Aus dem Institut für Klinische Genetik
der Philipps-Universität Marburg
Direktorin: Prof. Dr. Helga Rehder

Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) zur Aufklärung genomischer Imbalancen bei hämatologischen Neoplasien mit Chromosomensätzen über 50 Elemente

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich für Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Achim Teichgraeber
aus Stuttgart

Offenburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs am 13.11.2003
Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch
Referent: PD Dr. med. Harald Rieder
Coreferent: Prof. Dr. med. Andreas Neubauer

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Die Bedeutung von Genmutationen für die Tumorentstehung 1
1.1.1 Die Genmutationshypothese 1
1.1.2 Die Aneuploidiehypothese 3
1.1.3 Genmutationen können chromosomale Fehlverteilungen verursachen 5

1.2 Bedeutung numerischer Chromosomenveränderungen bei hämatologischen Neoplasien 8
1.2.1 Akute lymphatische Leukämien 8
1.2.1.1 Einteilung der ALL 8
1.2.1.2 Bedeutung genetischer Veränderungen für die risikoadaptierte Therapie der ALL 8
1.2.1.3 Ein Chromosomensatz mit mehr als 50 Chromosomen ist bei Kindern mit ALL ein ausgezeichneter prognostischer Faktor 10
1.2.1.4 Bei Erwachsenen ist ein hyperdiploider Chromosomensatz >50 kein günstiger prognostischer Faktor 11
1.2.1.5 Eine alleinige Identifizierung und Charakterisierung der $ALL^{>50}$ anhand des DNA-Indexes und der Chromosomenzahl erfasst viele genetischen Eigenschaften nicht 13
1.2.1.6 Bei der $ALL^{>50}$ lassen sich Untergruppen mit unterschiedlichen biologischen und klinischen Eigenschaften definieren 15
1.2.2 Akute myeloische Leukämie 17
1.2.2.1 Einteilung der AML 17
1.2.2.2 Genetische Veränderungen bei der AML 17
1.2.2.3 Die Bedeutung hyperdiploider Chromosomensätze bei der AML 18
1.2.3 Non-Hodgkin-Lymphome 19
1.2.3.1 Einteilung der Non-Hodgkin-Lymphome 19
1.2.3.2 Bedeutung genetischer Veränderungen für die Klassifikation der NHL 19
1.2.3.3 Leukämische Verlaufsformen von NHL 20
1.2.3.4 Numerische Chromosomenveränderungen bei Non-Hodgkin-Lymphomen 21

1.3 Methoden zur Untersuchung numerischer Chromosomenveränderungen 21
1.3.1 Klassische Zytogenetik 21
1.3.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung 22
1.3.3 Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) 23
1.3.3.1 Die Bedeutung der CGH für die Erforschung der ALL 28
1.3.3.2 Die Bedeutung der CGH für die Erforschung der AML 29
1.3.3.3 Die Bedeutung der CGH für die Erforschung der Non-Hodgkin-Lymphome 29

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit 31

2 MATERIAL UND METHODEN 32

2.1 Patienten 32
2.1.1 Fallzahlen und Diagnosen 32

2.2 Chromosomenbandenanalyse 34
2.2.1 Probenentnahme und Transport 34
2.2.2 Zellkulturen 34
2.2.3 Chromosomenpräparation 35
2.2.4 Chromosomenbandenfärbung mit Giemsa 37
2.2.5 Zytogenetische Befundung 37
2.2.5.1 Numerische Chromosomenveränderungen 38
2.2.5.2 Strukturaberrationen 39

2.3 DNA-Aufbereitung für die Comparative Genomische Hybridisierung 41
2.3.1 Gewinnung hochmolekularer DNA aus Blut und Knochenmark mittels Säulenaufreinigung 41

2.3.2 Präparation niedrigmolekularer genomischer DNA mit Chelex 100® 42
2.3.3 Prüfung der Chelexpräparation durch PCR 43
2.3.4 Vermehrung genomischer DNA mittels PCR mit degeneriertem Oligonukleotid-Primer (DOP-PCR) 45
2.3.5 Charakterisierung des PCR-Produktes mittels Agarose-Gelelektrophorese 46
2.3.6 Bestimmung der DNA-Konzentration 48

2.4 Comparative Genomische Hybridisierung 49
2.4.1 Chromosomenpräparation eines gesunden Spenders für die CGH 49
2.4.2 Denaturierung der Chromosomen für die CGH 50
2.4.3 Markierung der DNA durch Nicktranslation 50
2.4.4 Hybridisierung 52
2.4.5 Waschung der Hybridisierung 54
2.4.6 Detektion 55
2.4.7 Computergestützte Auswertung der CGH 56
2.4.8 Aufnahme der Metaphase-Bilder 56
2.4.9 Computergestützte Karyotypisierung und statistische Auswertung 56
2.4.10 Symbole zur Beschreibung der CGH-Befunde 58
2.4.11 Graphische Übersichtsdarstellung der detektierten Imbalancen aller 20 untersuchten Fälle 59

3 ERGEBNISSE 60

3.1 Die Zellkultur RiFo280/93 dient als Kontrollfall zur Etablierung der CGH-Methode und der verschiedenen Methoden der DNA-Aufbereitung 60
3.1.1 Der Fall RiFo280/93 60
3.1.1.1 Karyotyp 60
3.1.1.2 CGH-Befund 61
3.1.2 Vorversuche zur Validierung der verschiedenen Aufbereitungsmethoden 62
3.1.2.1 Vergleich der Hybridisierungseigenschaften verschiedener Methoden der DNA-Aufbereitung 62
3.1.2.2 Vergleich der CGH-Ergebnisse nach unterschiedlicher DNA-Aufbereitung und daraus resultierenden unterschiedlichen DNA-Konzentrationen 65

3.2 Untersuchung der Fälle mit chromosomalen Zugewinnen auf >50 Chromosomen 67
3.2.1 ALL im Bereich eines hyperdiploiden Chromosomensatzes mit 51-57 Chromosomen 67
3.2.1.1 Fall Nr.1: c-ALL, männlich, 18 Jahre 67
3.2.1.2 Fall Nr.2: c-ALL, männlich, 63 Jahre 69
3.2.1.3 Fall Nr.3: c-ALL, männlich, 18 Jahre 71
3.2.1.4 Fall Nr.4: c-ALL, weiblich, 45 Jahre 73
3.2.1.5 Fall Nr.5: c-ALL, männlich, 37 Jahre 74
3.2.1.6 Fall Nr.6: c-ALL, männlich, 26 Jahre 75
3.2.1.7 Fall Nr.7: c-ALL, männlich, 26 Jahre 77
3.2.1.8 Fall Nr.8: c-ALL, männlich, 47 Jahre 78
3.2.1.9 Fall Nr. 9: ALL, männlich, 27 Jahre 79
3.2.1.10 Fall Nr.10: prä-B-ALL, männlich, 41 Jahre 80
3.2.2 ALL im Bereich eines triploiden Chromosomensatzes mit 58-80 Chromosomen 81
3.2.2.1 Fall Nr.11: c-ALL, weiblich, 61 Jahre 81
3.2.2.2 Fall Nr.12: c-ALL, männlich, 42 Jahre 83
3.2.2.3 Fall Nr.13: c-ALL, männlich, 66 Jahre 85
3.2.2.4 Fall Nr.14: ALL, männlich, 52 Jahre 86
3.2.3 ALL im Bereich eines tetraploiden Chromosomensatzes mit 81-103 Chromosomen 87
3.2.3.1 Fall Nr.15: c-ALL, männlich, 27 Jahre 87
3.2.3.2 Fall Nr.16: ALL, männlich, 40 Jahre 88
3.2.4 2 Fälle von Non-Hodgkin-Lymphomen 90
3.2.4.1 Fall Nr.17: T-NHL, weiblich, 60 Jahre 90
3.2.4.2 Fall Nr.18: zentrozytisches NHL, männlich, 59 Jahre 91
3.2.5 2 Fälle mit akuter myeloischer Leukämie 93
3.2.5.1 Fall Nr.19: AML, M 5, männlich, 76 Jahre 93
3.2.5.2 Fall Nr.20: AML, M0, männlich, 44 Jahre 94
3.2.6 Tabelle 10: CGH-Befund und Chromosomenbefund im Vergleich bei den 20 untersuchten

Patienten 96
3.2.7 Übersichtsgraphik: Überblick über alle genetischen Imbalancen der 20 untersuchten Fälle 99

4 AUSWERTUNG UND DISKUSSION 100

4.1 Auch bei Leukämien ist es möglich, aus archiviertem Material DNA für eine CGH-Studie zu gewinnen 100
4.1.1 Bei Zellsuspensionen und Chelexaufbereitung ist eine Amplifikation mittels DOP-PCR sowohl der Test- als auch der Referenz-DNA notwendig 100
4.1.2 Auch aus sehr wenig Ausgangsmaterial archivierter Zellsuspensionen mit fixierten Zellen kann noch genügend DNA für ein CGH-Experiment gewonnen werden 103

4.2 CGH-Befunde bei 16 Patienten mit ALL$^{>50}$ 105
4.2.1 Chromosomale Zusammensetzung der vorliegenden Fälle mit ALL$^{>50}$ 105
4.2.1.1 Chromosomale Zusammensetzung der ALL mit hoch-hyperdiploidem Chromosomensatz 106
4.2.1.2 Chromosomale Zusammensetzung der ALL mit nahezu triploidem Chromosomensatz 108
4.2.2 Partielle Imbalancen der vorliegenden Fälle mit ALL$^{>50}$ 110
4.2.2.1 Anteil struktureller Chromosomenaberrationen 110
4.2.2.2 Bedeutung der detektierten partiellen Imbalancen 112
4.2.2.2.1 Partielle Überrepräsentation des langen Armes von Chromosom 1 112
4.2.2.2.2 Weiterer Beleg für eine primäre Chromosomenaberration dup(2)(q21q31) 113
4.2.2.2.3 Zugewinne im langen Arm von Chromosom 3 113
4.2.2.2.4 Partielle Imbalancen auf Chromosom 6 114
4.2.2.2.5 9p-Verluste 115
4.2.2.2.6 Häufiger Zugewinn im langen Arm von Chromosom 13 116
4.2.2.2.7 Hinweise für ein Isochromosom 17q bei einem tetraploiden Karyotyp 117

4.3 CGH-Befunde bei 2 Patienten mit leukämischem Non-Hodgkin-Lymphom 119
4.3.1 17p-Unterrepräsentationen bei beiden Patienten mit lymphoblastischem Non-Hodgkin-Lymphom 119
4.3.2 Ein Zugewinn von 3q könnte mit einem leukämischen Verlauf assoziiert sein 120
4.3.3 Zugewinne im langen Arm von Chromosom 13 120
4.3.4 18q Überrepräsentation 121
4.3.5 In der Region Xq26-28 wird ein für NHL relevantes Onkogen vermutet 121
4.3.6 Zugewinne im Bereich 1q verweisen auf aggressiven und leukämischen Verlauf 121
4.3.7 Zugewinne im langen Arm von von Chromosom 8 122
4.3.8 Zugewinne im Bereich von Chromosom 7 122

4.4 CGH-Befunde bei 2 untersuchten Patienten mit AML 123

4.5 In einigen Fällen kann die CGH keinen auffälligen Befund erheben 124
4.5.1 Gerade bei numerischen Veränderungen mit Änderungen des Ploidiegrades verliert die CGH an Sensitivität 124
4.5.2 Bei einem geringen Anteil maligner Zellen in der Probe verliert die CGH an Sensitivität 126
4.5.3 Untersuchungsmaterial und maligner Klon 126
4.5.4 Die CGH verpasst partielle Imbalancen, die weniger als 10-20 Mb umfassen 127

5 ZUSAMMENFASSUNG 129

6 LITERATURVERZEICHNIS 131

7 ANHANG 153

7.1 Lebenslauf 153

7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer 154

7.3 Danksagungen 155

7.4 Ehrenwörtliche Erklärung 156

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Genmutationen für die Tumorentstehung

1.1.1 Die Genmutationshypothese

Bei der Entstehung von malignen Tumoren spielen genetische Veränderungen eine zentrale Rolle. Dabei handelt es sich aber in den wenigsten Fällen um vererbte, also angeborene Veränderungen. Vielmehr finden genetische Mutationen in bis dahin gesunden Zellen statt und führen zu deren Umwandlung in eine Krebszelle. Konkrete Vorstellungen über genetische Veränderungen als Grundlage der Krebsentstehung kamen in den sechziger Jahren auf. Damals wurden verbesserte Methoden der Zellkultivierung und der Chromosomendarstellung entwickelt, und es konnten morphologische Auffälligkeiten der Chromosomen in Krebszellen beschrieben werden. Die erste chromosomale Aberration, welche bei einem malignen Tumor beschrieben wurde, war das sogenannte Philadelphiachromosom bei der chronisch myeloischen Leukämie (Nowell und Hungerford 1960). Bei dieser Chromosomenveränderung sind Teile der Chromosomen 9 und 22 gegeneinander ausgetauscht, was zu einem verkürzten Chromosom 22 führt. Dieses wurde, nach dem Ort seiner Entdeckung, als Philadelphiachromosom bezeichnet (Rowley 1973). Zunächst wurde eine Vielzahl solcher wiederkehrender Chromosomenveränderungen beschrieben und als diagnostische und prognostische Parameter herangezogen. Später konnten durch molekulargenetische Untersuchungsmethoden an beteiligten Chromosomenstellen Gene identifiziert werden, die bei der Tumorentstehung eine zentrale Rolle spielen, sogenannte Tumorgene.

Ein Beispiel für solch ein Tumorgen ist das Gen MYC auf Chromosom 8. Bei einer bestimmten Form der akuten lymphatischen Leukämie bzw. dem Lymphom vom Burkitt-Typ, besteht ein Stückaustausch zwischen Chromosomen 8 und 14. Dadurch gelangt das MYC-Gen von Chromosom 8 in die Nähe einer Regulationseinheit auf Chromosom 14, welche normalerweise das Ablesen der dort liegenden Antikörpergene fördert. Dies führt nun zu einer erhöhten Transkriptionsrate des MYC-Onkogens. Das MYC-Gen scheint eine wichtige Rolle während der Aktivierung eines B-Lymphozyten im Rahmen der Immunantwort zu spielen. Wird ein B-Lymphozyt im Rahmen der Immunantwort aktiviert, führt dies zur Teilung des Lymphozyten und Antikörperproduktion. MYC codiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher Gene anschaltet, die letztendlich zur Zellteilung führen können. Aufgrund der oben beschriebenen Translokation wird das MYC-Gen unabhängig von den komplexen

Regulationsmechanismen des Immunsystems aktiviert. Dadurch ist die betroffene Zelle bezüglich ihrer Teilung unabhängig von diesen Regulationsmechanismen geworden. Sie hat einen Schritt in Richtung eines ungebremsten, malignen Wachstums getan. Allerdings reicht eine alleinige Veränderung der MYC-Aktivität nicht aus, um die Zelle zu einer bösartigen Tumorzelle werden zu lassen. Erst wenn weitere Mutationen hinzukommen, zum Beispiel die Überproduktion eines Gens, welches die Fähigkeit der B-Lymphozyten zum programmierten Zelltod blockiert, ist eine maligne Zelle entstanden (Snow 1997). Die maligne Transformation ist also ein mehrschrittiger Prozess, bei dem sich solche Ereignisse anhäufen.

Das MYC-Gen spielt bei der Entstehung vieler Tumoren eine Rolle. Es handelt sich um ein Gen, das in den komplexen Steuerungsmechanismen der Zellteilung eine zentrale Rolle spielt. Bei Überaktivität entfaltet es seine onkogene Wirkung. Bereits die Fehlfunktion eines Allels reicht aus, um seine pathogene Wirkung zu entfalten, es wirkt dominant. Solche Gene werden Onkogene genannt. Da ihre eigentliche Aufgabe natürlich nicht die Krebsentstehung ist, wird ihre physiologische Form Protoonkogen genannt. Es gibt auch Tumorgene, welche einem rezessiven Wirkungsmuster folgen. Dies bedeutet, dass beide Allele des Gens mutiert sein müssen, um eine maligne Transformation bewirken zu können. Ist ein Allel intakt, so reicht dies aus, um eine mögliche Tumorentstehung zu unterdrücken. Deshalb nennt man sie auch Tumorsuppressorgene (Weinberg 1994).

Ein relativ neu entdecktes Tumorsuppressorgen bei Leukämien ist das Gen CDKN2A ($p16^{ink4a}$), welches im kurzen Arm von Chromosom 9 liegt. Es kann zum Beispiel durch eine Deletion, also einen Stückverlust des kurzen Armes von Chromosom 9 verloren gehen. Dieses Gen spielt bei der Regulation des Zellzyklus durch sogenannte Zykline eine wichtige Rolle, da es deren Funktion hemmen kann. Zykline sind Proteine, welche sich während des Zellzyklus phasenweise anhäufen und als Aktivatoren der Zellteilung wirken. Zykline aktivieren zyklin-abhängige Kinasen (CDK, cyclin- dependent kinase), welche über weitere Proteine zum Beispiel die Replikation der DNA und damit die Zellteilung einleiten können. In einer gesunden Zelle wird die Konzentration und Aktivität der Zykline durch komplexe Regulationsvorgänge, zum Beispiel durch Wachstumfaktoren gesteuert. Das Gen CDKN2A hat einen hemmenden Einfluss auf die Funktion der Zykline. Es kodiert für ein Protein, welches die Aktivität der zyklinabhängigen Kinasen als sogenannter CDK-Inhibitor hemmen kann. Fällt die Funktion des Tumorsuppressorgens CDKN2A aus, so fehlt diese Möglichkeit, den Zellzyklus zu bremsen, und die betroffene Zelle hat einen Schritt in Richtung ungebremster, maligner Zellteilung gemacht (Ragione und Iolascon 1997).

In den letzten 30 Jahren wurde eine Vielzahl wiederkehrender Chromosomenaberrationen beschrieben, die eine große Bedeutung für die Klassifizierung der einzelnen Tumorgruppen, die Einschätzung der Malignität der Erkrankungen und das Verständnis der biologischen Grundlagen der Krebsentstehung besitzen. Gleichzeitig wurde eine Vielzahl von Genen und deren Rolle bei der Tumorentstehung entdeckt (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 2003). Neben den strukturellen Chromosomenveränderungen können solche Schlüsselgene auch durch Mutationen auf molekularer Ebene, z.B. durch Punktmutationen oder Amplifikationen von Genen in ihrer Funktion verändert werden. Nach der vorherrschenden Meinung der modernen Krebsforschung führen erworbene, somatische Mutationen in einzelnen umschriebenen Genen zur Krebsentstehung. Nach dieser Genmutationshypothese entwickelt sich ein Tumor dabei aus einer Krebsvorläuferzelle, die im Laufe der Tumorprogression eine Reihe von Veränderungen an bestimmten Genen anhäuft und durch jede Mutation einen entsprechenden Selektionsvorteil erwirbt. Im Laufe der Tumorprogression entwickeln die malignen Zellen durch Anhäufung entsprechender Mutationen dann zum Beispiel die Fähigkeit zu invasivem Wachstum oder eine Resistenz gegenüber Zytostatika. Um die rasche Akkumulation einzelner Genmutationen im Rahmen der Tumorprogression zu erklären, wurde postuliert, dass Tumoren eine erworbene genetische Instabilität mit erhöhter Mutationsrate besitzen (Nowell 1976; Fearon und Vogelstein 1990).

1.1.2 Die Aneuploidiehypothese

In den letzten Jahren wurde neben den umschriebenen Veränderungen an einzelnen Chromosomen und Genen einer anderen Eigenschaft des Tumorgenoms vermehrt Aufmerksamkeit gewidmet (Bialy 1998). Die meisten Tumoren weisen nämlich neben umschriebenen Genmutationen und Chromosomenaberrationen auch Veränderungen in der chromosomalen Zusammensetzung auf. Häufig bestehen Zugewinne oder Verluste von ganzen Chromosomen oder von Chromosomenteilen (Rew 1994; Dos Santos und Van Kessel 1999). Der einfache Chromosomensatz mit 23 Elementen wird als haploid bezeichnet. Der normale Chromosomensatz des Menschen, bei dem jedes Chromosom doppelt vorliegt, ist diploid mit 46 Elementen. Entsprechend werden Sätze mit 69 als triploid, mit 92 als tetraploid bezeichnet (Ploidiegrad). Bewegt sich die Chromosomenzahl mit +/- 11 um ein ganzzahliges Vielfaches des haploiden Satzes, wird dies z.B. als "nahezu diploid" bezeichnet. Abweichungen nach unten werden mit "hypo", Abweichungen nach oben mit "hyper" gekennzeichnet. Abweichungen vom diploiden Chromosomensatz und DNA-Gehalt werden als Aneuploidie bezeichnet. Bei den meisten malignen Tumoren bestehen starke Zunahmen

der Chromosomenzahl und des DNA-Gehaltes der Zellen. Oft werden dabei Chromosomenzahlen von 60-90 und ein 1,5-2 facher DNA-Gehalt gefunden (Rasnick und Duesberg 1999).

Bereits im Jahre 1890 wurden von Hansemann asymmetrische Mitosen und Chromosomenfehlverteilungen in Krebszellen beobachtet (Hansemann 1890). Zu Beginn des vorigen Jahrhunderts stellte Boveri die Hypothese auf, dass diese Chromosomenfehlverteilungen und die damit verbundenen Veränderungen der chromosomalen Zusammensetzung die Ursache der Krebsentstehung sind (Boveri 1914). Auch in den Anfängen der modernen zytogenetischen Forschung wurden in den Jahren 1958 und '59, noch vor der Beschreibung des Philadelphiachromosoms, bei Patienten mit akuten Leukämien Abweichungen von der normalen Chromosomenzahl beschrieben und vermutet, dass es sich dabei um pathogenetisch bedeutsame Veränderungen handelt (Ford et al. 1958; Baikie et al. 1959).

Boveri´s Hypothese wurde in den letzen Jahren wieder aufgenommen und von einigen Wissenschaftlern als Alternative zur vorherrschenden Genmutationshypothese formuliert (Bialy 1998; Brinkley und Goepfert 1998). Von den Vertretern dieser Aneuploidiehypothese wird angenommen, dass Abweichungen von der normalen Chromosomenzahl die primäre Eigenschaft von Tumoren ist und am Anfang der malignen Entartung steht und nicht Mutationen an einzelnen Genen. Als Argument wurde angeführt, dass alleine durch Auslösen einer Chromosomenfehlverteilung eine maligne Entartung herbeigeführt werden kann (Tsutsui et al. 1984; Li et al. 1997). Weiterhin wird argumentiert, dass die Anhäufung von einzelnen umschriebenen Genmutationen nicht ausreicht, um die massiven Veränderungen einer Krebszelle gegenüber einer gesunden Zelle und die große Heterogenität einzelner Subklone von Tumoren erklären zu können. Veränderungen der chromosomalen Zusammensetzung könnten die massiven Veränderungen einer Tumorzelle gegenüber einer normalen Zelle bewirken, da durch den Verlust eines Chromosoms oder von Teilen eines Chromosoms eine riesige Anzahl von Genen verloren gehen, beim Zugewinn eine riesige Anzahl von Genen hinzugewonnen werden. Demnach würden die phänotypischen Veränderungen der Tumorzellen eher durch ein verändertes Zusammenspiel einer sehr großen Anzahl von unbalanciert vorliegenden Genen bewirkt als durch Veränderungen einer Reihe von bestimmten Tumorgenen an kritischen Stellen des Zellstoffwechsels (Rasnick und Duesberg 1999).

Auch die genetische Instabilität und Heterogenität maligner Tumore könnte durch eine primäre Chromosomenfehlverteilung verursacht werden. An transformierten Hamsterzellen

konnte gezeigt werden, dass deren genetische Instabilität mit zunehmender Aneuploidie wächst (Duesberg et al. 1998). Unbalanciert vorliegende Chromosomen erschweren eine symmetrische Aufteilung der Chromosomen auf zwei identische Tochterzellen. Unbalanciert vorliegende Gene zum Beispiel für Mitosespindeln oder Centrosomen können zu einer assymmetrischen Mitose mit erneuter Chromosomenfehlverteilung führen (Li et al. 2000). Eine aneuploide Chromosomenzusammensetzung würde demnach in Form eines autokatalytischen Prozesses immer neue aneuploide Zellen mit einer wiederum veränderten chromosomalen Zusammensetzung erzeugen und dadurch genetisch destabilisierend wirken (Holliday 1989). Die phänotypische Heterogenität einer Tumorzellpopulation wäre damit durch das nicht-klonale Vorliegen verschiedener Formen von Aneuploidie erklärt. Während der Tumorentstehung könnte ein bestimmtes Maß an Aneuploidie anfangs noch toleriert werden. Erst wenn dieses Maß überschritten wird, würde eine maligne Transformation erfolgen (Duesberg et al. 2000).

1.1.3 Genmutationen können chromosomale Fehlverteilungen verursachen

Möglicherweise lässt sich aus der Genmutationshypothese und der Aneuploidiehypothese der Tumorentstehung ein Kompromiss formulieren. In den letzten Jahren wurde nämlich eine Vielzahl von Angriffspunkten und molekularen Mechanismen gefunden, über die potentielle "Aneuploidiegene" eine Chromsomenfehlverteilung induzieren können (Pihan und Doxsey 1999).

Eine Schlüsselrolle spielen dabei bestimmte Kontrollpunkte des Zellzyklus. Einer dieser Kontrollpunkte besteht am Übergang von der Metaphase zur Anaphase der Mitose. Hier wird die Intaktheit der Mitosespindel und die exakte Chromosomenpaarung geprüft. Treten Fehlbildungen der Mitosespindel auf, so wird das weitere Fortschreiten des Zellzyklus verzögert, um entsprechende Reparaturen zu ermöglichen. Chromosomen, die mit ihren Kinetochoren während der Metaphase keinen Kontakt zum Spindelapparat bekommen, aktivieren diesen Kontrollpunkt. Bei Hefen sind einige Gene identifiziert worden, die an diesem Kontrollpunkt eine wichtige Rolle spielen. Ein Kinetochorproteinkomplex aus bestimmten Proteinen, z.B. "Mad" und "Bub", ist dabei an der Signalübertragung beteiligt. Mutationen der für diese Proteine codierenden Gene können zu entsprechenden Fehlfunktionen führen. Diese können dann zu einer Chromososomenfehlverteilung führen, indem Zellen in die Anaphase eintreten, obwohl der Spindelapparat noch nicht vollständig an die Kinetochore der Chromosomen gebunden ist (Hardwick 1998; Gorbsky et al. 1998; Pihan und Doxsey 1999; Sen 2000).

Die exakte Ausbildung und Ausrichtung der Mitosespindel ist für eine symmetrische Verteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen von großer Bedeutung. Dabei spielen die zwei Centrosomen der Zelle eine wichtige Rolle. Sie bilden die Organisationspunkte, von denen aus der Mikrotubuliapparat der Mitosespindel gebildet wird. Bei vielen malignen Tumoren wurden veränderte oder überzählige Centrosomen gefunden. Überzählige und atop vorliegende Centrosomen oder Störungen der Centrosomenfunktion führen zu asymmetrischen, nicht voll funktionsfähigen Mitosespindeln. Dadurch können Chromosomenfehlverteilungen entstehen. Ein Genprodukt, welches mit einer geordneten Centrosomfunktion assoziiert ist und bei Überexprimierung zu dislokalisierten Centrosomen und Chromosomenfehlverteilungen führen kann, ist die Centrosom-assoziierte Serin-Threonin-Kinase STK15 (Zhou et al. 1998; Salisbury et al. 1999).

Ein anderes kritisches Ereignis der Zellteilung ist die saubere und zeitgerechte Trennung der Schwesterchromatiden am Übergang der Meta- zur Anaphase. Zwischen Replikation der DNA und Anaphase wird eine Trennung der Schwesterchromatiden verhindert. Eine Gruppe von Proteinen, die sogenannten Sekurine, spielen dabei eine zentrale Rolle. Am Übergang zwischen Meta- und Anaphase kommt es zum Abbau der Sekurine, zur Trennung der Schwesterchromosomen und Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen. Eine Genmutation, die eine erhöhte Produktion oder Aktivität von Sekurinen zur Folge hat, könnte eine Chromosomenfehlverteilung induzieren, weil dadurch die Chromosomentrennung erschwert wäre. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ein Gen, welches für ein Sekurin kodiert, bereits als Tumorgen bekannt war (Zou et al. 1999; Sen 2000).

Am Übergang der G_1 zur S-Phase liegt ein weiterer wichtiger Zellzykluskontrollpunkt. Hier wird vor der DNA-Verdopplung die Intaktheit des Genoms geprüft (Pihan und Doxsey 1999). Auch die bereits erwähnten Zykline sind an diesem Kontrollpunkt beteiligt. Eine Anhäufung von Zyklinen führt dabei zum Eintritt in die S-Phase und zur DNA-Verdopplung. Eine inadäquate Produktion bestimmter Zykline kann den Zellzyklus beschleunigen, unkontrollierte S-Phasen hervorrufen und damit eine vermehrte Neigung der Zellen, ihre DNA zu verdoppeln, bewirken. Bei Mantelzelllymphomen führt die Translokation t(11;14) zu einer Überproduktion von Zyklin CCND1. Es wurde deshalb vermutet, dass diese Genmutation unmittelbar mit der Neigung der Lymphome zur Verdoppelung ihres Chromosomensatzes zusammenhängt, indem sie bewirkt, dass die Tumorzellen rasch hintereinander zwei S-Phasen durchlaufen, ohne dazwischen eine Chromosomentrennung durchzuführen. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines tetraploiden Chromosomensatzes (Ott et al. 1997).

Verschiedene Mechanismen können also zu numerischen Aberrationen führen: Auf der einen Seite können Chromosomenfehlverteilungen einzelner Chromosomen zu Verlusten und Zugewinnen führen. Auf der anderen Seite kann eine Verdoppelung des gesamten Chromosomensatzes während einer Mitose zum Zugewinn sehr vieler Chromosomen führen.
Dabei wird angenommen, dass es sich bei diesen numerischen Aberrationen von malignen Tumoren nicht um primäre Veränderungen im Sinne der Aneuploidiehypothese handelt, sondern um sekundäre Veränderungen, die aufgrund einer primären Mutation in entsprechenden "Aneuploidiegenen" entstehen. Trotzdem kommt der Aneuploidie im Rahmen der Tumorprogression eine gewisse katalytische Wirkung zu. In vielen Tumoren werden Fehlverteilungen einzelner Chromosomen relativ konstant beibehalten. In anderen kommt es aufgrund ständiger Chromosomenfehlverteilungen zu immer wieder neuen Tumorkaryotypen. Durch Selektionsvorteile bestimmter chromosomaler Zusammensetzungen ist es möglich, dass sich im Laufe der Tumorprogression bestimmte chromosomale Zusammensetzungen etablieren. Dadurch können sich pathogenetisch bedeutsame genetische Imbalancen anhäufen. Von großem Interesse ist bei der Untersuchung aneuploider, unbalancierter Turmorkaryotypen daher, welche Veränderungen pathogenetisch bedeutsam sind und welche Veränderungen irrelevante, sekundäre Veränderungen sind, die den Blick auf pathogenetisch bedeutsame Aberrationen eher verstellen (Johansson et al. 1996; Pihan und Doxsey 1999; Rasnick und Duesberg 1999).

1.2 Bedeutung numerischer Chromosomenveränderungen bei hämatologischen Neoplasien

1.2.1 Akute lymphatische Leukämien

1.2.1.1 Einteilung der ALL

Während ihrer normalen Reifung und Differenzierung exprimieren die Lymphozyten eine Reihe von Oberflächenmarker, welche eine Zuordnung zur B -oder T-Zelllinie und zum jeweiligen Reifegrad zulassen. Da die leukämischen Blasten die normale Reifung und Differenzierung eingestellt haben, lassen sie sich anhand ihrer Oberflächenmarker bestimmten Differenzierungs- und Zellreifestadien zuordnen, welche den Zeitpunkt der malignen Transformation repräsentieren (Greaves 1986; Pui et al. 1993). Anhand der Oberflächenmarker wurden die Blasten wie aus Tabelle 1 ersichtlich in die entsprechenden Untergruppen eingeteilt (Bene et al. 1995).

