p13 mit der p53 Sonde in FISH bestätigt werden. Verluste im langen Arm des Chromosoms konnten mit CGH insgesamt in 12 Patienten beobachtet werden. Dabei lag in 9 Fällen eine Monosomie vor. Die Bande 17q21 war bei jedem dieser Patienten betroffen. Die CGH und die Interphase-FISH Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Ergebnisse

Patienten-Nr.	17p13- Verlust in CGH	17p13 (p53)- Verlust in FISH
1	X	X
3	X	X
4	X	X
6	X	X
7	X	X
10	X	X
11	X	X
12	X	X
13	X	X
14	X	X
15	X	X
16	X	X
18	X	X
20	X	X
21	X	X
23	X	X
28	X	X
29	X	X
30	X	X
31	X	X
32	X	X
37	X	X
38	X	X
39	X	X
42	X	X
43	X	X
44	X	X

Tabelle 18: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 17

Ergebnisse

3.3.10 Chromosom 18

25% der Patienten (n=11) zeigten einen kompletten Verlust des Chromosoms 18 (Nr. 5, 8, 12, 13, 18, 20, 30, 32, 33, 37, 43). Weiterhin konnten mit CGH bei zwei Patienten Verluste im kurzen und langen Arm (Nr. 2, 22) und bei drei weiteren Patienten Verluste nur im langen Arm detektiert werden (Nr. 11, 16, 35). Dabei waren im kurzen Arm die Bande 18p11.3 und im langen Arm die Banden 18q21q22 immer betroffen.

3.3.11 Chromosom 20

Mit der CGH ließ sich in 13,6% der Fälle (n=6) ein Verlust in 20q detektieren (Nr. 3, 6, 11, 16, 36, 42). Ein weiterer Patient zeigte einen Verlust in 20p (Nr. 29). Die Banden 20q12q13.3 lagen bei allen Patienten deletiert vor. Bei allen Patienten wurde eine FISH-Analyse mit einer lokus-spezifischen Sonde für 20q13.2 durchgeführt und die Deletionen nachgewiesen. Vermehrungen konnten bei insgesamt zwei Patienten nachgewiesen werden (Nr. 2, 4). Die CGH und die Interphase-FISH Ergebnisse sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Patienten-Nr.	20q13.2- Verlust in CGH	20q13.2- Verlust in FISH
3	X	X
6	X	X
11	X	X
16	X	X
36	X	X
42	X	X

Tabelle 19: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 20

Ergebnisse

3.3.12 Chromosom 21

Insgesamt konnten mit CGH in 15,9% der Fälle (n=7) Vermehrungen in 21q detektiert werden (Nr. 1, 6, 19, 32, 39, 40, 41). Dabei war die Bande 21q22 in 6 von 7 betroffen. Zwei dieser Patienten zeigten eine Amplifikation dieser Region (Nr. 19, 32), wobei es sich bei einem dieser Patienten um ein Markerchromosom handelte, welches sich mit einer „whole chromosome painting“ Sonde für Chromosom 21 anfärbte (Nr. 19). Bei Nr. 32 ließ sich in der FISH-Analyse ein einfacher Zugewinn des AML1-Gens nachweisen. Ein weiterer Patient (Nr. 39) zeigte in CGH eine einfache Vermehrung in 21q und in der FISH eine Amplifikation, die nur in einem Subklon vorkam. Patient Nr. 1 zeigte zusätzlich einen Verlust in 21q21q22. Die CGH und die Interphase-FISH Ergebnisse sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Patienten-Nr.	21q22- Zugewinn in CGH	21q22 (AML1)- Zugewinn in FISH
1	X	X
6	X	X
19	X++	X
32	X++	X
39	X	X++
40	X	X
41	X	X

Patienten-Nr.	21q22- Verlust in CGH	21q22 (AML1)- Verlust in FISH
1	X	?
21	-	X

Tabelle 20: Vergleich der CGH und Interphase-FISH Ergebnisse in bezug auf Chromosom 21

Die Zeichen ++ entsprechen Amplifikationen. Das Zeichen – bedeutet: keine Veränderung detektiert
Das Zeichen ? bedeutet, dass wegen unzureichendem Material eine FISH-Untersuchung nicht mehr möglich war.

Ergebnisse

3.3.14 Chromosom 22

Insgesamt lag in 11,4% (n=5) eine Trisomie 22 vor (Nr. 5, 10, 12, 18, 42). Vermehrungen ließen sich bei einem Patienten dem langen Arm zuordnen (Nr. 15). Verluste konnten mittels CGH bei einem Patienten im langen Arm detektiert werden (Nr. 11).

3.4 Gleichzeitig auftretende Aberrationen bestimmter Chromosomen bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp

In dieser Arbeit konnten bei den komplex aberranten Karyotypen unterschiedlich häufig Kombinationen bestimmter Aberrationen nachgewiesen werden. Die einzelnen Kombinationen und deren Häufigkeit sind im folgendem Abschnitt aufgezählt. Hierbei werden die Ergebnisse, die durch mindestens zwei Methoden gesichert sind, aufgeführt.

3.4.1 Chromosomen 5, 7 und 17

In 36,4% der Patienten (n=16) konnten gleichzeitig die Aberrationen der Chromosomen 5, 7 und 17 in CGH detektiert werden (Nr. 4, 6, 11, 12, 14, 20, 23, 28, 29, 31, 34, 37, 38, 40, 43, 44). Dabei handelte es sich stets um Deletionen in 5q, Verluste im kurzen oder langen Arm des Chromosoms 7 und um die Deletion in 17p13.

3.4.2 Chromosomen 5 und 7

20,4% der Patienten (n=9) zeigten nach der CGH Analyse Deletionen im Bereich 5q und gleichzeitig in 7p und/ oder 7q, jedoch keine Deletion in 17p (Nr. 2, 8, 22, 24, 25, 26, 33, 35, 41).

Ergebnisse

3.4.3 Chromosomen 5 und 17

Nach CGH konnten in insgesamt 27% der Patienten (n=12) eine Deletion in 5q und in 17p entdeckt werden, die keine zusätzliche Deletion in Chromosom 7 aufwiesen (Nr. 1, 7, 10, 13, 15, 16, 18, 21, 32, 36, 39, 42).

Von insgesamt 44 Patienten zeigten 4 Patienten (Nr. 5, 17, 27, 36) in CGH nur eine Deletion in 5q, ein Patient nur einen Verlust in Chromosom 7 (Nr. 9) und ein weiterer Patient nur einen Verlust in 17p (Nr. 3). Bei nur einem Patienten lag keine Aberration in diesen Chromosomen vor (Nr. 19).

3.4.4 Chromosomen 5 und 11

In 36,4% der Fälle (n=16) ließen sich in CGH Deletionen in 5q und Vermehrungen bzw. Amplifikationen in 11q gleichzeitig nachweisen (Nr. 1, 2, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 28, 31, 37, 41, 42). 16 von 17 der Patienten, die eine Vermehrung oder Amplifikation in 11q zeigten, hatten somit immer eine Deletion im Bereich 5q. Patient Nr. 30 zeigte diese Kombination nicht.

3.4.5 Chromosomen 5 und 12

29,5% der Fälle (n=13) zeigten gleichzeitig eine Deletion in 5q und eine Deletion in 12p (Nr. 4, 8, 14, 18, 22, 23, 25, 27, 31, 33, 34, 41, 43). 13 von 14 der Patienten, die eine Deletion in 12p in CGH aufwiesen, zeigten gleichzeitig eine Deletion im langen Arm von Chromosom 5. Patient Nr. 30 zeigte diese Kombination nicht.

3.5 Zusammenfassung der mit CGH detektierten Aberrationen bei komplex aberrantem Karyotyp

Die Anzahl der mit CGH detektierten Aberrationen lag im Median bei 7 pro Patient (zwischen 3 und 17). Insgesamt wurden häufiger Verluste als Zugewinne von chromosomalem Material und mehr strukturelle als numerische Aberrationen mit CGH nachgewiesen (Abbildungen 7 bis 9). Die häufigsten strukturellen Aberrationen, die insgesamt bei über 20% der analysierten Fälle detektiert wurden, waren Verluste

Ergebnisse

im langen Arm von Chromosom 5 (88,6%), im langen Arm von Chromosom 7 (43%), im kurzen Arm von Chromosom 7 (20,5%), im kurzen Arm von Chromosom 17 (41%), im langen Arm von Chromosom 16 (27%), im kurzen Arm von Chromosom 12 (29,5%) und im langen Arm von Chromosom 13 (20,5%) beobachtet. Zugewinne lagen besonders im Bereich des langen Arms von Chromosom 11 (36,4%) und des kurzen Arms von Chromosom 1 (20,5%) vor. Bei den numerischen Veränderungen zählte zu den häufigsten Anomalien der Verlust der Chromosomen 18 (25%), 17 (20,5%) und 7 (15,9%) und die Vermehrung der Chromosomen 8 (11,4%) und 22 (11,4%). Eine Übersicht der mittels CGH detektierten Aberrationen und deren Häufigkeiten ist in Tabelle 21, 22 und 23 gegeben. Zur besseren Darstellung der einzelnen unbalancierten Aberrationen wurden in den Abbildungen 10a und 10b alle Veränderungen, die mit CGH bei den 44 Patienten nachgewiesen wurden, zusammengefasst. Hierbei wird deutlich, dass die Veränderungen in den verschiedenen Chromosomen häufig die gleichen Regionen beinhalten. Regionen, die bei den einzelnen Patienten gleichermaßen vorkommen, sind bei Verlusten in Chromosom 3p die Banden **3p12p14** in 6/8, in 3q die Banden **3q11q23** in 6/6, in 4q die Banden **4q22q31** in 5/5, in 5q die Banden **5q23q31.3** in 39/40, in 6q die Banden **6q21q26** in 4/4, in 7p die Bande **7p21** in 14/16, in 7q die Banden **7q31q35** in 25/26, in 9q die Banden **9q21q22** in 4/4, in 11p die Bande **11p13** in 8/8, in 12p die Bande **12p13** in 14/14, in 12q die Banden **12q13q21** in 3/3, in 13q die Bande **13q14** in 9/9, in 15q die Banden **15q12q14** in 4/5, in 16q die Banden **16q22q24** in 14/14, in 16p die Banden **16p13.2p13.3** in 5/5, in 17p die Bande **17p13** in 27/27, in 17q die Bande **17q21** in 12/12, in 18p die Bande **18p11.3** in 13/13, in 18q die Banden **18q21q22** in 16/16 und in 20q die Banden **20q12q13.2** in 6/6 Fällen. Bei Vermehrungen waren besonders in 1p die Banden **1p33p36.2** in 10/10, in 8q die Banden **8q23q24.3** in 9/9, in 9p die Banden **9p21p24** in 4/4, in Chromosom 10 immer der **lange Arm** in 3/3, in 11q Fällen die Bande **11q23** in 17/17, in Chromosom 19 immer der kurze Arm in 4/4, in 21q die Bande **21q22** in 6/7 und in Chromosom 22 immer der **langen Arm** in 6/6 betroffen. Zusätzlich ließ sich mit CGH 6 Amplifikationen im Bereich 11q nachweisen, wobei bei allen Patienten mit 11q-Amplifikation die Banden **11q22q24** mitbetroffen waren.

Ergebnisse

Chromosomen- Arm	Zugewinn (%)	Verlust (%)	Amplifikation (%)
1p	23%	2,3%	-
1q	2,3%	-	-
2p	2,3%	6,8%	-
2q	-	11,4%	-
3p	-	18,1%	-
3q	-	13,6%	-
4p	2,3%	4,5%	-
4q	2,3%	11,4%	-
5p	2,3%	13,6%	-
5q	4,5%	90,9%	-
6p	2,3%	4,5%	-
6q	-	9,1%	-
7p	-	36,4%	-
7q	-	59,1%	-
8p	11,4%	4,5%	-
8q	20,5%	2,3%	2,3%
9p	9,1%	-	-
9q	2,3%	9,1%	-
10p	4,5%	-	-
10q	6,8%	-	-
11p	6,8%	18,1%	2,3%
11q	34,1%	9,1%	13,6%
12p	-	31,8%	-
12q	2,3%	6,8%	-
13p	-	-	-
13q	9,1%	20,5%	-
14p	-	-	-
14q	-	2,3%	-
15p	-	-	-
15q	2,3%	11,4%	-
16p	2,3%	11,4%	-
16q	-	31,8%	-
17p	-	61,4%	-
17q	4,5%	27,3%	-
18p	-	29,5%	-
18q	4,5%	36,4%	-
19p	9,1%	2,3%	-
19q	2,3%	2,3%	-
20p	4,5%	2,3%	-
20q	2,3%	13,6%	-
21p	-	-	-
21q	15,9%	2,3%	4,5%
22p	-	-	-
22q	13,6%	2,3%	-
Xp	2,3%	4,5%	-
Xq	2,3%	2,3%	-
Y	-	2,3%	-

Tabelle 21: Anzahl der Zugewinne und Verluste in CGH

Ergebnisse

Chromosomale Region	Häufigkeit (%)
1p33p36.2	22,7%
8q23q24.3	20,4%
9p21p24	9,1%
11q23q25	38,6%
21q22	13,6%

Tabelle 22: Häufig betroffene Chromosomenregionen: Zugewinne

Chromosomale Region	Häufigkeit (%)
3q11q23	13,6%
4q23q25	11,4%
5q31q32	90,9%
6q21q26	9,1%
7p21	31,8%
7q31q32	56,8%
9q21q22	9,1%
11p13	18,1%
12p13	31,8%
12q13q21	6,8%
13q14	20,5%
15q12q14	9,1%
16p13.2p13.3	11,4%
16q22q24	31,8%
17p13	61,4%
17q21	27,3%
18p11.3	29,5%
18q21q22	36,4%
20q12q13.2	13,6%