Tabelle 1: Immunologische Untergruppen der ALL und jeweilige Antigen-konstellation

Immunologische Subgruppe	exprimierte Antigene
B-Zelllinie	
pro-B-ALL	CD19+, CD24+/-, CD10-, cyIgM-
common-ALL	CD19+, CD10+, cyIgM-
prä-B-ALL	CD19+, CD10±, cyIgM+, sIgM-
B-ALL	CD19+, CD10±, cyIgM±, sIgM+
T-Zelllinie	
prä-T-ALL	cyCD3+, CD5+, CD7+, CD2+/-
T-ALL	sCD3+, CD5+, CD7+, CD2+, CD1±

1.2.1.2 Bedeutung genetischer Veränderungen für die risikoadaptierte Therapie der ALL

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) entsteht durch die maligne Entartung unreifer Vorstufen von lymphatischen Zellen, sogenannten Blasten. Die Symptome der akuten Leukämie lassen sich auf die Expansion der Blasten und auf die Schädigung der normalen Blutbildung zurückführen. Unbehandelt verlaufen die akuten Leukämien innerhalb weniger Monate durch progrediente Knochenmarkinsuffizienz tödlich. Wichtigste Todesursachen sind

durch Granulozytopenie und Antikörpermangel bedingte Infektionen und durch Thrombopenie bedingte Blutungen (Ostendorf und Seeber 1997). Die meisten ALL-Erkrankungen werden bei Kindern diagnostiziert. Bei ihnen stellt die ALL mit 25% der Krebserkrankungen den häufigsten malignen Tumor dar (Cortes und Kantarjian 1995). Am häufigsten erkranken Kinder im Alter zwischen 3 und 5 Jahren. Für diese Altersgruppe besteht eine Inzidenz von 5,3/100000. Bei älteren Kindern und Jugendlichen ist die Erkrankung seltener. Aber auch Erwachsene erkranken an akuter lymphatischer Leukämie. In der Altersgruppe von 35-40 Jahren ist die Rate jährlicher Neuerkrankungen mit 0,5/100000 am seltensten. Danach steigt sie erneut langsam an und erreicht ein zweites Maximum im Alter über 80 Jahren mit einer Inzidenz von 2,3/100000 (Gökbuget und Hoelzer 1998).

Bis in die Sechziger-Jahre konnten nur 1% der Kinder mit ALL geheilt werden. Durch moderne Behandlungskonzepte sind es heute insgesamt etwa 80% (Creutzig und Schrappe 1996). Die Therapie der ALL von Erwachsenen gestaltet sich dagegen immer noch äußerst schwierig, obwohl die Therapieprinzipien denen bei Kindern gleichen. Anfangs sprechen die Patienten meist gut auf die Therapie an, endgültig geheilt werden können aber nur 20-40%. Im Vergleich zu Kindern ist das eine weniger als halb so große Heilungschance (Rohatiner und Lister 1993; Hoelzer 1993a; Kantarjian 1994; Copelan und McGuire 1995; Cortes und Kantarjian 1995; Buchner 1997; Hoelzer et al. 2001; Verma und Stock 2001).

Die Fortschritte in der Behandlung der ALL lassen sich vor allem auf die Entwicklung einer Vielzahl von zytostatisch wirkender Substanzen und deren Einsatz in komplexen Therapieprotokollen zurückführen. Dabei soll der kombinierte Einsatz mehrerer Substanzen Resistenzentwicklungen der Blasten gegenüber Chemotherapeutika vorbeugen und die Durchführung mehrerer Therapiephasen über Monate die Rückfallquote aus verbliebenen Blasten reduzieren (Kersey 1997). Da die meisten Patienten in großen therapeutischen Studien behandelt werden, konnten inzwischen eine Vielzahl prognostischer Faktoren identifiziert werden, welche die Malignität der Erkrankung und die Heilungschancen einer Behandlung voraussagen lassen (Pinkel 1992; Cortes und Kantarjian 1995). Dadurch ist es möglich, Patienten, die mit den Standardtherapieprotokollen nur eine geringe Heilungschance haben, schon zum Zeitpunkt der Diagnose zu erkennen. Diese werden dann mit agressiven Hochrisikotherapien einschließlich Knochenmarktransplantation behandelt. Diese Therapien sind zwar komplikationsreich, bringen aber für diese Patienten wesentlich bessere Heilungsaussichten. Auf der anderen Seite ist es auch möglich, diejenigen Patienten zu erkennen, die an einer Form der ALL mit sehr guter Prognose erkrankt sind, um sie mit einer nebenwirkungsärmeren Therapie ohne Langzeitschäden behandeln zu können. Bei diesen

Patienten würden nebenwirkungsreiche, aggressive Therapien die Gesamtsterblichkeit erhöhen (Kersey 1997; Liesner und Goldstone 1997).

Die risikoadaptierte Therapie beruht zum einen auf der Einteilung nach klinischen Parametern, vor allem dem Alter der Patienten und der Leukozytenzahl bei Diagnose, aber auch auf dem Ansprechen der Krankheit auf die initiale Therapie (Smith et al. 1996). Die meisten dieser klinischen Kriterien sind Ausdruck der Biologie und Malignität der vorhandenen Blasten. Deshalb wurde nach Bewertungskriterien gesucht, die die Biologie der Blasten direkter widerspiegeln. Heute besteht weitgehend Übereinkunft, dass die genetischen Veränderungen der Blasten am besten die Biologie und Malignität der Krankheit abbilden (Kersey 1997). Zytogenetische Befunde lassen Aussagen über die Malignität und den Verlauf der Erkrankung zu, welche unabhängig von klinischen Parametern sind (Swansbury et al. 1981; Bloomfield et al. 1989; Secker-Walker 1990).

1.2.1.3 Ein Chromosomensatz mit mehr als 50 Chromosomen ist bei Kindern mit ALL ein ausgezeichneter prognostischer Faktor

Ein Chromosomensatz mit mehr als 50 Chromosomen kommt bei Kindern in 25-30% der Fälle vor. Kinder, deren Blasten mehr als 50 Chromosomen ($ALL^{>50}$) enthalten, haben viel bessere Heilungschancen als Kinder ohne diese Veränderung (Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1981a; Kaneko et al. 1982; Kowalczyk et al. 1985; Michael et al. 1988; Secker-Walker et al. 1989; Secker-Walker 1990; Heim et al. 1990; Pui et al. 1990a; Raimondi 1993; Pui 1995; Forestier et al. 1997). Zum ersten Mal konnten dies Secker-Walker und Mitarbeiter 1978 demonstrieren. In zahlreichen weiteren Studien konnten ausgezeichnete Therapieergebnisse mit 5-Jahres-Heilungsraten von 71-90% in dieser Untergruppe erzielt werden (Williams et al. 1982; Smets et al. 1985; Bloomfield et al. 1986; Williams et al. 1986; Pui et al. 1989; Trueworthy et al. 1992; Van der Plas et al. 1992; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1993; Micallef-Eynaud et al. 1993; Kobayashi et al. 1994; Chessells et al. 1997). Um Patienten mit einer $ALL^{>50}$ zu erkennen, gibt es eine automatisierte Methode, die schnell und einfach durchzuführen ist: Mittels Durchflusszytometrie kann man den DNA-Gehalt der leukämischen Blasten bestimmen und so auf deren Chromosomenzahl rückschließen. Dies geschieht, indem man Farbstoffe benützt, die die Blasten proportional zur enthaltenen DNA-Menge anfärben. Die angefärbten Blasten wandern an einer Lichtquelle vorbei und streuen das ausgesendete Licht abhängig von der gebundenen Farbstoffmenge. Auf diese Weise kann in kürzester Zeit der DNA-Gehalt einer großen Anzahl von Zellen gemessen werden (Rew 1994). Vergleicht man den DNA-Gehalt der leukämischen Blasten in der G_0/G_1-Phase des Zellyklus mit dem DNA-Gehalt einer normalen diploiden Zelle, so

entspricht ein DNA-Index von 1,0 einem Chromosomensatz von 46 Chromosomen. Ein Chromosomensatz mit 51 und mehr Chromosomen entspricht einem DNA-Gehalt von ≥1,16. Kinder, deren Blasten einen DNA-Index ≥1,16 besitzen, haben eine Vier -Jahres - Heilungsrate von etwa 90% (Look et al. 1985; Smets et al. 1987; Stary et al. 1990; Hammond 1991; Trueworthy et al. 1992; Smets et al. 1995).

Es wurden verschiedene Eigenschaften hyperdiploider Blasten identifiziert, welche die gute Prognose und das Ansprechen auf die chemotherapeutische Behandlung erklären könnten. So konnte gezeigt werden, dass hyperdiploide Blasten wesentlich höhere Mengen an Methotrexat in ihre Zellen aufnehmen als andere leukämische Blasten, was sie für Methotrexat und andere Antimetabolite, die in der Chemotherapie eingesetzt werden, möglicherweise empfindlicher macht (Whitehead et al. 1992; Synold et al. 1994; Kaspers et al. 1995; Masson et al. 1996; Whitehead et al. 1998; Zhang et al. 1998; Belkov et al. 1999). Außerdem befindet sich bei Erkrankten mit einer $ALL^{>50}$ ein besonders hoher Anteil der Leukämiezellen in der S-Phase der Zellteilung, was sie ebenfalls für antimetabolit wirkende, also die DNA-Synthese hemmende Zytostatika empfindlicher machen könnte (Look et al. 1982). Auch haben hyperdiploide Blasten eine stärkere Neigung zum programmierten Zelltod als andere Leukämiezellen. Dies könnte sie sensibler für einige Chemotherapeutika machen, die über eine Aktivierung der natürlichen Apoptose wirken (Ito et al. 1999). Für Patienten mit einer $ALL^{>50}$ steht deshalb eine milde und relativ nebenwirkungsarme Therapie zur Verfügung, die zu ausgezeichneten Therapieergebnissen führt. Die Chemotherapie basiert auf Antimetaboliten wie Methotrexat und Mercaptopurin, welche die DNA-Synthese stören, jedoch keine direkt DNA-schädigende Wirkung und damit mutagene Effekte entfalten (Trueworthy et al. 1992; Kaspers et al. 1995; Kersey 1997).

1.2.1.4 Bei Erwachsenen ist ein hyperdiploider Chromosomensatz >50 kein günstiger prognostischer Faktor

Bei Erwachsenen kommt ein hyperdiploider Chromosomensatz >50 in 7-17% der Fälle vor (Walters et al. 1990; Faderl et al. 1998). Im Gegensatz zu der Situation bei Kindern stellt ein DNA-Index ≥1,16 bei Erwachsenen kein günstiges prognostisches Kriterium dar (Hiddemann et al. 1986a; Barlogie et al. 1987; Hiddemann et al. 1990). Auch wenn man die modale Chromosomenzahl mittels konventioneller Zytogenetik bestimmt, trägt der hyperdiploide Chromosomensatz bei Erwachsenen weniger eindeutig zur Risikoklassifizierung bei als bei Kindern. In den meisten Studien konnten bei Erwachsenen mit $ALL^{>50}$ weit weniger gute Ergebnisse bezüglich einer Langzeitheilung erzielt werden als bei Kindern, es fanden sich 3-

Jahres-Heilungsraten von höchstens 50-60% (Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1981a; Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1981b; Kaneko et al. 1982; Bloomfield et al. 1986; Bloomfield et al. 1989; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996; Secker-Walker et al. 1997). In einigen zytogenetischen Studien bei Erwachsenen stellte eine Chromosomenzahl >50 überhaupt keinen günstigen prognostischen Faktor dar (Walters et al. 1987; Fenaux et al. 1988).

Zum Teil lassen sich die schlechteren Heilungschancen bei Erwachsenen sicherlich auf rein altersspezifische Faktoren zurückführen. So zeigen vor allem ältere Patienten gegenüber Chemotherapien eine weitaus geringere Toleranz als Kinder. Dies führt vermehrt zu Todesfällen, die durch hämatotoxische und kardiotoxische Nebenwirkungen der Zytostatika bedingt sind. Außerdem führt diese geringere Toleranz der Erwachsenen gegenüber der Therapie auch häufiger zu Therapieabbrüchen oder Unterdosierungen bzw. überlangen Behandlungspausen, wodurch wiederum die leukämiebedingte Mortalität steigt (Hoelzer 1993b).

Möglicherweise unterscheidet sich die $ALL^{>50}$ des Erwachsenen aber auch durch zusätzliche biologische und genetische Eigenschaften von der $ALL^{>50}$ der Kinder. Von Maurer wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei der ALL des Kindes mit hyperdiploidem Chromosomensatz und ausgezeichneter Prognose um eine spezifische Unterart der ALL mit eigener Ätiologie handelt, die vor allem im Alter von 3-7 Jahren auftritt und neben dem hyperdiploiden Chromosomensatz durch niedrige Leukozytenzahlen und einen early-pre-B-Immunphänotyp charakterisiert ist (Mauer 1993; Perentesis 1997).

Eine umfassende genetische Untersuchung der $ALL^{>50}$ bei Erwachsenen könnte dazu führen, dass genetische Veränderungen aufgedeckt werden, die für die unterschiedlichen Eigenschaften der $ALL^{>50}$ von Kindern und Erwachsenen verantwortlich sind. Eine differenziertere genetische Diagnostik der $ALL^{>50}$ könnte damit einen wichtigen Beitrag zur risikoadaptierten Therapie der ALL liefern. Darüber hinaus könnten genetische Veränderungen, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, zum besseren Verständnis der Entstehungsmechanismen und der Biologie numerischer Chromosomenveränderungen bei der ALL des Erwachsenen beitragen.

1.2.1.5 Eine alleinige Identifizierung und Charakterisierung der ALL$^{>50}$ anhand des DNA-Indexes und der Chromosomenzahl erfasst viele genetischen Eigenschaften nicht

Die durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehaltes liefert nicht alle relevanten Informationen über das Genom. Die alleinige Bestimmung des DNA-Gehaltes und der Anzahl der Chromosomen vermag deshalb die ALL$^{>50}$ des Erwachsenen nicht ausreichend zu charakterisieren.

Strukturelle Chromosomenveränderungen und andere Genmutationen werden durch die Bestimmung des DNA-Index´ nicht erkannt. Sie stellen jedoch einen eigenen prognostischen Faktor dar. Treten in einem hyperdiploiden Satz zusätzlich zu den numerischen Veränderungen noch strukturelle Chromosomenveränderungen auf, so wird die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens größer. Die beste prognostische Aussagekraft besitzt eine hierarchische Klassifikation, welche den prognostischen Einfluss struktureller Veränderungen höher einstuft als die Anzahl der Chromosomen (Pui et al. 1989; Secker-Walker et al. 1997). Bestimmte strukturelle Chromosomenveränderungen weisen auf besonders schlechte Heilungsaussichten hin. Patienten, bei denen ein Philadelphiachromosom t(9;22)(q34;q1) oder eine Translokation t(4;11)(q21;q23) nachgewiesen werden kann, gehören zur Hochrisikogruppe, auch wenn eine ALL$^{>50}$ vorliegt. ALL-Patienten mit einer Philadelphia-Translokation haben mit einer Fünfjahresüberlebenswahrscheinlichkeit von etwa 10% eine überaus ungünstige Heilungsaussicht gegenüber Patienten ohne diese Veränderung (Barrett et al. 1992; Fletcher et al. 1992). Auch Patienten mit einer Translokation t(4;11)(q21;q23) haben mit einer mittleren Überlebenszeit von einem Jahr eine schlechte Prognose (Bloomfield et al. 1989). Durch den Einsatz von Hochrisiko-Therapieprotokollen konnten die Heilungschancen der Patienten mit letzterer Translokation jedoch deutlich verbessert werden (Linker 1997).

Insgesamt konnten in der Gruppe der ALL$^{>50}$ weniger Translokationen oder andere strukturelle Veränderungen nachgewiesen werden als in anderen Gruppen (Williams et al. 1986; Pui et al. 1990a; Raimondi et al. 1996). Die Metaphasenqualität hyperdiploider ALL-Blasten ist jedoch überdurchschnittlich schlecht, was dazu führt, dass viele Aberrationen übersehen werden. So konnte allein mit verbesserten zytogenetischen Methoden der Anteil detektierbarer struktureller Veränderungen wesentlich erhöht werden (Williams et al. 1985; Heerema 1990). Bei Kindern konnten zytogenetisch in bis zu 64% der ALL-Fälle mit mehr als 50 Chromosomen zusätzliche strukturelle Veränderungen nachgewiesen werden (Pui et al. 1989; Raimondi et al. 1996). Bei Erwachsenen lag der Anteil der Patienten mit zusätzlichen

strukturellen Veränderungen in den Blasten in der Gruppe $ALL^{>50}$ bei bis zu 70% (Rieder et al. 1993; Charrin et al. 1996). Es könnte also durchaus sein, dass sich die $ALL^{>50}$ von Kindern und Erwachsenen bezüglich der Häufigkeit und der Art der strukturellen Veränderungen unterscheiden. Bestimmten strukturellen Veränderungen könnte dabei eine besondere prognostische Bedeutung zukommen. Darüber hinaus können strukturelle Aberrationen genetische Mutationen beinhalten, die ursächlich für chromosomale Fehlverteilungen und bestehende numerische Veränderungen sind.

Auch Aussagen darüber, **welche Chromosomen in den hyperdiploiden Zellen vermehrt** vorliegen, können durch durchflusszytometrische Messungen nicht gewonnen werden. Es gibt eine Reihe von Studien, in denen Zugewinne bestimmter Chromosomen mit klinischen Parametern korreliert wurden. Ein überzähliges Vorliegen von Chromosom 4 und 10 scheint mit einer besonders guten Vier-Jahresheilungsrate von über 96% verbunden zu sein. Auch für die Chromosomen 6 und Chromosom 17 konnte gezeigt werden, dass ihre Überrepräsentation mit einer verbesserten Prognose verbunden ist. Eine Trisomie von Chromosom 5 war dagegen mit auffällig schlechten Therapieergebnissen verbunden (Jackson et al. 1990; Harris et al. 1992; Heerema et al. 2000). Für die Zugewinne der Chromosomen X, 6, 8, 9, 11, 12 und 19 konnte ein Zusammenhang mit der Leukozytenzahl hergestellt werden, welche, wie oben beschrieben, von prognostischer Bedeutung ist (Bannier et al. 1998).

Zugewinne und Verluste einzelner Chromosomen könnten über Zugewinne und Verluste von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen auf den entsprechenden Chromosomen die Malignität der Blasten im Sinne eines Gendosiseffektes beeinflussen. Zusätzlich vorliegende „gesunde“ Varianten eines Chromosoms könnten vorhandene Gendefekte eines entsprechenden „kranken“ Chromosoms in ihrer Wirkung relativieren (Williams et al. 1982; Tsuchiya et al. 1991). Möglicherweise liegen auf überzähligen Chromosomen Gene, welche eine erhöhte Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika bewirken (Jackson et al. 1990; Heerema et al. 2000). So scheint die erhöhte Empfindlichkeit der hyperdiploiden ALL gegenüber Methotrexat durch die erhöhte Aktivität eines Folat-Carriers bedingt zu sein, der die intrazelluläre Anreicherung von Methotrexatpolyglutamaten erleichtert. Die Aktivität dieses Membrantransporters wird durch ein oder mehrere Gene auf Chromosom 21 kontrolliert (Whitehead et al. 1992; Zhang et al. 1998; Matherly und Taub 1999; Jarosova et al. 2000). Chromosom 21 gehört bei der hyperdiploiden ALL zu den am häufigsten hinzugewonnenen Chromosomen und ist in vielen Fällen vierfach vorhanden (Mertens et al. 1996).

Nicht alle Chromosomen sind regelmäßig überzählig vorhanden: Bei Kindern mit $ALL^{>50}$ sind es die Chromosomen 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20, 21 und X. Bei Erwachsenen wurden

zusätzlich auch Chromosom 8 und 19 als regelmäßig überzählig angegeben (Raimondi 1993; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996; Ankathil et al. 1996). Möglicherweise beruhen also die schlechteren Heilungschancen der ALL$^{>50}$ der Erwachsenen auf einer chromosomalen Zusammensetzung, die sich von der bei Kindern unterscheidet.

1.2.1.6 Bei der ALL$^{>50}$ lassen sich Untergruppen mit unterschiedlichen biologischen und klinischen Eigenschaften definieren

Die Abgrenzung der hoch-hyperdiploiden ALL mit mehr als 50 Chromosomen als eigene Einheit ist etwas willkürlich und beruht auf prognostischen Studien, die zu einer Abgrenzung gegenüber den Fällen mit weniger Chromosomen führen. Die Gruppe der niedrig-hyperdiploiden mit 47-50 Chromosomen zeichnet sich durch eine vergleichsweise schlechte Prognose aus (Raimondi et al. 1992; Raimondi 1993; Faderl et al. 1998). Außerdem scheint die Zahl 50 eine natürliche Trennlinie zu sein, da es kaum Patienten mit 50 Chromosomen gibt und dadurch eine zweigipfelige Häufigkeitsverteilung entsteht (Williams et al. 1982). Die Chromosomenzahl bei der ALL$^{>50}$ liegt meist zwischen 51-60 Chromosomen, in den meisten Fällen liegen 55 Chromosomen vor (Williams et al. 1982; Pui et al. 1989; Williams et al. 1990).

Einige Autoren untersuchten genauer, welche Chromosomen in hyperdiploiden Sätzen hinzugewonnen sind. Darauf beruhend wurden andere Einteilungen und Untergruppen definiert. Von Mertens et. al wurde vorgeschlagen, dass die Grenze der prognostisch günstigen hoch-hyperdiploiden von der weniger günstigen niedrig-hyperdiploiden eigentlich zwischen 51 und 52 liegen müsste (Mertens et al. 1996). In der Gruppe 47-51 sind vor allem Chromosomen X, 8 und 21 überzählig, in der Gruppe 52-57 die Chromosomen X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 und 21. Raimondi et al. schlugen vor, eine Gruppe mit 56-67 Chromosomen mit hervorragender Prognose von einer Gruppe mit 51-55 mit weniger guter Prognose abzutrennen. Dabei zeichnete sich die Gruppe mit 56-67 Chromosomen durch ein doppelt so häufiges Vorhandensein der „günstigen“ Chromosomen 4 und 10 aus (Raimondi et al. 1996). Von anderen Autoren wurde aufgrund von Unterschieden in der chromosomalen Zusammensetzung und der Prognose eine Gruppe mit 54-58 Chromosomen als Untereinheit definiert (Heerema et al. 2000). Aufgrund der chromosomalen Zusammensetzungen lassen sich also möglicherweise bei der ALL$^{>50}$ verschiedene Untergruppen abgrenzen, die sich in ihren biologischen und klinischen Eigenschaften unterscheiden.

Auch aufgrund verschiedener Ursachen der chromosomalen Zugewinne lassen sich unterschiedliche biologische Untergruppen definieren. Es wurden verschiedene Entstehungsmechanismen für chromosomale Zugewinne bei der ALL postuliert. Zum einen

könnten in aufeinanderfolgenden Zellteilungen immer wieder einzelne Chromosomen hinzugewonnen werden. Möglicherweise werden auch während einer einzigen Zellteilung eine größere Anzahl von Chromosomen hinzugewonnen. Zum anderen können gerade höhergradige chromosomale Zugewinne durch genaue Verdopplung des Chromosomensatzes im Sinne einer Endoreduplikation entstehen (Onodera et al. 1992a). Am eindeutigsten ist diese Ätiologie bei tetraploiden Sätzen mit 92 Chromosomen. Die nahezu tetraploide ALL kann mit größerer Sicherheit als die nahezu triploide ALL als eigene biologische Entität betrachtet werden (Pui et al. 1990b). Gerade bei Chromosomensätzen im Bereich eines triploiden Satzes sind verschiedene Entstehungsmechanismen denkbar: Sie könnten durch sukzessive Zugewinne einzelner Chromosomen, durch Tetraploidisierung mit darauffolgenden Chromosomenverlusten oder durch Verdopplung eines hypodiploiden Chromosomensatzes entstehen (Pui et al. 1990b). Inwieweit es sich gerade bei der $ALL^{>50}$ mit höhergradigen Zugewinnen im Bereich eines triploiden Chromosomensatzes um eine eigene biologische Einheit handelt, könnte durch ein besseres Verständnis der Ätiologie der chromosomalen Zugewinne geklärt werden.

Die Gruppen der nahezu tri- und tetraploiden ALL unterscheiden sich prognostisch und aufgrund ihrer chromosomalen Zusammensetzung von anderen Fällen der $ALL^{>50}$. So zeigten erwachsene Patienten mit einem nahezu triploiden Karyotyp eine nur etwa halb so lange mittlere Überlebenszeit wie Patienten mit einem hoch-hyperdiploiden oder nahezu tetraploiden Satz (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996; Secker-Walker et al. 1997). Bei Kindern scheint die Prognose von Patienten mit nahezu tetraploiden Karyotyp geringfügig schlechter zu sein als bei einem hyperdiploiden oder nahezu triploiden Karyotyp (Onodera et al. 1992a). Bei den Patienten mit nahezu triploiden Sätzen kommt es zu einer bevorzugten Vermehrung der Chromosomen 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21 und 22, also zu einem anderen Verteilungsmuster als bei den hoch-hyperdiploiden (Nordgren et al. 1997).

Bei Erwachsenen sind höhergradige Zugewinne von Chromosomen im Bereich von triploiden und tetraploiden Sätzen häufiger als bei Kindern. Bei Kindern mit ALL finden sich Blasten mit 66-73 Chromosomen im Bereich eines triploiden Chromosomensatzes in 0,3% und mit 82-94 Chromosomen im Bereich eines tetraploiden Chromosomensatzes in 1% der Fälle (Pui et al. 1990b). Bei Erwachsenen findet sich ein nahezu triploider Satz in 2-3%, und ein nahezu tetraploider Karyotyp in etwa 3% der Fälle (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996).

Möglicherweise ist also das häufigere Vorliegen höhergradiger chromosomaler Zugewinne bei der ALL$^{>50}$ des Erwachsenen mit verantwortlich für die schlechtere Prognose dieser Patienten. Eine Abgrenzung bestimmter Untergruppen mit eigenen biologischen und prognostischen Eigenschaften könnte dabei besser über die genaue Bestimmung der chromosomalen Zusammensetzung und der Ätiologie der chromosomalen Zugewinne möglich sein als über eine Abgrenzung anhand der Anzahl hinzugewonnener Chromosomen.

1.2.2 Akute myeloische Leukämie

1.2.2.1 Einteilung der AML

Die akute myeloische Leukämie wird aufgrund morphologischer und zytochemischer Eigenschaften nach den Kriterien der French-American-British Group unterteilt (FAB-Klassifikation) (Bennett et al. 1976).

Tabelle 2: Einteilung der AML nach der FAB-Klassifikation

AML-Subtypen	
M0	AML ohne Ausreifung
M1	AML mit minimaler Ausreifung
M2	AML mit Ausreifung
M3	Promyelozyten-Leukämie+
M4/M4Eo	Akute myelomonozytäre Leukämie/ mit Eosinophilie
M5	Akute monozytäre Leukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie

1.2.2.2 Genetische Veränderungen bei der AML

Die akute myeloische Leukämie (AML) tritt vor allem bei erwachsenen Patienten auf. 89% aller akuten Leukämien des Erwachsenen entstehen aus der myeloischen Zellreihe. Bei Kindern sind es nur 19% (Walker et al. 1994). Bei 50-60% der Patienten mit AML kann eine komplette Remission und bei 10-20% eine Heilung erzielt werden (Kimby et al. 2001). Auch für die AML sind die Therapieerfolge bei Erwachsenen insgesamt schlechter als bei Kindern. Besonders Patienten, die älter als 60 Jahre sind, weisen erheblich schlechtere Heilungsraten auf als jüngere Patienten (Lowenberg 1996; Visani et al. 2001).

10-30% der akuten myeloischen Leukämien sind sogenannte sekundäre Leukämien. Eine sekundäre AML ist eine Leukämie, die aus einem myelodysplastischen Syndrom entstanden ist oder durch mutagene Effekte einer zytostatischen Therapie (z.B. mit alkylierenden Substanzen), einer Strahlentherapie oder durch Umweltgifte ausgelöst wurde. Diese Form kommt naturgemäß bei Erwachsenen wesentlich häufiger vor als bei Kindern (Leone et al. 1999). Sekundäre myeloische Leukämien sind mit schlechten Heilungsaussichten behaftet (Walker et al. 1994).

Durch zytogenetische Studien konnten auch bei der AML wiederkehrende Aberrationen gefunden werden, die wesentliche Rückschlüsse auf die Biologie und Malignität der Erkrankung erlauben (Arthur et al. 1989; Fenaux et al. 1989; Leblanc und Berger 1997; Bloomfield et al. 1997). Zum Beispiel gilt das Vorhandensein einer Translokation t(8;21) bei AML als prognostisch günstiger Faktor. In dieser Untergruppe konnten Remissionsraten von bis zu 88% erzielt werden (Grimwade et al. 1998; Visani et al. 2001). Die AML des Erwachsenen weist häufiger als die von Kindern zytogenetische Veränderungen auf, die als prognostisch schlechte Parameter bekannt sind (Ferrara et al. 1998). Auch sekundäre, therapieassoziierte myeloische Leukämien sind durch charakteristische Chromosomenveränderungen gekennzeichnet. So treten bei sekundären AMLs nach einer Therapie mit alkylierenden Substanzen besonders häufig Verluste der Chromosomen 5 und 7 oder von Teilen dieser Chromosomen auf. Nach einer Behandlung mit Topoisomerasehemmern liegen bei sekundären AMLs häufig Aberrationen mit Beteiligung der Chromosomenbande 11q32 vor (Pedersen-Bjergaard und Andersen 1998).

1.2.2.3 Die Bedeutung hyperdiploider Chromosomensätze bei der AML

Bei der akuten myeloischen Leukämie werden bei 14-21% der Kinder hyperdiploide Blasten gefunden (Leblanc und Berger 1997). In einer Gruppe von 179 erwachsenen Patienten wurde ein hyperdiploider Karyotyp in 4,4% der Fälle gefunden. Unter allen zytogenetischen Gruppen zeichnete sich dabei diejenige mit hyperdiploiden Karyotyp durch die längste mediane Überlebenszeit aus (Becher 1994). Dabei spielen jedoch vor allem numerische Veränderungen im niedrig hyperdiploiden Bereich mit Zugewinnen von einigen wenigen Chromosomen eine Rolle. In durchflusszytometrischen Messungen des DNA-Index wurde nur in 1,3% der Fälle mit erhöhtem DNA-Index ein Wert über 1,15 erreicht (>52-53 Chromosomen). Ein DNA-Index >1,15 war dabei mit einer besonders kurzen Überlebenszeit verbunden (Barlogie et al. 1987). Eine einheitliche Bewertung der prognostischen

Aussagekraft eines hyperdiploiden Chromosomensatzes mit erhöhtem DNA-Index konnte nicht erreicht werden (Hiddemann et al. 1986b; Duque et al. 1993).

Einige wenige Fälle von AML mit einem triploiden oder tetraploiden Karyotyp sind beschrieben (Trujillo et al. 1971; Testa et al. 1983; Abe et al. 1985; Zelante et al. 1988; Lemez et al. 1994; Kwong et al. 1994; Kwong und Wong 1995; Clarke et al. 1996; Xue et al. 1996; Lemez et al. 1998; Au et al. 1998; Laurenti et al. 2000). Aus diesen konnte bisher keine einheitliche klinische Gruppe definiert werden. Zum Teil war ein tetraploider Karyotyp mit einer schlechten Prognose verbunden, insgesamt konnte jedoch aufgrund der geringen Fallzahl keine Bewertung erfolgen (Espinet et al. 1998; Lemez et al. 1998; Au et al. 1998). In einigen Fällen wurden Zelllinien mit diploiden und tetraploiden Metaphasen und entsprechend doppelt vorliegenden strukturellen Aberrationen gefunden. Dies könnte ein Indiz für die primäre Natur der strukturellen Veränderung sein, die dann ursächlich für eine Verdopplung des Chromosomensatzes sein könnte (Kohler et al. 1994; Xue et al. 1996; Xue et al. 2000).

1.2.3 Non-Hodgkin-Lymphome

1.2.3.1 Einteilung der Non-Hodgkin-Lymphome

Die wichtigsten 3 Klassifikationssysteme für NHL sind die REAL-Klassifikation von 1994, die KIEL-Klassifikation 1982 und die Working Formulation von 1982. Die zwei von mir untersuchten NHL waren nach der KIEL-Klassifikation klassifiziert. Das zentrozytische B-Zelllymphom der KIEL-Klassifikation entspricht dabei in der REAL-Klassifikation dem Mantelzelllymphom. Das lymphoblastische T-Zelllymphom entspricht in der REAL-Klassifikation dem Precursor-T-lymphoblastischen Lymphom (Stein et al. 1997).