Tabellen 23: Häufig betroffene Chromosomenregionen: Verluste

Ergebnisse

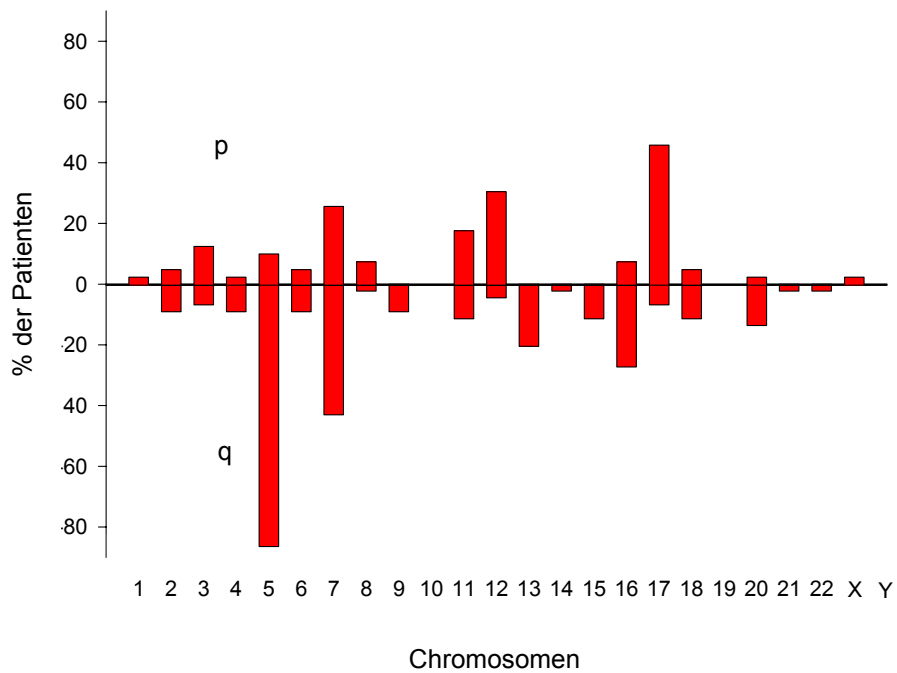


Abbildung 7: Häufigkeit struktureller Aberrationen: Verluste

Die Abkürzung p entspricht dem kurzen Arm und q dem langen Arm des jeweiligen Chromosoms.

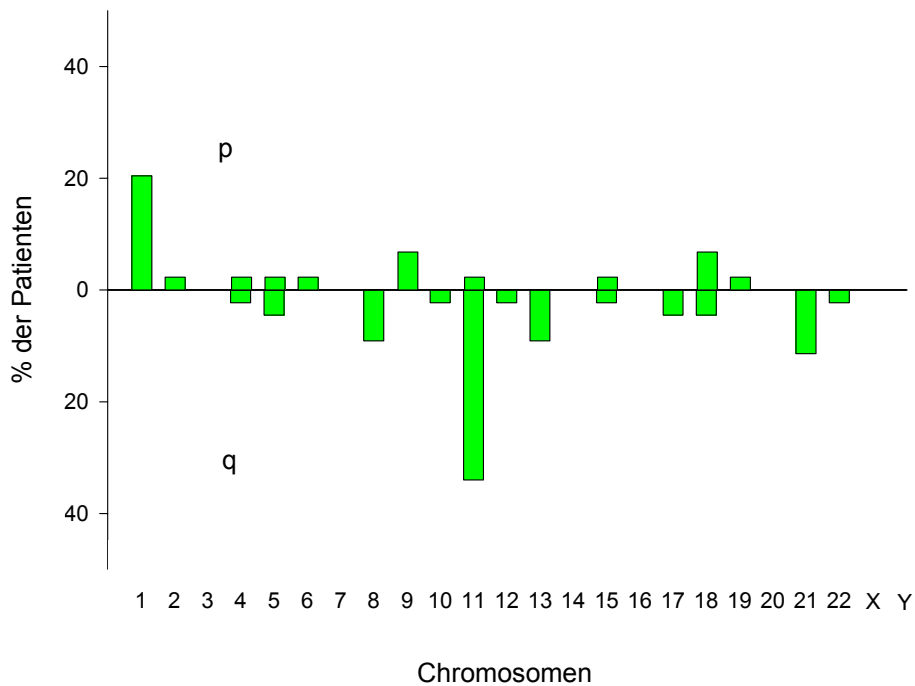


Abbildung 8: Häufigkeit struktureller Aberrationen: Zugewinne

Die Abkürzung p entspricht dem kurzen Arm und q dem langen Arm des jeweiligen Chromosoms.

Ergebnisse

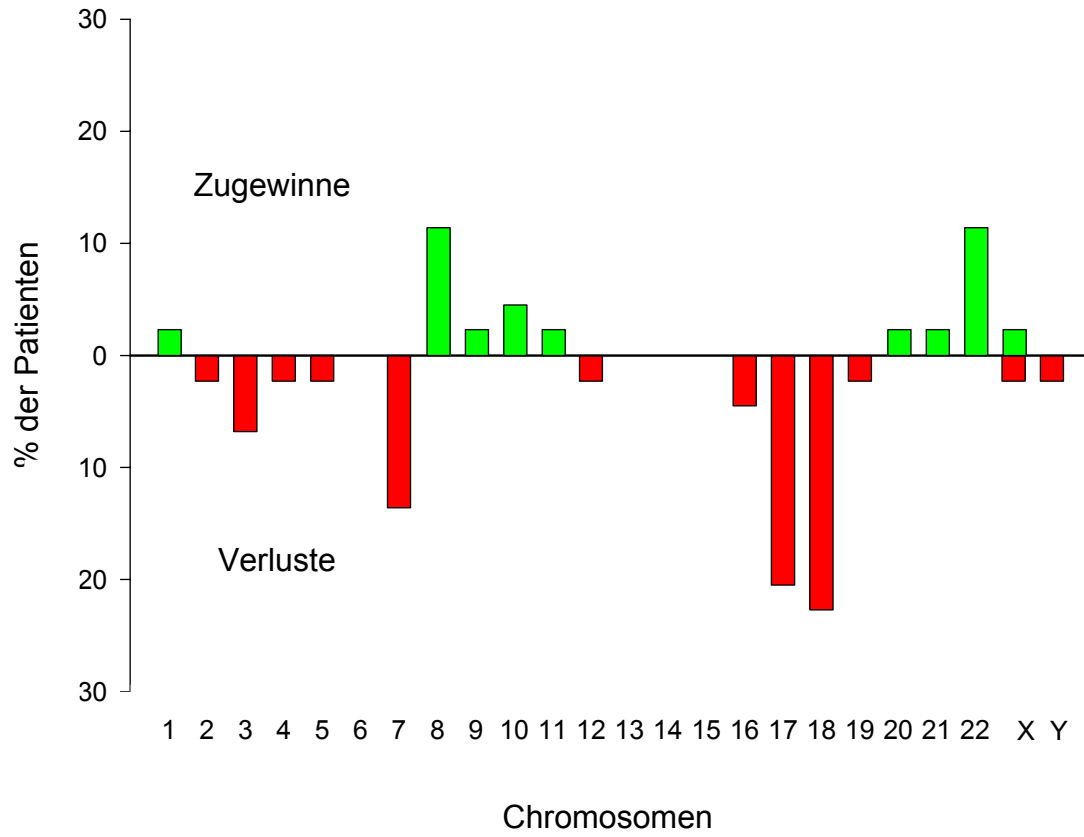


Abbildung 9: Häufigkeit numerischer Aberrationen: Zugewinne (grün) und Verluste (rot)

Ergebnisse

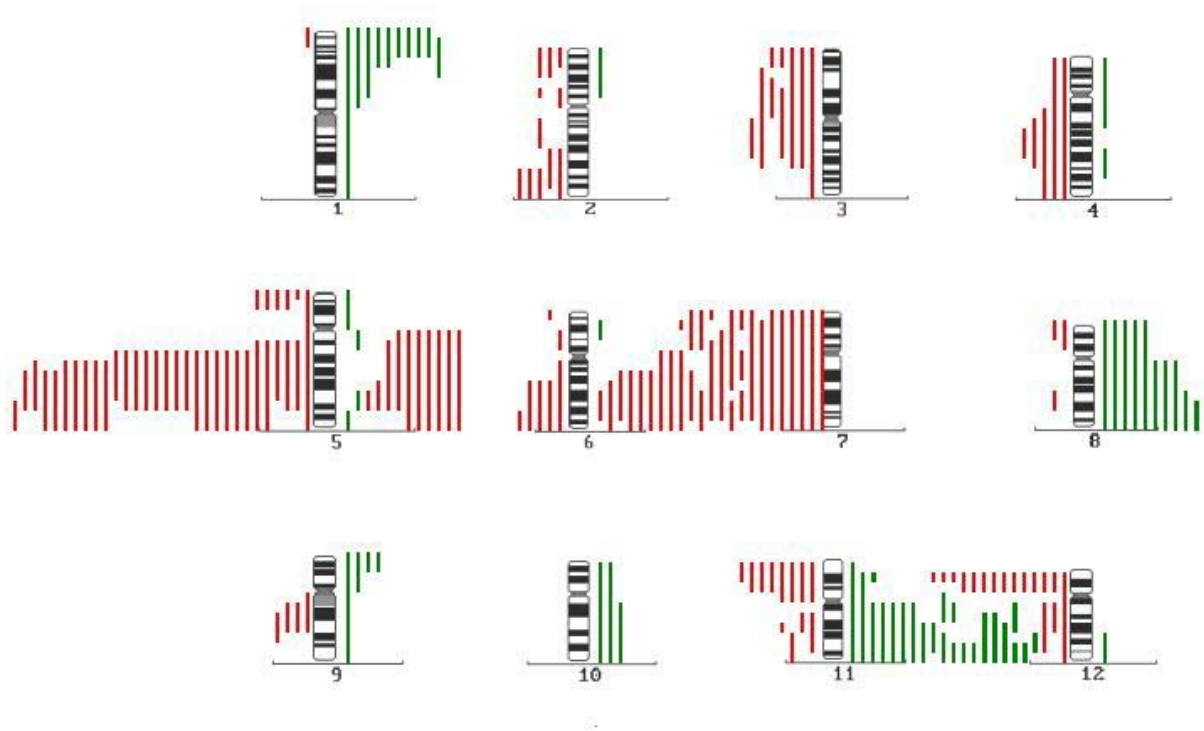


Abbildung 10a: Verluste (rot) und Zugewinne (grün) der Chromosomen 1-12 nach der CGH-Analyse bei 44 AML-Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp

Ergebnisse

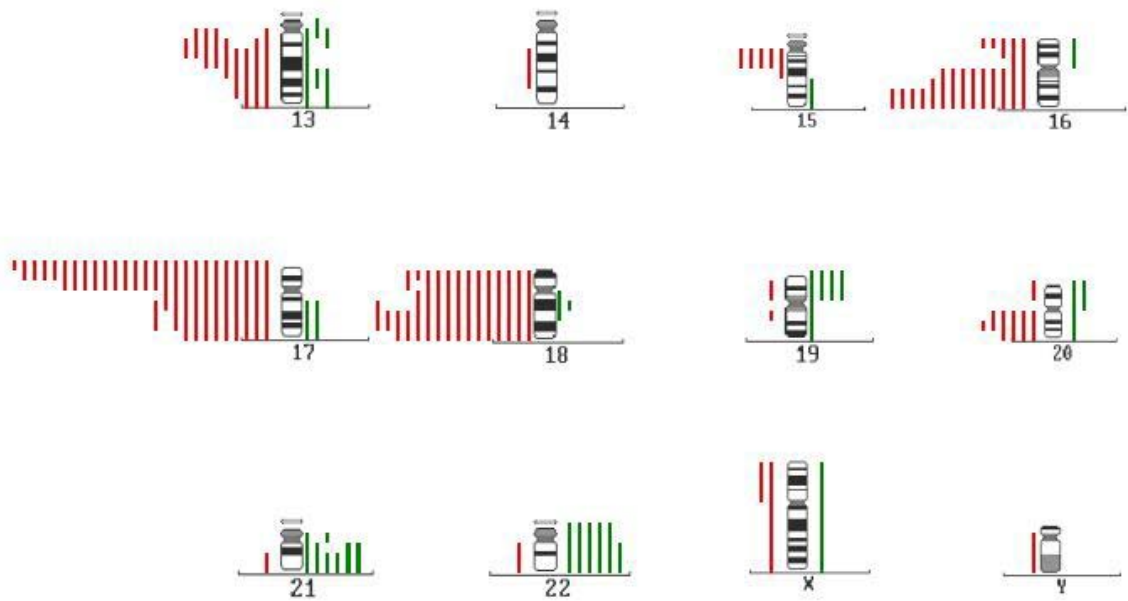


Abbildung 10b: Verluste (rot) und Zugewinne (grün) der Chromosomen 13-22, XY nach der CGH-Analyse bei 44 AML-Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp

4. Diskussion

Die akute myeloische Leukämie stellt auf klinischer, morphologischer und genetischer Ebene eine heterogene Erkrankung dar [Löwenberg, B. et al., 1999]. Dies führte zur Einteilung dieser hämatologischen Erkrankung in unterschiedliche Subgruppen in der FAB- bzw. WHO-Klassifikation [Bennett, J. M. et al., 1976; Harris, N. L. et al., 1999; World Health Organization Classification of Tumors, 2001]. Mehr als die Hälfte aller AML-Patienten zeigen genetische Veränderungen im Karyotyp [Pedersen-Bjergaard, J. und Rowley, J. D., 1994]. Hierbei wird zwischen primär balancierten und unbalancierten Veränderungen unterschieden. Während bei balancierten Aberrationen das Zusammenfügen von unterschiedlichem chromosomalen Material zur Entstehung abnormer Fusionsgene mit kanzerogenem Potential führt, kommt es bei unbalancierten Aberrationen durch den Verlust oder Zugewinn von chromosomalem Material zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bzw. zur Aktivierung bestimmter Protoonkogene [Budillon, A., 1995] (Tabelle 24 und 25). Die Folgen der veränderten Genexpression sind der Verlust der Wachstumskontrolle und die klonale Proliferation der transformierten Zellen [Appelbaum, F. R. et al., 2001]. Zytogenetische Untersuchungen zeigen, dass bei der AML sowohl balancierte wie auch unbalancierte Chromosomenaberrationen relevant sind. Weiterhin können bestimmte, für einzelne Subgruppen charakteristische Aberrationen nachgewiesen werden, welche sowohl der Aufklärung der Pathogenese wie auch der Diagnostik dienen [Schoch, C. und Haferlach, T., 2002]. Verschiedene Studien zeigen zusätzlich, dass der Karyotyp bei Erstdiagnose der AML eine entscheidende prognostische Bedeutung trägt [Arthur, D. C. et al., 1989; Mrozek, K. et al., 1997; Grimwade, D., 2001; Schoch, C. et al., 2004]. Somit lässt sich mittels der Zytogenetik die AML in prognostisch günstige, intermediäre und ungünstige Gruppen einteilen.

Insgesamt sind die Remissionsraten und die Remissionsdauer der AML mit den heutigen therapeutischen Ansätzen nicht zufriedenstellend [Buchner, T. et al., 2001]. Um risikoadaptierte Therapien entwickeln zu können, ist die Aufklärung der Leukämogenese der einzelnen Subgruppen hilfreich.

Während in den letzten Jahren einige Fortschritte in der Aufklärung der AML mit primär balancierten Aberrationen erzielt wurden, ist die Pathogenese der AML mit

Diskussion

unbalancierten Aberrationen noch unklar. Als Beispiel für einen Leukämie-Subtyp mit balancierter Chromosomenaberration sei hier die Promyelozyten-Leukämie genannt. Durch die Entdeckung der für die AML M3 spezifischen genetischen Veränderung mit der Translokation t(15;17) und der Detektion des Fusionsgens PML-RAR α konnte die Pathogenese geklärt werden [Larson, R. A. et al., 1984; Rowley, J. D., 2000]. Diese Fusion zwischen dem Gen des Retinsäure-Rezeptors α auf Chromosom 17 und dem PML-Gen auf Chromosom 15 führt zur Entwicklung eines abnormen chimären Fusionsprotein, welches eine stärkere Bindung an die Chromosomen aufweist als RAR α selbst. Dies hat ein undifferenziertes Zellwachstum zur Folge [Rousselot, P. et al., 1994]. Die Gabe von all trans Retinsäure (ATRA) überwindet diese verstärkte Bindung, erlaubt die Ablesung der durch die Retinsäure induzierten Gene und ermöglicht somit die Ausdifferenzierung leukämischer Zellen [Guidez, F. et al., 1998]. Durch die Kombination dieser spezifischen Therapie und der zusätzlichen Zytostatikatherapie können besonders günstige Ergebnisse erzielt und die Prognose erheblich verbessert werden [Lengfelder, E. et al., 2000; Fenaux, P. et al., 2001].

Den größten Anteil der Subgruppe mit unbalancierten Veränderungen machen die komplex aberranten Karyotypen aus, die bei insgesamt 10-15% aller Patienten mit einer *de novo* AML und 30-50% der t-AML vorkommen. Definitionsgemäß handelt es sich hierbei um Karyotypen, die mindestens 3 bzw. 5 Aberrationen beinhalten [Grimwade, D. et al., 1998; Schoch, C. et al., 2001a]. Diese Subgruppe zeigt eine besonders ungünstige Prognose und ein schlechtes therapeutisches Ansprechen. Aufgrund des unterschiedlichen Aberrationsmusters, der unterschiedlichen Prognose und Ansprechen auf die Therapie, scheint die AML-Subgruppe mit komplex aberrantem Karyotyp eine eigenständige biologische Entität darzustellen. Eine vollständige Aufklärung der Leukämogenese könnte helfen, für die einzelnen AML-Subgruppen spezifische und risikoadaptierte Therapien zu entwickeln. Über die genaue Leukämogenese bei dieser Subgruppe ist jedoch bisher nur wenig bekannt.

Zur besseren Aufklärung komplex aberranter Karyotypen werden unterschiedliche zytogenetische Methoden eingesetzt. Einige Studien zeigen, dass besonders der Einsatz der 24-Farben-FISH und SKY bei komplex aberranten Karyotypen aufgrund der zahlreichen Aberrationen und kryptischen Rearrangements hilfreich ist [Veldman, T. et al., 1997; Mohr, B. et al., 2000; Hilgenfeld, E. et al., 2001; Odero, M. D. et al.,

Diskussion

2001; Mrozek, K. et al., 2002]. Die Ergebnisse zeigen, dass das Aberrationsmuster bei der komplex aberranten AML besonders auf unbalancierten Rearrangements beruht. Hierbei kommt besonders häufig der Verlust von genetischem Material durch strukturelle Aberrationen vor [Schoch, C. et al., 2002a]. Häufig betroffen sind Verluste von Material 5q, 17p, 12p und Zugewinne in 11q, 21q und 8q. Mit der 24-Farben-FISH kann zusätzliches genetisches Material, wie Markerchromosome, den Chromosomen zugeordnet und kryptische Rearrangements einzelner Chromosomen besser dargestellt werden [Schrock, E. und Padilla-Nash, H., 2000]. Ein Nachteil ergibt sich aus der Tatsache, dass keine genauen Angaben über die involvierten Chromosomenbanden gemacht werden können. Hier liegt die Indikation der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH), die es ermöglicht, Vermehrungen und Verluste im genetischen Material bis auf Bandenebene den einzelnen Chromosomen zuzuordnen [Kallioniemi, A. et al., 1992].

Ziel dieser Arbeit ist das Aberrationsmuster von der AML mit komplex aberrantem Karyotyp mittels der CGH detaillierter zu beschreiben. Die Detektion häufig betroffener Regionen, die eventuell relevante Gene enthalten, die bei der Leukämogenese in dieser Subgruppe eine besondere Rolle spielen, stellt ein weiteres Ziel dar. In dieser Studie wurden 44 Patienten mit konventioneller Zytogenetik, Interphase-FISH, 24-Farben-FISH und CGH analysiert. Sie stellt derzeit die größte CGH-Studie in dieser Subgruppe dar.

Bei den meisten der vorliegenden Aberrationen fand sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der CGH, der konventionellen Zytogenetik und der 24-Farben-FISH. Die CGH konnte in allen Fällen dieser Studie zusätzliche Information erbringen. Ausschlaggebend war die Fähigkeit, mittels der CGH die verschiedenen Deletionen und Zugewinne den einzelnen chromosomalen Banden genauer zuzuordnen. Mittels der 24-Farben-FISH konnten die einzelnen betroffenen Regionen nicht genauer beschrieben werden, jedoch ließ sich mit dieser Methode die chromosomale Herkunft unbalancierter Aberrationen bzw. die Art eines Rearrangements bestimmen. Dies zeigt, dass zur genauen Eingrenzung relevanter Regionen beide Methoden benötigt werden. In einigen wenigen Fällen konnte trotz der Untersuchungen mit unterschiedlichen Methoden keine vollständige Auflösung der komplex aberranten Karyotypen erfolgen. Dies lag teilweise daran, dass bestimmte Rearrangements zu komplex waren und somit keine genaue Aussage

Diskussion

getroffen werden konnte, welche Banden an welcher der unterschiedlichen Aberrationen innerhalb eines Chromosoms beteiligt waren. Weitere Gründe für eine erschwerte und unvollständige Auflösungen mittels der CGH waren triploide Chromosomensätze oder das Vorkommen verschiedener Aberrationen in mehrere Subklonen. In der Literatur wird angegeben, dass der Nachweis einer Aberration mit der CGH erst gelingt, wenn der Anteil der Zellen, die diese Aberration tragen, bei >50% liegt. Eigene Untersuchungen zeigten, dass Aberrationen je nach Größe auch bei einem Anteil von nur 40% detektierbar sind. Limitierende Faktoren für die Detektion bestimmter Veränderungen sind weiterhin die Größe der Aberration und die Erkennungsschwelle für die CGH, die für Amplifikationen bei 2 Mb und für Deletionen bei 10-20 Mb liegt.

Die Anzahl der Aberrationen pro Karyotyp lagen im Median bei 7 (Bereich: 3-17). Die häufigsten Aberrationen in diesem Patientenkollektiv waren Verluste, die durch strukturelle Aberrationen entstanden. Dies wurde ebenfalls in weiteren Studien beobachtet [Schoch, C. et al., 2002a]. In der vorliegenden CGH-Studie konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass die Deletionen meistens größere Bereiche der einzelnen Chromosomen betreffen. Aus einigen zytogenetischen Studien geht hervor, dass besonders bei komplex aberranten Karyotypen die Chromosomen 5, 7 und 17 involviert sind [Neuman, W. L. et al., 1992]. In dieser Arbeit lagen in 91% 5q-Deletionen, in 59% 7q-Deletionen und in 61% der Fälle 17p-Deletionen vor. Verluste ganzer Chromosomen betrafen in 2% das Chromosom 5, in 16% das Chromosom 7 und in 20% das Chromosom 17. Die Beobachtung, dass diese häufig involvierten Chromosomen in Kombination auftreten [Castro, P. D. et al., 2000], konnte hier ebenfalls nachgewiesen werden. In 36% der Fälle waren die Chromosomen 5, 7 und 17 gleichzeitig betroffen. Weiterhin fanden sich in 20% der Fälle Verluste in den Chromosomen 5 und 7 und in 27% in den Chromosomen 5 und 17. In nur 2% der Fälle lag keine Aberration in einer dieser drei Chromosomen vor. Verluste in 5q ohne Beteiligung der Chromosomen 7 oder 17 lagen in 9% und in 17p nur in 2% vor. Aberrationen, die nur das Chromosom 7 ohne zusätzliche Involvierung der Chromosomen 5 oder 17 betrafen, konnten bei einem Patienten nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass diese in Kombination nachweisbaren Aberrationen Teil eines mehrstufigen pathogenetischen Prozesses darstellen [Castro, P. D. et al., 2000]. Aufgrund der Beobachtung, dass Deletionen häufiger in 5q als in 17p

Diskussion

vorliegen, vermuten Castro et al., dass die Aberrationen in 5q frühe Veränderungen darstellen, die zu einem selektiven Proliferationsvorteil der Zelle führen. Der Verlust von 17p oder weiter nachgewiesene Rearrangements führen dann zu einer malignen Transformation der Zelle, die eine abnorme Differenzierung der Zelle zur Folge hat.

Weitere häufig detektierte Verluste von chromosomalem Material in der hier vorgelegten CGH-Studie lagen in 7p, 16q, 12p, 13q bei jeweils über 20% und in 20q, 11p, 11q und 5p bei jeweils über 10% der Fälle. Strukturelle Zugewinne ließen sich in 11q in über 30% und in 21q in über 10% der Patienten darstellen. Bei den mit CGH nachgewiesenen numerischen Veränderungen waren Verluste ganzer Chromosomen häufiger vertreten als ihre Zugewinne. Monosomien lagen besonders von den Chromosomen 18 in 25%, 17 in 20% und 7 in 16% der Fälle vor. Seltener wurden Verluste der Chromosomen 16, 5, 12 und 1 beobachtet. Trisomien betrafen besonders die Chromosomen 8 in 11% und 22 in 11% der AML-Patienten. In einem Fall konnte eine Trisomie 11 mit CGH detektiert werden.

Mit der CGH gelang es zusätzlich die betroffenen Regionen involvierter Chromosomen genauer einzugrenzen. Dabei fiel auf, dass verschiedene Aberrationen häufig mehrere Banden gleichzeitig betrafen. Chromosomale Banden, die bei den verschiedenen Deletionen häufig beteiligt waren, lagen in 5q31q32, 17p13, 7q31q32, 7p22, 16q22q24, 18q21q22, 12p13, 17q21, 18p11.3, 13q14, 11p13, 3p12p14, 3q11q23, 20q12q13.2, 4q24q31, 15q12q14, 16p13.2p13.3, 6q21q26, 9q21q22. Zugewinne betrafen besonders die Banden 11q23, 1p33p36.2, 8q23q24.3, 21q22, 22q, 9p21p24, 12q13q21 und 10q.

Das chromosomale Aberrationsmuster der komplex aberranten Karyotypen der AML unterscheidet sich von den anderen Subgruppen der AML sowohl in der Anzahl als auch in der Art der Veränderungen. AML mit komplex aberrantem Karyotyp sind charakterisiert durch das Vorliegen von vor allem unbalancierten Aberrationen und einer hohen Anzahl an Chromosomenaberrationen. So finden sich in dieser Subgruppe im Median 7 Aberrationen, während AML-Subgruppen mit balancierten Aberrationen in den meisten Fällen keine oder nur eine oder zwei zusätzliche Aberrationen aufweisen. Eine genauere neue Definition der Subgruppe der AML mit komplex aberrantem Karyotyp könnte daher lauten: keine balancierten

Diskussion

Primäraberrationen sowie mindestens 5 numerische und/oder strukturelle Veränderungen im Karyotyp mit Deletionen zumindest einer der Regionen 5q, 7q oder 17p.

Aufgrund der eigen erhobenen Daten scheint besonders die Deletion in 5q eine häufige und essentielle Aberration der AML mit komplex aberrantem Karyotyp zu sein. Eine weitere Unterteilung der komplex aberranten Karyotypen in eine Gruppe mit (ca. 85%) und eine Gruppe ohne (ca. 15%) eine Deletion in 5q würde deshalb sinnvoll sein, da sich diese beiden Untergruppen in ihrer Pathogenese eventuell unterscheiden.