1.2.3.2 Bedeutung genetischer Veränderungen für die Klassifikation der NHL

Lymphome unterscheiden sich von Leukämien dadurch, dass die malignen Zellen vorrangig in Lymphknoten und anderen Lymphgeweben und nicht im Knochenmark oder Blut lokalisiert sind. Die Klassifizierung der Non-Hodgkin-Lymphome ist seit mehr als zwei Jahrzehnten Gegenstand leidenschaftlicher Diskussionen. Weltweit standen sechs Klassifizierungssysteme nebeneinander. Im Jahre 1994 wurde die REAL-Klassifikation als Versuch einer Vereinheitlichung vorgeschlagen. Da spezifische genetische Veränderungen am ehesten biologische Einheiten widerspiegeln, werden dieser neuen Klassifikation neben morphologischen und immunologischen Kriterien auch molekulargenetische Eigenschaften zu Grunde gelegt (Harris et al. 1994; Stein et al. 1997). Zytogenetische Untersuchungen konnten

dabei durch die Beschreibung wiederkehrender Chromosomenaberrationen wesentlich zur Differenzierung bestimmter Gruppen beitragen. Ein Beispiel ist die Translokation t(11;14)(q13;q32), die häufig bei Mantelzelllymphomen gefunden wird oder die Translokation t(14;18)(q32;q21), die mit dem zentroblastisch-zentrozytischen (follikulären) Lymphom assoziiert und mit einer sehr guten Prognose verbunden ist (Le Beau 1990; Ong und Le Beau 1998). Andere zytogenetische Veränderungen konnten mit fortgeschrittenen Erkrankungsphasen von Lymphomen in Zusammenhang gebracht werden (Johansson et al. 1995; Knutsen 1998).

1.2.3.3 Leukämische Verlaufsformen von NHL

Obwohl die Non-Hodgkin-Lymhome vorrangig Tumoren der Lymphknoten oder anderer lymphatischer Gewebe sind, können auch bei den Lymphomen maligne Zellen im Blut zirkulieren oder das Knochenmark infiltrieren. Bei 14-20% aller NHL kommt es zu einer leukämischen Verlaufsform mit Ausschwemmung von Lymphomzellen in das Blut (Tura et al. 1985). Zum Teil finden sich solche leukämischen Zellen bereits zu Beginn der Erkrankung, zum Teil führt ein leukämisches Blutbild zur Diagnose einer malignen Erkrankung. Meist ist dann die diagnostische Differenzierung gegenüber einer chronisch lymphatischen oder einer anderen lymphatischen Leukämie erschwert. Obwohl die Diagnose eines Lymphoms vorrangig auf der histologischen Untersuchung des befallenen Gewebes basiert, können zytologische, zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen der im Blut zirkulierenden Zellen bereits eine vorläufige Diagnose zulassen und zum Teil wesentlich zur Klassifizierung beitragen. Zum Beispiel lassen sich die oben genannten typischen Chromosomenaberrationen des zentroblastisch-zentrozytischen (follikulären) oder des Mantelzelllymphoms auch in den zirkulierenden Zellen nachweisen. Auch konnten bei leukämisch verlaufenden NHL, zusätzlich zu den primären wiederkehrenden Chromosomenaberrationen, sekundäre zytogenetische Veränderungen nachgewiesen werden, die mit der leukämischen Transformation verbunden sind (Khokhar et al. 1995; Bain und Catovsky 1995).

Die Häufigkeit einer leukämischen Verlaufsform ist in den Untergruppen der Lymphome unterschiedlich. Insgesamt tritt sie häufiger bei niedriggradigen Lymphomen auf. Auch die prognostische Bedeutung eines leukämischen Verlaufes ist in den verschiedenen Subgruppen nicht einheitlich. Vor allem bei hochmalignen NHL kommt ihm eine prognostische Bedeutung zu. Beim Burkitt-Lymphom tritt eine leukämische Transformation in der

Spätphase der Erkrankung auf und weist auf eine schlechte Prognose hin (Tura et al. 1985; Bain und Catovsky 1995).

1.2.3.4 Numerische Chromosomenveränderungen bei Non-Hodgkin-Lymphomen

In durchflusszytometrischen Messungen an Non-Hodgkin-Lymphomen zeigen sich DNA-Indices, die häufig im hyperdiploiden (DNA-Index 1-1,3) oder peritetraploiden (DNA-Index 1,8-2,3) Bereich liegen. Dabei finden sich Zellen mit erhöhtem DNA-Gehalt bei aggressiven Lymphomen mit 50-60% wesentlich häufiger als bei niedrigmalignen NHL (10-20% der Fälle) (Braylan 1993; Duque et al. 1993). Trotzdem hat sich in durchflusszytometrischen Messungen der DNA-Index nicht als eigenständiger prognostischer Faktor erwiesen (Braylan 1993; Duque et al. 1993). Auch in zytogenetischen Untersuchungen ließen sich keine eindeutigen Aussagen machen. Bei T-NHL fanden sich polyploide Karyotypen häufiger bei fortgeschrittenen und hochmalignen Formen (Schlegelberger et al. 1994; Knutsen 1998). Bei zentroblastisch-zentrozytischen (follikulären) Lymphomen war eine Einteilung nach Chromosomenzahl nicht prognostisch relevant (James et al. 1998).

Zum Teil können Zusammenhänge zwischen hyperdiploiden und polyploiden Karyotypen und leukämischer Verlaufsform gesehen werden. Bei Mantelzelllymphomen mit der Translokation t(11;14)(q13;q32) und leukämischer Verlaufsform fanden sich gehäuft hyperdiploide Karyotypen (Daniel et al. 1995). Auch Ott et al. fanden bei Mantelzelllymphomen mit dieser Translokation gehäuft polyploide Zellen und vermuteten einen Zusammenhang mit der Translokation t(11;14)(q13;q32). Dabei fanden sich polyploide Zellen gehäuft bei lympho-blastischen Formen, welche besonders häufig einen leukämischen Verlauf zeigen (Tura et al. 1985; Ott et al. 1997).

1.3 Methoden zur Untersuchung numerischer Chromosomen-veränderungen

1.3.1 Klassische Zytogenetik

Nach wie vor ist die klassische Zytogenetik die zentrale Methode in der Tumorzytogenetik. Dabei werden die Chromosomen im Stadium der Metaphase analysierbar gemacht und mit Hilfe verschiedener Bänderungsfärbungen lichtmikroskopisch dargestellt. Die Chromosomenbänderung erlaubt die Identifizierung einzelner Chromosomen. Veränderungen in dem für ein bestimmtes Chromosom typischen Bänderungsmuster deuten auf strukturelle Aberrationen wie Translokationen, Deletionen oder Inversionen hin (Mitelman et al. 2001). Da es bei Leukämien verhältnismäßig einfach ist, Probenmaterial zu gewinnen, Tumorzellen

anzuzüchten und Metaphasen zu gewinnen, sind die Leukämien von allen malignen Tumoren die am besten untersuchten (Raimondi 1993; Mitelman et al. 1998). Die klassische Zytogenetik ist aber auch mit Nachteilen behaftet (Le Beau 1993): Zur Präparation von Metaphasezellen sind frische teilungsfähige Zellen erforderlich. Bei 5-45% der ALL-Patienten ist es nicht möglich, eine ausreichende Anzahl sich teilender Zellen zu gewinnen (Fenaux et al. 1988; Hudis et al. 1990; Williams et al. 1990; Walters et al. 1990; Hawkins und Secker-Walker 1991; Raimondi et al. 1996). Auch wenn teilungsfähige Zellen kultiviert worden sind, ist oft aufgrund schlechter Chromosomenmorphologie oder unzureichender Metaphasenspreitung eine Identifizierung der Chromosomen und das Erkennen struktureller Veränderungen nicht möglich. Vor allem die malignen Zellen bei der ALL scheinen sich durch eine besonders schlechte Chromosomenmorphologie auszuzeichnen (Czepulkowski und Rooney 2001). Die Identifizierung hinzugewonnener oder fehlender Chromosomen bei ALL-Patienten mit mehr als 50 Chromosomen ist aus diesem Grund mit der klassischen Zytogenetik nur in etwa der Hälfte der Fälle möglich (Ritterbach et al. 1998). Bei 20-40% der ALL-Patienten mit einer ausreichenden Anzahl von Metaphasen gelingt es überhaupt nicht, irgendwelche Chromosomenveränderungen festzustellen (Fenaux et al. 1988; Hudis et al. 1990; Williams et al. 1990; Walters et al. 1990; Hawkins und Secker-Walker 1991; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996; Raimondi et al. 1996; Secker-Walker et al. 1997; Chessells et al. 1997). Auch bei 5-10% der akuten myeloischen Leukämien kann mit der konventionellen zytogenetischen Diagnostik aufgrund unzureichender Metaphasenqualität der Karyotyp nicht eindeutig bestimmt werden (Bloomfield und de la Chapelle 1987).

1.3.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Durch Hybridisierungstechniken ist es möglich, bestimmte DNA-Sequenzen in einem Zell-Präparat aufzufinden. Dabei macht man sich zu Nutze, dass zwei Nukleinsäure-Einzelstränge die Eigenschaft haben, sich wieder zu Doppelsträngen zusammenzulagern, wenn sie sich in ihrer Basenabfolge entsprechen. Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) benutzt man einen DNA-Einzelstrang, der in seiner Basenfolge einem bestimmten Gen entspricht, als Sonde, um das entsprechende Gen z.B. in einer Leukämiezelle aufzufinden. Die Nukleotide der Sonde sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die DNA der Zellen auf dem Objektträger wird denaturiert. Die Sonde bindet an den entsprechenden Einzelstrang der Zielsequenz und bildet mit ihr einen Doppelstrang. Unter einem Fluoreszenzmikroskop kann man nun erkennen, wo sich die Sonde angelagert hat, wo sich also die Zielsequenz befindet.

Neben Translokationen und anderen strukturellen Veränderungen ist es mittels FISH auch möglich, Veränderungen der chromosomalen Zusammensetzung nachzuweisen. Dafür benutzt man Sonden, welche spezifisch für ein bestimmtes Chromosom sind. An den Zentromeren liegen kurze, sich wiederholende DNA-Sequenzen, sogenannte „Tandem-Repeats“. Aufgrund ihrer geringen Größe und hoher Kopienzahl hybridisieren diese Sequenzen besonders leicht und führen zu kräftigen Signalen. Der Einsatz chromosomenspezifischer Zentromersonden für die bei $ALL^{>50}$ häufig überzählig vorhandenen Chromosomen lässt erkennen, wie oft das entsprechende Chromosom vorhanden ist: Liegt es in der normalen Kopienzahl vor, so hat man zwei Fluoreszenzsignale, liegt es überzählig vor, zählt man, je nach Anzahl der Zugewinne, drei oder mehr Fluoreszenzsignale (Tosi et al. 1994; Heinonen und Mahlamäki 1996; Cuneo et al. 1997; Ritterbach et al. 1998). Benützt man als Sonden viele verschiedene sich ergänzende DNA-Fragmente, die insgesamt das Genom eines bestimmten Chromosoms repräsentieren, kann man mittels FISH auch ganze Chromosomen anfärben und so deren Kopienzahl bestimmen. Diese Methode wird "chromosome painting" genannt (Carter 1994).
Der Nachteil der FISH-Technik besteht darin, dass vor dem Experiment die Wahl einer geeigneten Sonde und damit die Beschränkung auf einen kleinen Ausschnitt des Genoms erfolgen muss. Es ist nicht möglich, überblicksartig das Genom nach möglichen Veränderungen abzusuchen und neue bisher unbekannte Veränderungen zu erkennen, da man für unbekannte Zielsequenzen keine geeigneten Sonden herstellen kann. Man muss also vorher wissen, was man sucht.

1.3.3 Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Möchte man in einem Chromosomensatz ein nicht genau zu identifizierendes, verändertes Chromosom genauer charakterisieren, so kann man das entsprechende Chromosom mittels Durchflußzytometrie oder Mikrodissektion isolieren und die DNA des Chromosoms als Sonde einsetzen. Das bedeutet, dass die zu untersuchende DNA als Sonde eingesetzt wird. Diese Sonde lässt man auf normale Metaphasechromosomen hybridisieren. Jetzt färbt die DNA des unbekannten Chromosoms die entsprechenden Chromosomen der normalen Metaphase an. Die Chromosomen des gesunden Satzes sind leicht zu identifizieren und verraten die Herkunft der DNA und damit die Zusammensetzung des veränderten Chromosoms. Die Comparative Genomische Hybridisierung ist eine Weiterentwicklung dieses „reverse chromosome painting“ (Carter et al. 1992; Joos et al. 1993; Carter 1994). Sie ermöglicht in einem einzigen Hybridisierungsexperiment überblicksartig die Bestimmung der Chromosomen und Chromosomenregionen, die in einem Test-Genom über- oder

unterrepräsentiert sind. Bei dieser Methode wird die gesamte genomische DNA einer zu untersuchenden Zellpopulation zusammen mit einer Referenz- DNA auf normale Metaphasenchromosomen hybridisiert. Die Referenz-DNA stammt von einem gesunden Spender und enthält demnach außer eventuell vorhandenen genetischen Polymorphismen kein über- oder unterrepräsentiertes genetisches Material. Test- und Referenz-DNA sind unterschiedlich markiert und können mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen dargestellt werden, z.B. grün für die Test- und rot für die Referenz-DNA. Test- und Referenz-DNA werden zu gleichen Teilen gemischt. War im Testgenom zum Beispiel das Chromosom 4 in vierfacher statt in zweifacher Kopienzahl vorhanden, so ist die Konzentration der grünen Test-DNA von Chromosom 4 in diesem Gemisch doppelt so hoch wie die rote Referenz-DNA von Chromosom 4. Bei der Hybridisierung konkurrieren nun beide um die entsprechenden Zielsequenzen auf den Chromosomen 4 der normalen Metaphase. Es resultiert eine zweifach stärkere Anfärbung der Metaphasechromosomen 4 mit Grün als mit Rot. Diese unterschiedliche Anfärbung lässt sich meist schon mit bloßem Auge erkennen, für eine zuverlässige Auswertung ist jedoch eine digitale Bildauswertung mit computerunterstützter Berechnung der Färbeverhältnisse notwendig (Abbildung 1.3.3).

Mit dieser Methode können nicht nur Verluste und Hinzugewinne von ganzen Chromosomen, sondern auch Über- und Unterrepräsentationen einzelner Chromosomenregionen aufgedeckt werden. In einem Tumor wären dann Deletionen, der Verlust von genetischem Material, möglicherweise der Sitz eines Tumorsuppressorgens. Ein Zugewinn genetischen Materials, oder eine Amplifikation, also Vervielfältigung genetischen Materials, würde auf ein Onkogen in der entsprechenden Region hinweisen.

Vor allem bei der Erforschung von nicht-hämatologischen, soliden Tumoren hat die CGH enorme Fortschritte gebracht. Die Gewinnung und Anzüchtung von Tumorzellen solider Tumoren ist mit größeren Schwierigkeiten verbunden als die Kultur leukämischer Blasten: Das Tumorgewebe ist oft nekrotisch, die Zellen teilen sich in Kulturen nur sehr langsam und sind z.B. bei Kolonkarzinomen häufig bakteriell überwuchert. Die Präparation von Metaphasechromosomen liefert häufig schlecht auswertbare, komplex veränderte Chromosomensätze. Oft ist es nicht möglich, zu erkennen, inwieweit die ausgewerteten Metaphasen auch die primären genetischen Veränderungen des Tumors in vivo wiederspiegeln (Houldsworth und Chaganti 1994; James 1999). Viele dieser Probleme lassen sich mit der CGH umgehen. Es ist einfach, aus Tumorgewebe DNA zu gewinnen, und in einem einzigen Hybridisierungsexperiment bekommt man einen Überblick über die Regionen

des Tumorgenoms in vivo, die Zugewinne und/oder Verluste aufweisen und im Hinblick auf die Tumorentstehung von Bedeutung sein könnten.

Zeitgleich mit der CGH wurde 1992 von Telenius und Mitarbeitern eine Variante der Polymerasekettenreaktion (PCR) entwickelt, die nicht nur einen bestimmten Ausschnitt des Genoms vervielfältigt, sondern gleichmäßig das gesamte Genom vermehren kann (Telenius et al. 1992). Dabei kommen degenerierte kurze Nukleotidabfolgen als Startsequenzen unter speziell gewählten Reaktionsbedingungen zum Einsatz (degenerate oligonucleotide primed PCR; DOP-PCR). Durch diese Methode der universellen DNA-Vermehrung ist es seither möglich, auch aus sehr wenig Probenmaterial ausreichende Mengen an DNA für eine CGH-Untersuchung zu gewinnen. Dadurch wurde die Untersuchung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Archivproben, von Material aus Feinnadelpunktionen und sogar von einzelnen Zellen möglich (Speicher et al. 1993; James et al. 1997; Kuukasjarvi et al. 1997; Weber et al. 1998; Wells et al. 1999; Voullaire et al. 1999). Da auch aus archiviertem Tumorgewebe DNA gewonnen werden kann, wurden nach der Vorstellung der CGH-Methode durch Kallioniemi 1992 in kurzer Zeit praktisch alle Tumoren auf genetische Imbalancen untersucht und eine Vielzahl neuer wiederkehrender Veränderungen beschrieben (Kallioniemi et al. 1992; Knuutila et al. 1998). Zum Beispiel wurde mittels CGH gezeigt, dass beim Mammakarzinom häufig die Region 20q13 amplifiziert ist (Tanner et al. 1994; Kallioniemi et al. 1994a). Zwei neue Gene, die an dieser Amplifikation beteiligt und für die Tumorentstehung und Progression von Bedeutung sein könnten, wurden daraufhin entdeckt (Anzick et al. 1997; Sen et al. 1997; Albertson et al. 2000; Martin et al. 2001). Außerdem können durch die Untersuchung verschiedener Malignitätsstufen eines Tumors die genetischen Hintergründe der Tumorprogression eindrücklich beleuchtet werden: Zum Beispiel ist der Übergang einer zervikalen Dysplasie in ein invasives Zervixkarzinom durch den Hinzugewinn der Region 3q charakterisiert. Dieser Befund ist auch von diagnostischer Bedeutung (Heselmeyer et al. 1996; Knuutila et al. 1999).

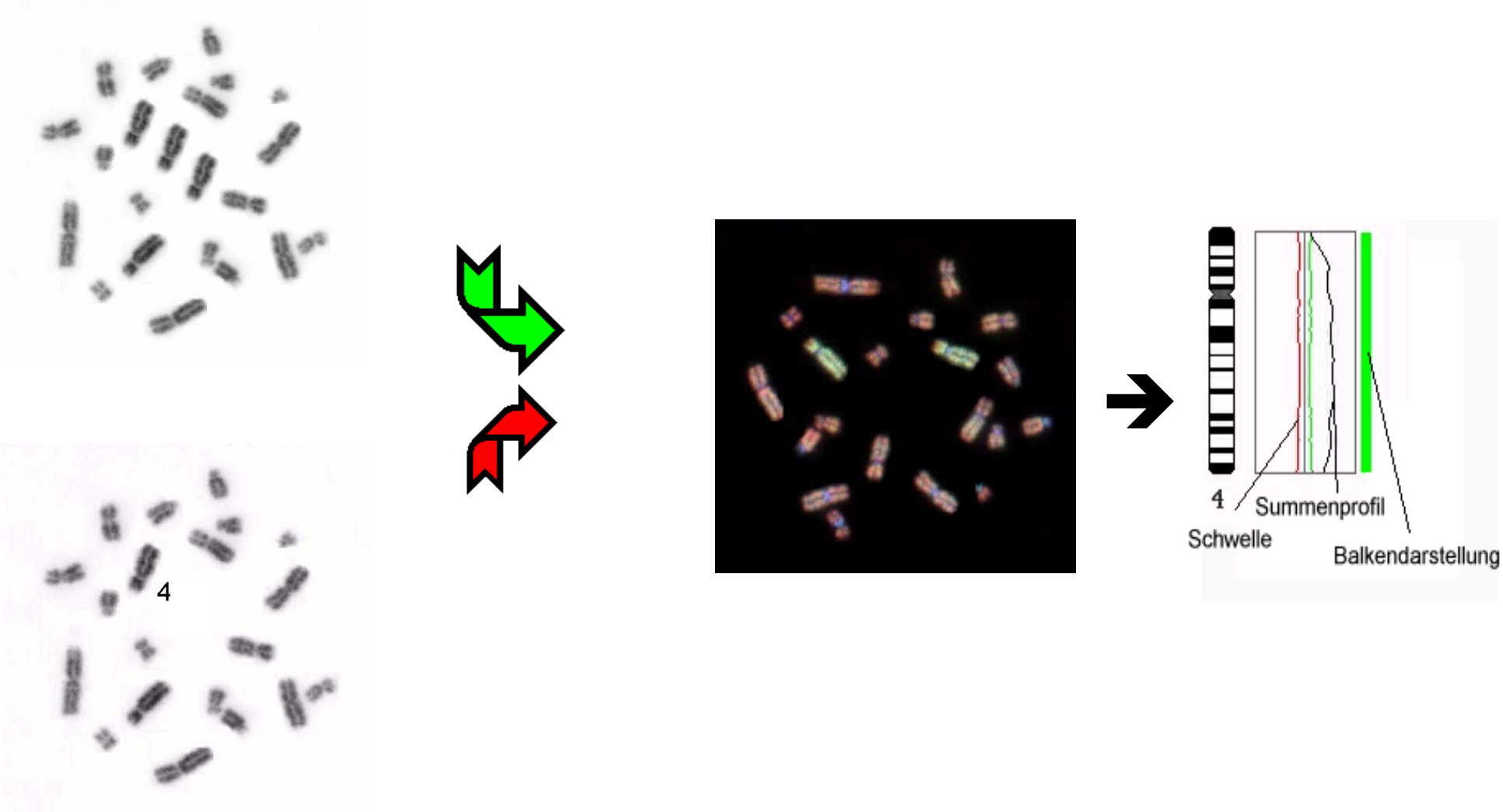
Die CGH ist hervorragend geeignet, die chromosomale Zusammensetzung von numerischen Aberrationen bei der akuten lymphatischen Leukämie und anderen hämatologischen Neoplasien zu untersuchen. Sie bildet einen Chromosomensatz mit überzähligen Chromosomen, die unter Umständen schwer zu identifizieren sind, auf einem gut lesbaren normalen Karyotyp ab. Die CGH kann aber auch Hinweise auf strukturelle Aberrationen liefern. Es ist allerdings nicht möglich, balancierte Veränderungen wie Translokationen oder Inversionen zu detektieren, da diese nicht zu einer Verschiebung der DNA-Dosis und damit der Fluoreszenzverhältnisse führen. Wenn eine unbalancierte strukturelle Aberration vorliegt,

oder z.B. in einem hyperdiploiden Satz ein Translokationschromosom hinzugewonnen ist, führt dies jedoch zu partiellen Imbalancen, die in der CGH indirekte Hinweise für eine strukturelle Aberration liefern können.

Die Comparative Genomische Hybridisierung ist auch mit Nachteilen behaftet. Die Auswertung der CGH ist nur semiquantitativ möglich. Eine quantitative Aussage über die genaue Kopienzahl hinzugewonnener Chromosomen kann nicht getroffen werden. Ein genereller Intensitätsunterschied beider Fluoreszenzfarbstoffe ist oft durch rein experimentelle Variablen bedingt. So wird eine experimentell bedingte Mehranfärbung aller Chromosomen durch eine Farbe bei der Berechnung der Verhältnisse der Fluoreszenz-Intensitäten durch eine Normalisierung der Werte ausgeglichen. Von der CGH wird also nur eine relative Überrepräsentation oder Unterrepräsentation im Vergleich zu den anderen Chromosomen erkannt.

Durch die CGH wird die DNA einer bestimmten Zellpopulation untersucht. Diese Zellpopulation ist jedoch meist nicht homogen, sondern eine Mischung aus normalen Zellen ohne genetische Veränderungen und verschiedener Klone des Tumors mit unterschiedlichen Veränderungen. Die CGH-Analyse liefert ein Querschnittsbild all dieser in der untersuchten DNA vorhandenen Genome. Dadurch kann die Aussagekraft der CGH vermindert sein (Zitzelsberger et al. 1997).

Möchte man durch die CGH Amplifikationen oder Deletionen nachweisen, um Rückschlüsse auf aktivierte oder inaktivierte Gene zu ziehen, welche z.B. an der Entstehung numerischer Veränderungen beteiligt sind, so ist zu beachten, dass die Sensitivität der CGH diesbezüglich begrenzt ist: Die Amplifikation einer Region, die weniger als zwei Megabasen umfasst, entgeht dem Nachweis durch die CGH, es sei denn sie ist in sehr hoher Kopienzahl vorhanden (Joos et al. 1993; Piper et al. 1995). Deletionen werden in der CGH nur gesehen, wenn eine Region von mehr als 10 Mb verloren gegangen ist (Kallioniemi et al. 1994b; Bentz et al. 1998).



Chromosom 4 ist im Test-Genom des Tumors in vierfacher Kopienzahl vorhanden (oben). Im Referenz-Genom liegt Chromosom 4 in zweifacher, normaler Kopienzahl vor (unten).

Im DNA-Gemisch der Hybridisierungslösung liegt die „grüne“ DNA von Chromosom 4 aus dem Tumorgenom in doppelt so hoher Konzentration vor wie die „rote“ DNA von Chromosom 4 aus dem Referenzgenom.

Dadurch kommt es nach der Hybridisierung und Detektion zu einer mehr grünen als roten Anfärbung von Chromosom 4 der Ziel-Metaphase.

Durch eine computerunterstützte Auswertung werden die Farbintensitäten der einzelnen Chromosomen von mehreren Zielmetaphasen statistisch ausgewertet und als Summenprofil dargestellt. Überschreitet das Summenprofil eine bestimmte Schwelle, wird dies schematisch als Balken dargestellt.

Abbildung 1.3.3: Schematische Darstellung der Comparativen Genomischen Hybridisierung. Um eine übersichtliche Darstellung zu erreichen haben die Metaphasen nur wenige Chromosomen.

1.3.3.1 Die Bedeutung der CGH für die Erforschung der ALL

Da sich die CGH besonders für die Identifizierung hinzugewonnener Chromosomen in einem komplexen Karyotyp eignet, wurde die CGH schon bald zur Untersuchung der ALL des Kindesalters, vor allem der hyperdiploiden Formen eingesetzt (Karhu et al. 1997; Paszekvigier et al. 1997; Wong et al. 1998; Haas et al. 1998; Cao et al. 1998; Larramendy et al. 1998a; Larramendy et al. 1998b; Rice et al. 2000; Jarosova et al. 2000; Scholz et al. 2001). In den meisten Studien wurden dabei die Ergebnisse der konventionellen zytogenetischen Diagnostik mit den Ergebnissen der CGH-Diagnostik verglichen. Dabei zeigte sich, dass in den meisten Fällen bei guter Qualität der zytogenetischen Präparate die Ergebnisse der CGH und der konventionellen zytogenetischen Diagnostik gut übereinstimmen (Wong et al. 1998). Bezüglich der hinzugewonnenen Chromosomen wurden in allen CGH-Studien die Ergebnisse der klassischen Zytogenetik bestätigt. In fast allen Fällen, in denen durch die konventionelle Zytogenetik die chromosomale Zusammensetzung hyperdiploider Sätze nicht bestimmt werden konnte, war die CGH in der Lage, die Herkunft der hinzugewonnen Chromosomen unzweifelhaft zu bestimmen. Obwohl die CGH balancierte strukturelle Veränderungen, vor allem Translokationen nicht aufdecken kann, zeigte sich interessanterweise in mehreren Fällen, dass die CGH bezüglich partieller Imbalancen als Ausdruck unbalancierter struktureller Aberrationen eine höhere Sensitivität hat, als die konventionelle Zytogenetik. In mehreren Fällen wurden unbalancierte strukturelle Veränderungen in komplexen hyperdiploiden Sätzen durch die zytogenetische Diagnostik nicht erkannt und erst in der CGH sichtbar (Larramendy et al. 1998a; Jarosova et al. 2000). Von den meisten Autoren wird deshalb die Kombination aus konventioneller Zytogenetik, CGH und FISH zur vollständigen Aufdeckung chromosomaler Zugewinne empfohlen. Die CGH kann Auskunft über die Art der hinzugewonnenen Chromosomen liefern, die dann die Wahl einer geeigneten FISH-Sonde zur Bestimmung der Kopienzahl der entsprechenden Chromosomen ermöglicht (Haas et al. 1998).

Karhu et al verwendete die DOP-PCR, um kleine Mengen DNA, die direkt aus Knochenmarklymphozyten gewonnen war, zu amplifizieren und anschließend in die CGH einzusetzen (Karhu et al. 1997). Die DOP-PCR wurde jedoch bisher noch nicht eingesetzt, um DNA aus archivierten Leukämiezellen, die für die zytogenetische Diagnostik bereits aufbereitet und fixiert waren, für die CGH zu amplifizieren. Dadurch ist es möglich, auch bei Leukämien große Mengen an vorhandenem Archivmaterial im nachhinein noch mittels CGH auf genetische Imbalancen zu untersuchen. Die CGH wurde noch nicht eingesetzt, um

genetische Imbalancen und numerische Veränderungen bei der ALL des Erwachsenen zu untersuchen.

1.3.3.2 Die Bedeutung der CGH für die Erforschung der AML

Auch bei der akuten myeloischen Leukämie wurden eine Reihe von CGH-Untersuchungen durchgeführt (Mohamed et al. 1993; Nacheva et al. 1995; Bentz et al. 1995a; El-Rifai et al. 1997; Huhta et al. 1999; Crossen et al. 1999; Heller et al. 2000; Bruckert et al. 2000; Castuma et al. 2000; Kim et al. 2001). Dabei zeigte sich teilweise eine so genaue Übereinstimmung mit den zytogenetischen Befunden, dass der Wert der CGH in der Routinediagnostik angezweifelt wurde (Huhta et al. 1999). In vielen Studien konnte die CGH allerdings neue, durch alleinige zytogenetische Diagnostik nicht erkannte Chromosomenaberrationen aufdecken (Nacheva et al. 1995; Castuma et al. 2000; Kim et al. 2001). Einen wichtigen Beitrag zur genetischen Charakterisierung der akuten myeloischen Leukämie kann die CGH bei der Identifizierung extrachromosomalen genetischen Materials liefern (Crossen et al. 1999). In manchen Fällen liegt bei der AML amplifizierte DNA in Form von sogenannten double minute Chromosomen vor. Mittels CGH kann dieses Material auf seine Ursprungschromosomen „abgebildet“ werden. So konnten double minutes der Region 8q24 zugeordnet und das genetische Material als Amplifikate des MYC-Onkogens identifiziert werden (Mohamed et al. 1993; Bruckert et al. 2000).

1.3.3.3 Die Bedeutung der CGH für die Erforschung der Non-Hodgkin-Lymphome

Die zytogenetische Befundung bei Lymphomen ist ähnlich wie die der soliden Tumoren durch die limitierte Verfügbarkeit frischen Tumormaterials erschwert. Mittels CGH wurde es möglich, Lymphknotenbiopsat und archiviertes Lymphomgewebe auf spezifische genetische Veränderungen zu untersuchen (Bentz et al. 1995b). In kurzer Zeit sind deshalb eine Vielzahl von CGH-Studien an Lymphomen durchgeführt worden (Bentz et al. 1995b; Monni et al. 1996; Bentz et al. 1996; Werner et al. 1997; Avet-Loiseau H et al. 1997; Monni et al. 1997; Dierlamm et al. 1997a; Dierlamm et al. 1997b; Barth et al. 1998; Autio et al. 1998; Rao et al. 1998; Chan et al. 1998; Werner et al. 1998; Bea et al. 1999; Alqahtani et al. 1999; Peters et al. 2000; Bentz et al. 2000; Arranz et al. 2000). Dadurch konnte gezeigt werden, dass Amplifikationen als Mechanismus der Onkogenaktivierung bei Lymphomen wesentlich häufiger vorkommen als dies aufgrund von zytogenetischen Untersuchungen erwartet wurde. Außerdem wurden eine Reihe von neuen Onkogenen entdeckt (Bentz et al. 1995b; Werner et al. 1997). Aber auch zur Unterscheidbarkeit verschiedener Lymphome kann die CGH

beitragen. So konnte in der Gruppe der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome das primäre mediastinale B-Zelllymphom abgegrenzt werden, das sich in CGH-Studien durch spezifische genetische Veränderung (z.B. 9p-Deletionen) als eigenständige biologische Gruppe erwies und inzwischen auch mit einem eigenen Behandlungsschema erfolgreich therapiert wird (Joos et al. 1996; Stein et al. 1997). In vielen Studien waren dabei genetische Imbalancen mit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung und aggressiven Verlaufsformen assoziiert. So wurde es durch die CGH auch bei Lymphomen möglich, in großen klinischen Studien detaillierte Kenntnisse über den Zusammenhang von Chromosomenaberrationen und klinischen Verlauf zu erwerben (Bentz et al. 1995b).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

- Ist es möglich, aus archivierten Zellsuspensionen von Chromosomenpräparationen aus kultivierten ALL-Blasten DNA für die CGH zu gewinnen und damit auch bei der ALL retrospektive CGH -Studien durchzuführen ?
- Lässt sich bei der ALL des Erwachsenen die CGH zur näheren Charakterisierung der chromosomalen Zusammensetzung bei numerischen Aberrationen einsetzen? Welche Übereinstimmungen und Diskrepanzen bestehen im Vergleich zur konventionellen zytogenetischen Diagnostik? Lassen sich Unterschiede in der chromosomalen Zusammensetzung bei Erwachsenen und bei Kindern erkennen?
- Kann die CGH zusätzliche Informationen über die Häufigkeit und die Art unbalancierter struktureller Aberrationen liefern?
- Inwieweit liegen bei der ALL des Erwachsenen genetische Imbalancen oder Amplifikationen vor, die Hinweise auf neue Onkogene liefern?
- Kann die CGH durch die Identifikation hinzugewonnener Chromosomen und die Detektion partieller Imbalancen Hinweise für das Verständnis der Ätiologie numerischer Aberrationen und für die Identifizierung möglicher biologischer Untereinheiten bei der ALL mit numerischen Aberrationen liefern?
- Finden sich genetische Imbalancen, denen prognostische Relevanz zukommen könnte?
- Lassen sich bei leukämisch verlaufenden NHL mit mehr als 50 Chromosomen durch die CGH genetische Imbalalancen detektieren, die prognostisch relevant sind oder mit einer leukämischen Verlaufsform assoziiert sind? Lassen sich genetische Veränderungen finden, die die Ätiologie der numerischen Veränderungen bei den NHL erklären können?
- Lassen sich bei der AML mit chromosomalen Zugewinnen spezifische genetische Imbalancen detektieren?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Fallzahlen und Diagnosen

Untersucht wurden insgesamt 20 Patienten mit leukämischem Blutbild, 17 männliche und 3 weibliche, von denen im Rahmen der zentralen zytogenetischen Diagnostik der deutschen multizentrischen Therapiestudie der ALL der Erwachsenen (Leiter: Prof. Dr. D. Hoelzer, Frankfurt) Knochenmark- und/oder Blutproben an die AG Tumorgenetik (Leiter: PD Dr. med. Harald Rieder) am Institut für Klinische Genetik der Philipps-Universität zur zytogenetischen Analyse eingesandt wurden. Ich untersuchte nur solche Fälle, die im Rahmen der zytogenetischen Routinediagnostik eine Chromosomenzahl von mehr als 50 Chromosomen aufwiesen. Dabei war mir die genaue Diagnose und der genaue Karyotyp der Fälle bis zum Abschluss der Auswertung der Experimente nicht bekannt. Die Befunde der immunologischen Untersuchungen wurden mir freundlicherweise von den Mitgliedern der zentralen immunologischen (Prof. Dr. E. Thiel, Berlin, und Prof. Dr. W.-D. Ludwig, Berlin) und die der zytomorphologischen Analyse von den Mitgliedern der zentralen morphologischen (Prof. Dr. W. Gassmann, Siegen, PD Dr. G. Horst, Kiel) Diagnostik der ALL-Studie zur Verfügung gestellt. Die zytogenetische Befundung wurde im Rahmen der Routinediagnostik der Tumorzytognetik Marburg durchgeführt.

Von den 20 untersuchten Patienten lautete bei 16 Patienten die Diagnose ALL. Zwei Patienten wiesen eine AML und zwei Patienten ein NHL auf. Von den 16 ALL-Patienten zeigten in der immunphänotypischen Klassifizierung 12 Patienten einen common-Typ und ein Patient einen prä-B-Typ. Drei Patienten waren immunphänotypisch nicht klassifiziert. In der Gruppe der ALL wiesen zehn Patienten einen hoch-hyperdiploiden Karyotyp mit 51-57 Chromosomen, vier einen nahezu triploiden und zwei einen nahezu tetraploiden Chromosomensatz auf. Von den beiden Fällen eines leukämisch transformierten Non-Hodgkinlymphoms wies ein Patient ein lymphoblastisches T-NHL mit nahezu triploidem Chromosomensatz, der andere Patient ein zentrozytisches NHL (cc-NHL) mit nahezu tetraploidem Chromosomensatz auf. Beide Patienten mit AML zeigten Chromosomenzahlen im nahezu triploiden Bereich.

Bei 14 Patienten lag als Ausgangsmaterial für die DNA-Gewinnung Blut vor, bei einem Patient Knochenmarkpunktat. Von acht Patienten lagen zum Teil mehrere Jahre archivierte Zellsuspensionen fixierter Zellen aus Zellkulturen vor. Bei sieben dieser acht Patienten waren

die Zellkulturen aus Knochenmark, bei einem Patienten aus Blut. Bei 3 der untersuchten Patienten konnte ich das Ergebnis der CGH nach verschiedenen DNA-Aufbereitungsmethoden vergleichen.

Zur Etablierung der CGH-Methode und als Kontrollprobe bei den verschiedenen Falluntersuchungen diente die Zelllinie RiFo280/93**,** einer reifen B-Zell-Leukämie mit 48 Chromosomen und einem komplex aberranten Karyotyp.

Tabelle 3: Übersicht über die 20 untersuchten Patienten

Fall	Alter	Ge-schlecht	Diag.	Immun-phänotyp	Ploidie-Grad	Für CGH verwendetes Material	
						nativ	Fixierte Zellen
1.	18	m	ALL	common	hh	KM	KM
2.	63	m	ALL	common	hh	pB	
3.	18	m	ALL	common	hh	pB	pB
4.	45	w	ALL	common	hh	pB	
5.	37	m	ALL	common	hh	pB	
6.	26	m	ALL	common	hh		KM
7.	26	m	ALL	common	hh	pB	
8.	47	m	ALL	common	hh	pB	
9.	27	m	ALL	n.n.b	hh	pB	
10.	41	m	ALL	prä-B	hh		KM
11.	61	w	ALL	common	n-tri		KM
12.	42	m	ALL	common	n-tri		KM
13.	66	m	ALL	common	n-tri	pB	
14.	52	m	ALL	n.n.b.	n-tri	pB	
15.	27	m	ALL	common	n-tetra		KM
16.	40	m	ALL	n.n.b.	n-tetra	pB	
17.	60	w	NHL	T-NHL	n-tri	pB	
18.	59	m	NHL	cc-NHL	n-tetra	pB	KM
19.	76	m	AML	M5	n-tri	pB	
20.	44	m	AML	M0	n-tri	pB	

Abkürzungen: n.n.b.: nicht näher beizeichnet; hh: hoch-hyperdiploid; n-tri: nahezu triploid; n-tetra: nahezu tetraploid; pB: peripheres Blut; KM: Knochenmark. Nativ: das Ausgangsmaterial wurde direkt eingesetzt. Fixierte Zellen: Es handelte sich um archivierte Zellsuspensionen fixierter Zellen aus Zellkulturen.

2.2 Chromosomenbandenanalyse

2.2.1 Probenentnahme und Transport

Grundlagen:

Die Chromosomenanalysen erfolgten an Knochenmarkzellen aus Sternal- und Spina-Iliaca-Punktionen und/oder aus Zellen des peripheren Blutes. Von den Einsendern wurde beachtet, dass eine Materialentnahme immer vor Einleitung einer zytoreduktiven Therapie erfolgen musste, da nach Therapiebeginn das Ergebnis verfälscht würde. Die Proben sollten innerhalb eines Tages im Labor eintreffen, da sich nach der Entnahme das Milieu, in dem sich die Zellen befinden, verändert: Nährstoffangebot, Abtransport von Stoffwechselprodukten, Regulation des Elekrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes sind nicht mehr gewährleistet. Dies beeinträchtigt insgesamt die Zellausbeute, verändert aber auch die Zusammensetzung der einzelnen Zellpopulationen: Es muss davon ausgegangen werden, dass sich der Anteil maligner Zellen verringert, da sie einerseits der spontanen Apoptose anheim fallen und andererseits von anderen Zellen überwuchert werden können (Williams et al. 1984). Mindestens 2-3 ml Knochenmarkaspirat sowie 5-10 ml Blut, mit Li-Heparin versetzt, wurden unmittelbar nach Entnahme per Expresspost an das Tumorzytogenetiklabor versandt.

2.2.2 Zellkulturen

Grundlagen:

Für die Zellkulturen werden kommerziell erhältliche Nährstofflösungen verwendet, um den Leukämiezellen möglichst optimale Milieubedingungen für ein Wachstum in vitro zu bieten.
Sicherlich kennen wir nicht alle Faktoren, die für ein optimales Wachstum der Zellen nötig sind. Um das natürliche Zusammenspiel zwischen Blut- und Stromazellen nicht zu zerstören und physiologische Wachstumsfaktoren zu erhalten, wird das Probenmaterial ohne größere Manipulationen oder Auftrennung der zellulären Bestandteile direkt in die Kulturen eingesetzt (McGinnes et al. 1991; Manabe et al. 1992; Eder et al. 1992). Es gibt Hinweise darauf, dass Leukämiezellen verstärkt auf einen Nebenstoffwechselweg zurückgreifen, bei dem der DNA- Baustein Thymidintriphosphat direkt aus Thymidin gewonnen wird (Wilmanns 1967; Hallek et al. 1992). Um einem vermehrten Bedarf der leukämischen Zellen an Thymidin gerecht zu werden, werden auch Kulturen mit Thymidin versetzt. Zusätzlich werden Antiobiotika hinzugegeben, die verhindern sollen, dass Pilze oder Bakterien die Kulturen überwuchern. Die Dauer der Zellkultivierung kann sich unterschiedlich auf das Wachstum verschiedener Zellarten auswirken, weshalb für jede Probe verschiedene Kulturen

mit unterschiedlichen Kulturzeiten angesetzt werden (Knuutila et al. 1981; Stewart und Secker-Walker 1986; Li et al. 1991).

Lösungen:

McCoy´s Nährmedium:	Fa. GIBCO BRL/ Life-Technologies
RPMI 1640 Nährmedium:	Fa. PAN-Biotech (GIBCO BRL)
Antibiotikalösung:	GIBCO BRL/Life-Technologies
	10000 IE Penicillin G/ml
	10000µg/ml Streptomycin
	25µg/ml Amphotericin B
Fötales Kälberserum (FKS):	Fa. Life Technologies
Thymidin:	Fa. Life Technologies

Vorgehen:

Als Kulturmedium diente 1 ml FKS, gemischt mit 4ml der Nährmedien RPMI 1640 oder McCoy´s 5a. Die Nährmedien wurden vorher mit der Antibiotikalösung versetzt (1ml Antibiotikalösung auf 100 ml Nährmedium). Ein Teil der Kulturen wurde mit Thymidin (4ng/ml) angesetzt. Pro Ansatz wurden nicht mehr als 0,5 ml KM-Aspirat oder Blut verwendet. Die Kulturen wurden in Zentrifugenröhrchen (Fa. Harre) bei 37°C für 24h, 48h, und 72h im Wärmeschrank, Kurzzeitkulturen für 4h im 37° warmen Wasserbad, inkubiert.

2.2.3 Chromosomenpräparation

Grundlagen:

Die Chromosomen der Zellen sind im Zellteilungsstadium der Metaphase maximal kondensiert, und damit am besten darstellbar. Indem den Zellkulturen das Spindelgift Colcemid®, eine chemisch modifizierte Form des Colchizins, zugegeben wird, kommt es zur Hemmung der Ausbildung des Spindelapparates, wodurch sich teilende Zellen im Stadium der Metaphase anhäufen. Durch gleichzeitige Zugabe von DNase kann überschüssige freie DNA verdaut und die Chromosomenqualität verbessert werden. Danach lässt man die Zellen in hypotoner Kaliumchloridlösung quellen. Dabei kommt es zu einer Ausdehnung der Zellen und einer besseren Verteilung der Metaphasechromosomen. Damit die Struktur der Metaphasechromosomen dauerhaft erhalten bleibt, werden sie in mehreren Waschgängen mit Carnoy´s Fixativ, einem Essigsäure/ Methanol- Gemisch behandelt. Dabei kommt es zur Auflösung der Zellmembran. Die fixierten Zellen werden auf Objektträger aufgetropft. Beim

Auftropfen breiten sich die Chromosomen aus, so dass sie einer numerischen und strukturellen Analyse zugänglich werden.

Für die zytogenetische Befundung ist eine übersichtliche Metaphasenspreitung von großer Bedeutung. Die einzelnen Chromosomen sollten in voller Ausdehnung sichtbar sein, nicht übereinander liegen, aber auch nicht völlig versprengt sein. Verschiedene Faktoren spielen dabei eine Rolle: Die Objektträger sollten fettfrei und mit Wasser benetzt sein. Temperatur, Luftfeuchtigkeit und vor allem die Auftropfhöhe sind wichtige Einflussgrößen und können gegebenfalls variiert werden (Weiss et al. 1999).

Lösungen:

hypotone Kaliumchloridlösung:	0,075 M KCl-Lösung
Colcemid®:	10 µg/ml, Fa. Life Technologies
DNase:	100 µg/µl in 50% Glycerin, Fa. Boehringer
Carnoy´s Fixativ:	Methanol: Eisessig = 3:1, -20°C kalt
	Methanol, Eisessig: Fa. Merck

Vorgehen:

2h vor Ende der Inkubationszeit gab ich 0,1 ml Colcemid® und 50 µl der DNase-Lösung zu den Kulturen. Danach zentrifugierte ich die Zellen bei 1000 U/min (195x g) für 7 min ab, nahm den Überstand mit der Pipette ab und schüttelte das Sediment vorsichtig wieder auf. Unter ständigem, langsamen Schütteln (Vortex, Stufe 1) tropfte ich ca. 9 ml hypotone KCL-Lösung hinein und ließ diese für 15 min einwirken. Nach erneuter Zentrifugation mit 700 U/min (95x g), Abnahme des Überstandes und Aufschütteln der Zellen, fixierte ich diese, indem ich, wiederum bei Vortex Stufe 1, tropfenweise 5-7ml Carnoy´s Fixativ hinzufügte. Für die Chromosomenqualität entscheidend ist, dass dieser Schritt anfangs vorsichtig und langsam geschieht. Danach erfolgten erneut eine Zentrifugation (900 U/min für 7 min), Abnahme des Überstandes, Resuspension und Zugabe von Fixativ. Danach wiederholte ich die letzten Schritte zur Waschung der fixierten Zellsuspension. Zum Schluß stellte ich mir eine Auftropflösung mit einer geeigneten Konzentration an Zellkernen her, indem ich nach der letzten Abzentrifugation mehr oder weniger Fixativ abnahm und das Sediment zu einer homogenen Suspension aufmischte.

Die Objektträger legte ich für 2h in 100% vergällten Alkohol ein, spülte sie danach mehrmals mit destilliertem Wasser, um sie dann, mit Eiswürfeln und Aqua bidest. eisgekühlt, zu verwenden. Ich tropfte Suspension aus verschiedenen Höhen auf die mit Wasser benetzten

Objektträger auf, kippte überschüssige Suspension seitlich ab, um die Präparate dann luftzutrocknen.

2.2.4 Chromosomenbandenfärbung mit Giemsa

Lösungen:

Giemsalösung:	Azur-Eosin-Methylenblau Fa.Merck
Phosphatpuffer:	3,6 mM KH_2PO_4, 2,75 mM Na_2HPO_4, pH 7,2
	(1,14 g $Na_2HPO_4x2H_2O$; 0,49 g KH_2PO_4 ad 1000 ml aqua bidest,
	pH 6,72)
Modifiziertes	
2xSSC:	0,03 M tri-Natriumcitrat 0,095 M NaCl

Vorgehen:

Für die G-Bandenfärbung wurden die bis zu 3 Tagen gealterten Chromosomen über Nacht in einer modifizierten 2xSSC-Lösung inkubiert. Die anschließende Färbung erfolgte in einer 5%-gen Giemsa-Lösung in Phosphatpuffer für 2,5 min. Nach Lufttrocknung wurden die Präparate mit Corbit-Balsam eingedeckt (Fonatsch et al. 1980).

2.2.5 Zytogenetische Befundung

Zur Karyotypisierung der Metaphasen wurde die Software „Ikaros“ der Firma MetaSystems verwendet. Die Klassifikation von Chromosomenveränderungen erfolgte entsprechend dem Internationalen System für humane zytogenetische Nomenklatur (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995) (ISCN 1995). Damit Veränderungen des Karyotyps als charakteristisch für die malignen Blasten betrachtet werden können, mussten folgende Kriterien erfüllt sein: Es darf sich nicht um eine konstitutionelle, d.h. angeborene Veränderung handeln. Die Veränderung sollte klonal sein, d.h. in mehreren Zellen beobachtet werden können: Die gleichen strukturelle Veränderungen und Hinzugewinne von Chromosomen sollten mindestens in 2 Zellen, Verluste in mindestens 3 Zellen zu sehen sein (ISCN 1995; Secker-Walker et al. 1997).

Zunächst wird die modale Chromosomenzahl angegeben. Das ist die Anzahl von Chromosomen pro Zelle, die am häufigsten auftritt, wenn Zellpopulationen mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen vorkommen. Danach folgt die Nennung der Geschlechtschromosomen, dann numerische sowie strukturelle Veränderungen.

2.2.5.1 Numerische Chromosomenveränderungen

Der einfache Chromosomensatz mit 23 Elementen wird als haploid bezeichnet. Der normale Chromosomensatz des Menschen, bei dem jedes Autosom doppelt vorliegt, ist diploid mit 46 Elementen. Entsprechend werden Sätze mit 69 als triploid, mit 92 als tetraploid bezeichnet (Ploidiegrad). Bewegt sich die Chromosomenzahl mit +/- 11 um ein ganzzahliges Vielfaches des haploiden Satzes, wird dies z.B. als "nahezu diploid" bezeichnet. Abweichungen nach unten werden mit "hypo", Abweichungen nach oben mit "hyper" gekennzeichnet. Verluste oder Zugewinne von einzelnen Chromosomen werden in Bezug zum Ploidiegrad mit + und - gekennzeichnet.

Tabelle 4: Ploidiegrade numerischer Aberrationen

Ploidiegrad	modale Chromosomenzahl
nahezu haploid	<= 34
hypohaploid	< 23
hyperhaploid	24-34
nahezu diploid	35-57
hypodiploid	35-45
hyperdiploid	47-57
nahezu triploid	58-80
hypotriploid	58-68
hypertriploid	70-80
nahezu tetraploid	81-103
hypotetraploid	81-91
hypertetraploid	93-103

Tabelle 5: Beispiele

26,X,+4,+6,+21:	ein hyperhaploider Karyotyp mit 2 Kopien von Chromosom 4, 6, und 21 und einer Kopie aller anderen Chromosomen.
71,XXX,+8,+10:	ein hypertriploider Karyotyp mit 4 Kopien der Chromosomen 8 und 10 und drei Kopien aller anderen Chromosomen.
89,XXYY,-1,-3,-5,+8,-21:	ein hypotetraploider Karyotyp mit 3 Kopien der Chromosomen 1,3,5 und 21, 5 Kopien von Chromosom 8 und 4 Kopien aller anderen Chromosomen.

2.2.5.2 Strukturaberrationen

Durch Strukturaberrationen wird die Morphologie der Chromosomen verändert. Für ihre exakte Beschreibung ist eine eindeutige Benennung der Chromosomenabschnitte nötig. Das Zentromer unterteilt das Chromosom in einen kurzen und einen langen Arm (p- und q-Arm). Innerhalb der Arme werden anhand der Bandenfärbung einzelne Regionen, Bande und Subbande unterschieden. 2q37.1 bezeichnet die Subbande 1 der Bande 7 der Region 3 auf dem langen Arm von Chromosom 2. Um Veränderungen in Kurzform beschreiben zu können benützt man untenstehende Abkürzungen. Danach werden in Klammern die beteiligten Chromosomen genannt, in einer zweiten Klammer die beteiligten Chromosomenregionen.

Tabelle 6: Überblick über die Nomenklatur struktureller Chromosomenaberrationen mit Beispielen

t	= translocation	Verlagerung eines Chromsomenstückes an ein anderes Chromosom.
	46,XY,t(2;5)(q21;q13):	Die Banden 2q21 und 5q31 sind gebrochen, die Chromosomenfragmente wurden in veränderter Form wieder zusammengefügt. Dabei kam es zu einem Stückaustausch der distal zu diesen Banden liegenden Segmente. Es liegen zwei Chromosomen mit veränderter Struktur vor. Der Chromosomensatz bleibt balanciert, kein Chromosomen-material geht verloren oder wird hinzugewonnen.
del	= deletion	Verlust eines Chromosomenstückes
	46,XX,del(5)(q13):	Verlust des terminalen Endes des langen Armes von Chromosom 5 ab dem Segment q13.
add	= additional	Angelagertes chromosomales Material unbekannter Herkunft.
	46,XX,add(19)(p13):	An das Segment 19p13 ist chromosomales Material angelagert, dessen Ursprung nicht bekannt ist.
i	= isochromosome	Chromosom, das aus den identischen kurzen oder langen Armen eines Chromosoms zusammengesetzt ist.
	46,XX,i(17)(q):	Ein Isochromosom, das aus dem langen Arm von Chromosom 17 zusammengesetzt ist. Zusätzlich besteht ein normales Chromosom 17. Der Chromosomensatz ist unbalanciert, mit Zugewinn von 17q und Verlust von 17p.

der	= derivative	Aus Anteilen von zwei oder mehr Chromosomen zusammengesetztes oder in sich zwei- oder mehrfach verändertes Chromosom. Das Chromosom mit intaktem Centromer wird als Derivatchromosom bezeichnet.
	46,XX,der(1)t(1;3)(p22; q13):	Das Derivatchromosom 1 resultiert aus einer Translokation des distal von Segment 3q13 liegenden Teiles von Chromosom 3 an den kurzen Arm von Chromosom 1 an die Bande 1p22. Dabei ersetzt das der(1) ein normales Chromosom 1. Das fehlende normale Chromosom 1 muss nicht extra benannt werden. Zusätzlich bestehen bei dieser Beschreibung zwei normale Chromosomen 3. Der Karyotyp ist unbalanziert mit Verlust von Segment 1p22-pter und Zugewinn von 3q13-qter.
inc	= incomplett	Am Ende einer zytogenetischen Formel, bedeutet inc, dass nicht alle Chromosomen befundet wurden, d.h. eine genaue Aussage über die Zusammensetzung des Karyotyps, seinen balancierten oder imbalancierten Zustand konnte nicht getroffen werden.
mar	= marker chromosome	Rearrangiertes Chromosom gänzlich unbekannter Herkunft und Zusammensetzung. Falls ein Teil des Chromosoms bekannt ist, sollte es als Derivatchromosom beschrieben werden, z.B.: der(9)t(9;?)(q34;?). Das Fragezeichen steht dabei für nicht identifiziertes Material.
r	= ring chromosome	Der kurze und der lange Arm eines Chromosoms sind unter Stückverlusten des Chromosoms fusioniert.
dup	= duplication	Verdoppelung eines Chromosomenabschnittes

2.3 DNA-Aufbereitung für die Comparative Genomische Hybridisierung

2.3.1 Gewinnung hochmolekularer DNA aus Blut und Knochenmark mittels Säulenaufreinigung

Grundlagen:

Für die CGH wird genomische Test-DNA und Referenz-DNA benötigt. Test-DNA kann sowohl aus Blut- als auch aus Knochenmarkproben der Patienten gewonnen werden. Referenz-DNA wird aus Blut eines gesunden Spenders gewonnen. Um DNA aus den Zellen des Blutes oder Knochenmarkes zu gewinnen, werden zunächst die Zellwände lysiert und die Zellkerne abzentrifugiert. Danach werden die Zellkerne aufgeschlossen und störende Proteine, wie Histone oder Nukleasen werden denaturiert und mit Proteinase K enzymatisch verdaut. Danach wird die DNA gereinigt. Dazu bedient man sich einer Anionenaustauschersäule. Diese besteht aus einem Grundgerüst, das positiv geladene Gruppen besitzt. Die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA binden besser als die weniger negativ geladenen Proteine oder RNA an diese Matrix. Die Anziehungskräfte der verschiedenen Ionen variieren je nach pH-Wert und Salzkonzentration der verwendeten Puffersysteme (Ionenstärke). Mit dem ersten Puffer wird die Bindungskraft der Säule eingestellt (äquilibriert). Danach wird die DNA-Lösung auf die Säule gegeben, die DNA bindet an das Säulengrundgerüst. Dann werden mit einem Waschpuffer alle Moleküle, die weniger stark als die DNA gebunden sind, ausgewaschen. Schließlich wird die so gereinigte DNA mit einem Puffer höherer Ionenstärke von der Säule gelöst (eluiert). Die anschließende Fällung mit Alkohol und Lösung in TE-Puffer dient der Konzentrierung (Qiagen Genomic DNA Handbook 1995; Mülhardt 1999).

Lösungen:

(Zell-)Lysepuffer 1:	80 mM Saccharose; 1,25 mM $MgCl_2$; 2,5 mM Tris/HCl; 0,25% Triton X100; pH 7,5
(Kern-)Lysepuffer 2:	800 mM GuHCl; 30 mM EDTA; 30 mM Tris/HCl; 5%Tween-20; pH 8,0
Proteinase K:	20 mg/ml H_20
Äquilibrationspuffer:	750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15% Äthanol; 0,15% Triton X-100; pH 7,0
Waschpuffer:	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Äthanol; pH 7,0

Elutionspuffer:	1,25 M NaCl; 50 mM Tris/HCl; 15% Äthanol; pH 8,5
TE- Puffer:	10 mM Tris/ HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
Isopropanol:	100%
Äthanol:	70%

Vorgehen:

Ich benützte ein DNA-Aufbereitungsset der Firma Qiagen, in dem Pufferlösungen und Anionenaustauschersäulen verbrauchsfertig geliefert werden (Quiagen Genomic-tip; Blood&Cell Culture DNA Kit).

Bei 5 ml eingesetztem Blut oder Knochenmark lysierte ich diese mit 20 ml Lysepuffer 1 für 10 min auf Eis, zentrifugierte die Kerne dann bei 4°C für 15 min mit 1300g ab, entfernte den Überstand und wusch erneut mit Lysepuffer 1. Die wiederum abzentrifugierten Kerne resuspendierte ich in 5ml Lysepuffer 2 und gab 95µl Proteinase K hinzu. Das Ganze inkubierte ich bei 50°C für 30-60 min. Dann gab ich 4 ml des Äquilibrationspuffers auf die Säule, danach die Lösung mit der aufgeschlossenen DNA, wusch zweimal mit 7,5 ml Waschpuffer und spülte zuletzt die DNA mit 5ml des Elutionspuffers aus der Säule aus. Um die DNA aus dem Elutionspuffer zu gewinnen und zu konzentrieren, gab ich zum Fällen 3,5 ml Isopropanol hinzu, zentrifugierte bei mindestens 5000g bei 4°C für mehr als 15 min, verwarf den Überstand, spülte das Pellet mit 2ml Äthanol, trocknete bei Raumtemperatur für 10 min, und löste die DNA schließlich in TE-Puffer bei 55°C über Nacht auf einem Rüttler.

2.3.2 Präparation niedrigmolekularer genomischer DNA mit Chelex 100®

Grundlagen:

Um auch Test-DNA aus fixierten Zellsuspensionen, die im Rahmen der zytogenetischen Routinediagnostik des Labors für Tumorzytogenetik archiviert worden waren, gewinnen zu können, bediente ich mich einer Methode, die auch in der forensischen Genetik benützt wird, um zum Beispiel aus Blutspuren noch DNA gewinnen zu können (Willard et al. 1998). Die nach der konventionellen Chromosomenanalyse verbliebenen, fixierten Zellsuspensionen enthielten häufig nur noch eine geringe Menge an Zellen. Zum Teil verwendete ich Zellsuspensionen, in denen mit bloßem Auge kein Bodensatz an Zellen zu erkennen war. Prinzipiell besteht der Prozess der DNA-Isolierung bei dieser Methode darin, die Zellen thermisch und mechanisch aufzuschließen und anschließend störendes Material zu entfernen. Mit Hilfe der Chelex 100®-Mikropartikel können störende Metallionen entfernt werden. An ihrer Oberfläche sind Methyliminodiacet-Säurereste gebunden, die als Chelatbildner

fungieren. Durch die Chelexkügelchen werden sowohl „PCR-Inhibitoren“ entfernt als auch die DNA während des Präparationsprozesses vor Zerstörung geschützt (Walsh et al. 1991). Dabei entsteht Einzelstrang-DNA mit einer Länge von ungefähr 500 bp (Promega et al. 1995).

Lösungen:

1x PBS-Puffer:	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4, aqua bidest ad 1000 ml, mit NaOH auf pH 7,2
Chelex 100®:	Ready Amp™ Kit der Firma Promega (Cat.No A7710)

Vorgehen:

Zunächst stellte ich eine Suspension der Chelexkügelchen her, indem ich 2 g Chelex 100® in 40ml sterilem aqua dest. bei 70°C für 4-5h quellen ließ (0,05 g/ml) . Solch eine Suspension ist auch gebrauchsfertig im Ready Amp™ Kit der Firma Promega (Cat.No A7710) enthalten.

In Carnoys Fixativ gelagerte Zellen wurden erst gründlich gereinigt: Ich zentrifugierte die Zellen bei 195x g 10 min ab, entfernte den Überstand, wusch die Zellen mit 10 ml PBS-Puffer und zentrifugierte erneut bei 195x g für 10 min. Nachdem ich den Überstand wieder verworfen hatte, nahm ich die im Bodensatz verbliebenen Zellen in 1 ml aqua dest. auf und überführte sie in ein kleines Eppendorf-Cup. Abermals Abzentrifugieren bei 195x g und Absaugen des Überstandes. Nachdem ich 200 µl der Chelex 100® -Suspension hinzugegeben hatte, ließ ich das Ganze bei 56°C und permanentem Schütteln für 14-16h inkubieren. Danach erhitzte ich die Lösung 10 min lang auf 100°C. Nach dem Abkühlen zentrifugierte ich erneut, um nun die DNA im Überstand zu finden, welchen ich in einen neuen Cup überführte.

2.3.3 Prüfung der Chelexpräparation durch PCR

Grundlagen:

Die Vervielfältigung der DNA in vitro (Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde von Kary Mullis erdacht (Saiki et al. 1985). Er wurde dafür 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Mullis et al. 1992). Die PCR beruht auf den folgenden drei Schritten: Der DNA-Doppelstrang wird bei einer Temperatur von 94°C denaturiert, danach kann sich bei einer Temperatur von 60°C der im Überschuss vorliegende Primer, ein zur Zielsequenz komplementärer Oligonukleotidstrang, an die entsprechende Stelle der DNA anlagern (Annealing). Die angelagerten Primer werden dann bei einer Temperatur von 72°C von einer DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Die Polymerase baut zugegebene Nukleotide (dNTPs) komplementär zum vorhandenen Einzelstrang ein, bis wieder ein DNA-

Doppelstrang vorliegt, welcher der ursprünglichen DNA exakt gleicht. Man verwendet 2 Primer, die jeweils am 3'- und 5'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs binden, um die Zielsequenz an beiden Enden einzugrenzen. Da die Denaturierung der DNA bei hohen Temperaturen von 95°C stattfindet, benützt man die hitzestabile Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus (Taq-Polymerase) (Saiki et al. 1988). Dadurch ist es möglich, die oben genannten Schritte mehrmals hintereinander zu wiederholen, bevor eine zunehmende Denaturierung der Polymerase einsetzt. Ich verwendete ein Primerpaar (HUMTHO1) mit den Sequenzen 5´-GTGGGCT-GAAAAGCTCCCGATTAT-3´ und 5´-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3´. Dieses führt zur Vermehrung einer 183-207 bp langen Sequenz aus dem Tyrosinhydroxylase-Gen auf Chromosom 11p15 (Edwards et al. 1992). Mg^{2+} bildet mit den freien Nukleotiden einen löslichen Komplex, wodurch deren Einbau in den wachsenden DNA-Doppelstrang erleichtert wird. Je höher die Magnesiumkonzentration ist, desto eher entstehen allerdings auch unspezifische Produkte, da die DNA-Polymerase unspezifische Bindungen eingeht (Williams 1989).