Interessanterweise lassen sich Parallelen zwischen dem Aberrationsmuster dieser eigenständigen Subgruppe der AML mit komplex aberranten Karyotyp und dem solider Tumoren herstellen. Zytogenetische Studien in unterschiedlichen soliden Tumoren zeigen, dass besonders Verluste und Zugewinne von chromosomalem Material vorliegen. Weiterhin kommen häufig mehrere Aberrationen gleichzeitig vor [Mitelman, F., 2000]. Höglund et al. beschreiben in einer Studie das Aberrationsverhalten bei unterschiedlichen Tumoren [Höglund, M. et al., 2002]. Hierbei zeigt sich, dass die Anzahl der Aberrationen bei soliden Tumoren häufig zwischen 1-5 liegt, wobei Tumore der Lunge, Pankreas, Ovar und Hals-Kopf zusätzliche Veränderungen bis zu 24 Aberrationen - mit einem Median von 14 bis 16 - pro Karyotyp aufweisen. Es wird vermutet, dass diese Komplexität der chromosomalen Aberrationen bei soliden Tumoren von ihrem Stadium abhängt und somit ein Zeichen der Tumorprogression darstellt [Johansson, B. et al., 1994]. Gegenstand vieler Studien ist es, pathognomonische Veränderungen, die für die einzelnen Tumore spezifisch sind, von den Aberrationen, die sich bei vielen Tumoren gleichzeitig nachweisen lassen, zu unterscheiden [Forozan, F. et al., 1997]. Hierbei können besonders mit dem Einsatz der CGH die Veränderungen genauer charakterisiert werden, da diese Methode nur eine geringe Menge an DNA benötigt und Untersuchungen von Paraffin-eingebettetem Material ermöglicht. Die in verschiedenen CGH-Studien häufig detektierten Aberrationen in unterschiedlichen soliden Tumoren sind in der Abbildung 11 zusammengefasst dargestellt. Gemeinsame Verluste, die in verschiedenen Tumoren besonders häufig vorkommen, liegen in den Regionen 3p, 6q, 8p, 9p, 13q, 16q und 17p [Knuutila, S. et al., 1999].

Diskussion

Vermehrungen in 1q, 7p, 7q, 8q und 17q können in über 20 der verschiedenen Neoplasien nachgewiesen werden [Zitzelsberger, H. et al., 1997; Knuutila, S. et al., 1998; Struski, S. et al., 2002].

Der bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp häufig detektierte Verlust in 5q konnte in einem geringeren Prozentsatz bei Tumoren der Lunge, des Ösophagus und im Hals-Kopf-Bereich gefunden werden. Seltener lässt sich diese Aberration beim Kolonkarzinom, Prostatakarzinom und Karzinome der Geschlechtsorgane wie der Brust und des Ovars nachweisen. Insgesamt kommen Deletionen in Chromosom 5/5q in 10% der *de novo* AML vor [Nimer, S. D. und Golde, D. W., 1987]. Dies könnte bedeuten, dass der Verlust von 5q eine spezifische Aberration bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp darstellt. In der hier durchgeführten Studie konnte mittels CGH in 91% der Fälle eine Deletion in 5q detektiert werden und das betroffene Material den Banden 5q23 bis 5q31.3 genauer zugeordnet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass häufig größere Bereiche in 5q deletiert vorlagen. Dies könnte darauf hinweisen, dass in der Pathogenese dieser AML mehrere Gene involviert sind. Nur wenige Gene auf 5q, die bei der Kanzerogenese eine Rolle spielen, sind bekannt. Das EGR1-Gen auf 5q31.1 hat eine regulierende Funktion im Zellzyklus [Le Beau, M. M. et al., 1993]. Alle Fälle, die in diese Studie eingingen und eine Deletion in 5q aufwiesen, zeigten in der FISH-Analyse einen Verlust dieses Gens. Interessanterweise handelte es sich bei dieser Aberration um einen Verlust nur eines Allels, wobei das andere Allel von einer Mutation nicht betroffen war. Dies bedeutet, dass das klassische Modell der Tumorsuppressorgene, welches vorsieht, dass beide Allele eines Gens inaktiviert sein müssen [Marshall, C. J., 1991], hier nicht zutrifft. Jedoch zeigt das genannte Beispiel, dass eventuell der Verlust nur eines Allels, eine sogenannte Haploinsuffizienz, für die Leukämieentstehung ausreicht. Eine weiterhin häufig deletierte Region konnte mittels CGH den Banden 5q11 bis 5q13 zugeordnet werden. Weitere Tumorsuppressorgene werden hier vermutet [Fairman, J. et al., 1996]. Ein Kandidatengen in dieser Region stellt das auf 5q13 lokalisierte SKP2-Gen dar. Dieses Gen kodiert für ein bestimmtes Protein, welches Einfluss auf den Eintritt in die S-Phase während des Zellzyklus hat [Knuutila, S. et al., 1999]. Interessanterweise konnte mit CGH in nur 6 von 44 Fällen ein Verlust des kurzen Armes von Chromosom 5 detektiert werden. Dies könnte bedeuten, dass Gene, die im kurzen Arm lokalisiert sind, für die Entstehung der

Diskussion

malignen Transformation benötigt werden oder für das Überleben leukämischer Zellen essentiell sind. Interessanterweise lassen sich in soliden Tumoren, wie der Lungen, Kopf/Hals und Uterus, Zugewinne in 5p nachweisen. Auf dem Chromosom 5 sind weitere Kandidatengene, wie RAD1 (DNA-Reparaturregulation), XRCC4 (DNA-Reparaturgen) und die Protein-Tyrosin-Kinase CL 200 (Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation) bekannt [Fairman, J. et al., 1995]. Bei der Kanzerogenese des kolorektalen Karzinoms spielen zwei Tumorsuppressorgene, das APC (Adenomatosis polyposis gen) und das MCC (mutated in colorectal cancer) auf 5q21q22, eine besondere Rolle. Mutationen des APC-Gens liegen ebenfalls in Tumoren des Magens, des Pankreas, der Schilddrüse und des Ovars vor [Laurent-Puig, P. et al., 1998].

Aberrationen, die das Chromosom 7 betreffen, zeigen ein unterschiedliches Verhalten bei der AML und den soliden Tumoren. Während bei den soliden Tumoren das Chromosom vermehrt vorliegt, ist bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp ein Verlust des Chromosoms häufig. Da die Deletionen oder die Monosomie von Chromosom 7 in soliden Tumoren nur selten detektiert werden, scheinen diese spezifisch für die AML zu sein [Johansson, B. et al., 1993]. In unserer Studie wurden mit der CGH in 26 Fällen Verluste im langen Arm von Chromosom 7 nachgewiesen. Zusätzlich ließen sich die Verluste auf die Banden 7q31q32 eingrenzen. Gene, die hierbei eine Rolle spielen, sind bisher nicht bekannt. Interessanterweise zeigten fast alle in dieser CGH-Studie untersuchten Patienten mit einer Deletion in Chromosom 7 gleichzeitig Verluste in Chromosom 5 oder 17. Einige Onkogene auf Chromosom 7, die in soliden Tumoren aktiviert werden, sind bekannt. Dabei spielt das auf 7p12 lokalisierte EGFR-Gen eine besondere Rolle in der Kanzerogenese solider Tumoren.

Die bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp detektierten Deletion in 12p scheint spezifisch für diese Erkrankung zu sein, da diese bei den soliden Tumoren nicht vorkommt. In verschiedenen zytogenetischen Studien konnte diese Deletion den Banden 12p13 zugeordnet werden [Hoglund, M. et al., 1996; Andreasson, P. et al., 1998]. Insgesamt zeigten 14 der 44 Patienten unserer Studie diese spezifische Aberration. In dieser Region liegt das ETV6-Gen (TEL). Bei der AML ist dieses Gen häufig von balancierten Aberrationen betroffen. Bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp scheint jedoch der Verlust dieses Gens eine wichtige Rolle in der

Diskussion

Pathogenese zu spielen [La Starza, R. et al., 1999]. In unserem Patientenkollektiv konnten in allen Fällen, die in der CGH Verluste in 12p zeigten, eine TEL-Deletion mit der FISH bestätigt werden. Ein weiteres Kandidatengen in dieser Region stellt das CDKN1B-Gen dar, welches ebenfalls eine regulatorische Funktion im Zellzyklus hat. In einer FISH-Studie von Odero et al. wurde bei 19 Patienten mit hämatologischen Neoplasien in 74% Deletionen der Gene ETV6 und CDKN1B detektiert. Inwiefern die Größe der Deletion prognostische Bedeutung trägt wird derzeit überprüft. Streubel et al. zeigen in einer Studie, dass Patienten mit Verlust eines größeren Bereichs in 12p oder zusätzlich komplexen Aberrationen, eine ungünstigen Prognose haben [Streubel, B. et al., 1998].

Deletionen auf Chromosom 13q sind sowohl bei hämatologischen als auch bei soliden Tumoren vorhanden. In unserer Studie lagen in 9 Fällen die Banden 13q14 deletiert vor. Ein bereits bekanntes Tumorsuppressorgen ist auf 13q14.3 lokalisiert. Dieses RB1Gen (retinoblastoma 1) liegt in mehreren unterschiedlichen Tumoren, wie beispielsweise beim Retinoblastom, Osteosarkom, kleinzelligem Bronchial-, Brust- und Blasen-Karzinom, wie auch bei hämatologischen Neoplasien deletiert vor [Juneau, A. L. et al., 1998]. In unserer Studie konnte in 8 von 9 Fällen mit einer Deletion in diesem Bereich eine RB-Deletion mittels FISH bestätigt werden. Interessanterweise konnte die CGH in zwei Fällen (Nr. 39, 40) diese Aberration erkennen, obwohl diese jeweils nur in Subklonen vorhanden waren. 13q14 enthält weitere Kandidatengene, wie Leu 1 und Leu 2 (leukemia associated gene), die bei der chronischen lymphatischen Leukämie deletiert sind [Liu, Y. et al., 1997]. Der Verlust des BRCA2-Gens, welches auf 13q12.3 lokalisiert ist, spielt eine wesentliche Rolle in der Kanzerogenese des Mammakarzinoms, des Ovarialkarzinoms und des Prostatakarzinoms [Wooster, R. et al., 1994]. Ein weiteres Tumorsuppressorgen, das ING1 (inhibitor of growth1)-Gen auf Chromosom 13, ist bei der Entstehung der Tumoren des Hals/Kopf-Bereiches involviert [Maestro, R. et al., 1996].

Verluste in 16q können – wie bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp - besonders beim hepatozellulären Karzinom und bei den Karzinomen der Geschlechtsorgane wie Brust, Ovarien und Prostata nachgewiesen werden. Auch bei Lungenkarzinomen kommen in einigen wenigen Fällen Verluste in 16q vor. In der hier vorgestellten Studie lag bei den Patienten mit AML und komplex aberrantem

Diskussion

Karyotyp ein Verlust in 16q in 14 Fällen vor. Mehrere Kandidatengene auf dem langen Arm des Chromosoms 16 sind bekannt. Besonders bei der AML spielt das CBF β -Gen eine besondere Rolle. Dieses Gen stellt eine Untereinheit des CBF (core binding factor)-Transkriptionskomplexes dar, der eine essentielle Funktion in der normalen Hämatopoese im Knochenmark hat [Hart, S. M. und Foroni, L., 2002]. Eine Deletion dieses Gens konnte in unserer Studie mit FISH in 13 Patienten bestätigt werden. Bei soliden Tumoren scheint ein weiteres Gen, das RB2/p130-Gen (16q12.2), bei der Entwicklung von Metastasen beim Lungenkarzinom von besonderer Bedeutung zu sein. Deletionen des CMAR-Gens (cell matrix adhesion regulator) auf 16q24.3 liegen sowohl beim kolorektalen, wie auch beim hepatozellulären Karzinom vor. Weiterhin lassen sich das CTCF-Gen und das CDH1-Gen auf 16q22.1 als Kandidatengen bei der Entstehung des Mammakarzinoms nachweisen. Das CDH13-Gen auf 16q24.2 scheint eine Rolle bei der Pathogenese der Lungentumoren zu spielen [Knuutila, S. et al., 1999]

Verluste in 17p liegen besonders in den Tumoren der Lunge, des Gastrointestinaltraktes, der Brust und dem hepatozellulären Karzinom vor. Hierbei liegt das Tumorsuppressorgen TP53, welches auf 17p13 lokalisiert ist, bei vielen Tumoren deletiert vor [Isobe, M. et al., 1986; Hollstein, M. et al., 1991; Levine, A. J. et al., 1991]. In unserer CGH-Studie zeigten alle 27 Patienten, die eine Deletion in 17p mit CGH aufwiesen, einen Verlust des TP53-Gens in FISH. In insgesamt 3 zusätzlichen Fällen (Nr. 34, 36, 40) konnte die TP53-Deletion nur in der FISH nachgewiesen werden und blieb in der CGH unerkant. Dieses Gen spielt bei der Replikation fehlerhafter DNA eine inhibierende Rolle [Polyak, K. et al., 1997]. Der Verlust nur eines Allels scheint hier ebenfalls einen leukämogenen Effekt zu haben [Fenaux, P. et al., 1991]. Die Deletion des TP53-Gens scheint mit einer erhöhten Therapieresistenz und einer ungünstigen Prognose assoziiert zu sein [Christiansen, D. H. et al., 2001]. Verluste auf Chromosom 17 scheinen bei den soliden Tumoren nur auf den kurzen Arm begrenzt zu sein, da diese zusätzlich Zugewinne von 17q aufweisen. Ein wichtiges Kandidatengen, das bei den soliden Tumoren wie der Lunge oder der Mamma in diesem Bereich vermehrt vorliegt, ist das ERBB-Gen. Dieses Aberrationsmuster unterscheidet sich von dem der AML mit komplex aberrantem Karyotyp aufgrund der hier häufig detektierten Monosomie 17. Eventuell liegen auf dem langen Arm bestimmte Tumorsuppressorgene, die für die Entstehung

Diskussion

der Leukämien eine besondere Rolle spielen. Einige Tumorsuppressorgene, die auf dem langen Arm liegen, sind das BCRA1 und das NF1 (neurofibromatosis 1)-Gen.