Lösungen:

Taq-Polymerase:	5 U/µl, AmpliTaq DNA Polymerase
	Fa. Perkin Elmer
PCR-Puffer:	„GeneAmp" Fa Perkin Elmer
	100 mM Tris-HCl, pH8,3; 500 mM KCl
$MgCl_2$:	GeneAmp Fa Perkin Elmer, 25 mM
dNTP´s:	GeneAmp dNTP´s Fa Perkin Elmer
	je 10 mM in aqua bidest.
	Ansatz: je 200 µM dNTP in aqua bidest.
BSA:	Fa. Pharmacia Biotech
	10,2 mg/ml in 1,0 mM EDTA (pH7,5)
Primerlösung HUMTHO1:	250 µM in aqua bidest.
Aqua bidest.:	ad 25 µl

Vorgehen:

Aus 2-5 µl der gewonnenen DNA-Lösung und den obengenannten Lösungen fertigte ich 25 µl eines Reaktionsgemisches, in dem 10 mM Tris-HCl (ph 8,3), 50 mM $MgCl_2$, 4% BSA,
1 U Taq-Polymerase und 2 µM Primer HUMTHO1 enthalten war. Die PCR erfolgte in einem Thermo-Cycler der Fa. Perkin Elmer. Nach einem initialen Schritt von 94°C für 5 min (initiale Denaturierung) amplifizierte ich in 30 Zyklen mit 94°C (Denaturierung) für je 45 sec,

60°C (Annealing) für je 30 sec und 72°C (Elongation) für je 30 sec. Die Reaktion endete mit einem Elongationsschritt von 2 min Dauer und anschließender Kühlung auf 4°C bis zur Entnahme der Amplifikate aus dem PCR-Gerät.

2.3.4 Vermehrung genomischer DNA mittels PCR mit degeneriertem Oligonukleotid-Primer (DOP-PCR)

Grundlagen:

Die DOP-PCR ermöglicht die universelle Vermehrung der gesamten genomischen DNA, da der verwendete Primer 6MW unter geeigneten Bedingungen unspezifisch an verschiedenen Stellen der DNA ansetzen kann. Zum einen beruht dies auf der degenerierten Struktur des Primers: 5´-CCG-ACT-CGA-GNN-NNN-NAT-GTG-G-3´. N steht dabei für zufällig gewählte Nukleotide. Der Primer deckt also rein rechnerisch 4^6 verschiedene Basensequenzen ab, macht es also möglich, die PCR an den verschiedensten Stellen des Genoms zu starten. Zum anderen wird das Annealing, der Teil des PCR-Zyklus, währenddessen sich der Primer an komplementäre Basensequenzen der zu vervielfältigenden DNA anlagert, bei niedrigeren Temperaturen als üblich durchgeführt. Dadurch ermöglicht man dem Primer, zusätzlich an Stellen des Genoms zu binden, an denen er einige Fehlpaarungen eingegangen ist: fehlgepaarte Basen können keine Wasserstoffbrücken ausbilden, der entstandene Doppelstrang ist weniger stabil und dissoziiert schon bei niedrigeren Temperaturen als ein exakt gepaarter Doppelstrang. Mit niedrigeren Annealingtemperaturen akzeptiert man also diese Fehlpaarungen des Primers. Um eine effektive Vermehrung der DNA zu erreichen, ist es nötig, nach diesen unspezifischen Zyklen bei niedriger Temperatur, einige Zyklen mit hoher Spezifität anzuschließen, das Annealing also bei hohen Temperaturen durchzuführen. In diesen Zyklen kann der Primer dann die in den ersten Zyklen hergestellten Stränge, welche schon das gesamte Genom repräsentieren, mit hoher Spezifität und Effizienz vermehren, indem er die in den unspezifischen Zyklen eingebauten Primer als Zielsequenz benützt (Telenius et al. 1992; Cheung und Nelson 1996).

Lösungen:

Taq-Polymerase:	5 U/µl, AmpliTaq DNA Polymerase
	Fa. Perkin Elmer
PCR-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl;
	GeneAmp Perkin Elmer
$MgCl_2$:	25 mM, GeneAmp Perkin Elmer
dNTP´s:	dNTP´s je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in aqua bidest.;
	GeneAmp Perkin Elmer
	Ansatz: je 200 µM dNTP in aqua bidest
BSA:	10,2 mg/ml in 1,0 mM EDTA, pH 7,5
	Fa. Pharmacia Biotech
Primer MW6:	Fa. Eurogenetic 200 µM
Aqua bidest.:	ad 50 µl

Vorgehen:

Aus 5-10 µl der gewonnenen DNA-Lösung und den obengenannten Lösungen fertigte ich eine Reaktionslösung, in der 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 2 µM Primer MW6, 1,0 mM $MgCl_2$, 4% BSA und 2,5 U/100µl Taq-Polymerase enthalten waren. Nach einem Schritt von 94°C für 5 min folgten 15 Zyklen mit 94°C für 1 min, 30°C für 1,5 min, Aufheizung von 30 auf 72°C innerhalb von 3 min und 72°C für 3 min. Diesem schlossen sich 20 Zyklen mit 94°C für 1 min, 62°C für 1 min und 72°C für 3 min an. Die DOP-PCR endete schließlich mit einem Schritt bei 72°C für 10 min.

2.3.5 Charakterisierung des PCR-Produktes mittels Agarose-Gelelektrophorese

Grundlagen:

Bei der Elektrophorese wandert das PCR-Produkt, die neu synthetisierte DNA, in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Je kürzer die entstandenen DNA-Fragmente sind, desto weiter können sie pro Zeiteinheit im Agarosegel gelangen. Die Ladung der DNA, pH-Wert des Laufpuffers, angelegte Spannung, Dichte der Agarosegitterstruktur sind weitere Faktoren, welche die Laufgeschwindigkeit beeinflussen. Dem Agarosegel wird der Farbstoff Ethidiumbromid zugegeben, welcher in die DNA interkaliert. Dadurch kann die DNA zur Auswertung des Gels im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Vergleicht man nun Laufstrecke des PCR-Produkts mit der Laufstrecke eines Längenmarkers, der DNA-Fragmente von definierter Länge besitzt, kann man auf die Länge des PCR-Produktes schließen. Verdaut man

die DNA des Bakteriophagen λ mit dem Restriktionsenzym Hind III, erhält man Fragmente von charakteristischer Länge, welche man als Längenmarker einsetzten kann. Zu erwähnen ist noch, dass der eingesetzte Blaumarker der groben Abschätzung der bisherigen Laufstrecke während der Elektrophorese dient.

Lösungen:

10xTBE-Puffer:	162,33 g Tris-Base, 46,37 g Borsäure, 9,3 g EDTA, aqua bidest. auf 1000 ml, pH 8,8. (1,34 M Tris, 750 mM Borsäure, 25 mM EDTA)
1xTBE-Puffer:	10 ml 10 x TBE-Puffer, 90 ml Aqua bidest.
1% Agarosegel:	auf 100 ml 1 x TBE-Puffer kommen 1 g Agarose und 1-2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Fa. Merck)
Laufpuffer:	5 µl des Chelex®-Produktes +5 µl aqua dest + 2 µl Blaumarker
Längenmarker:	λ Hind III: Fa. Life Technologies 0,5 µg/µl
Probenansatz:	2 µl λ Hind III Lösung + 8 µl Blaumarker + 2 µl aqua dest

Vorgehen:

Ich mischte in einem Erlenmayerkolben die Agarose mit dem TBE-Puffer und brachte das Gemisch in der Mikrowelle zum Kochen. Anschließend gab ich das Ethidiumbromid zu und goss mit der Lösung in einer Gelkammer der Firma Life Technologies (Horizontal Gel Electrophoresis System) ein 0,5-1 cm dickes Gel mit der benötigten Menge an Taschen für die Probenapplikation. Das Ganze wurde mit dem Laufpuffer übergossen, Längenmarkerlösung und die verschiedenen Probenlösungen in die Taschen eingebracht, und das Ganze bei einer angelegten Spannung von 80-90 V für etwa 30 min laufen gelassen. Die Elektrophoresegele photographierte ich mit einer Videokamera unter einer UV-Lampe mit 312 nm Wellenlänge (Herolab, E.A.S.Y.).

Bei der Prüfung des Erfolges der Chelexpräparation galt ein Produkt der erwarteten Größe von 183-207 bp (nach PCR mit dem Primer HUMTHO1) als Nachweis einer erfolgreichen DNA-Präparation (Abbildung 2.3.5.a). Auch den Erfolg der DOP-PCR prüfte ich durch Gelelektrophorese. Da es sich bei dem geprüften PCR-Produkt um genomische DNA mit Fragmenten unterschiedlichster Länge handelt, wird in der Elektrophorese keine Einzelbande, sondern ein kontinuierlicher "Schmier" sichtbar. Dabei galt ein möglichst deutlicher und gleichmäßiger "Schmier" als Zeichen des Erfolges (Abbildung 2.3.5.b).

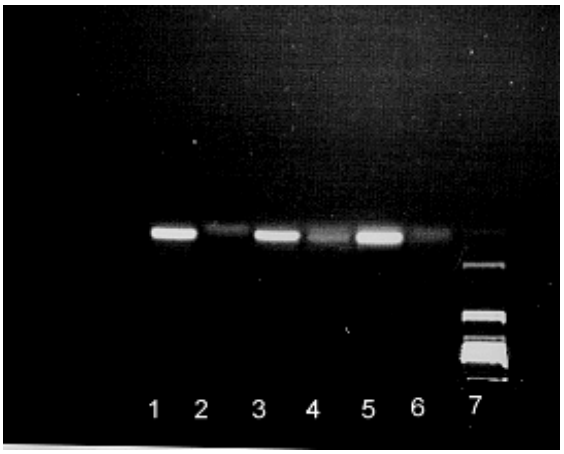


Abbildung 2.3.5.a: Elektrophorese verschiedener Chelexpräparationen nach Amplifikation mit Primern für HUMTHO1. Drei der sechs getesteten Präparationen zeigen ein deutliches Amplifikationsprodukt (Spuren 1,3 und 5; Spur 7= Längenmarker).

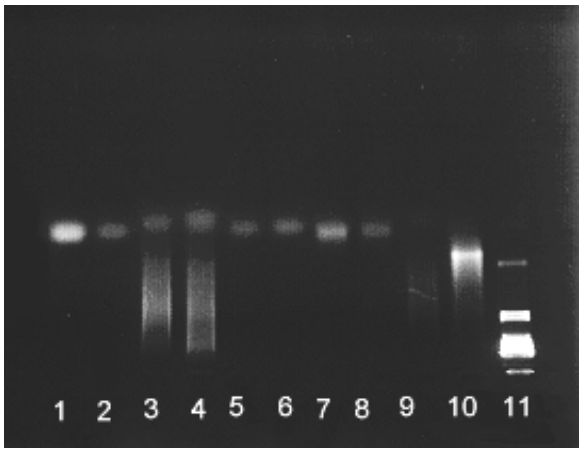


Abbildung 2.3.5.b: Elektrophorese verschiedener DOP-PCR-Produkte. Nur 2 der 9 Amplifikate zeigen in der Elektrophorese einen deutlichen „Schmier" als Zeichen des Präparationserfolges (Spuren 3 und 4; Spur 10 = genomische Kontroll-DNA, Spur 11 = Längenmarker).

2.3.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Grundlagen:

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA wird der Fluoreszenzfarbstoff (dye) bis-Benzimidazol (Hoechst 33258) verwendet, der sich an A-T-reiche Regionen der DNA bindet. Regt man diesen Farbstoff mit einer Wellenlänge von 365 nm an, so emittiert er Licht in einer Wellenlänge von 465 nm. Ein Fluorometer misst die Menge des emittierten Lichtes und somit indirekt die Konzentration der DNA. Das Fluorometer muss vor jeder Messung geeicht werden, indem man mit reiner Pufferlösung den Nullpunkt und mit einer DNA von definierter Konzentration die Skala festlegt. Die Messung findet in einem Puffer (TNE-Puffer) statt. Zu beachten ist, dass Hoechst 33258 zweimal besser an doppelsträngige als an einzelsträngige DNA bindet.

Lösungen:

10x TNE-Puffer:	100 mM Trispuffer, 10 mM EDTA, 58,4 g NaCl, ph 7,4
	(12,1 g Tris; 3,7 g EDTA; 58,4 g NaCl auf 1000 ml Aqua bidest.)
1x TNE-Puffer:	10 ml 10x TNE, 90 ml aqua bidest.
Dye-Lösung:	50 ml 1x TNE und 5 µl Dye (Hoechst 33258)
Kontroll-DNA-Lösung:	Kontroll-DNA pBR322 aus Nicktranslationskit der Fa. Boehringer Mannheim, 50 ng/µl

Vorgehen:

Zur Skalierung des Fluorometers (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) füllte ich zunächst reine Pufferlösung in die Messküvetten und fixierte den Nullpunkt der Eichskala. Danach setzte ich eine kommerzielle DNA-Lösung mit definierter Konzentration von 50 ng/µl zur Messung ein und skalierte das Fluorometer so, dass es diesen Wert anzeigte. Zur Herstellung der Messlösung mischte ich 2 µl DNA-Probe mit 1998 µl der dye-Lösung. Vor jeder neuen Messung einer DNA-Charge eichte ich das Fluorometer erneut.

2.4 Comparative Genomische Hybridisierung

2.4.1 Chromosomenpräparation eines gesunden Spenders für die CGH

Für die CGH werden Metaphasen eines gesunden männlichen Spenders als Hybridisierungsziel benötigt. Diese gewann ich aus den T-Lymphozyten meines eigenen Blutes, das ich in Li-Heparinröhrchen entnehmen ließ und analog der Chromosomenpräparation aus malignen Blasten, wie in Punkt 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben, aufbereitete. Dabei waren folgende Besonderheiten zu beachten:

Als Kulturzusatz wird das Lektin Phytohämagglutinin verwendet, welches das Wachstum von T-Lymphozyten stimuliert (Nowell 1960; Hungerford und Nowell 1962). Zur Gewinnung von Kontrollmetaphasen setzte ich also 1ml meines Blutes mit 1 ml fötalem Kälberserum, 10 ml McCoy´s, 2 ml Phytohämagglutinin (Fa. Life Technologies), den Antibiotika wie oben, in 50 ml Zellkulturflaschen (Fa. Nunclon) im 37°C Wärmeschrank für 72h an. Bei der anschließenden Aufbereitung legte ich strengen Wert auf eine langsam durchgeführte und homogene Fixierung der Kerne. Für die Auswertung der CGH ist es sehr wichtig, dass nach dem Auftropfen der Kontrollmetaphasen auf die Objektträger die einzelnen Chromosomen gut gespreitet und in voller Ausdehnung sichtbar sind, damit genügend übersichtliche und gut karyotypisierbare Metaphasen vorhanden sind. Unter dem Phasenkontrastmikroskop war es mir möglich, die Ergebnisse sofort nach dem Auftropfen zu begutachten. Ich verwendete nur solche Objektträger für eine CGH, die eine ausreichende Anzahl übersichtlicher, gut gespreiteter Metaphasen enthielten. Oft war es nötig, unter variierten Bedingungen erneut aufzutropfen, um befriedigende Ergebnisse erzielen zu können. Die verbliebene Zellsuspension konnte ich mit Fixativ aufgefüllt bei -20°C lagern und mehrmals verwenden.

2.4.2 Denaturierung der Chromosomen für die CGH

Grundlagen:

Die Denaturierung der Kontrollmetaphasen für die Hybridisierung führte ich nach einem Protokoll von Fritz et al. durch (Fritz et al. 1998). Dabei erfolgt die Denaturierung durch alkalische Hydrolyse mittels Natronlauge. Die Alkoholreihen dienen dem schonenden Re- und Dehydrieren, die Inkubation mit SSC-Puffer soll die Chromosomenstruktur verbessern.

Lösungen:

Äthanol:	100%, 70%, 50%, 30%
20x SSC-Puffer:	350,4 g NaCl + 176,4 g Na-Citrat ad 2000 ml Aqua dest.
	PH einstellen auf 7,4 und autoklavieren
2x SSC :	100 ml 20 x SSC +900 ml Aqua dest.
0,1 x SSC :	5 ml 20 x SSC + 995 ml Aqua dest.
0,07 N NaOH :	186 ml Aqua dest.+ 14 ml 1 N NaOH

Vorgehen:

Die über Nacht getrockneten Objektträger rehydrierte ich, indem ich sie jeweils für 1 min in 100%, 70%, 50%, 30% Äthanol stellte. Nach Inkubation für 1 min in 0,1x SSC, 10 min in 2x SSC und schließlich 30 min 2x SSC bei 75°C erfolgte nach Abkühlung der eigentliche Denaturierungsschritt für 1 min in 0,07N NaOH. Anschließend inkubierte ich die Objektträger für jeweils 1 min in eiskaltem 0,1x SSC und 2x SSC, um sie danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 100% Äthanol) zu dehydrieren und danach für mindestens 10 min luftzutrocknen.

2.4.3 Markierung der DNA durch Nicktranslation

Grundlagen:

Mit Hilfe der Nicktranslation wird in der Test- und Referenz-DNA die Base Thymin gegen die mit Digoxigenin oder Biotin markierte analoge Base Uracil ausgetauscht (Rigby et al. 1977). Nach der Hybridisierung können diese Markermoleküle dann über Reportermoleküle z.B. mit roten oder grünen Floureszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden. Dadurch wird die Test-DNA grün und die Referenz-DNA rot markiert. Die Nicktranslation geschieht mit Hilfe der Enzyme DNase I und DNA-Polymerase I. Die DNase I erzeugt an statistisch verteilten Stellen der DNA Einzelstrangbrüche, sogenannte “nicks“. Von diesen “nicks“ ausgehend synthetisiert die DNA-Polymerase eine zum intakten Strang komplementäre DNA, indem sie in 5’→3’ Richtung als Exonuclease Nukleotide entfernt und als Polymerase die

entsprechende Nukleotide wieder einbaut. Bietet man nun die markierten Nukleotide Biotin-11dUTP oder Digoxigenin-11dUTP an, so werden diese statt des analogen dTTP eingebaut. Die markierten Nukleotide behindern aufgrund der sterischen Anordung der gekoppelten Farbstoffe in der neu synthetisierten DNA den weiteren Einbau von Nukleotiden. Um zu vermeiden, dass eine unvollständige Neusynthese durch die Polymerase I erfolgt, wird dTTP, und markiertes dUTP und dTTP ungefähr im Verhältnis 1:3 angeboten.

Je nachdem wieviele "nicks" die DNase setzt, entstehen nach der Denaturierung Einzelstränge unterschiedlicher Länge. Die Substrate für die Enzymreaktion liegen im Überschuss vor, so dass die Aktivität der DNase und Polymerase, und damit die Fragmentlänge, durch die Wahl von Temperatur, Reaktionsdauer und Enzymkonzentration determiniert werden kann. Für die CGH werden Fragmentlängen von 500-1000 Nukleotiden verlangt (Kallioniemi et al. 1994b). Kürzere Fragmente erhöhen die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Hybridisierungen, längere Fragmente können schlechter zur Zielsequenz vordringen, da sie zu "sperrig" sind. Der von mir verwendete Nicktranslationskit der Firma Vysis lieferte Fragmente der Größe 300-3000 bp.

Lösungen:

Nukleotide:	Biotin-11-dUTP; 22,5 nMol/75µl = 0,3 mM (Fa.Sigma, Art.-Nr.B 6780) Digoxigenin-11-dUTP; 125 nMol/125µl = 1 mM (Fa.Boehringer Mannheim, Art.-Nr. 1558706)
unmarkierte Nukleotide:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, jeweils 60 nMol/200 µl = 0,3 mM (Aus Nicktranslationskit der Firma Vysis Cat.-No. 32-801024)
Puffer (Vysis):	500 mM Tris-HCL, pH 7.2, 100 mM $MgSO_4$, 1 mM DDT (Aus Nicktranslationskit der Firma Vysis Cat.-No. 32-801024)
Enzymmischung:	DNA-Polymerase I und DNase I in vom Hersteller vorgewählten Konzentrationen in 50% Glycerol, 50 mM Tris-HCL, pH 7.2, 10 mM $MgSO_4$, 0,1 mM DDT, 0.5 mg/ mL BSA (Aus Nicktranslationskit der Firma Vysis Cat.-No. 32-801024)
DNA:	genomische Test und Referenz- DNA in unterschiedlichen Konzentrationen
Aqua bidest.:	zum Einstellen der Konzentrationen

Vorgehen:

Ich fertigte aus 1 µg genomischer DNA, 5 µl Pufferlösung, Nukleotiden und Aqua bidest. 40 µl einer Lösung an, in der dATP, dCTP und dGTP jeweils in 20 µM, dTTP in 14 µM und das markierte dUTP in 6 µM Konzentration vorlagen. Für die Markierung der Test-DNA verwendete ich Digoxigenin-11-dUTP, für die Markierung der Referenz- DNA Biotin-11-dUTP. Um die Reaktionszeit besser kontrollieren zu können, kühlte ich dieses Gemisch erst auf Eis, bevor ich 10 µl der Enzymlösung hinzupipettierte und das Ganze bei 15°C für 2h im Wasserbad inkubierte. Durch Erhitzen auf 70°C für 10 min im Wasserbad wurden die Enzyme denaturiert und die Reaktion gestoppt.

2.4.4 Hybridisierung

Grundlagen:

Markierte Test- und Referenz-DNA werden im Verhältnis 1:1 gemischt und erhitzt. Bei hohen Temperaturen lösen sich die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Einzelsträngen. Das Gemisch wird auf die denaturierten Metaphasechromosomen gegeben. Bei niedrigeren Temperaturen finden sich komplementäre DNA-Sequenzen wieder spontan zu Doppelsträngen. Auch homologe DNA-Regionen, das heißt aufgrund interindividueller Unterschiede nicht völlig identische DNA-Stränge der gleichen Genomabschnitte von markierter DNA und Chromosomen-DNA können stabile Doppelstränge, Hybride, ausbilden. Je mehr Fehlpaarungen bei nicht genau identischen Regionen vorliegen, desto instabiler ist das Nukleinsäurehybrid. Die Zusammensetzung der Hybridisierungsmischung beeinflusst die Stabilität der Nukleinsäurehybriden: Deionisiertes Formamid hemmt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, und wirkt damit destabilisierend; Kationen wie Na^+, in SSC-Puffer enthalten, wirken stabilisierend auf die Doppelhelix. Deshalb kann man über ein entsprechendes Mischverhältnis dieser Substanzen auch den Anteil an schlecht gepaarten Hybridisierungen beeinflussen. Das in der Hybridisierungsmischung enthaltene Dextransulfat ist ein Polyanion, das eine Matrix für die DNA bildet und durch deren lokale Konzentration die Geschwindigkeit der Hybridisierung erhöht. Das menschliche Genom enthält eine große Anzahl repetitiver Sequenzen an verschiedenen Stellen, die untereinander so ähnlich sind, dass unspezifische Hybridisierungen nicht korrespondierender Genomabschnitte entstehen würden. Auf Grund ihrer Struktur und Häufigkeit finden sich diese repetitiven Sequenzen in einem Gemisch aus DNA-Einzelsträngen besonders schnell zu Doppelstranghybriden zusammen. Dies macht man sich zunutze, um diese Sequenzen zu supprimieren: Man gibt der markierten DNA in großen Mengen unmarkierte Cot-1 DNA hinzu. Das ist ein Teil der menschlichen DNA, welcher aus geschnittener Einzelstrang-DNA besonders schnell wieder

Doppelstränge gebildet hat und deshalb reich an solchen repetitiven Sequenzen ist (Britten et al. 1974; Marx et al. 1976). Die unmarkierte Cot-1 DNA blockiert die unspezifischen Stellen der Test- und Referenz-DNA, indem sie mit deren hochrepetitiven Sequenzen Doppelstränge bildet, so dass diese nicht mehr für eine Hybridisierung zur Verfügung stehen und unspezische Fluoreszenzsignale unterdrückt werden. Außerdem lässt man dem DNA-Gemisch, bevor man es auf die denaturierten Chromosomen gibt, noch etwas Zeit, damit sich diese schnellen unspezifischen Blockadebindungen ausbilden können, während die spezifischen Sequenzen einzelsträngig bleiben, da sie längere Zeit brauchen, um sich zu finden. Diese Inkubationsphase wird „Preannealing“ genannt (Landegent et al. 1987).

Lösungen:

DNA:	Markierte Test- und Referenz-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen
Cot-1 DNA:	1 mg/ml (Fa. Life Technologies)
LiCl:	100%
Äthanol:	100 Vol %
Äthanol:	70 Vol %
Formamid:	100% deionisiertes Formamid ultra Pure (Fa. Gibco BRL/Life Technologies)
20 x SSC-Puffer:	350,4 g NaCl + 176,4 g Na-Citrat ad 2000 ml Aqua dest. PH einstellen auf 7,4 und autoklavieren.
4 x SSC-Puffer:	20 ml 10 x SSC + 80 ml Aqua dest.
Dextransulfat:	Fa. Pharmacia Biotech
Mastermix:	20% Dextransulfat , 4 x SSC
Fixogum:	Marabuwerke GmbH & Co, Tamm

Vorgehen:

Ich mischte je 100- 400 ng markierter Test- und Referenz-DNA in gleichen Verhältnissen und fügte 25 µl Cot1-DNA hinzu. Dann fällte ich die DNA aus, indem ich sie mit 5,6µl 4M LiCl einsalzte und 195 µl 100% eiskaltes Äthanol zugab, mischte, und bei -20°C für mindestens 30 min kühlte. Die ausgefällte DNA zentrifugierte ich bei 13000 U/ min und 4°C ab, verwarf den Überstand und spülte das DNA-Pellet noch 2 mal mit 150 µl 70% Äthanol, um das LiCl voll auszuwaschen. Nach Abnahme des Überstandes ließ ich das Pellet für 30 min an der Luft trocknen, pipettierte dann 7,5 ml Formamid hinzu und löste darin die DNA bei 37°C auf einem Rüttler für mindestens 1h, meist über Nacht. Die DNA-Lösung mischte ich mit 7,5 µl

Mastermix und erhitzte dann das Hybridisierungsgemisch bei 73°C im Wasserbad für 10 min, um die DNA zu denaturieren. Das Reannealing führte ich für 30 min im 37°C warmen Wasserbad durch. Die vorbehandelten Objektträger mit den denaturierten Metaphasechromosomen wärmte ich kurz auf einer 45°C warmen Platte vor, gab die ganze Mischung darüber und deckte mit Deckgläsern ab. Das Ganze versiegelte ich luftdicht, indem ich am Rand der Deckgläser Fixogum-Gummilösung aufbrachte. Die Hybridisierung fand dann für 3 Tage bei 37°C in einer feuchten Kammer statt.

2.4.5 Waschung der Hybridisierung

Grundlagen:

Durch die Waschung sollen solche Bindung der markierten DNA an Stellen der Chromosomen wieder gelöst werden, welche nur eine geringe Übereinstimmung der Basenabfolge haben, und deshalb zu unspezifischen Fluoreszenzsignalen führen würden. Dies geschieht unter Bedingungen, bei denen sich instabile, schlecht gepaarte Doppelstränge wieder lösen: Eine geringere Konzentration von stabilisierenden Na^+-Ionen (1x SSC statt 4x SSC) und eine höhere Temperatur als bei der Hybridisierung kommen dabei zum Einsatz. Zusätzlich verwendet man ein Detergens (Trition X100), welches die Oberflächenspannung der Waschlösung herabsetzt.

Lösungen:

1x SSC, pH 7,0:	50 ml 20x SSC +950 ml Aqua dest
2x SSC, pH 7,0 :	100 ml 20x SSC +900 ml Aqua dest
Trition X100:	Fa. Sigma
2x SSC/ 0,1% Trition X100:	200 µl Triton X100 auf 200 ml 2x SSC

Vorgehen:

Ich entfernte die Deckgläser der Objektträger vorsichtig, indem ich sie in 2x SSC spülte. Danach inkubierte ich sie für 5 min in 75°C heißem 1x SSC und dann in 2x SSC/ 0,1% Triton. Sofort danach erfolgte die Detektion, damit die Objektträger nicht eintrockneten.

2.4.6 Detektion

Grundlagen:

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind an Proteine gekoppelt, welche spezifisch an die Markermoleküle von Test- und Referenz-DNA binden. An das Biotin der Referenz-DNA bindet Streptavidin, ein Protein, das aus dem Bakterium Streptococcus avidini stammt und mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Texas Red gekoppelt ist. An das Digoxigenin der Test-DNA bindet der Antikörper Anti-Diogoxigenin, der mit FITC, einem grünen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Auch diese Nachweisproteine können eine Reihe von unspezifischen Bindungen mit anderen Eiweißen des Präparates eingehen. Rinderserumalbumin, das man vor der eigentlichen Detektion einwirken lässt, bindet an diese unspezifischen, "klebrigen" Stellen und macht sie für die fluoreszenzmarkierten Proteine unzugänglich. Im anschließenden Waschschritt mit TritonX 100 werden ungebundene Proteine ausgewaschen. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI dient der Gegenfärbung der Chromosomen. Er führt zu einem Q-Bandenmuster und erlaubt die eindeutige Identifizierung der Chromosomen.

Das Einbetten der Präparate in einem Einbettmedium, das ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe verhindert, erleichtert die spätere Analyse unter Exposition an einer starken Lichtquelle (Vectashield).

Lösungen:

Blocklösung:	4x SSC/ 3% BSA
Inkubationslösung:	1 ml 4x SSC/ 1% BSA+ 25µg Streptavidin-Texas Red (Fa. Vector-Laboraties) + 20 µg anti-Digoxigenin-FITC (Fa. Boehringer-Mannheim)
Waschlösung:	4x SSC/ 0,1% TritonX 100
DAPI:	700 ng/ ml 4´-6´-Diamino-2-Phenylindol (Fa. Sigma) in 4x SSC
Einbettmedium:	Vectashield ®, Fa. Vector-Laboratories

Vorgehen:

Ich trug 100 µl der Blocklösung auf die noch feuchten Objektträger auf, deckte mit einem Deckglas ab und ließ die Blocklösung für 15 min in einer 37°C warmen, feuchten Kammer einwirken. Anschließend ließ ich 100 µl der Inkubationslösung auf die gleiche Art für 1h einwirken. Danach stellte ich die Objektträger zweimal hintereinander für 5 min in 45°C

warme Waschlösung, für 2 min in DAPI, und deckte dann mit Vectashield und einem Deckglas ein.

2.4.7 Computergestützte Auswertung der CGH

Obwohl die durch genetische Imbalancen im Tumorgenom hervorgerufenen Verschiebungen der Fluoreszenzverhältnisse von Rot und Grün oft schon mit bloßem Auge unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar sind, ist zur quantitativen Auswertung eine digitalisierte Bildverarbeitung mit anschließender computerunterstützter statistischer Auswertung nötig. So können auch kleine Veränderungen, die mit dem bloßen Auge nicht sichtbar sind, erkannt werden. Durch die statistische Auswertung der Fluoreszenzverhältnisse homologer Chromosomen mehrerer Metaphasen können rein experimentell bedingte, nicht durch genetische Imbalancen hervorgerufene Helligkeitsunterschiede der Fluoreszenzfarbstoffe eliminiert werden. Im einzelnen werden dabei folgende Schritte durchgeführt:

2.4.8 Aufnahme der Metaphase-Bilder

Die Fluoreszenzsignale der 3 Farben rot (Texas-Red/Referenz-DNA), grün (FITC/Tumor-DNA) und blau (Dapi/Gegenfärbung) wurden getrennt voneinander mit einer elektronischen Kamera, die in ein Fluoreszenzmikroskop integriert ist, aufgenommen. Das von mir benutzte Epifluoreszenzmikroskop (Axiophop, Fa.Zeiss, Oberkochen) war mit einer 100 Watt Quecksilberdampflampe ausgestattet und ermöglichte über eine Filterkombination die getrennte Darstellung der 3 Fluoreszenzen. Dabei ist ein Wechseln der Filter nötig; möglichst ohne dass es zu einem Versatz der 3 hintereinander aufgenommenen Bilder der einzelnen Fluoreszenzfarben kommt, die anschließend übereinander gelagert durch den Computer dargestellt werden. Mit der von mir verwendeten Filterkombination nach Pinkel (AHF Analysentechnik, Tübingen) ist dies möglich, da die Filter für das Anregungslicht unabhängig von den anderen Filtern des Systems gewechselt werden. Eine mit einem Photochip ausgestattete digitale Kamera (charged-coupled device-, CCD-Kamera, Fa. IMAC) kann über längere Zeit Photonen sammeln und dadurch auch Signale auffangen, die vom Auge nicht erkannt werden. Die Integrationszeit wird dabei automatisch vom Computersystem festgelegt. Die Kamera erfasst unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten als unterschiedliche Grauwerte. Ein buntes Bild wird zur besseren Anschauung vom Computer erzeugt.