Verluste von chromosomalem Material in Chromosom 18 scheinen bei den soliden Tumoren auf den langen Arm begrenzt. Diese Veränderung liegt besonders in gastrointestinalen Tumoren, aber auch in Lungentumoren und Tumoren der Geschlechtsorgane vor. In unserer Studie wiesen 16 Patienten Verluste in dieser Region auf. Der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 18 scheint eine spezifische Aberration für die AML zu sein, da diese bei soliden Tumoren nicht vorkommt. In unserem Patientenkollektiv konnten in 13 Fällen Deletionen in 18p detektiert werden. Eventuell liegen hier bestimmte Tumorsuppressorgene, die für die Entwicklung der AML eine besondere Rolle spielen. Auf dem langen Arm des Chromosom 18 befinden sich in der Bande 18q21 das DCC (deleted in colorectal carcinoma) und das DPCA4 (deleted in pancreatic carcinoma)-Gen. Das DPCA-Gen, welches insbesondere bei den Pankreastumoren deletiert vorliegt, ist bei der Progression des Kolonkarzinoms relevant. Das DCC-Gen scheint besonders bei der Apoptoseinduktion involviert zu sein [Mehlen, P. et al., 1998]. Jedoch können Deletionen dieses Gens ebenfalls in weiteren soliden Tumoren und in hämatologischen Tumoren gefunden werden [Porfiri, E., 1995]. Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 18 sind derzeit noch keine Tumorsuppressorgene bekannt.

Verluste des langen Armes in Chromosom 20 kommen außer bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp nur beim Mammakarzinom vor. Verantwortliche Tumorsuppressorgene sind nicht bekannt. Mittels der CGH konnte in einigen Studien die relevante chromosomale Bande 20q12 eingegrenzt werden [Wang, P. W. et al., 1998]. In unserer CGH-Studie wiesen 6 Patienten eine Deletion dieser Bande auf, die mittels FISH in allen Patienten bestätigt wurde. In dieser Region befinden sich einige Kandidatengene wie PLCG1, HNF4, TOP1, MYBB und ADA [Asimakopoulos, F. A. und Green, A. R., 1996].

Die Vermehrungen des Chromosoms 8 bei soliden Tumoren scheinen im Gegensatz zu der AML auf den langen Arm begrenzt zu sein. Diese Aberration liegt besonders in Tumoren der Lunge, des Kopfes/Halses, der Geschlechtsorgane, des Gastrointestinaltraktes und der Leber vor. Bei der AML lassen sich in 5-15% der Fälle

Diskussion

eine Trisomie 8 detektieren [Mitelman, F. und Heim, S., 1992]. Über den Mechanismus dieser Veränderung, der zu einer malignen Transformation oder zur Tumorprogression führt, ist weiterhin wenig bekannt. In unserer CGH-Studie konnte in 5 Fällen ein Zugewinn dem kurzen Arm und in 9 Fällen dem langen Arm zugeordnet werden. Zusätzlich konnte bei einem Fall (Nr.32) mit CGH eine Amplifikation in 8q22q24 beschrieben werden. In dieser Region liegt das bekannte CMYC-Oncogen, welches in der FISH-Analyse in allen Fällen vermehrt vorlag. Patient Nr. 32 zeigte in der FISH-Analyse nur einen einfachen Zugewinn des Gens. Diese Beobachtung zeigt, daß bei einer Vermehrung oder Amplifikation in diesem Bereich weitere Gene betroffen sein müssen. Kandidatengene, die in der Pathogenese der AML eventuell betroffen sein könnten, sind MOZ und FGFR1 auf 8p11 und ETO auf 8q22. Im Gegensatz zur AML zeigen solide Tumore häufig Verluste im kurzen Arm von Chromosom 8, so dass ein Isochromosom 8q nachgewiesen werden kann. Bei unserem Patientenkollektiv konnte bei einem Patienten diese Aberration detektiert werden. Eventuell liegen im kurzen Arm bestimmte Tumorsuppressorgene, die in der Pathogenese involviert sind.

Vermehrungen in der Region 11q kommen in soliden Tumoren eher selten vor, können jedoch bei Tumoren des Kopf/Halsbereiches, des Ösophagus, der Leber, der Lunge, der Mamma und der Ovarien beobachtet werden. In einigen Studien an hämatologischen Erkrankungen ließ sich der Zugewinn auf die Region 11q23 eingrenzen. In dieser Region ist das MLL-Gen lokalisiert, welches häufig an verschiedenen Rearrangements beteiligt ist [Ziemin-van der Poel, S. et al., 1991; Rowley, J. D., 1993]. Das MLL-Gen spielt besonders bei der Zelldifferenzierung und bei der Wachstumsregulation der Zellen eine Rolle [Martin, M. E. et al., 2003]. Schoch et al. konnten bei einem Patientenkollektiv von 1897 AML-Fällen MLL-Rearrangements mit einer Inzidenz von 2,8% nachweisen. Diese Aberrationen korrelierten mit dem FAB-Subtyp M4 und M5 und zeigten eine ungünstige Prognose [Schoch, C. et al., 2003]. Weiterhin lassen sich von den 11q23-Translokationen die MLL-Tandem-Duplikation abgrenzen, die jedoch insgesamt bei der AML seltener nachgewiesen werden [Schnittger, S. et al., 2000]. Die MLL-Tandem-Duplikation scheint eine besondere Rolle bei der AML mit normalem Karyotyp zu spielen und geht mit einer ungünstigen Prognose einher. Die in dieser Region detektierte Genamplifikation könnte einen weiteren wichtigen Mechanismus bei der Entstehung

Diskussion

einer AML mit komplex aberrantem Karyotyp darstellen. In unserer Studie war es mittels der CGH möglich 11q23-Amplifikationen bei den komplex aberranten Karyotypen zu detektieren. Dieser Befund könnte auf eine unterschiedliche Pathogenese der Subgruppe der komplex aberranten Karyotypen hindeuten, da diese Art der Aberration in den anderen Subgruppen der AML selten vorkommt [Streubel, B. et al., 2000; Andersen, M. K. et al., 2001]. Besonders häufig ließen sich Amplifikationen im langen Arm des Chromosoms 11 nachweisen, wobei die Banden 11q22q24 in 6/6 Patienten hauptsächlich betroffen waren. In 5 dieser 6 Fälle konnte in der FISH eine MLL-Amplifikation nachgewiesen werden. Dieser Befund und die Tatsache, dass mehrere Banden (11q22 bis 11q24) involviert waren, könnten darauf hinweisen, dass weitere Gene in dieser Region in der Leukämogenese dieser Subgruppe eine Rolle spielen. Kandidatengene in dieser Region sind DDX6, ETS1, FLI1, PLZF, CBL, SRPR, NFRK β , KCNJ5, FN β 1 und CDKN2A [Michaux, L. et al., 2000; Poppe, B. et al., 2004]. Auf 11q23.3 liegt weiterhin das ATM- (ataxia telangiectasia mutated) Gen, welches als Tumorsuppressorgen in der Regulation des Zell-Zyklus und im Zellschutz Funktionen ausübt [Rotman, G. und Shiloh, Y., 1997]. Inwieweit diese Gene in der Pathogenese involviert sind, werden weitere molekulargenetische Studien zeigen. Deletionen des kurzen Armes auf Chromosom 11 können zu Verlusten bestimmter Gene, wie dem WT1 (wilmstumor1)-Gen auf 11p13, CDKN1C auf 11p15.5 oder weiterer Tumorsuppressorgene führen.

Mit der CGH ließen sich weiterhin Vermehrungen in Chromosom 21 in 7 Fällen nachweisen. Zwei Patienten zeigten eine Amplifikation im Bereich des langen Armes, wobei die Bande 21q11q22 immer betroffen war. In dieser Region liegt das AML1-Gen, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert und regulatorische Funktionen in der Expression für die Hämatopoese relevanter Gene hat. Die FISH-Analyse konnte in einem Fall die Amplifikation des Gens bestätigen, in dem anderen Fall jedoch nur einen einfachen Zugewinn nachweisen.

Vermehrungen in Chromosom 22 kommen selten in Tumoren der Lunge, des Kopfes/Halses und der Brust vor. In dieser Arbeit lagen in 6 Fällen Vermehrungen im langen Arm von Chromosom 22 bei der AML vor. Gene dieser Region, die bei der Leukämogenese eine Rolle spielen könnten, sind bisher noch nicht bekannt.

Diskussion

Einige Studien konnten ebenfalls Amplifikationen besonders der Regionen 8q, 11q, 21q und 22q mittels zytogenetischer Methoden in der AML mit komplex aberrantem Karyotyp nachweisen [Hilgenfeld, E. et al., 2001; Mrozek, K. et al., 2002]. In der Literatur wird angegeben, dass Patienten mit Amplifikationen besonders in 8q eine schlechtere Prognose im Gegensatz zu komplex aberranten Karyotypen ohne Amplifikationen in diesem Bereich haben [Bruckert, P. et al., 2000]. Eine SKY-Studie von Mrozek et al. konnte zeigen, dass 8 von 29 Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp eine Amplifikation in 21q aufwiesen. In allen Fällen wurde eine FISH-Analyse mit der AML1 (Runx1)-Sonde durchgeführt, jedoch zeigte nur einer von 8 Patienten eine Amplifikation des AML1-Gens. Mrozek et al. vermuten hier weitere Gene, die in der Pathogenese der AML mit komplex aberrantem Karyotyp involviert sind. Die Genamplifikation scheint für die AML mit komplex aberrantem Karyotyp ein spezifisches Ereignis darzustellen, da diese Art der Veränderungen in soliden Tumoren nur selten nachzuweisen sind. Welche Rolle die Genamplifikation hierbei spielt, ist noch nicht vollständig aufgelöst. Michaux et al. vermuten, dass diese Aberrationen einen selektiven Vorteil für leukämische Zellen schaffen könnten. Es scheint jedoch klar zu sein, dass eine Amplifikation in dieser Region besonders bei komplex aberrantem Karyotyp vorkommt und mit einer schlechteren Prognose einhergeht [Michaux, L. et al., 2000; Andersen, M. K. et al., 2001].

Vergleicht man die Veränderungen im Karyotyp solider Tumore und deren Häufigkeit mit unseren AML-Daten, lassen sich bestimmte Aberrationsmuster bei den unterschiedlichen Tumoren erkennen. Dabei können Veränderungen, die in den unterschiedlichen Tumoren gleichzeitig, von denen, die besonders bei der AML und selten bei den soliden Tumoren vorliegen, unterschieden werden. Aberrationen, die sowohl bei den soliden Tumoren als auch bei der AML vorkommen, sind insbesondere Verluste in 17p, 13q, 18q und 16q und Vermehrungen in 8q. Diese Aberrationen könnten als Zeichen der Tumorprogression bewertet werden, die den Zellen unabhängig von ihrer Gewebeabstammung einen Selektionsvorteil bieten. Genetische Veränderungen, die bei der AML häufig, bei soliden Tumoren jedoch nur selten detektiert werden, sind Verluste in Chromosom 5q, 7, 12p und 20q und Zugewinne in 8p, 21q und 22q. Diese Regionen tragen eventuell spezifische Gene, deren Aktivitätsänderung bei der Pathogenese der AML mit komplex aberrantem Karyotyp eine wichtige Rolle spielen.

Diskussion

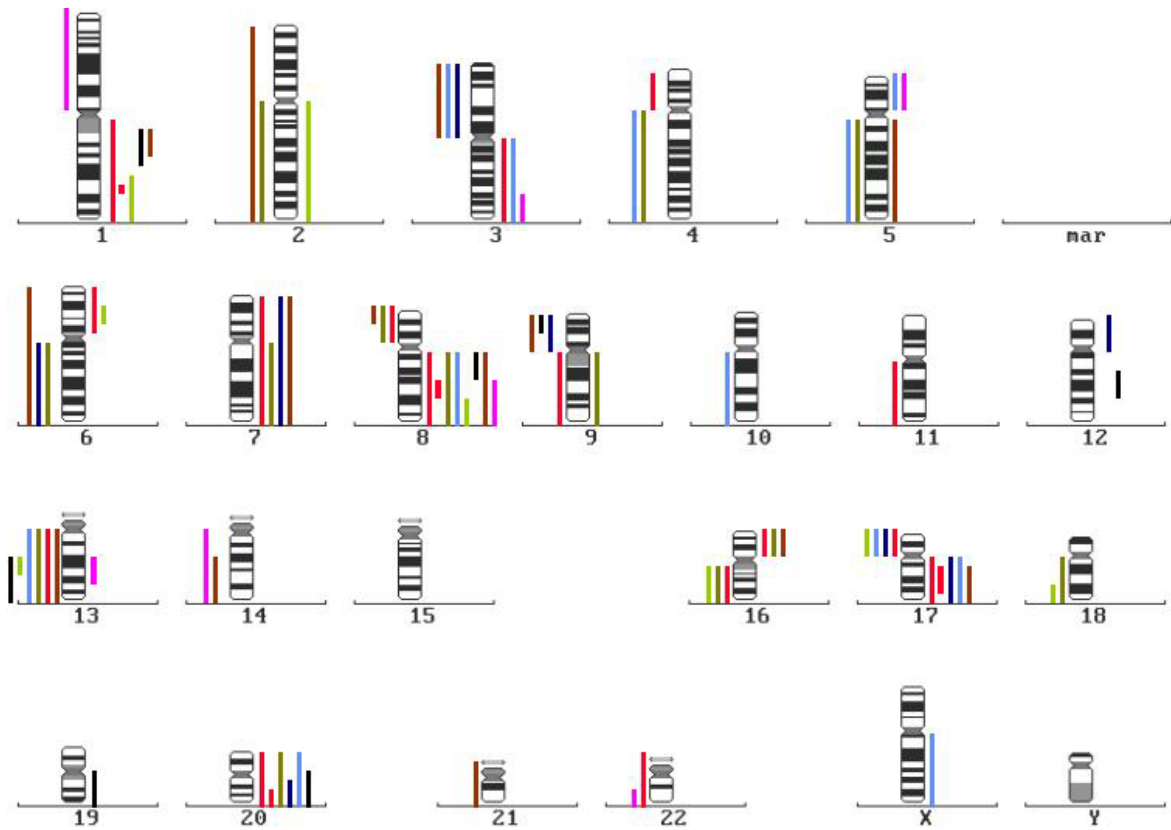


Abbildung 11: Verluste und Zugewinne bei soliden Tumoren nach CGH-Analysen.

Verluste sind links und Zugewinne rechts der Chromosomenachse dargestellt. Die einzelnen soliden Tumore sind unterschiedlich farblich dargestellt.

Prostata-Karzinom **Mamma-Karzinom**

Pankreas-Karzinom **Ovarial-Karzinom**

Nieren-Karzinom **Gastrointestinale Tumore**

Kleinzelliges Bronchial-Karzinom

Hepatozelluläres Karzinom

Diskussion

Funktion	Lokalisation	Gen
Signaltransduktion	5q21	APC
	5q31.1	EGR-1
	16q22	DCC
	18q21	E-Cadherin/CDH1
	18q21	DPCA
DNA-Reparatur	2p16	MSh2
	2q31q33	PMS1
	13q12	BRCA-2
	17q21	BRCA-1
Transkriptionsfaktor	13q14	RB1
	17p13	TP53
	11p13	WT1

Tabelle 24: Tumorsuppressorgene

Funktion	Lokalisation	Gen
DNA-Bindungsproteine	1p34.3	MYCL1
	2p24.3	MYCN
	2p12p13	REL
	6q22q23	MYB
	8q24	MYC
GTPase	1p13	NRAS
	11p15.5	HRAS1
	12p12	KRAS2
Weitere	11q13.3	BCL1
	11q13.3	HSTF1
	11q13.3	INT2
	18q21	BCL2

Tabelle 25: Onkogene

5. Zusammenfassung

Die AML mit komplex aberrantem Karyotyp stellt die größte Gruppe der Patienten mit unbalancierten Karyotypveränderungen dar. Während die Häufigkeit bei der *de novo* AML bei insgesamt 10-15% liegt, kann diese Subgruppe besonders bei der t-AML mit 30-50% nachgewiesen werden. Zusätzlich liegt bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp eine altersabhängige Inzidenz mit einem Anteil von 12,8 % bei Patienten unter 60 und 16,5 % über dem 60. Lebensjahr vor. Diese Gruppe der AML zeigt eine besonders ungünstige Prognose. Unterschiedliche therapeutische Ansätze konnten bisher die Prognose dieser Gruppe nicht verbessern. Über die Pathogenese dieses AML-Subtyps ist nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es den komplex aberrantem Karyotyp bei insgesamt 44 AML-Patienten mittels verschiedener zytogenetischer Methoden genauer zu charakterisieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp besonders Verluste durch strukturelle Aberrationen häufiger auftreten als Zugewinne von genetischem Material. Dies könnte bedeuten, dass die Inaktivierung bestimmter Tumorsuppressorgene eine vorrangige Rolle bei der Pathogenese spielt. Alternativ könnte das Model der Haploinsuffizienz genetisch bedeutsam sein. Weiterhin konnte mittels CGH nachgewiesen werden, dass größere Regionen bei dieser Subgruppe von verschiedenen Aberrationen betroffen sind. Bereiche, die besonders häufig deletiert vorliegen, betreffen die Chromosomen 5q (91%), 7q (59%) und 17p (61%), während nur 2% keine Veränderungen in zumindest einer dieser Chromosomen zeigen. Zusätzlich lagen in 36% der Fälle eine Kombination dieser drei Aberrationen vor.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass besonders bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp die Anwendung unterschiedlicher zytogenetischer Methoden einer detaillierten Auflösung der Karyotyp-Veränderungen dient. Besonders CGH kann hierbei zusätzliche Information erbringen. Mittels CGH konnten Regionen, die von Deletionen und Vermehrungen besonders häufig bei der AML betroffen sind, genauer den chromosomalen Banden zugeordnet werden. Weiterhin ließen sich mittels CGH Amplifikationen vor allem in 11q nachweisen. Dies könnte bedeuten, dass bei der Pathogenese der komplex aberranten AML der

Zusammenfassung

Gendosisseffekt eine besondere Rolle spielt. Insgesamt scheint bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp besonders die Komplexität unterschiedlicher Rearrangements und weniger die einzelnen Aberrationen für die Kanzerogenese und ungünstige Prognose verantwortlich zu sein. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten lassen eine detaillierte Definition der AML mit komplex aberrantem Karyotyp als eigene Entität sinnvoll erscheinen. Diese beinhaltet das Fehlen einer spezifischen, primär balancierten Chromosomenaberration, 5 oder mehr klonale numerische und/oder strukturelle Aberrationen und das Vorhandensein einer Deletion mindestens einer der chromosomalen Banden 5q31, 7q31 und 17p13.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Andersen, M. K., Christiansen, D. H., Kirchhoff, M. und Pedersen-Bjergaard, J. Duplication or amplification of chromosome band 11q23, including the unrearranged MLL gene, is a recurrent abnormality in therapy-related MDS and AML, and is closely related to mutation of the TP53 gene and to previous therapy with alkylating agents. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31:33-41.
- (2) Andersen, M. K., Johansson, B., Larsen, S. O. und Pedersen-Bjergaard, J. Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML. Relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements. *Haematologica* 1998; 83:483-488.
- (3) Andreasson, P., Johansson, B., Billstrom, R., Garwicz, S., Mitelman, F. und Hoglund, M. Fluorescence in situ hybridization analyses of hematologic malignancies reveal frequent cytogenetically unrecognized 12p rearrangements. *Leukemia* 1998; 12:390-400.
- (4) Appelbaum, F. R., Rowe, J. M., Radich, J. und Dick, J. E. Acute myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2001; 62-86.
- (5) Arthur, D. C., Berger, R., Golomb, H. M., Swansbury, G. J., Reeves, B. R., Alimena, G., Van Den, Berghe H., Bloomfield, C. D., de la, Chapelle A., Dewald, G. W. und . The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 40:203-216.
- (6) Asimakopoulos, F. A. und Green, A. R. Deletions of chromosome 20q and the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1996; 95:219-226.
- (7) Barth, T. F., Benner, A., Bentz, M., Dohner, H., Moller, P. und Lichter, P. Risk of false positive results in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28:353-7.
- (8) Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. und Sultan, C. Proposals for the classification of the acute

Literaturverzeichnis

- leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33:451-458.
- (9) Bentz, M., Plesch, A., Stilgenbauer, S., Dohner, H. und Lichter, P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21:172-175.
- (10) Bernasconi, P., Cavigliano, P. M., Boni, M., Calatroni, S., Klersy, C., Giardini, I., Rocca, B., Crosetto, N., Caresana, M., Lazzarino, M. und Bernasconi, C. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. *Leukemia* 2003; 17:2107-2112.
- (11) Bitter, M. A., Le Beau, M. M., Rowley, J. D., Larson, R. A., Golomb, H. M. und Vardiman, J. W. Associations between morphology, karyotype, and clinical features in myeloid leukemias. *Hum Pathol* 1987; 18:211-225.
- (12) Bloomfield, C. D. Clinical importance of genetic findings in adult AML. *Int J Hematol* 2002; 76 Suppl 2:176-177.
- (13) Bloomfield, C. D., Lawrence, D., Byrd, J. C., Carroll, A., Pettenati, M. J., Tantravahi, R., Patil, S. R., Davey, F. R., Berg, D. T., Schiffer, C. A., Arthur, D. C. und Mayer, R. J. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 1998; 58:4173-4179.
- (14) Bonnet, D. und Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3:730-737.
- (15) Broudy, V. C. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997; 90:1345-1364.
- (16) Bruckert, P., Kappler, R., Scherthan, H., Link, H., Hagmann, F. und Zankl, H. Double minutes and c-MYC amplification in acute myelogenous leukemia: Are they prognostic factors? *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 120:73-79.

Literaturverzeichnis

- (17) Buchner, T., Hiddemann, W., Schoch, C., Haferlach, T., Sauerland, M. C. und Heinecke, A. Acute myeloid leukaemia (AML): treatment of the older patient. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14:139-151.
- (18) Budillon, A. Molecular genetics of cancer. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer* 1995; 76:1869-1873.
- (19) Burnett, A. K., Grimwade, D., Solomon, E., Wheatley, K. und Goldstone, A. H. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. *Blood* 1999; 93:4131-4143.
- (20) Byrd, J. C., Mrozek, K., Dodge, R. K., Carroll, A. J., Edwards, C. G., Arthur, D. C., Pettenati, M. J., Patil, S. R., Rao, K. W., Watson, M. S., Koduru, P. R., Moore, J. O., Stone, R. M., Mayer, R. J., Feldman, E. J., Davey, F. R., Schiffer, C. A., Larson, R. A. und Bloomfield, C. D. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; 100:4325-4336.
- (21) Caligiuri, M. A., Strout, M. P. und Gilliland, D. G. Molecular biology of acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997; 24:32-44.
- (22) Campos, L., Guyotat, D., Archimbaud, E., Calmard-Oriol, P., Tsuruo, T., Troncy, J., Treille, D. und Fiere, D. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 1992; 79:473-476.
- (23) Castilla, L. H., Wijmenga, C., Wang, Q., Stacy, T., Speck, N. A., Eckhaus, M., Marin-Padilla, M., Collins, F. S., Wynshaw-Boris, A. und Liu, P. P. Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CBF β -MYH11. *Cell* 1996; 87:687-696.
- (24) Castro, P. D., Liang, J. C. und Nagarajan, L. Deletions of chromosome 5q13.3 and 17p loci cooperate in myeloid neoplasms. *Blood* 2000; 95:2138-2143.

Literaturverzeichnis

- (25) Cheson, B. D., Cassileth, P. A., Head, D. R., Schiffer, C. A., Bennett, J. M., Bloomfield, C. D., Brunning, R., Gale, R. P., Grever, M. R., Keating, M. J. und . Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1990; 8:813-819.
- (26) Christiansen, D. H., Andersen, M. K. und Pedersen-Bjergaard, J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001; 19:1405-1413.
- (27) Dastugue, N., Payen, C., Lafage-Pochitaloff, M., Bernard, P., Leroux, D., Huguet-Rigal, F., Stoppa, A. M., Marit, G., Molina, L., Michallet, M. und . Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group. *Leukemia* 1995; 9:1491-1498.
- (28) du Manoir, S., Schrock, E., Bentz, M., Speicher, M. R., Joos, S., Ried, T., Lichter, P. und Cremer, T. Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; 19:27-41.
- (29) du Manoir, S., Speicher, M. R., Joos, S., Schrock, E., Popp, S., Dohner, H., Kovacs, G., Robert-Nicoud, M., Lichter, P. und Cremer, T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 1993; 90:590-610.
- (30) Estey, E. H. Early blast clearance by remission induction as a prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep* 2003; 5:389.
- (31) Fairman, J., Chumakov, I., Chinault, A. C., Nowell, P. C. und Nagarajan, L. Physical mapping of the minimal region of loss in 5q- chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:7406-7410.
- (32) Fairman, J., Wang, R. Y., Liang, H., Zhao, L., Saltman, D., Liang, J. C. und Nagarajan, L. Translocations and deletions of 5q13.1 in myelodysplasia and acute myelogenous leukemia: evidence for a novel critical locus. *Blood* 1996; 88:2259-2266.