2.4.9 Computergestützte Karyotypisierung und statistische Auswertung

Ich wertete pro Fall 5-10 Metaphasen (10-20 Chromosomen) mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ISIS für CGH der Firma Metasystems aus. Die einzelnen

Schritte der Analyse werden dabei teils automatisch, teils interaktiv durchgeführt: Unterschiedliche Helligkeiten und Farbintensitäten eines ganzen Bildes wirken sich auch auf die Fluoreszenzintensitäten der Chromosomen aus und verfälschen den Vergleich mehrerer Metaphasen. Diese generellen Unterschiede spiegeln sich in den Farbqualitäten des Hintergrundes wieder. Durch Subtraktion des Hintergrundes von allen Elementen eines Bildes werden diese Unterschiede ausgeglichen. Danach werden die Grenzen der Chromosomen interaktiv anhand der DAPI-Färbung festgelegt. Anschließend werden die Chromosomen interaktiv getrennt und können anhand der DAPI-Gegenfärbung karyotypisiert werden. Chromosomen, die nicht ausgewertet werden können, stark überlagerte oder gekrümmte Chromosomen werden gelöscht.

Dann werden für jedes Chromosom die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten als sog. Ratio-Profile dargestellt: Zuerst werden die Chromosomenachsen begradigt, und die Fluoreszenzwerte, für Rot und Grün getrennt, als Profil über die Längsachse eines Chromosoms dargestellt. Dabei werden alle Fluoreszenzwerte quer zur Längsachse aufsummiert, die Breitenausdehnung des Chromosoms also auf eine Linie reduziert. Nun können für alle Punkte dieser Chromosomenlinie die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten der beiden Farben ermittelt werden. Das Ratio-Profil eines Chromosoms besteht aus diesen Verhältnissen, die längs der Achse des Chromosoms aufgetragen werden. Eine generelle Mehranfärbung mit einem der beiden Farbstoffe, also eine generelle Verschiebung der Ratioprofilwerte, kann durch viele rein experimentelle Variablen bedingt sein: die Qualität der Fluoreszenzfarbstoffe, die Effektivität der Nicktranslation oder auch die Dosierung der DNA. Derartige Verschiebungen werden durch eine Normalisierung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten der beiden Farben rot und grün innerhalb der Chromosomen einer Metaphase ausgeglichen. Bei dieser Normalisierung wird der Durchschnitt der Ratio-Profilwerte aller Chromosomen einer Metaphase auf den Wert 1,0 eingestellt.

Für die Endauswertung werden die Ratioprofile über mehrere Chromosomen verschiedener Metaphasen verglichen. Deshalb muss auch die Länge der Chromosomen normiert werden: Alle Chromosomen eines Typs bekommen durch lineare Interpolation die gleiche Länge. Danach werden aus den sich entsprechenden Ratioprofilwerten aller homologen Chromosomen Punkt für Punkt die Mittelwerte sowie die Standardabweichung berechnet. Diese Mittelwerte werden nun entlang der Längsachse des Chromosoms als gemittelte Ratioprofile graphisch dargestellt. Die Nulllinie dieser gemittelten Ratioprofile entspricht dem Ratioverhältnis 1:1.

Zur Ermittlung von Über- und Unterrepräsentationen wurde der Schwellenwert auf die dreifache Standardabweichung festgesetzt, was einem Konfidenzintervall von etwa 99% entspricht (ISIS CGH Algorithms, Fa. Metasystems). Schwellenwertüberschreitungen im Sinne von Überrepräsentationen werden als grüner, im Sinne von Unterrepräsentationen als roter Balken dargestellt. In vielen Fällen muss der Verlauf des Ratioprofils zur kritischen Auswertung und Interpretation herangezogen werden, da die gewählten Schwellen immer künstlich geschaffene „cut-offs" darstellen.

Zentromer- und Telomerregionen und die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen zeigen in allen CGH-Experimenten häufig falsch positive Imbalancen. Hochrepetitive Sequenzen werden ausgeschlossen, da sie durch Cot-1 DNA geblockt werden und außerdem starke Unterschiede in der Kopienzahl bei verschiedenen Individuen zeigen. Unterrepräsentationen in den Bereichen 1p32pter, 16p, Chromosomen 19 und 22 werden nicht gewertet. In diesen Bereichen zeigen sich bei Kontrollexperimenten häufig falsch positive Unterrepräsentationen, die durch unterschiedliche Hybridisierungseigenschaften von biotinylierter und digoxigenierter DNA bedingt sind, und durch direkte Fluoreszenzmarkierung der DNA vermieden werden können. Entsprechende Veränderungen dieser Regionen werden deshalb nach den CGH-Konventionen nicht als tumorassoziierte Imbalancen gewertet (Piper et al. 1995; Du Manoir et al. 1995a).

2.4.10 Symbole zur Beschreibung der CGH-Befunde

Zur Beschreibung eines CGH-Ergebnisses werden die aus der in situ-Hybridisierung gebräuchlichen Symbole enh und dim verwendet: enh(), dim(): In den Klammern stehen die beteiligten Chromosomenabschnitte in aufsteigender Reihenfolge. Dabei wird keine quantitative Aussage vorgenommen.

Tabelle 7: Erklärung der Symbole zur Beschreibung eines CGH-Befundes

enh(1,3,17), dim(2,6,11):	Chromosom 1,3 und 17 sind bezüglich der mittleren Chromosomenzahl vermehrt, Chromosom 2,6 und 11 bezüglich der mittleren Chromosomenzahl vermindert vorliegend.
enh(1q22qter):	Der Abschnitt zwischen Segment q22 auf Chromosom 1 und dem Ende des langen Armes von Chromosom 1 ist im Vergleich zur mittleren Chromosomenzahl vermehrt vorliegend.

2.4.11 Graphische Übersichtsdarstellung der detektierten Imbalancen aller 20 untersuchten Fälle

Zur besseren Übersicht über die detektierten Gewinne und Verluste der untersuchten 20 Fälle stellte ich die aufgedeckten partiellen Imbalancen in einer Übersichtsgraphik dar (Übersichtsgraphik 3.2.7). In dieser sind alle Schwellenüberschreitungen der CGH-Ergebnisprofile aufsummiert. Imbalancen über einem bestimmten Chromosom oder einer Chromosomenregion sind in Form von Balken neben dem Chromosom dargestellt. Die Anzahl der Balken einer bestimmten Region stellt dar, wie oft diese Region in den vorliegenden 20 untersuchten Fällen als Zugewinn oder Verlust beteiligt war. Zugewinne sind grün, Verluste sind rot unterlegt. Es wurden je vier verschieden Farbstärken gewählt, um die Befunde zu gewichten:

Farbstufe 1: CGH-Befunde, die zytogenetisch durch entsprechende Imbalancen untermauert wurden.

Farbstufe 2: CGH-Befunde die nur in der CGH, nicht zytogenetisch gesehen wurden.

Farbstufe 3: CGH-Befunde, die durch entsprechende Ratioprofilausschläge, jedoch nicht durch Schwellenüberschreitungen gekennzeichnet waren. Als Bestätigung des Ratioprofilbefundes zeigte sich allerdings eine entsprechende Imbalance in der zytogenetischen Diagnostik.

Farbstufe 4: Ratioprofilausschläge der CGH, die als chromosomale Imbalancen gewertet wurden, obwohl keine Schwellenüberschreitung mit Balkendarstellung in der Computerauswertung vorlagen. Da jedoch homogene Profilausschläge über längere Strecken oder die gesamte Längen eines Chromosoms vorlagen die nur zu kurzfristigen Schwellenüberschreitungen geführt haben, muss angenommen werden, dass es sich um echte Imbalancen, entsprechend dem Ratioprofilverlauf, handelt. Entsprechende Imbalancen in der zytogenetischen Befundung fanden sich nicht.

3 Ergebnisse

3.1 Die Zellkultur RiFo280/93 dient als Kontrollfall zur Etablierung der CGH-Methode und der verschiedenen Methoden der DNA-Aufbereitung

3.1.1 Der Fall RiFo280/93

Zur Qualitätskontrolle der CGH-Methode und der verwendeten DNA-Aufbereitungsmethoden verwendete ich eine Zellreihe einer reifen B-Zell-ALL mit folgendem komplexen Karyotyp:

3.1.1.1 Karyotyp

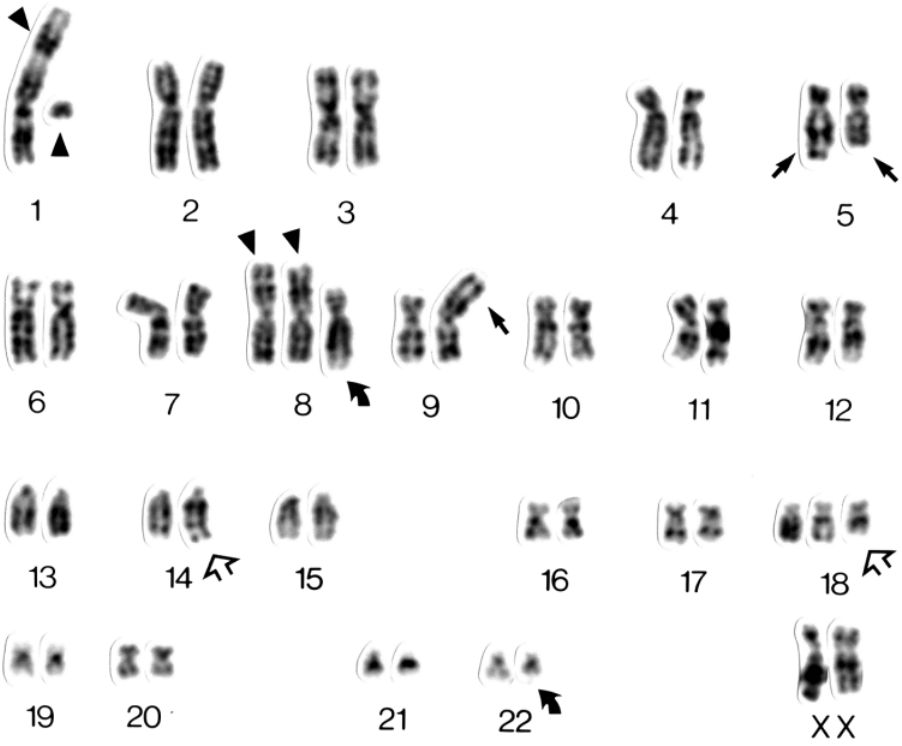


Abbildung 3.1.1.1.a: Karyogramm des Falles RiFo280/93: Translokation t(14;18))(q32;q21) (offene Pfeile), t(8;22)(q24;q11) (gebogene Pfeile), Dreifachtranslokation t(5;5;9)(q31-32;q15; p21-22) (Pfeile). Darüber hinaus bestehen komplexe Veränderungen von Chromosom 1 (Pfeilspitzen) mit Verlagerungen von Teilen des kurzen Armes an den kurzen Arm des homologen Chromosoms 1 und des langen Armes an den kurzen Arm eines Chromosoms 8. Das Derivativchromosom der(8)t(1;8) liegt verdoppelt vor.

Die folgenden chromosomalen Veränderungen lagen vor (Abbildung 3.1.1.1.a):

- Eine balancierte Translokation t(14;18)(q32;q21) (offene Pfeile in der Abbildung). Dabei waren beide normalen Chromosomen 18 vorhanden. Es bestand also eine Trisomie für Chromosom 18.
- Ein Teil des langen Arms von Chromosom 1 war an den kurzen Arm von Chromosom 8 verlagert. Dieses Derivatchromosom lag verdoppelt vor, was zu einer partiellen Trisomie

der langen Arme von Chromosom 1 und 8 führte: der(8)t(1;8)(q21;p11.2), +der(8)t(1;8)(q21;p11.2). Der kurze Arm von Chromosom 8 ist in diesem Derivatchromosom verlorengegangen. Ein Teil des kurzen Armes eines Chromosoms 1 ist an den kurzen Arm des homologen Chromosoms 1 angelagert. Der Rest des in die Translokationen verwickelten Chromo-soms 1 verblieb als kleines Ringchromosom: r(1)(p13q12) (Pfeilspitzen).

- Eine balancierte Translokation t(8;22)(q24;q11) (gebogene Pfeile).
- Eine Dreifachtranslokation bei der es im Sinne eines Ringtausches zum Austausch chromosomalen Materials zwischen 2 Chromosomen 5 und dem Chromosom 9 kam: t(5;5;9)(q31-32;q15;p21-22). Zusätzlich bestand im Rahmen dieser Translokation eine Mikrodeletion der Chromosomenregion 9p21-22, in der das Tumorsuppressorgen p16 lokalisiert ist (Pfeile).

3.1.1.2 CGH-Befund

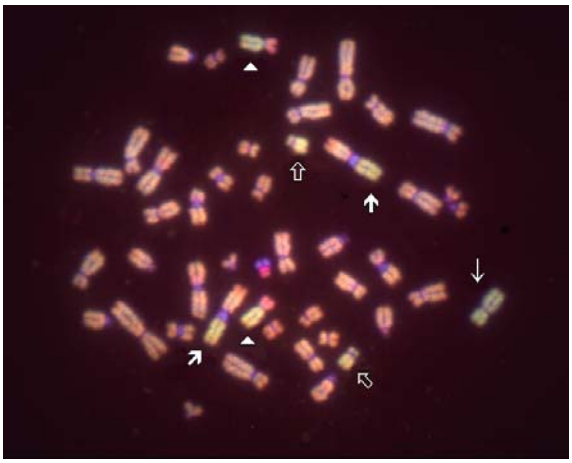


Abbildung 3.1.1.2.a: Metaphase nach CGH mit DNA der Zelllinie RiFo280/93. Es zeigt sich eine Überrepräsentation (grün) der DNA der Zelllinie auf den langen Armen der Chromosomen 1 (Pfeile) und 8 (Pfeilspitzen), sowie auf dem gesamten Chromosom 18 (Pfeilumrisse) und dem X-Chromosom (dünner Pfeil). Zelllinien-DNA ist unterrepräsentiert (rot) auf den kurzen Armen der Chromosomen 8 (Pfeilspitzen).

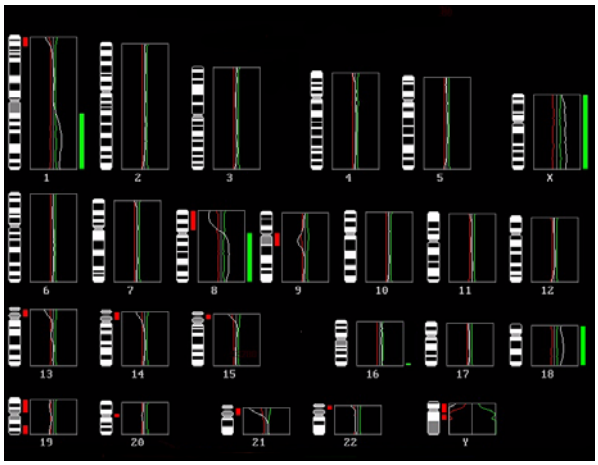


Abbildung 3.1.1.2.b: Statistische Auswertung der Fluoreszenz-Verhältnisse nach CGH mit DNA der Zelllinie RiFo280/93. Es bestehen Zugewinne von Material der langen Arme der Chromosomen 1 und 8 sowie der gesamten Chromosomen 18 und X. Eine Teil des kurzen Armes von Chromosom 8 fehlt. Die Imbalancen im Bereich der Telomere und Zentromere sowie des Chromosoms 19 entziehen sich aufgrund technisch bedingter unspezifischer Variationen einer Bewertung (vgl Abschnitt 2.4.9).

In der CGH-Analyse resultieren folgende chromosomale Imbalancen: enh(1q21qter,8q,18), dim(8p11pter), d.h.:

- eine Vermehrung von 1q21qter und 8q, sowie des ganzen Chromosoms 18.
- eine Verminderung im Bereich des kurzen Armes von Chromosom 8.
- da ein weiblicher Karyotyp vorlag, resultierte eine Überrepräsentation des X-Chromosoms und eine Unterrepräsentation des Y-Chromosoms.

Die Unterrepräsentation im kurzen Arm von Chromosom 1 sowie von Chromosom 19 und 22 wurden entsprechend den oben genannten CGH- Konventionen nicht gewertet (Abbildung 3.1.1.2.a und b).

3.1.2 Vorversuche zur Validierung der verschiedenen Aufbereitungsmethoden

3.1.2.1 Vergleich der Hybridisierungseigenschaften verschiedener Methoden der DNA-Aufbereitung

Um einschätzen zu können, inwieweit verschiedene Methoden der DNA-Aufbereitung die Hybridisierungseigenschaften der gewonnen DNA bei Einsatz in einem CGH-Experiment beeinflussen, führte ich Vergleichsexperimente am Fall Rifo 280/93 durch:

1. Sowohl die Test-DNA der Zelllinie als auch die Referenz-DNA aus Nativblut eines gesunden Probanden wurden mit dem Säulenaufreinigungskit gewonnen (Abbildung 3.1.1.2.a und b).
2. Sowohl Test- als auch Referenz-DNA wurden durch Chelexpräparation aus Zellsuspensionen fixierter Zellen und anschließender DOP-PCR gewonnen.
3. Die Test-DNA wurde durch Chelexaufbereitung aus fixierten Zellen und anschließender DOP-PCR gewonnen, die Referenz-DNA mittels Säulenaufreinigung aus Nativblut ohne anschließende DOP-PCR (Abbildung 3.1.2.1.a und b).
4. Die Test-DNA wurde mittels Säulenaufreinigung gewonnen, anschließend mit DOP-PCR vervielfältigt, die Referenz-DNA mittels Säulenaufreinigung aus Nativblut ohne anschließende DOP-PCR (Abbildung 3.1.2.1.c und d).

Der CGH-Befund bei beiden Experimenten, in denen mittels DOP-PCR amplifizierte DNA gegen nicht amplifizierte DNA hybridisiert wurde, wich wesentlich von dem des Kontrollexperimentes ab. Dabei entsprachen sich die Abweichungen beider Experimente. Schon mit bloßem Auge zeigte sich ein „buntes Bild“ mit stark ausgeprägten Rot- und Grünfärbungen. Beide Hybridisierungen konnten zwar die genetischen Imbalancen des Kontrollfalles nachweisen, wiesen also keine falsch negativen Befunde auf. Die Ratioprofile zeigten in beiden Experimenten extreme Abweichungen vom Mittelwert, besonders im

Bereich der Zentromere und Telomere (Abbildung 3.1.2.1.a-d). Beide zeigten aber auch eine große Anzahl falsch positiver, meist partieller Imbalancen. Beide zeigten dabei Überrepräsentationen in den Bereichen 2q33, 4q, 5q, 6q, 13q, und relative Verluste im Bereich 1p, 9q32qter, 16p, 17, 19, 20q, 22. Wurden beide Proben mittels DOP-PCR amplifiziert, zeigten sich diese Veränderungen nicht. Die Ergebnisse entsprachen denen des Kontrollexperimentes (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich der CGH-Ergebnisse des Falles RiFo280 bei verschiedenen DNA-Aufbereitungsmethoden

	Aufbereitungsmethode Test-DNA	Aufbereitungsmethode Referenz-DNA	CGH-Befund
1.	Nativzelllinie	Nativblut	enh(1q21qter,8q,18),dim(8q21qter)
2.	Fixierte Zellen/ DOP-PCR	Fixierte Zellen/ DOP-PCR	enh(1q21qter,8q,18),dim(8q21qter)
3.	Fixierte Zellen/ DOP-PCR	Nativblut	enh(1p22p31,1q22qter,2q21q24, 3q22q26.1,4q,5p13p14,5q11q23, 6q12q24,8q,12q15q21,13q21q31,18) dim(8p21pter,9q32qter,12q24qter, 14q31qter,16q23q24,17,20q?,21?)
4.	Nativzelllinie/ DOP-PCR	Nativblut	enh(1p31,1q24qter,2q22q31,4q13q32, 5q13q22,6q22q23,8q,13q21q22, 18q11q22) dim(7p12q22,8q21qter,9q32qter,12q24, 14q31qter ,16q22q24,17,20q?)

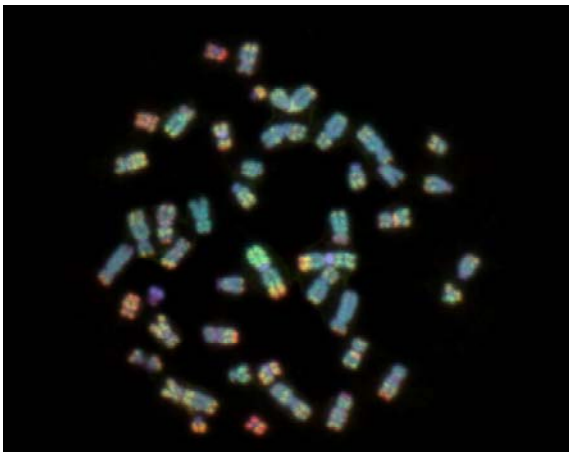


Abbildung 3.1.2.1.a: Metaphase einer CGH des Kontrollfalles RiFo280/93. Die Test-DNA wurde aus fixierten Zellen des Falles 280/93 durch Chelexaufbereitung und anschließender DOP-PCR gewonnen, die Referenz-DNA mittels Säulenaufreinigung aus Blut ohne anschließende DOP-PCR. Schon mit bloßem Auge zeigt sich ein „buntes Bild“ mit stark ausgeprägten Rot- und Grünfärbungen.

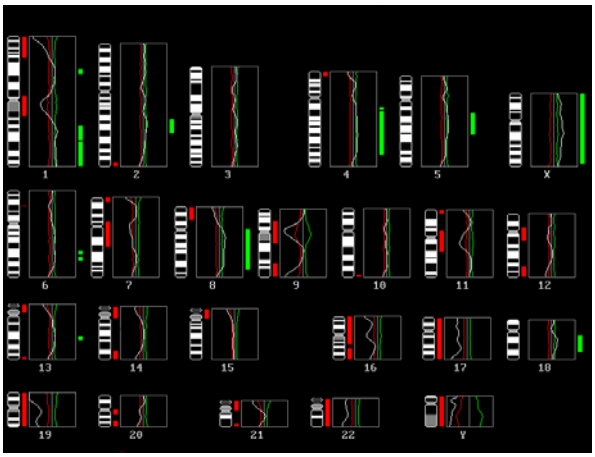


Abbildung 3.1.2.1.b: CGH-Auswertung dieses Experimentes: Im Vergleich zu **Abbildung 3.1.1.2.b** zeigen sich eine große Anzahl zusätzlicher, meist partieller Imbalancen. Es bestehen jedoch keine falsch negativen Befunde.

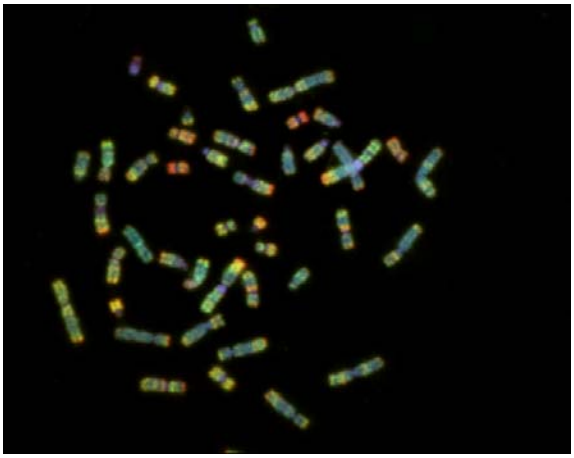


Abbildung 3.1.2.1.c: Metaphase einer CGH des Kontrollfalles RiFo280/93. Die Test-DNA wurde mittels Säulenaufreinigung aus Blut gewonnen, anschließend mit DOP-PCR vervielfältigt, die Referenz-DNA mittels Säulenaufreinigung aus Blut ohne anschließende DOP-PCR. Auch hier zeigt sich ein „buntes Bild“ mit stark ausgeprägten Rot- und Grünfärbungen**.**

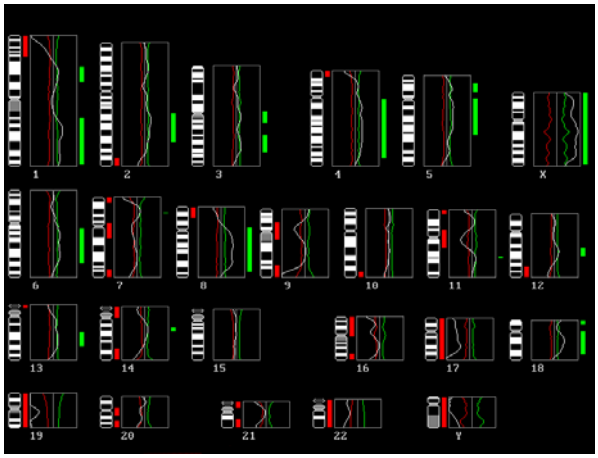


Abbildung 3.1.2.1.d: CGH-Auswertung: Es zeigt sich ein ähnliches Bild wie in **Abbildung 3.1.2.1.b** mit einer hohen Zahl zusätzlicher partieller Imbalancen.

3.1.2.2 Vergleich der CGH-Ergebnisse nach unterschiedlicher DNA-Aufbereitung und daraus resultierenden unterschiedlichen DNA-Konzentrationen

Insgesamt war der DNA-Präparationserfolg aus archivierten Zellsuspensionen gering. Nur aus einem kleinen Teil der Proben gelang es, durch Chelexextraktion und anschließender DOP-Amplifikation ausreichend genomische DNA zu gewinnen, die in der Elektrophorese ein entsprechend kräftiges Signal ergaben. Auch nach erfolgreicher Chelexpräparation mit entsprechend kräftigem Amplifikatnachweis konnte aus dieser DNA nur in ungefähr der Hälfte der Fälle durch DOP-PCR ein ausreichendes genomisches Amplifikat hergestellt werden. Von 92 dokumentierten Elektrophoresen zum Nachweis genomischer DNA nach DOP-PCR wiesen nur 42 (51%) ein ausreichendes genomisches Amplifikat nach (siehe auch Abbildung 2.3.5.a und b).

Bei erfolgreicher Präparation war die erzielte DNA-Menge stark begrenzt. Es waren im Durchschnitt DNA-Konzentrationen von 10-40 ng/µl zu erreichen, und es standen dann für die Herstellung des Hybridisierungsgemisches zum Teil nur 150 ng DNA zur Verfügung. Auch aus Proben mit sehr viel Zellmaterial waren keine höheren Endkonzentrationen zu erzielen. Im von mir verwendeten CGH-Protokoll wurden für die Nicktranslation DNA-Lösungen mit einer Mindestkonzentration von 60 ng/µl gefordert. 400 ng markierte Test-DNA wurden dann für die Herstellung des Hybridisierungsmixes eingesetzt.

Um zu überprüfen, ob die nach Chelexaufbereitung und DOP-PCR resultierenden geringeren Mengen markierter DNA valide Ergebnisse in der CGH-Analyse ergaben, führte ich mit der Zelllinie RiFo 280/93 CGH-Hybridisierungen mit verschiedenen DNA-Mengen durch:

1. Test-DNA, gewonnen aus Nativblut mittels Säulenaufreinigung, mit einer Ausgangskonzentration von 170 ng/µl wurden in die Nicktranslation eingesetzt, und es wurden wie gefordert 400 ng DNA für die Hybridisierung verwendet (normales Experiment).
2. Test-DNA, gewonnen aus Zellsuspension und mit DOP-PCR vervielfältigt, mit einer Ausgangskonzentration von 22 ng/µl, wurden in die Nicktranslation eingesetzt, und es wurden 330 ng DNA für die Hybridisierung verwendet.
3. Test-DNA, gewonnen aus Zellsuspension und mit DOP-PCR vervielfältigt, mit einer Ausgangskonzentration von 30 ng/µl, wurden in die Nicktranslation eingesetzt, und es wurden 170 ng DNA für die Hybridisierung verwendet.

Bei allen drei Experimenten bereitete ich die Kontroll-DNA nach der gleichen Methode wie die Test-DNA auf und setzte sie in der gleichen Konzentration wie die Test-DNA ein.

In allen drei Experimenten konnten die chromosomalen Imbalancen konstant nachgewiesen werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: CGH-Ergebnisse bei unterschiedlichen DNA-Ausgangskonzentrationen

	Konzentration der Test-DNA:	DNA-Menge der Hybridisierung:	CGH-Ergebniss:
1.	170 ng/µl	400 ng	enh(1q21qter,8q,18), dim(8q21qter)
2.	22 ng/µl	330 ng	enh(1q22qter,8q,18), dim(8q21qter)
3.	30 ng/µl	170 ng	enh(1q22qter,8q,18), dim(8q21qter)

3.2 Untersuchung der Fälle mit chromosomalen Zugewinnen auf >50 Chromosomen

3.2.1 ALL im Bereich eines hyperdiploiden Chromosomensatzes mit 51-57 Chromosomen

3.2.1.1 Fall Nr.1: c-ALL, männlich, 18 Jahre

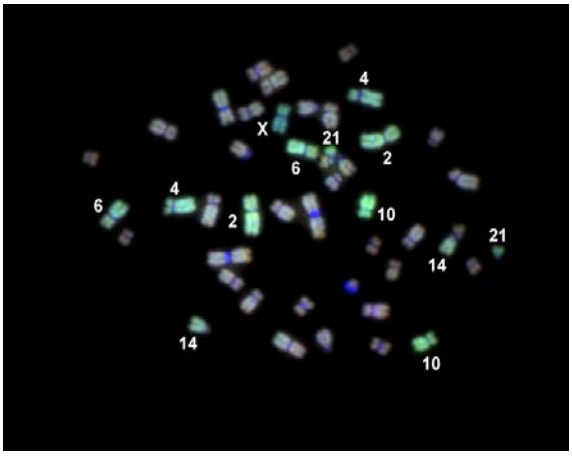


Abbildung 3.2.1.1.a: Metaphase nach CGH mit DNA von Fall 1. In der Metaphase sind bereits deutliche Mehranfärbungen der Chromosomen 2, 4, 6, 10, 14 und 21 zu erkennen. Auch im Bereich des X-Chromosoms ist eine Mehranfärbung mit grüner Tumor-DNA zu erkennen.

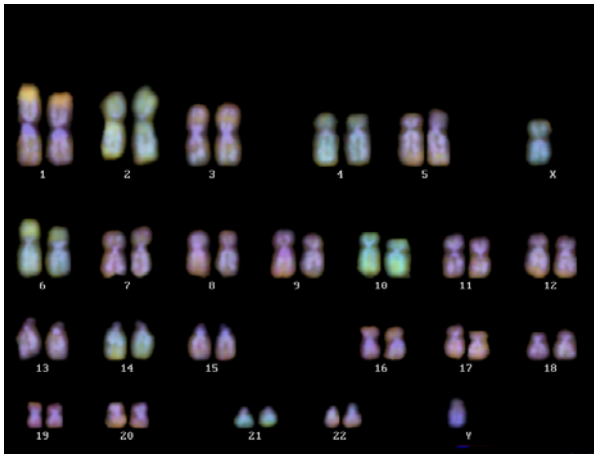


Abbildung 3.2.1.1.b: Im Karyogramm geordnete Chromosomen der in Abbildung 3.2.1.1.a dargestellten Chromosomen. Mehranfärbungen mit grüner Tumor-DNA der Chromosomen 2, 4, 6, 10, 14 und 21 sind vorhanden. Die im CGH-Profil detektierte partielle Imbalance im langen Arm von Chromosom 3 konnte ohne computerunterstützte Auswertung nicht erkannt werden.