Literaturverzeichnis

- (33) Fenaux, P., Chomienne, C. und Degos, L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol* 2001; 38:13-25.
- (34) Fenaux, P., Jonveaux, P., Quiquandon, I., Lai, J. L., Pignon, J. M., Loucheux-Lefebvre, M. H., Bauters, F., Berger, R. und Kerckaert, J. P. P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 1991; 78:1652-1657.
- (35) Fenaux, P., Preudhomme, C., Lai, J. L., Morel, P., Beuscart, R. und Bauters, F. Cytogenetics and their prognostic value in de novo acute myeloid leukaemia: a report on 283 cases. *Br J Haematol* 1989; 73:61-67.
- (36) Ferrara, F. und Mirto, S. Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukaemia of the elderly. *Br J Haematol* 1996; 92:627-631.
- (37) Fialkow, P. J., Singer, J. W., Raskind, W. H., Adamson, J. W., Jacobson, R. J., Bernstein, I. D., Dow, L. W., Najfeld, V. und Veith, R. Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1987; 317:468-473.
- (38) Forozan, F., Karhu, R., Kononen, J., Kallioniemi, A. und Kallioniemi, O. P. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997; 13:405-9.
- (39) Frohling, S., Skelin, S., Liebisch, C., Scholl, C., Schlenk, R. F., Dohner, H. und Dohner, K. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2002; 20:2480-2485.
- (40) Grimwade, D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14:497-529.
- (41) Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A. und Goldstone, A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients

Literaturverzeichnis

- entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92:2322-2333.
- (42) Guidez, F., Ivins, S., Zhu, J., Soderstrom, M., Waxman, S. und Zelent, A. Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RAR α underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1998; 91:2634-2642.
- (43) Haferlach, T., Bennett, J. M., Löffler, H., Gassmann, W., Andersen, J. W., Tuzuner, N., Cassileth, P. A., Fonatsch, C., Schoch, C., Schlegelberger, B., Becher, R., Thiel, E., Ludwig, W. D., Sauerland, M. C., Heinecke, A. und Buchner, T. Acute myeloid leukemia with translocation (8;21). Cytomorphology, dysplasia and prognostic factors in 41 cases. AML Cooperative Group and ECOG. *Leuk Lymphoma* 1996; 23:227-34.
- (44) Haferlach, T., Kohlmann, A., Kern, W., Hiddemann, W., Schnittger, S. und Schoch, C. Gene expression profiling as a tool for the diagnosis of acute leukemias. *Semin Hematol* 2003a; 40:281-295.
- (45) Haferlach, T. und Schoch, C. [Modern techniques in leukemia diagnosis]. *Internist (Berl)* 2002a; 43:1190-1202.
- (46) Haferlach, T. und Schoch, C. [WHO classification of acute myeloid leukaemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS)]. *Dtsch Med Wochenschr* 2002b; 127:447-450.
- (47) Haferlach, T., Schoch, C., Löffler, H., Gassmann, W., Kern, W., Schnittger, S., Fonatsch, C., Ludwig, W. D., Wuchter, C., Schlegelberger, B., Staib, P., Reichle, A., Kubica, U., Eimermacher, H., Balleisen, L., Gruneisen, A., Haase, D., Aul, C., Karow, J., Lengfelder, E., Wormann, B., Heinecke, A., Sauerland, M. C., Buchner, T. und Hiddemann, W. 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* 2003b; 21:256-265.

Literaturverzeichnis

- (48) Haferlach, T., Schoch, C., Schnittger, S., Kern, W., Löffler, H. und Hiddemann, W. Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients. *Br J Haematol* 2002; 118:426-431.
- (49) Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A. und Bloomfield, C. D. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17:3835-3849.
- (50) Hart, S. M. und Foroni, L. Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica* 2002; 87:1307-1323.
- (51) Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H. und Naoe, T. Tandem-duplicated FIt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19:624-631.
- (52) Hermsen, M. A., Meijer, G. A., Baak, J. P., Joenje, H. und Walboomers, J. J. Comparative genomic hybridization: a new tool in cancer pathology. *Hum Pathol* 1996; 27:342-9.
- (53) Hiddemann, W., Kern, W., Schoch, C., Fonatsch, C., Heinecke, A., Wormann, B. und Buchner, T. Management of acute myeloid leukemia in elderly patients. *J Clin Oncol* 1999; 17:3569-3576.
- (54) Hilgenfeld, E., Padilla-Nash, H., McNeil, N., Knutsen, T., Montagna, C., Tchinda, J., Horst, J., Ludwig, W. D., Serve, H., Buchner, T., Berdel, W. E., Schrock, E. und Ried, T. Spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization detect novel chromosomal aberrations, a recurring involvement of chromosome 21 and amplification of the MYC oncogene in acute myeloid leukaemia M2. *Br J Haematol* 2001; 113:305-317.
- (55) Hoglund, M., Gisselsson, D., Sall, T. und Mitelman, F. Coping with complexity. multivariate analysis of tumor karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 135:103-109.

Literaturverzeichnis

- (56) Hoglund, M., Johansson, B., Pedersen-Bjergaard, J., Marynen, P. und Mitelman, F. Molecular characterization of 12p abnormalities in hematologic malignancies: deletion of KIP1, rearrangement of TEL, and amplification of CCND2. *Blood* 1996; 87:324-330.
- (57) Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. und Harris, C. C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
- (58) Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M. und Croce, C. M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986; 320:84-85.
- (59) Isselbacher K J, Braunwald E, Wilson D, Martin J B, Fauci A S und Kasper D L. *Harrisons Innere Medizin*. 1995; 13. Auflage:2062-2068.
- (60) Jahns-Streubel, G., Braess, J., Schoch, C., Fonatsch, C., Haase, D., Binder, C., Wormann, B., Buchner, T. und Hiddemann, W. Cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia differ in proliferative activity and response to GM-CSF. *Leukemia* 2001; 15:377-384.
- (61) James, L. A. Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J Pathol* 1999; 187:385-95.
- (62) Johansson, B., Mertens, F. und Mitelman, F. Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 8:205-218.
- (63) Johansson, B., Mertens, F. und Mitelman, F. Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemias. *Leukemia* 1994; 8:953-962.
- (64) Juneau, A. L., Kaehler, M., Christensen, E. R., Schad, C. R., Zinsmeister, A. R., Lust, J., Hanson, C. und Dewald, G. W. Detection of RB1 deletions by fluorescence in situ hybridization in malignant hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 103:117-123.
- (65) Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F. und Pinkel, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258:818-21.

Literaturverzeichnis

- (66) Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F. M., Gray, J. W. und Pinkel, D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10:231-43.
- (67) Keating, M. J., Cork, A., Broach, Y., Smith, T., Walters, R. S., McCredie, K. B., Trujillo, J. und Freireich, E. J. Toward a clinically relevant cytogenetic classification of acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* 1987; 11:119-133.
- (68) Kern, W., Haferlach, T., Schoch, C. und Hiddemann, W. [Diagnostics and therapy of acute myeloid leukemia]. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127:2208-2213.
- (69) Kern, W., Haferlach, T., Schoch, C., Löffler, H., Gassmann, W., Heinecke, A., Sauerland, M. C., Berdel, W., Buchner, T. und Hiddemann, W. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial. *Blood* 2003; 101:64-70.
- (70) Knudson, A. G. Cancer genetics. *Am J Med Genet* 2002; 111:96-102.
- (71) Knuutila, S., Aalto, Y., Autio, K., Bjorkqvist, A. M., El Rifai, W., Hemmer, S., Huhta, T., Kettunen, E., Kiuru-Kuhlefelt, S., Larramendy, M. L., Lushnikova, T., Monni, O., Pere, H., Tapper, J., Tarkkanen, M., Varis, A., Wasenius, V. M., Wolf, M. und Zhu, Y. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* 1999; 155:683-694.
- (72) Knuutila, S., Bjorkqvist, A. M., Autio, K., Tarkkanen, M., Wolf, M., Monni, O., Szymanska, J., Larramendy, M. L., Tapper, J., Pere, H., El-Rifai, W., Hemmer, S., Wasenius, V. M., Vidgren, V. und Zhu, Y. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 1998; 152:1107-23.
- (73) Koller, E., Karlic, H., Krieger, O., Mistrik, M., Michlmayr, G., Gadner, H., Lutz, D., Heinz, R. und Pittermann, E. Early detection of minimal residual disease by

Literaturverzeichnis

- reverse transcriptase polymerase chain reaction predicts relapse in acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol* 1995; 70:75-78.
- (74) La Starza, R., Stella, M., Testoni, N., Di Bona, E., Ciolli, S., Marynen, P., Martelli, M. F., Mandelli, F. und Mecucci, C. Characterization of 12p molecular events outside ETV6 in complex karyotypes of acute myeloid malignancies. *Br J Haematol* 1999; 107:340-346.
- (75) Larson, R. A., Kondo, K., Vardiman, J. W., Butler, A. E., Golomb, H. M. und Rowley, J. D. Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia. *Am J Med* 1984; 76:827-841.
- (76) Larson, R. A., Williams, S. F., Le Beau, M. M., Bitter, M. A., Vardiman, J. W. und Rowley, J. D. Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils and inv(16) or t(16;16) has a favorable prognosis. *Blood* 1986; 68:1242-1249.
- (77) Laurent-Puig, P., Beroud, C. und Soussi, T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:269-270.
- (78) Le Beau, M. M., Espinosa, R., III, Neuman, W. L., Stock, W., Roulston, D., Larson, R. A., Keinanen, M. und Westbrook, C. A. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:5484-5488.
- (79) Le Beau, M. M., Larson, R. A., Bitter, M. A., Vardiman, J. W., Golomb, H. M. und Rowley, J. D. Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinicopathological association. *N Engl J Med* 1983; 309:630-636.
- (80) Leitch, A. R., Schwarzacher, T. und Jackson, D. *In situ-Hybridisierung*. 1994.
- (81) Leith, C. P., Kopecky, K. J., Chen, I. M., Eijdens, L., Slovak, M. L., McConnell, T. S., Head, D. R., Weick, J., Grever, M. R., Appelbaum, F. R. und Willman, C. L. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1999; 94:1086-1099.

Literaturverzeichnis

- (82) Lengfelder, E., Reichert, A., Schoch, C., Haase, D., Haferlach, T., Löffler, H., Staib, P., Heyll, A., Seifarth, W., Saussele, S., Fonatsch, C., Gassmann, W., Ludwig, W. D., Hochhaus, A., Beelen, D., Aul, C., Sauerland, M. C., Heinecke, A., Hehlmann, R., Wormann, B., Hiddemann, W. und Buchner, T. 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* 2000; 14:1362-70.
- (83) Levine, A. J., Momand, J. und Finlay, C. A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453-456.
- (84) Levine, E. G. und Bloomfield, C. D. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol* 1992; 19:47-84.
- (85) Liu, Y., Corcoran, M., Rasool, O., Ivanova, G., Ibbotson, R., Grander, D., Iyengar, A., Baranova, A., Kashuba, V., Merup, M., Wu, X., Gardiner, A., Mullenbach, R., Poltarau, A., Hultstrom, A. L., Juliusson, G., Chapman, R., Tiller, M., Cotter, F., Gahrton, G., Yankovsky, N., Zabarovsky, E., Einhorn, S. und Oscier, D. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 1997; 15:2463-2473.
- (86) Look, A. T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278:1059-1064.
- (87) Löwenberg, B., Downing, J. R. und Burnett, A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341:1051-1062.
- (88) Löffler H und Haferlach, T. Die neue WHO-Klassifikation von akuten myeloischen Leukämien und myelodysplastischen Syndromen. 2000; 11:329-331.
- (89) Löwenberg, B., van Putten, W., Theobald, M., Gmur, J., Verdonck, L., Sonneveld, P., Fey, M., Schouten, H., de Greef, G., Ferrant, A., Kovacsovics, T., Gratwohl, A., Daenen, S., Huijgens, P. und Boogaerts, M. Effect of priming

Literaturverzeichnis

with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 349:743-752.

- (90) Maestro, R., Piccinin, S., Doglioni, C., Gasparotto, D., Vukosavljevic, T., Sulfaro, S., Barzan, L. und Boiocchi, M. Chromosome 13q deletion mapping in head and neck squamous cell carcinomas: identification of two distinct regions of preferential loss. *Cancer Res* 1996; 56:1146-1150.
- (91) Marlton, P., Claxton, D. F., Liu, P., Estey, E. H., Beran, M., LeBeau, M., Testa, J. R., Collins, F. S., Rowley, J. D. und Siciliano, M. J. Molecular characterization of 16p deletions associated with inversion 16 defines the critical fusion for leukemogenesis. *Blood* 1995; 85:772-779.
- (92) Marshall, C. J. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64:313-326.
- (93) Martin, M. E., Milne, T. A., Bloyer, S., Galoian, K., Shen, W., Gibbs, D., Brock, H. W., Slany, R. und Hess, J. L. Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* 2003; 4:197-207.
- (94) Mauritzson, N., Johansson, B., Albin, M., Billstrom, R., Ahlgren, T., Mikoczy, Z., Nilsson, P. G., Hagmar, L. und Mitelman, F. A single-center population-based consecutive series of 1500 cytogenetically investigated adult hematological malignancies: karyotypic features in relation to morphology, age and gender. *Eur J Haematol* 1999; 62:95-102.
- (95) Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S. J., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S. und Bredesen, D. E. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998; 395:801-804.
- (96) Metcalf, D. The molecular control of proliferation and differentiation in hemopoietic cells. *C R Acad Sci III* 1993; 316:860-870.
- (97) Michaux, L., Wlodarska, I., Stul, M., Dierlamm, J., Mugneret, F., Herens, C., Beverloo, B., Verhest, A., Verellen-Dumoulin, C., Verhoef, G., Selleslag, D., Madoe, V., Lecomte, M., Deprijck, B., Ferrant, A., Delannoy, A., Marichal, S., Duhem, C., Dicato, M. und Hagemeijer, A. MLL amplification in myeloid

Literaturverzeichnis

- leukemias: A study of 14 cases with multiple copies of 11q23. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29:40-47.
- (98) Miller, W. H., Jr., Levine, K., DeBlasio, A., Frankel, S. R., Dmitrovsky, E. und Warrell, R. P., Jr. Detection of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia by a reverse transcription polymerase chain reaction assay for the PML/RAR-alpha fusion mRNA. *Blood* 1993; 82:1689-1694.
- (99) Mitelman F. *ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*; 1995.
- (100) Mitelman, F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 2000; 462:247-253.
- (101) Mitelman, F. und Heim, S. Chromosome abnormalities in cancer. *Cancer Detect Prev* 1990; 14:527-537.
- (102) Mitelman, F. und Heim, S. Quantitative acute leukemia cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5:57-66.
- (103) Mohr, B., Bornhauser, M., Thiede, C., Schakel, U., Schaich, M., Illmer, T., Pascheberg, U. und Ehninger, G. Comparison of spectral karyotyping and conventional cytogenetics in 39 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2000; 14:1031-1038.
- (104) Mrozek, K., Heinonen, K., de la, Chapelle A. und Bloomfield, C. D. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997; 24:17-31.
- (105) Mrozek, K., Heinonen, K., Theil, K. S. und Bloomfield, C. D. Spectral karyotyping in patients with acute myeloid leukemia and a complex karyotype shows hidden aberrations, including recurrent overrepresentation of 21q, 11q, and 22q. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34:137-153.
- (106) Nederlof, P. M., van der, Flier S., Wiegant, J., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ploem, J. S. und van der, Ploeg M. Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 1990; 11:126-131.

Literaturverzeichnis

- (107) Neuman, W. L., Rubin, C. M., Rios, R. B., Larson, R. A., Le Beau, M. M., Rowley, J. D., Vardiman, J. W., Schwartz, J. L. und Farber, R. A. Chromosomal loss and deletion are the most common mechanisms for loss of heterozygosity from chromosomes 5 and 7 in malignant myeloid disorders. *Blood* 1992; 79:1501-1510.
- (108) Nimer, S. D. und Golde, D. W. The 5q- abnormality. *Blood* 1987; 70:1705-1712.
- (109) Nucifora, G., Larson, R. A. und Rowley, J. D. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. *Blood* 1993; 82:712-715.
- (110) Odero, M. D., Carlson, K. M., Calasanz, M. J. und Rowley, J. D. Further characterization of complex chromosomal rearrangements in myeloid malignancies: spectral karyotyping adds precision in defining abnormalities associated with poor prognosis. *Leukemia* 2001; 15:1133-1136.
- (111) Okuda, T., Cai, Z., Yang, S., Lenny, N., Lyu, C. J., van Deursen, J. M., Harada, H. und Downing, J. R. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 1998; 91:3134-3143.
- (112) Pedersen-Bjergaard, J. Radiotherapy- and chemotherapy-induced myelodysplasia and acute myeloid leukemia. A review. *Leuk Res* 1992; 16:61-65.
- (113) Pedersen-Bjergaard, J. und Rowley, J. D. The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* 1994; 83:2780-2786.
- (114) Piper, J., Rutovitz, D., Sudar, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Waldman, F. M., Gray, J. W. und Pinkel, D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; 19:10-26.

Literaturverzeichnis

- (115) Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389:300-305.
- (116) Poppe, B., Vandesompele, J., Schoch, C., Lindvall, C., Mrozek, K., Bloomfield, C. D., Beverloo, H. B., Michaux, L., Dastugue, N., Herens, C., Yigit, N., De Paepe, A., Hagemeijer, A. und Speleman, F. Expression analyses identify MLL as a prominent target of 11q23 amplification and support an etiologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. *Blood* 2004; 103(1):229-235.
- (117) Porfiri, E. DCC (deleted in colorectal cancer) inactivation in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 1995; 18:69-72.
- (118) Rabbitts, T. H. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372:143-149.
- (119) Ries, L. A., Wingo, P. A., Miller, D. S., Howe, H. L., Weir, H. K., Rosenberg, H. M., Vernon, S. W., Cronin, K. und Edwards, B. K. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* 2000; 88:2398-2424.
- (120) Rotman, G. und Shiloh, Y. The ATM gene and protein: possible roles in genome surveillance, checkpoint controls and cellular defence against oxidative stress. *Cancer Surv* 1997; 29:285-304.
- (121) Rousselot, P., Hardas, B., Patel, A., Guidez, F., Gaken, J., Castaigne, S., Dejean, A., de The, H., Degos, L., Farzaneh, F. und . The PML-RAR alpha gene product of the t(15;17) translocation inhibits retinoic acid-induced granulocytic differentiation and mediated transactivation in human myeloid cells. *Oncogene* 1994; 9:545-551.
- (122) Rowley, J. D. Rearrangements involving chromosome band 11Q23 in acute leukaemia. *Semin Cancer Biol* 1993; 4:377-385.
- (123) Rowley, J. D. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin Hematol* 1999; 36:59-72.

Literaturverzeichnis

- (124) Rowley, J. D. Molecular genetics in acute leukemia. *Leukemia* 2000; 14:513-517.
- (125) Rubnitz, J. E. und Look, A. T. Molecular basis of leukemogenesis. *Curr Opin Hematol* 1998; 5:264-270.
- (126) San Miguel, J. F., Vidriales, M. B., Lopez-Berges, C., Diaz-Mediavilla, J., Gutierrez, N., Canizo, C., Ramos, F., Calmuntia, M. J., Perez, J. J., Gonzalez, M. und Orfao, A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001; 98:1746-1751.
- (127) Schnittger, S., Kinkelin, U., Schoch, C., Heinecke, A., Haase, D., Haferlach, T., Buchner, T., Wormann, B., Hiddemann, W. und Griesinger, F. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000; 14:796-804.
- (128) Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Löffler, H., Sauerland, C. M., Serve, H., Buchner, T., Haferlach, T. und Hiddemann, W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100:59-66.
- (129) Schnittger, S., Weisser, M., Schoch, C., Hiddemann, W., Haferlach, T. und Kern, W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003; 102:2746-2755.
- (130) Schoch, C., Haase, D., Fonatsch, C., Haferlach, T., Löffler, H., Schlegelberger, B., Hossfeld, D. K., Becher, R., Sauerland, M. C., Heinecke, A., Wormann, B., Buchner, T. und Hiddemann, W. The significance of trisomy 8 in de novo acute myeloid leukaemia: the accompanying chromosome aberrations determine the prognosis. German AML Cooperative Study Group. *Br J Haematol* 1997; 99:605-11.

Literaturverzeichnis

- (131) Schoch, C. und Haferlach, T. Cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep* 2002; 4:390-397.
- (132) Schoch, C., Haferlach, T., Bursch, S., Gerstner, D., Schnittger, S., Dugas, M., Kern, W., Löffler, H. und Hiddemann, W. Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2002a; 35:20-29.
- (133) Schoch, C., Haferlach, T., Haase, D., Fonatsch, C., Löffler, H., Schlegelberger, B., Staib, P., Sauerland, M. C., Heinecke, A., Buchner, T. und Hiddemann, W. 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* 2001a; 112:118-126.
- (134) Schoch, C., Kern, W., Krawitz, P., Dugas, M., Schnittger, S., Haferlach, T. und Hiddemann, W. Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype. *Blood* 2001b; 98:3500.
- (135) Schoch, C., Kern, W., Schnittger, S., Hiddemann, W. und Haferlach, T. 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* 2004; 18:120-125.
- (136) Schoch, C., Kohlmann, A., Schnittger, S., Brors, B., Dugas, M., Mergenthaler, S., Kern, W., Hiddemann, W., Eils, R. und Haferlach, T. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002b; 99:10008-10013.
- (137) Schoch, C., Schnittger, S., Kern, W., Lengfelder, E., Löffler, H., Hiddemann, W. und Haferlach, T. Rapid diagnostic approach to PML-RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia. *Hematol J* 2002c; 3:259-263.
- (138) Schoch, C., Schnittger, S., Klaus, M., Kern, W., Hiddemann, W. und Haferlach, T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution,

Literaturverzeichnis

- and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003; 102:2395-2402.
- (139) Schrock, E. und Padilla-Nash, H. Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Semin Hematol* 2000; 37:334-347.
- (140) Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 1988; 68:487-494.
- (141) Slovak, M. L., Kopecky, K. J., Cassileth, P. A., Harrington, D. H., Theil, K. S., Mohamed, A., Paietta, E., Willman, C. L., Head, D. R., Rowe, J. M., Forman, S. J. und Appelbaum, F. R. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96:4075-4083.
- (142) Storkel, S., Simon, R., Brinkschmidt, C., Gronwald, J. und Bocker, W. [Comparative genomic hybridization in pathology. A new molecular cytogenetic method]. *Pathologe* 1996; 17:189-94.
- (143) Streubel, B., Sauerland, C., Heil, G., Freund, M., Bartels, H., Lengfelder, E., Wandt, H., Ludwig, W. D., Nowotny, H., Baldus, M., Grothaus-Pinke, B., Buchner, T. und Fonatsch, C. Correlation of cytogenetic, molecular cytogenetic, and clinical findings in 59 patients with ANLL or MDS and abnormalities of the short arm of chromosome 12. *Br J Haematol* 1998; 100:521-533.
- (144) Streubel, B., Valent, P., Jager, U., Edelhauser, M., Wandt, H., Wagner, T., Buchner, T., Lechner, K. und Fonatsch, C. Amplification of the MLL gene on double minutes, a homogeneously staining region, and ring chromosomes in five patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27:380-386.

Literaturverzeichnis

- (145) Struski, S., Doco-Fenzy, M. und Cornillet-Lefebvre, P. Compilation of published comparative genomic hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 135:63-90.
- (146) Swansbury, G. J., Lawler, S. D., Alimena, G., Arthur, D., Berger, R., Van Den Berghe H., Bloomfield, C. D., de la, Chappelle A., Dewald, G., Garson, O. M. und . Long-term survival in acute myelogenous leukemia: a second follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 73:1-7.
- (147) Van Limbergen, H., Poppe, B., Michaux, L., Herens, C., Brown, J., Noens, L., Berneman, Z., De Bock, R., De Paepe, A. und Speleman, F. Identification of cytogenetic subclasses and recurring chromosomal aberrations in AML and MDS with complex karyotypes using M-FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 33:60-72.
- (148) Vardiman, J. W., Harris, N. L. und Brunning, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100:2292-2302.
- (149) Varmus, H. E. und Lowell, C. A. Cancer genes and hematopoiesis. *Blood* 1994; 83:5-9.
- (150) Veldman, T., Vignon, C., Schrock, E., Rowley, J. D. und Ried, T. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet* 1997; 15:406-410.
- (151) Ventura, G. J., Hester, J. P., Smith, T. L. und Keating, M. J. Acute myeloblastic leukemia with hyperleukocytosis: risk factors for early mortality in induction. *Am J Hematol* 1988; 27:34-37.
- (152) Vogt, P. K. Cancer genes. *West J Med* 1993; 158:273-278.
- (153) Wang, P. W., Iannantuoni, K., Davis, E. M., Espinosa, R., III, Stoffel, M. und Le Beau, M. M. Refinement of the commonly deleted segment in myeloid leukemias with a del(20q). *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21:75-81.

Literaturverzeichnis

- (154) Weiss, M. M., Hermsen, M. A., Meijer, G. A., van Grieken, N. C., Baak, J. P., Kuipers, E. J. und van Diest, P. J. Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 1999; 52:243-51.
- (155) Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D. und . Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265:2088-2090.
- (156) World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon. 2001.
- (157) Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C. J., Burel, S. A., Lagasse, E., Weissman, I. L., Akashi, K. und Zhang, D. E. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10398-10403.
- (158) Yunis, J. J., Brunning, R. D., Howe, R. B. und Lobell, M. High-resolution chromosomes as an independent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1984; 311:812-818.
- (159) Ziemin-van der Poel, S., McCabe, N. R., Gill, H. J., Espinosa, R., III, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S. D., LeBeau, M. M., Rowley, J. D. und . Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:10735-10739.
- (160) Zitzelsberger, H., Lehmann, L., Werner, M. und Bauchinger, M. Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. *Histochem Cell Biol* 1997; 108:403-17.

Danksagung

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt besonders Frau PD Dr. C. Schoch, Leiterin der Zytogenetik des Labors für Leukämiediagnostik im Klinikum Großhadern an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, für die großartige Betreuung und lehrreichen Ratschläge während meiner Promotion.

Für die Förderung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. T. Haferlach, Oberarzt in der Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik III und Leiter des Labors für Leukämiediagnostik im Klinikum Großhadern an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Frau S. Bursch, Medizinisch-Technische Assistentin des Labors für Leukämiediagnostik im Klinikum Großhadern an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, bin ich für die Einführung und Hilfestellung bezüglich des Methodenteils dieser Arbeit dankbar.

Mein Dank gilt weiterhin den Patienten für die Genehmigung der Nutzung von Blut- und Knochenmarksmaterial, durch die diese Arbeit ermöglicht wurde.

Meinen Eltern, Theodoros und Loukia Christodoulou, danke ich insbesondere für Ihre moralische und finanzielle Unterstützung während meines Medizinstudiums.

8. Curriculum vitae

Name: Johanna Christodoulou
Geburtsdaten: 22.09.1979 in München
Eltern: M.A. Phil. Loukia Christodoulou, Lehrerin
Dipl. Ing. Theodoros Christodoulou, Prüfer im Europäischen
Patentamt München
Geschwister: Marianthe Christodoulou, Politik- und Wirtschaftswissenschaftlerin

Bildungsweg:

2004: Drittes Staatsexamen
2003: Zweites Staatsexamen
2000: Erstes Staatsexamen
1999: Physikum
1997/98-2004: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
in München
1997: Abitur an der Europäischen Schule in München mit der Note 1,2

Famulaturen

1999: Pädiatrie, Dr. von Haunersches Kinderspital, München
2000: Chirurgie, Chirurgische Klinik Dr. med. Michael Schreiber, München
2001: Radiologie, Sant Savvas Hospital, Athen
2001: Hämatologie/Onkologie, Internistische Praxis, Dr. med. Sandor,
München

Praktisches Jahr (2003/2004):

Innere Medizin: Kardiologie/Endokrinologie im Yale New Haven Hospital, Yale
University, School of Medicine, USA
Hämatologie/Onkologie im Universitätsklinikum München,
Großhadern
Chirurgie: Universitätsklinikum München, Innenstadt
Gynäkologie : Kantonsspital Baden, Schweiz

Poster und Vorträge:

2001: Posterpräsentation bei dem „Wissenschaftlichen Symposium“ der
Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern mit Erlangung des
Posterpreises
2002: Vortrag bei der 15. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung
2002: Posterpräsentation bei der gemeinsamen Jahrestagung der
Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und
Onkologie, München

Publikationen:

2003: Christodoulou J., Schoch C., Schnittger S., Haferlach T.:
Myelodysplastic syndrome (RARS) with +i(12p) abnormality in a
patient 10 months after diagnosis and successful treatment of a
mediastinal germ cell tumor (MGCT). Ann Hematol, 2003 Nov 13