CGH-Befund:

enh(X,2,3q24qter,**4,6,10,14,21**)
dim(**9q32qter**)
(KM, Säulenaufreinigung)

enh(X,2,3q24qter,**4,6,10**,13q21q31,**14,21**)
dim(**9q32qter**)
(KM, fixierte Zellen, DOP-PCR)

Zytogenetischer Befund:

57,XY,**+4,+6**,+?7,**der(9)t(9;?)(q3?4;?)**,**+10**,+?12,**+14**,
+?18,**+21**,**+21**,der(22)?t(**9**;22)(**q34**;q11),+der(22) [6/6]
(KM)

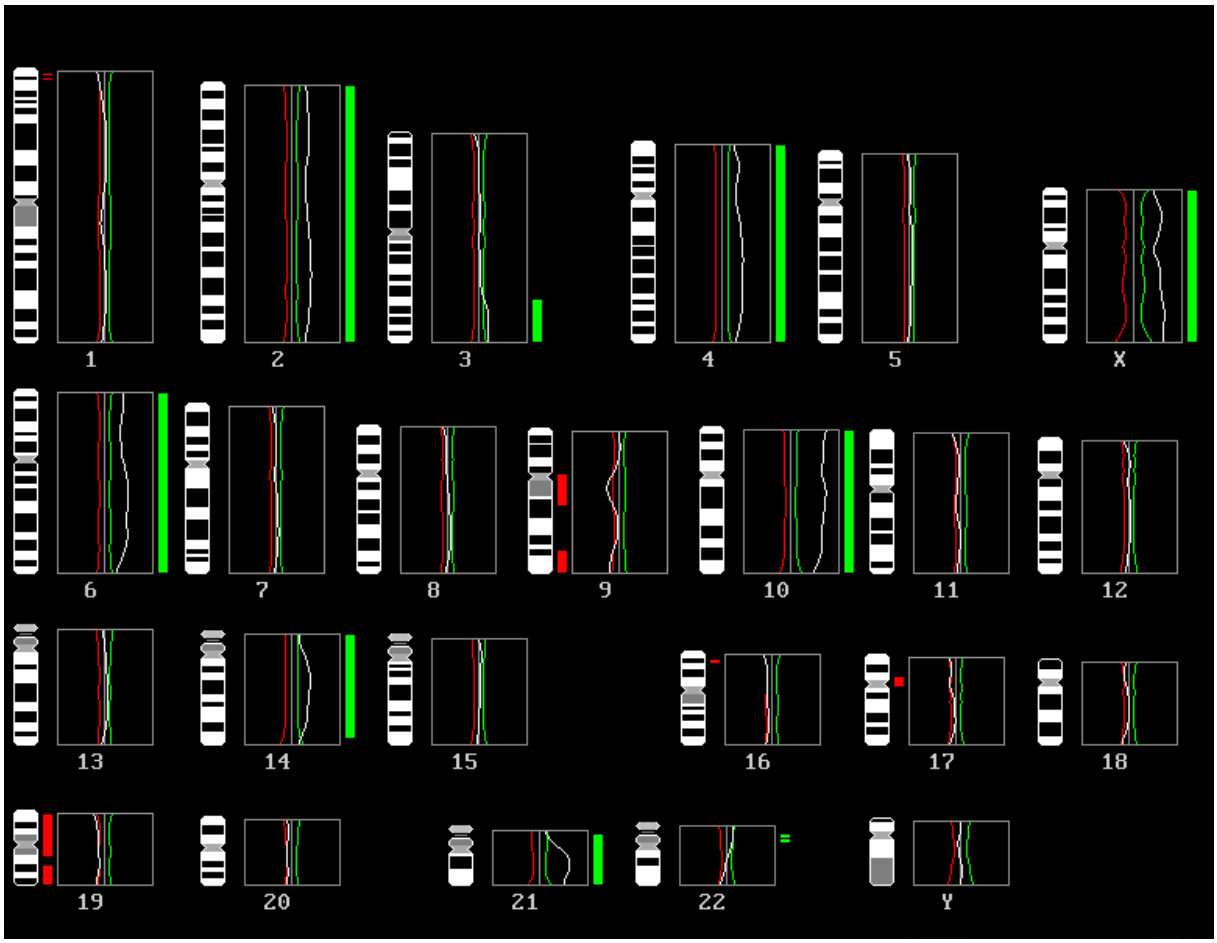


Abbildung 3.2.1.1.c: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 1. Chromosomale Überrepräsentationen finden sich in den Bereichen X, 2, 3q24qter, 4, 6, 10, 14 und 21. Unterrepräsentationen sind in der Region 9q32qter nachweisbar. Die Verluste im Zentromerbereich von Chromosom 9 und auf Chromosom 19 liegen in Bereichen genomisch bedingter Variabilität (vgl. Abschnitt 2.4.9).

Interpretation:

Alle Zellen aus Knochenmarkkulturen zeigten einen hyperdiploiden Satz mit 57 Elementen. Die CGH-Analyse aus DNA von Knochenmarkaspirat konnte die Zugewinne der Chromosomen 4, 6, 10, 14 und 21 bestätigen und zeigte eindeutige Überrepräsentationen des X-Chromosoms und von Chromosom 2, welche zytogenetisch nicht gesehen wurden. Zytogenetisch gesehene Zugewinne der Chromosomen 7, 12 und 18 konnten durch die CGH nicht bestätigt werden. Zytogenetisch wurde eine Philadelphiatranslokation mit Stückaustausch zwischen den Chromosomen 9 und 22 vermutet. Zusätzlich bestand ein Derivatchromosom (9)t(9;?)(q3?4;?), bei dem ein Teil des langen Armes von Chromosom 9 gegen unbekanntes Material ausgetauscht war, wobei der distale Anteil des langen Armes von Chromosom 9 verloren gegangen schien. Die CGH bestätigte diesen zytogenetischen Befund: Als partielle Imbalance deckte sie neben enh(3q24qter) einen Verlust im Endbereich des langen Armes von Chromosom 9 auf. Allerdings schien ein größerer Bereich als ursprünglich vermutet deletiert. Verluste in der Telomerregion wie hier auf Chromosom 9 sind

entsprechend den CGH-Konventionen kritisch zu bewerten, in Zusammenschau mit dem zytogenetischen Befund lag die obengenannte Interpretation als echte partielle Imbalance nahe. In der zusätzlich durchgeführten CGH aus DNA von Zellsuspensionen zeigte sich ein weitgehend übereinstimmender Befund. Die hier in großer Anzahl vorliegenden Abweichungen in heterochromatinreichen Bereichen, in Zentromer- und Telomerregionen wurden routinemäßig nicht als Imbalancen gewertet. Nur im Bereich 13q21qter zeigte sich in der CGH nach Chelexaufbereitung aus Zellsuspension damit eine zusätzliche Schwellenüberschreitung, welche als genetische Imbalance zu werten war. Die Übereinstimmungen zwischen zytogenetischem Befund und CGH-Ergebniss sind fett unterlegt.

3.2.1.2 Fall Nr.2: c-ALL, männlich, 63 Jahre

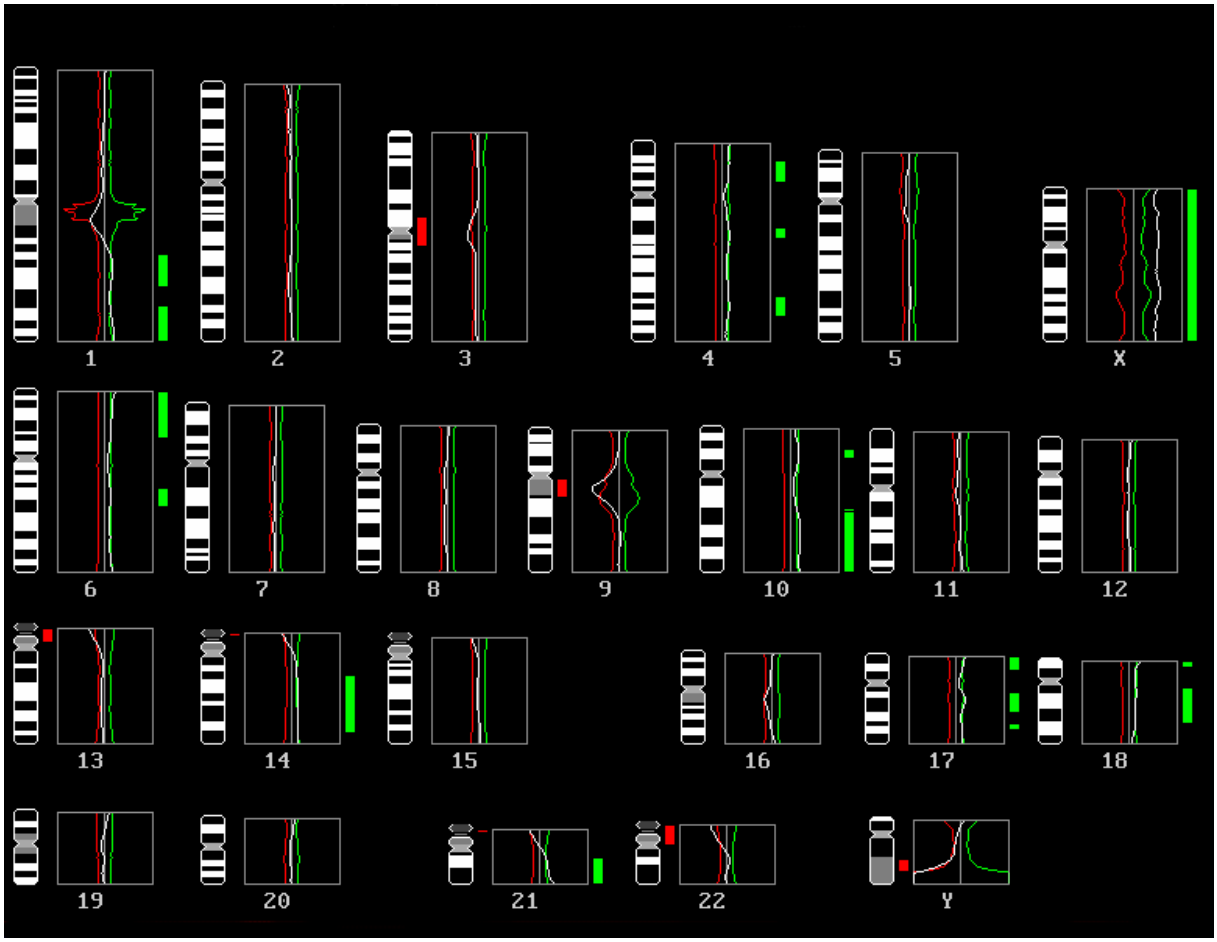


Abbildung 3.2.1.2.a: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 2. Auf den Chromosomen 4, 6, 10, 17 und 18 liegen Schwellenüberschreitungen vor, die von homogenen Zugewinnen im Ratioprofil über die gesamten Chromosomen begleitet sind. Die Schwellenüberschreitung im langen Arm von Chromosom 1 werden von einem entsprechenden partiellen Zugewinn im Ratioprofilverlauf bestätigt. Imbalancen im Bereich des Heterochromatins werden nicht gewertet (vgl. Abschnitt 2.4.9).

CGH-Befund: enh(**X**,**1q**24q36, **1q**41qter,**4**p13p15,**4**q21q22,**4**q31q32, **6**p21pter,**6**q16q21,**10**p12,**10**q22qter,14q13q32,**17**p12pter, **17**q12q21,**18**q11q21,**21**q21qter)
(Blut, Säulenaufreinigung)

Zytogenetischer Befund: 46,XY[1/21]
55,XY,+**X,+4,+6,+10,**
der(14)t(**1**;14)(**q11**;p13),+**17,+18**,+19,+**21**,+**21**[21/22]
(KM)

Interpretation:

Der zytogenetische Befund zeigte in 21 von 22 Metaphasen aus Knochenmarkkulturen einen hyperdiploiden Chromosomensatz mit 55 Elementen. Neben Zugewinnen ganzer Chromosomen wurde ein Derivatchromosom 14 gesehen, welches durch die Anlagerung eines Teils des langen Armes eines Chromosoms 1 an den kurzen Arm eines Chromosoms 14 entstanden war. Da beide Chromosomen 1 vollständig vorhanden waren, lag eine partielle Trisomie 1q vor. Die CGH-Auswertung aus Blut-DNA lieferte einen komplexen Befund, der zunächst schwer mit dem zytogenetischen Befund zu vereinbaren war. Der CGH-Befund bekam zusammen mit dem zytogenetischen Befund und durch die Auswertung des Verlaufs der Ratioprofile eine bessere Aussagekraft. Zytogenetisch wurde ein Zugewinn der Chromosomen 4, 6, 10, 17, 18, 19 und 21 gesehen. Für all diese Chromosomen, außer Chromosom 19, zeigte die CGH partielle Überrepräsentationen, und bei allen zeigten die Profile homogene Zugewinne über das ganze Chromosom, die jedoch nur über kurze Strecken die Schwelle überschritten. Zugewinne von Chromosom 4, 6, 10, 17, und 21 wurden also zytogenetisch und in der CGH gesehen. Die CGH zeigte außerdem Zugewinne für die langen Arme der akrozentrischen Chromosome 14 und 21. Dies entspricht den zytogenetisch nachgewiesenen Zugewinne der Chromosomen 14 und 21. Ein partielle Überrepräsentation für den langen Arm von Chromosom 1, passend zum zytogenetischen Befund, wurde durch den inhomogenen Kurvenverlauf des Ratioprofils bestätigt. Interpretation des CGH-Befundes: enh(X,1q,4,6,10,14,17,18,21).

3.2.1.3 Fall Nr.3: c-ALL, männlich, 18 Jahre

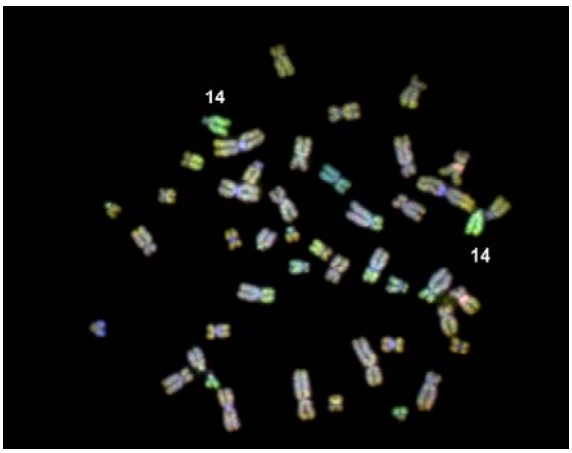


Abbildung 3.2.1.3.a: Metaphase nach CGH mit DNA von Fall 3. Besonders deutlich ist die Mehranfärbung mit grüner Test-DNA von Chromosom 14.

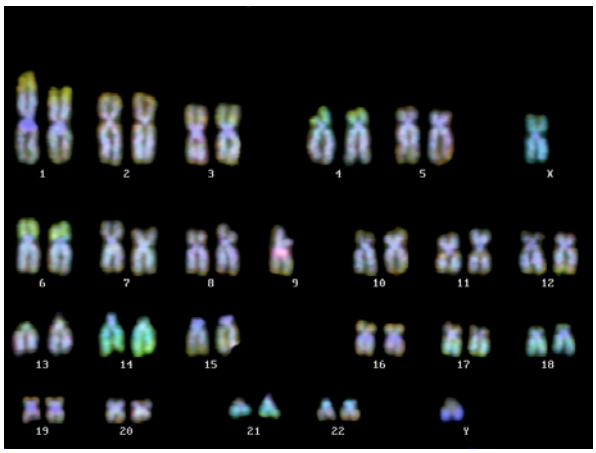


Abbildung 3.2.1.3.b: Im Karyogramm geordnete Chromosomen der in Abbildung 3.2.1.3.a dargestellten Chromosomen. Wie in der Metaphase ist im Karyogramm die Mehranfärbung mit grüner Tumor-DNA auf Chromosom 14 deutlich erkennbar. Auch deutliche partielle Überrepräsentationen grüner Tumor-DNA von 4p, 6p und 17p sind zu erkennen.

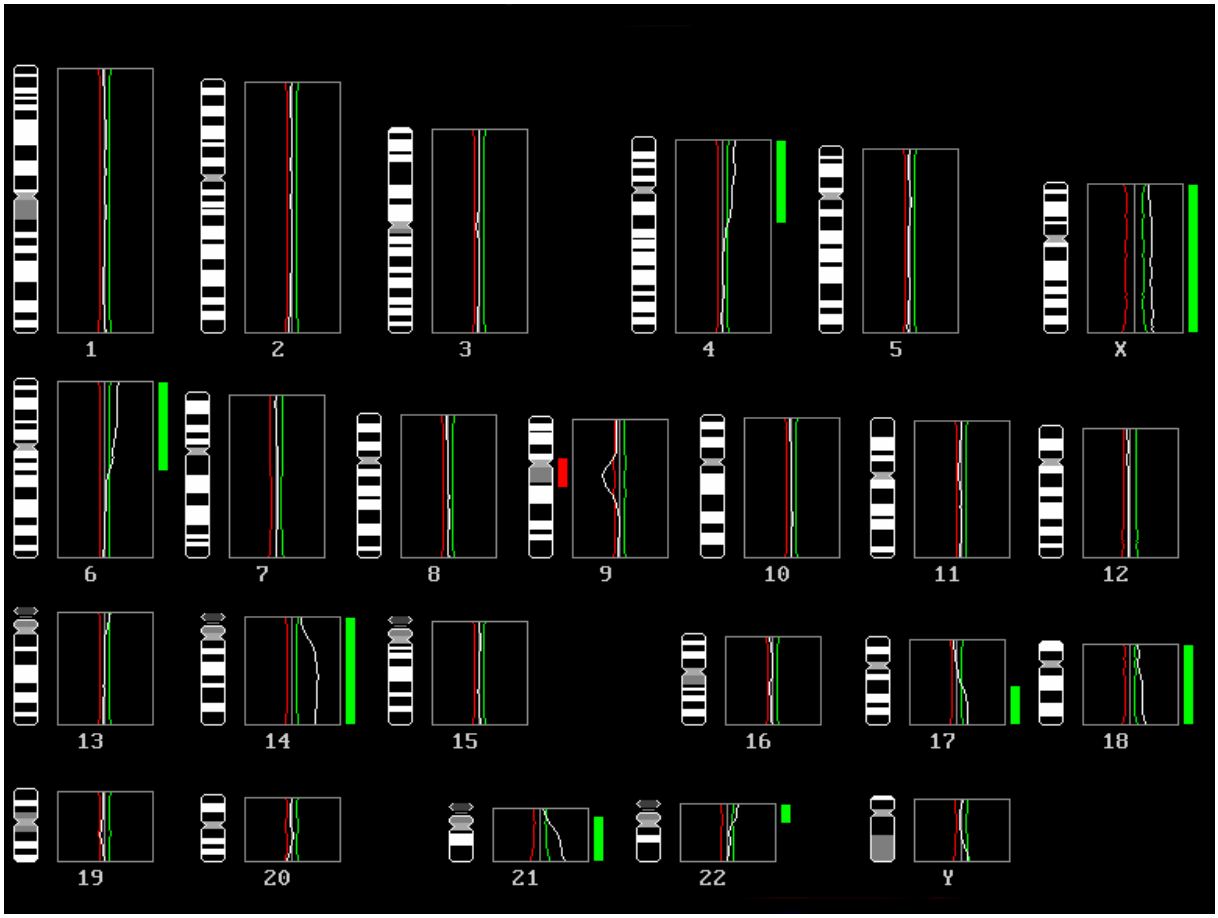


Abbildung 3.2.1.3.c: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 3. Es finden sich Zugewinne in den Bereichen 4p, X, 6p, 14, 17q, 18 und 21.

CGH-Befund:	enh(**X**,4pterq21,**6pterq14**,**14**,**17q21qter**,**18,21**) (Blut, Säulenaufreinigung) enh(**X**,4pterq21,**6pterq11**,**14**,**17q21qter**,**18,21**) (Blut, fixierte Zellen, DOP-PCR)
Zytogenetischer Befund:	51-53,XY,+**X**,der(2)t(2;**17**)(q3?7**;q1?1**), +**?del(6)(q1?)**,+**14,**+**14**,+**18,**+**21,**+**21**[19/19] (Blut)

Interpretation:

Alle Metaphasen aus den Blutkulturen zeigten einen hyperdiploiden Karyotyp. Die CGH aus Blut-DNA konnte die ganzzahligen Zugewinne der 4 Chromosomen X, 14, 18 und 21 bestätigen. Dabei konnten die stärkeren Ausschläge im Profil von Chromosom 14 und 21 als Hinweise für die zytogenetisch gesehenen vierfachen Kopienzahlen gesehen werden. Im zytogenetischen Befund bestand außerdem der Verdacht auf ein überzähliges Derivatchromosom 6, dessen langer Arm deletiert war. Bei 2 vorhandenen normalen Chromosomen 6 führte dies zu einer partiellen Imbalance des kurzen Armes von Chromosom 6, die in der CGH als partielle Überrepräsentation von 6p bestätigt wurde. Bei einem der 2 vorhandenen Chromosomen 2 war ein Teil des langen Armes durch einen Teil eines langen Armes von Chromosom 17 ersetzt. Dieser Befund ging mit einem partiellen Verlust des Armes 2q, und, da beide ursprünglichen Chromosomen 17 erhalten waren, mit einer partiellen Trisomie 17q einher. Die Trisomie 17q, nicht aber eine Unterrepräsentation des distalen Teils von 2q, konnte die CGH diagnostizieren. Im CGH-Befund war der translozierte Teil von Chromosom 17 kürzer als zytogenetisch erwartet.

Die CGH deckte einen vom zytogenetischen Befund nicht erkannten partiellen Zugewinn 4pterq21 auf. Alle partiellen Imbalancen der CGH waren schon auf den Nativbildern zu erkennen und im CGH-Ratioprofil mit nachvollziehbaren Ausschlägen verbunden. Die CGH aus Nativblut-DNA und DNA aus Zellsuspension von Blutkulturen zeigten den gleichen Befund.

3.2.1.4 Fall Nr.4: c-ALL, weiblich, 45 Jahre

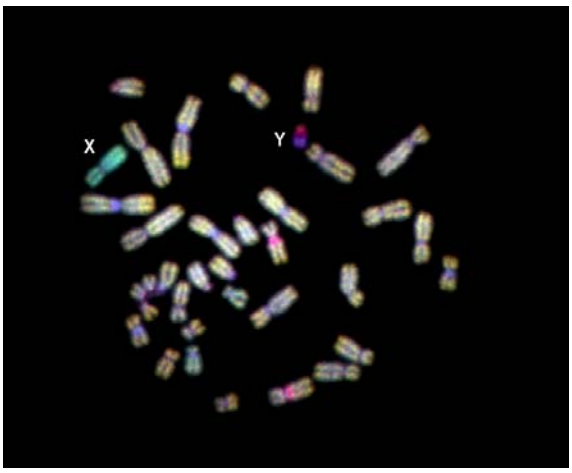


Abbildung 3.2.1.4.a: Metaphase nach CGH mit DNA von Fall 4. Es ist eine leicht vermehrte Grünfärbung von Chromosom 18 zu erkennen.

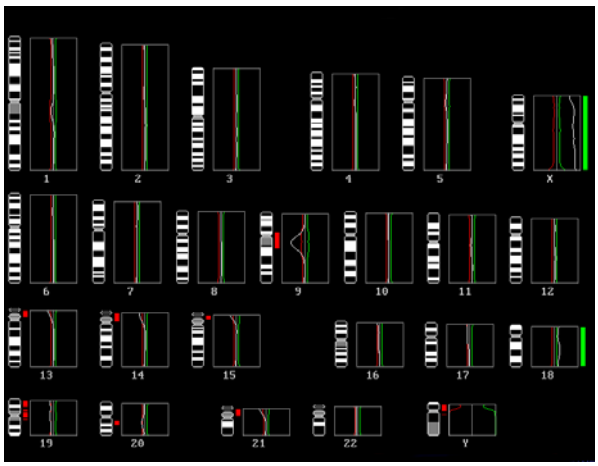


Abbildung 3.2.1.4.b: Profile der Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnisse von Fall 4. Es zeigt sich eine Mehranreicherung für das ganze Chromosom 18. Die übrigen Imbalancen werden entsprechend den CGH-Konventionen nicht als tumorspezifische Veränderungen gewertet.

CGH-Befund:	enh(**18**) (Blut, Säulenaufreinigung)
Zytogenetischer Befund:	51-52,XX,+1,add(9)(p?),+12, t(14;18)(q32;q21), **+18**,+**der(18)**t(14;18),+21,+mar[6/30] (Blut)

Interpretation:

Nur in einem relativ geringen Anteil der Metaphasen (6 von 30) aus den Blutkulturen wurde ein hyperdiploider Chromosomensatz gesehen. Die CGH aus Blutkulturen lieferte nur wenig zusätzliche Informationen: Von 4 Überrepräsentationen ganzzahliger Chromosomen konnte die CGH nur den von Chromosom 18 bestätigen. Die Überrepräsentation des X-Chromosoms, verbunden mit einer Unterrepräsentation des Y-Chromosoms, entsprach dem konstitutionellen weiblichen Karyotyp. Eine balancierte Translokation t(14;18)(q32;q21) ließ sich in der CGH nicht nachweisen. An ein Chromosom 9 war unbekanntes chromosomales Material angelagert. Zusätzlich lag ein Derivatchromosom der(18)t(14;18) vor, welches zu partiellen Imbalancen von Teilen von Chromosom 14 und 18 führte, außerdem ein Markerchromosom, dessen Zusammensetzung gänzlich unbekannt war. Die CGH konnte zu diesen Befunden keine weitere Information liefern, denn es lagen keine auswertbaren partiellen Imbalancen vor.

3.2.1.5 Fall Nr.5: c-ALL, männlich, 37 Jahre

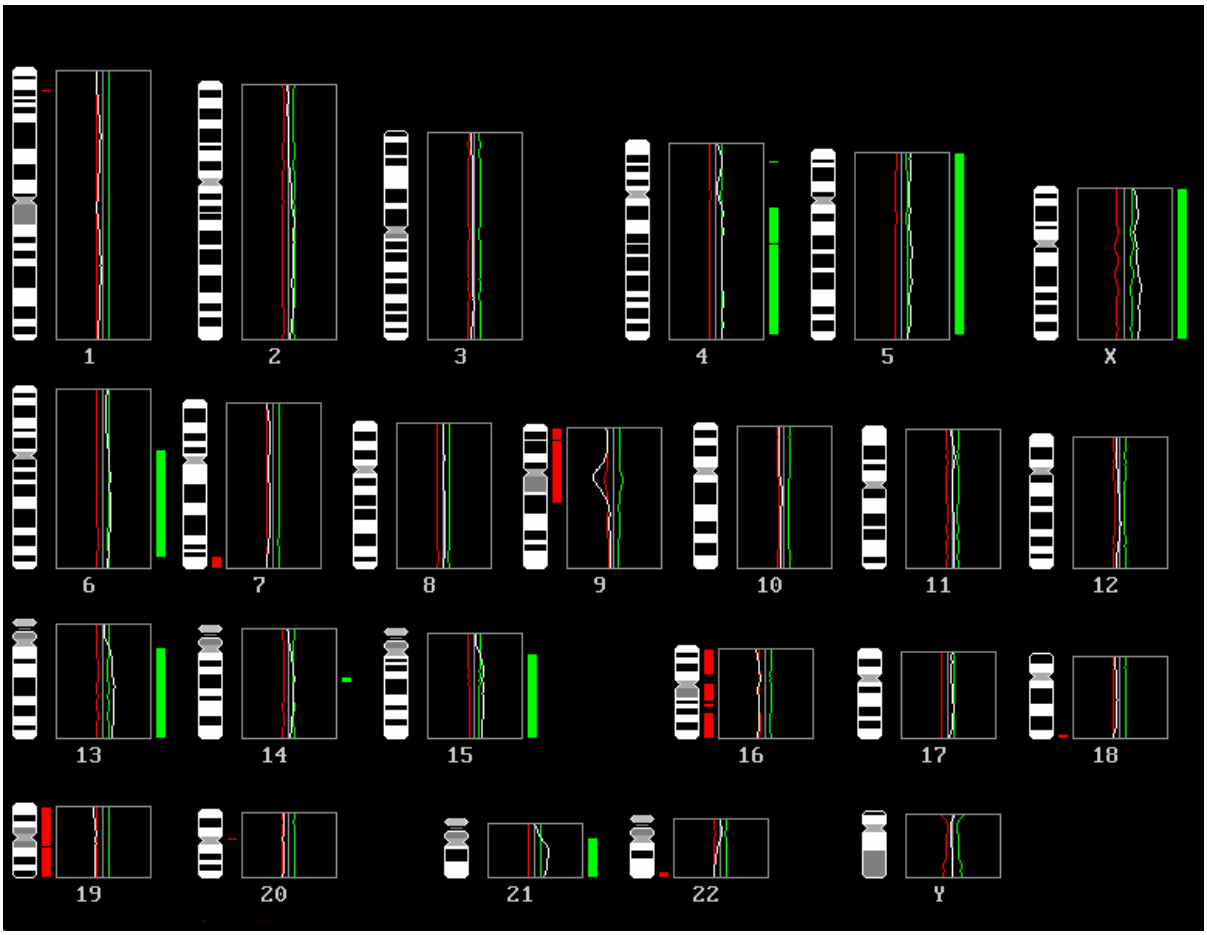


Abbildung 3.2.1.5.a: Profile der Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnisse von Fall 5. Erkennbar sind Zugewinne der Chromosomen X, 5, 13, 15 und 21 und partielle Zugewinne auf 4q und 6q. Verluste zeigen sich für den kurzen Arm von Chromosom 9 und für das Chromosom 16. Die übrigen Veränderungen werden nicht als tumorassoziierte Veränderungen berücksichtigt, da sie sich in Bereichen genomisch bedingter Variabilität befinden (vgl. Abschnitt 2.4.9).

CGH-Befund:	enh(X,4q,5,6q,13,15,21)
	dim(9p,16)
	(Blut, Säulenaufreinigung)
Zytogenetischer Befund:	46,XY[1/6]
	57-58,2xder?(22)t(9;22),inc[5/6]
	(Blut)

Interpretation:

In 5 von 6 Metaphasen des Blutes wurde ein hyperdiploider Karyotyp gefunden. Zytogenetisch fanden sich 2 Derivatchromosomen, die aus einer Philadelphiatranslokation t(9;22) hervorgegangen zu sein schienen. Die Identifizierung der hinzugewonnenen

Chromosomen war zytogenetisch nicht möglich. Die CGH ergab Zugewinne der Chromosomen X, 5, 13, 15 und 21. Ein Verlust zeigte sich für Chromosom 16. Die CGH detektierte partielle Imbalancen für die Chromosomenarme 4q, 6q und 9p. Bei Chromosom 4 zeigte das relativ homogene Ratioprofil nur über der Zentromerregion keine Abweichung in Richtung Zugewinn, im kurzen Arm kam es aber nur zu einer punktuellen Schwellenüberschreitung für eine Überrepräsentation. Dieser Befund war also nicht eindeutig als partielle Imbalance für den kurzen Arm zu interpretieren, es könnte auch eine Überrepräsentation des ganzen Chromosom 4 vorgelegen haben. Die Ratioprofile für Chromosom 6 und 9 ergaben keine Interpretationshilfe: enh(X,4,5,6q,13,15,21), dim(9p,16).

3.2.1.6 Fall Nr.6: c-ALL, männlich, 26 Jahre

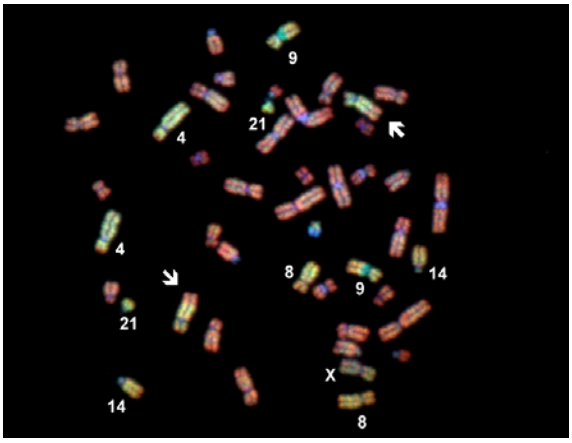


Abbildung 3.2.1.6.a: Metaphase nach CGH mit DNA von Fall 6. Im Bereich von Chromosom 5 ist bereits nativ ein Verlust von Tumor-DNA zu erkennen (Pfeile). Die Metaphase zeigt für die Chromosomen X, 4, 8, 9, 14 und 21 eine Mehranfärbung mit Tumor-DNA an.

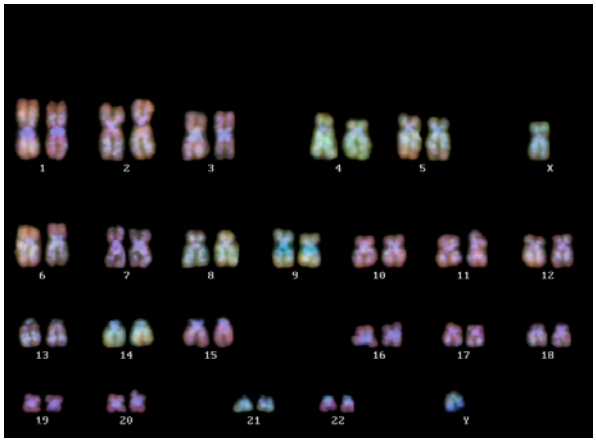


Abbildung 3.2.1.6.b: Im Karyogramm geordnete Chromosomen der in Abbildung 3.2.1.6.a dargestellten Chromosomen. Es ist der partielle Verlust im langen Arm von Chromosom 5 erkennbar. Außerdem legt das Nativkaryogramm Zugewinne für die Chromosomen X, 4, 8, 9, 14 und 21 nahe. Auch das X-Chromosom zeigt eine Mehranfärbung mit grüner Tumor-DNA.

CGH-Befund: enh(X,Y,2q21q32,3p12p13,3q24q26,4,5pter-q31,6q11q21,8,9,12q14q21,13q21q32,14,21), dim(15q22qter,20)
(Knochenmark, fixierte Zellen)

Zytogenetischer Befund: 50-54[2/2] Knochenmark

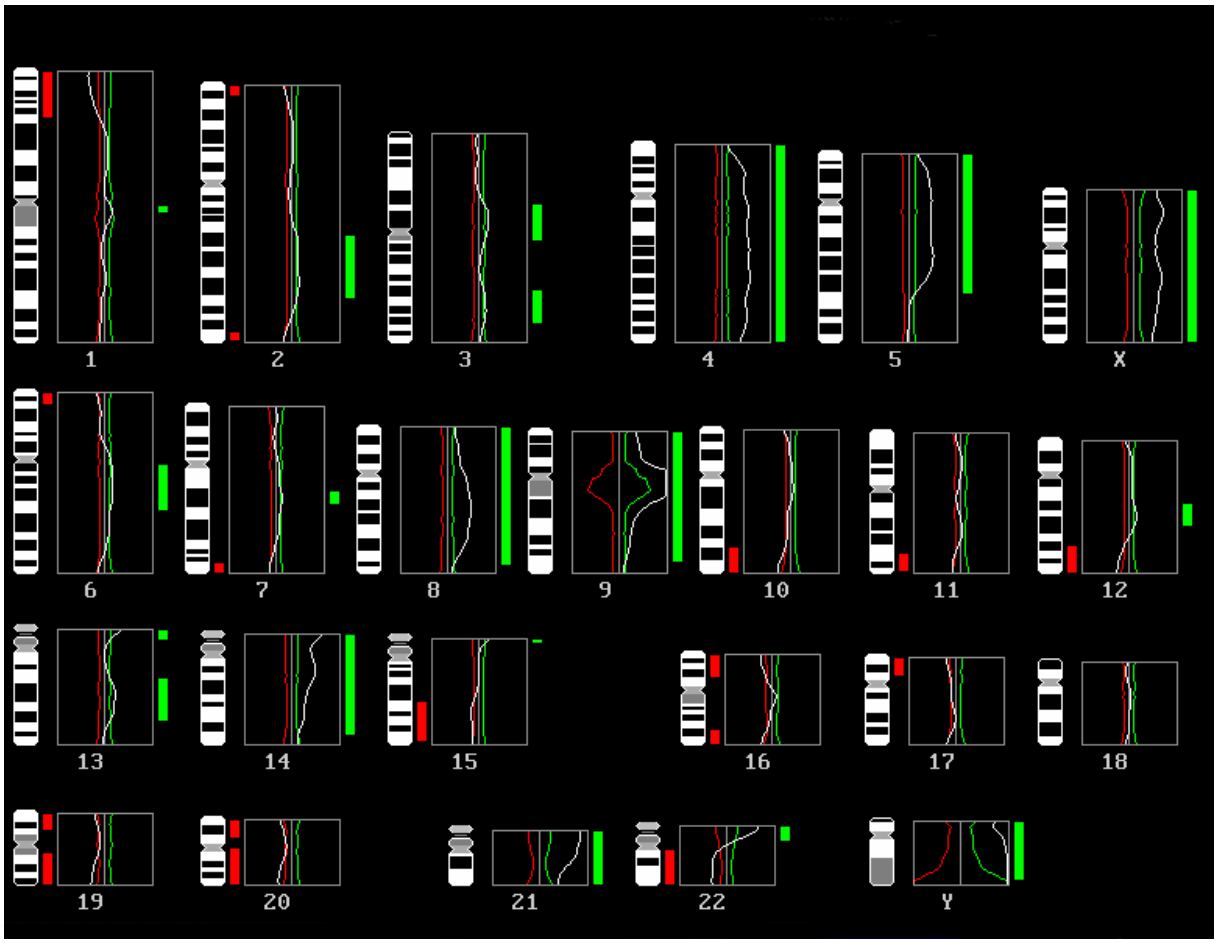


Abbildung 3.2.1.6.c: Profile der Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnisse von Fall 6. Chromosomale Überrepräsentationen finden sich für die Chromosomen X, Y, 4, 8, 9, 14 und 21. Ein partieller Zugewinn liegt in der Region 5pterq31 vor. Die übrigen Abweichungen werden nicht als tumorassoziierte Veränderungen berücksichtigt (vgl. Abschnitt 2.4.9). Die starken Ausschläge im heterochromatinreichen Bereich von Chromosom 9 weisen auf eine unzureichende Supprimierung dieser Regionen durch cot1-DNA hin.

Interpretation:

Es konnten nur 2 Metaphasen aus den Knochenmarkkulturen gewonnen werden. Dies reichte für eine sichere zytogenetische Diagnostik nicht aus. Die Ratioprofile der CGH-Analyse waren durch starke Ausschläge in Regionen, die sich nach den CGH-Konventionen einer Auswertung entziehen, geprägt. Die CGH lieferte eindeutige Hinweise für Zugewinne der Chromosomen X, Y, 4, 8, 9, 14 und 21. Eine eindeutige partielle Überrepräsentation ergab sich für den Bereich 5pterq31. Bei diesen Imbalancen fanden sich in den Ratioprofilen im Vergleich zu den übrigen Befunden vielfache Abweichungen vom Mittelwert und deutliche Schwellenüberschreitungen. All diese Befunde waren schon in den Nativaufnahmen als deutliche Mehranfärbungen mit grüner Tumor-DNA zu erkennen. Die restlichen CGH-Befunde waren aufgrund des unregelmäßigen Ratioprofils kritisch zu bewerten. Die Auswertung der Ratioprofilverläufe ließ keine eindeutigen Interpretationen zu. Eindeutige Befunde der CGH: enh(X,Y,4,5pterq31,8,9,14,21)

3.2.1.7 Fall Nr.7: c-ALL, männlich, 26 Jahre

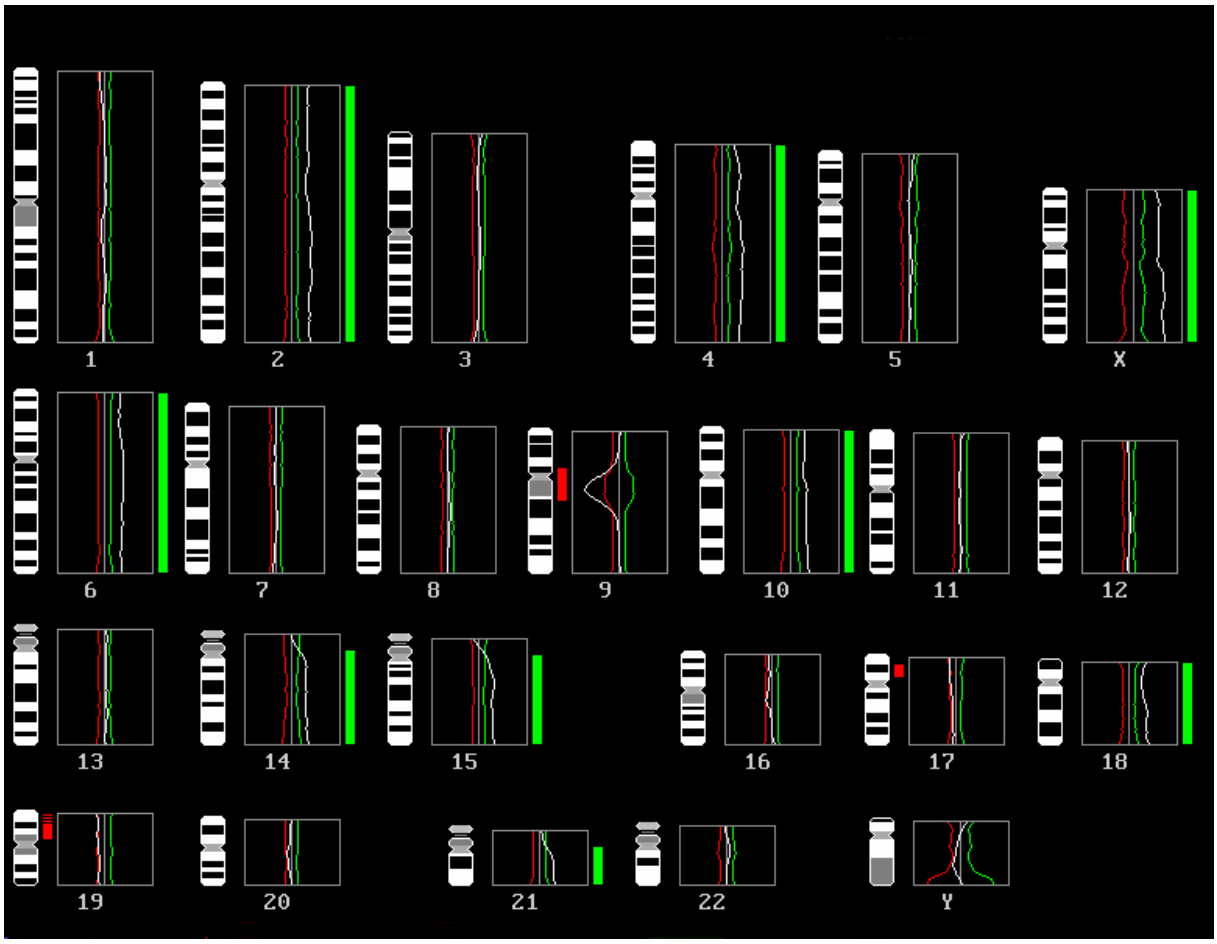


Abbildung 3.2.1.7.a: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 7. Chromosomale Überrepräsentationen finden sich für die Chromosomen X, 2, 4, 10, 14, 15, 18 und 21. Im kurzen Arm von Chromosom 17 findet sich eine Unterrepräsentation von Tumor-DNA.

CGH-Befund:	enh(X,**2**,4,6,10,14,15,18,21)
	dim(17p11p12)
	(Blut, Säulenaufreinigung)
Zytogenetischer Befund:	46,XY [2/18]
	51-56,XY,+**2**,der(22)t(9;22),inc [16/18]
	(Blut)

Interpretation:

Zytogenetisch wurde in 16 von 18 Metaphasen aus Blutkulturen ein hyperdiploider Chromosomensatz gefunden. Dabei konnte der Zugewinn von Chromosom 2 und ein Derivatchromosom 22, welches von einer Philadelphiatranslokation herrührte, identifiziert

werden. Die CGH-Analyse aus DNA des Blutes konnte den Zugewinn von Chromosom 2 bestätigen und weitere Zugewinne ganzer Chromosomen detektieren. Auf Chromosom 17 zeigte sich eine Überschreitung der Schwelle für Unterrepräsentationen im Bereich des kurzen Armes.

3.2.1.8 Fall Nr.8: c-ALL, männlich, 47 Jahre

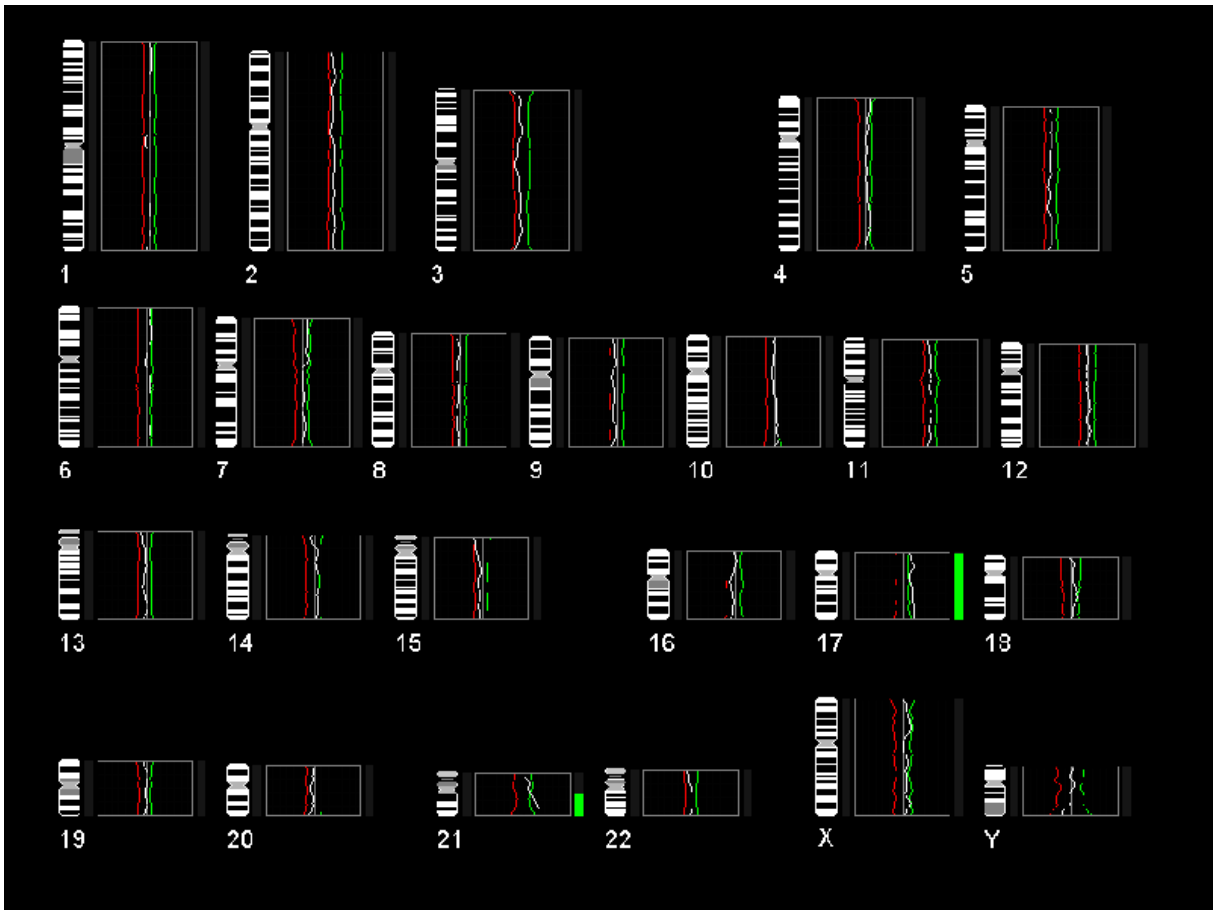


Abbildung 3.2.1.8.a: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 8. Zu erkennen ist ein Zugewinn von Chromosom 17 und 21.

CGH-Befund: enh(17,**21**)
(Blut, Säulenaufreinigung)

Zytogenetischer Befund: 55,XY,+X,+5,+6,+7,+12,+16,+19,+**21**,+**21**[5/5]
(Blut)

Interpretation:

In allen Metaphasen aus Blutkulturen wurde ein hyperdiploider Karyotyp gefunden. Die CGH-Analyse mit Blut-DNA konnte von den 8 Chromosomen, die zytogenetisch als

überzählig identifiziert wurden, nur das überzählige Vorliegen von Chromosom 21 bestätigen. Aufgrund der genomisch bedingten Variabilität im Bereich des Heterochromatins des kurzen Armes von Chromosom 21 widersprach die Schwellenüberschreitung auf Chromosom 21 nicht dem zytogenetischen Befund eines Zugewinnes des ganzen Chromosoms 21. Dieses schien zytogenetisch in vierfacher Kopienzahl vorzuliegen. Das in der CGH als vermehrt charakterisierte Chromosom 17 wurde mit Hilfe der konventionellen Zytogenetik nicht gesehen, zeigte aber eine eindeutige und homogene Schwellenüberschreitung über die gesamte Länge des Ratioprofiles.

3.2.1.9 Fall Nr. 9: ALL, männlich, 27 Jahre

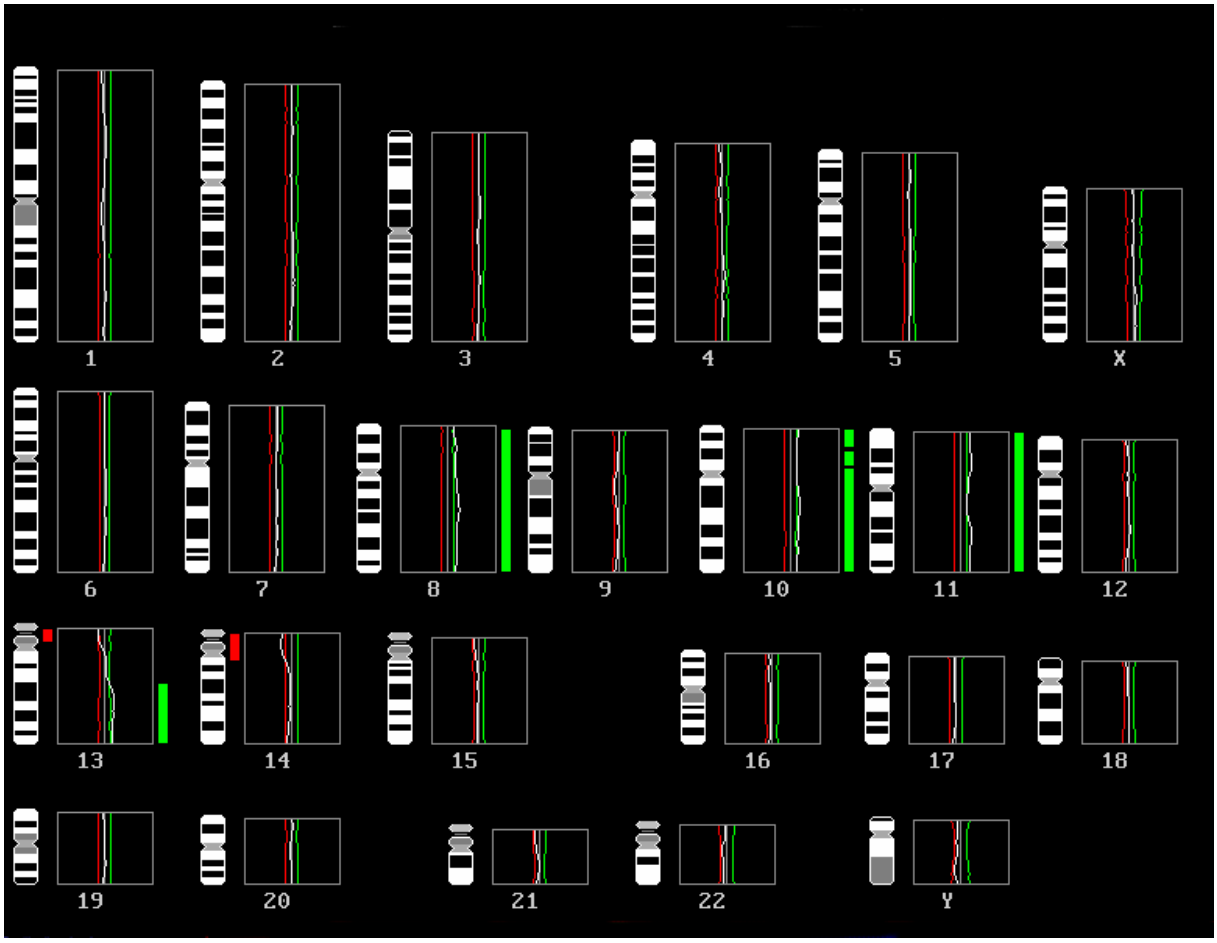


Abbildung 3.2.1.9.a: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 9. Es zeigen sich Zugewinne für die Chromosomen 8, 10, 11 und im Bereich des langen Armes von Chromosom 13. Die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen 13 und 14 entziehen sich nach den CGH-Konventionen einer Beurteilung (vgl. Abschnitt 2.4.9). Die partielle Imbalance auf dem langen Arm von Chromosom 13 ist mit einem nachvollziehbaren Ausschlag im Ratioprofil verbunden.

CGH-Befund: enh(**8,10,11**,13q21qter)

(Blut, Säulenaufreinigung)

Zytogenetischer Befund: 51,XY,+**8,+10,+11**,+?14,+?22[11/13]
(Knochenmark)

Interpretation:

11 von 13 Zellen aus Knochenmarkkulturen zeigten einen hyperdiploiden Karyotyp. Die CGH wurde mit DNA aus Blut durchgeführt. Sie konnte die zytogenetisch gesehenen Zugewinne der Chromosomen 8, 10 und 21 bestätigen. Weiterhin wurde durch die CGH eine partielle Imbalance im langen Arm von Chromosom 13 detektiert, für die es zytogenetisch keinen Anhalt gab.

3.2.1.10 Fall Nr.10: prä-B-ALL, männlich, 41 Jahre

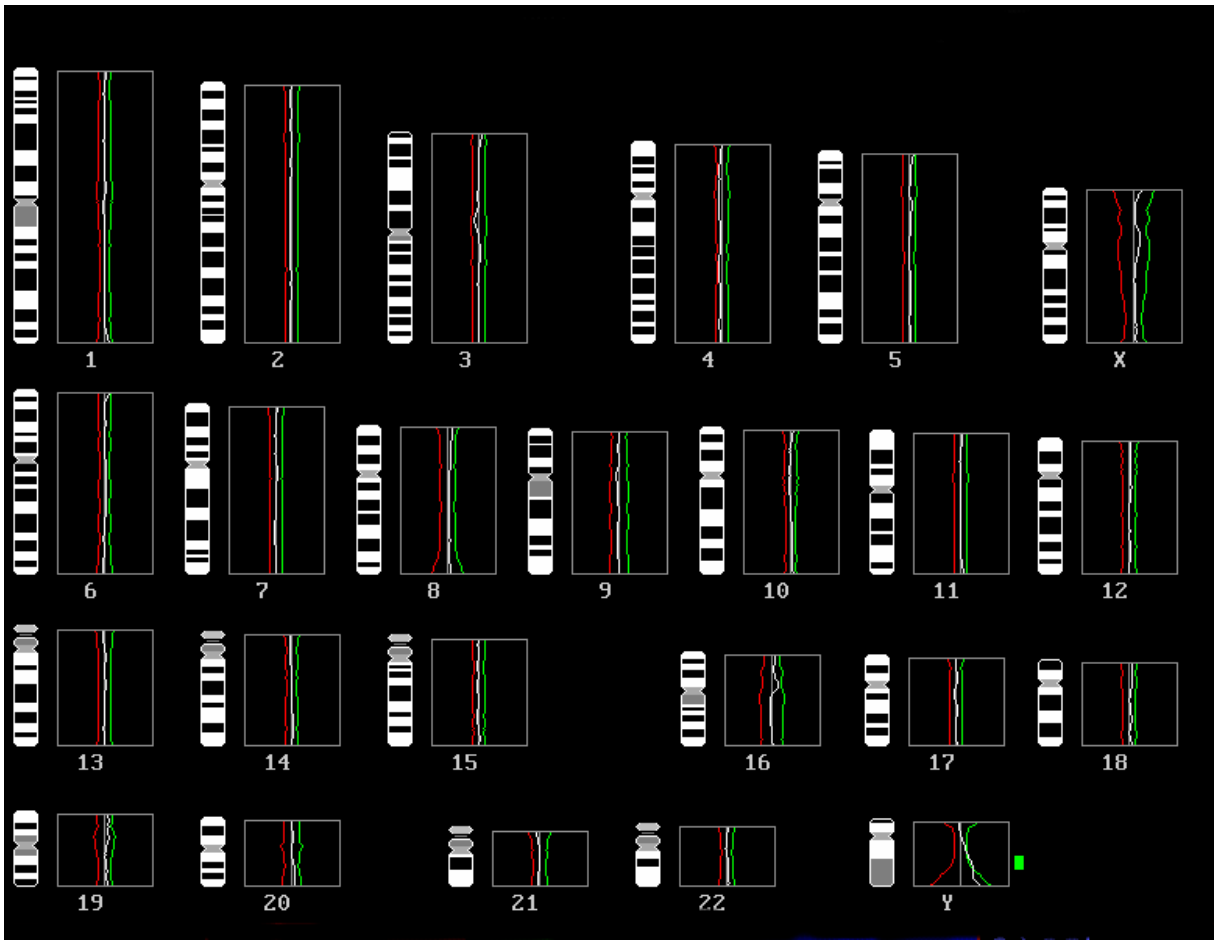


Abbildung 3.2.1.10.a: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 10. Das Ratioprofil zeigt einen Normalbefund ohne partielle Imbalancen. Die kurze Schwellenüberschreitung im langen Arm des Y-Chromosoms liegt im Heterochromatinbereich.

CGH-Befund: normal
(KM, fixierte Zellen, DOP-PCR)

Zytogenetischer Befund: 51-55[5/14]
(KM/ Blut)

Interpretation

Nur 5 von 14 Zellen aus Knochenmark und Blut zeigten einen aberranten Karyotyp. Die CGH mit DNA aus Knochenmarkkultur erbrachte einen Normalbefund, keine zusätzlichen Informationen.

3.2.2 ALL im Bereich eines triploiden Chromosomensatzes mit 58-80 Chromosomen

3.2.2.1 Fall Nr.11: c-ALL, weiblich, 61 Jahre

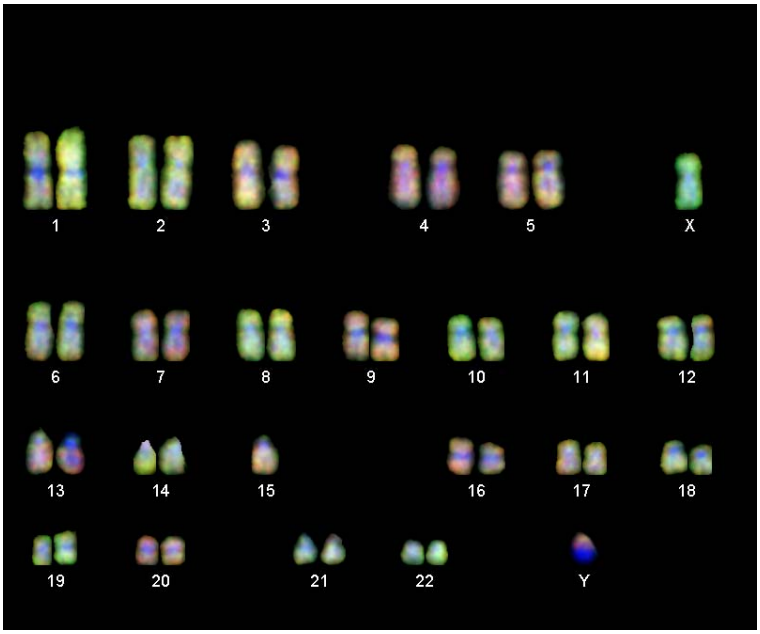


Abbildung 3.2.2.1.a: Karyogramm des Falls Nr.11. Die Chromosomen sind entweder deutlich grün oder deutlich rot angefärbt. Im CGH-Befund zeigen sich entsprechend viele Verluste und Zugewinne von Chromosomen.

CGH-Befund: enh(1,2p16pter,2q11q24,6q24pter,8,10,11,12,14, 18,19,21,22)
dim(3,4,5,7p,7q31,7q35,9p,13,15q21q22,15q24qter, 20p,20q13.3)
(KM, fixierte Zellen, DOP-PCR)

Zytogenetischer Befund: 46,XX[24/44]
36[9/44]
72[11/44]
Blut/KM

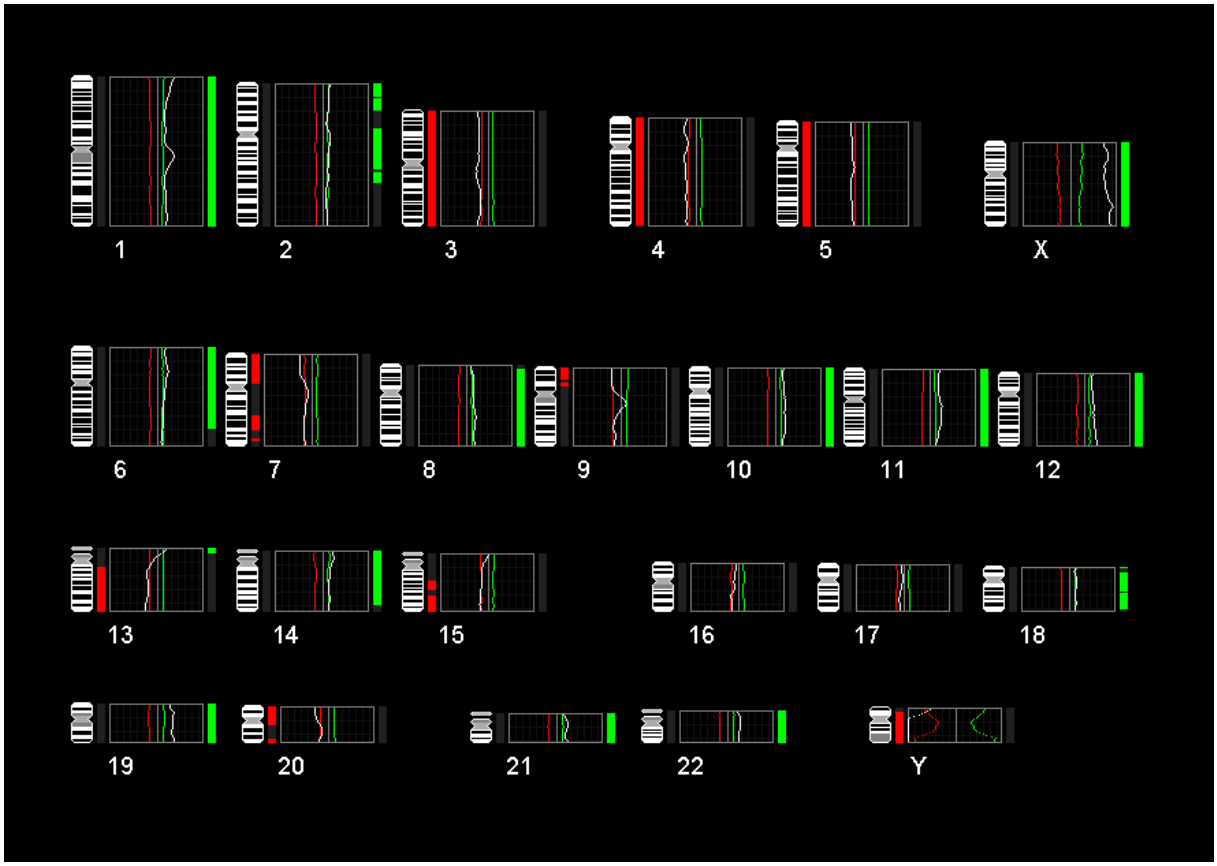


Abbildung 3.2.2.1.b: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 11. Es zeigt Zugewinne von Chromosom 1, 8, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 21 und 22 und Unterrepräsentationen für die Chromosomen 3, 4, 5 und 13. Ausserdem liegen partielle Überrepräsentationen auf den Chromosomen 2 und 6 und partielle Verluste auf den Chromosomen 7, 9, 15 und 20 vor. Zum Teil sind diese partiellen Schwellenüberschreitungen von homogenen Ratioprofilausschlägen über die gesamte Länge der Chromosomen begleitet.

Interpretation:

In 9 von 44 untersuchten Metaphasen aus Blut-und Knochenmarkkulturen zeigte sich mit 36 Chromosomen ein hypodiploider Karyotyp, in 11 von 44 Metaphasen mit 72 Elementen ein nahezu triploider Satz. Der CGH-Befund zeigte mit einer Überrepräsentation des X-Chromosoms und einer Unterrepräsentation des Y-Chromosoms den weiblichen Karyotyp richtig an. Hinzugewinne ganzer Chromosomen ergaben sich für 1, 8, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 21, 22 und Verluste für die Chromosomen 3, 4, 5 und 13. Da Profilabweichungen in kurzen Armen der akrozentrischen Regionen kritisch bewertet werden müssen, wurden die Imbalancen im Bereich von Chromosom 13 als dim(13) gewertet. Für die Chromosomen 2

und 6 gab die CGH partielle Zugewinne an. Die Ratioprofile dieser Chromosomen zeigten homogene Zugewinne über die gesamte Strecke des Chromosoms an, unterschritten jedoch zum Teil die Schwellen über kürzere Strecken. Vermutlich lagen Zugewinne der ganzen Chromosomen 2 und 6 vor. Das gleiche galt für Unterrepräsentationen der Chromososomen 9 und 15. Bei Chromosom 7 und 20 war die Interpretation erschwert, denn hier lagen in den Ratioprofilen auch leichte partielle Ausschläge vor. Mögliche Interpretation des CGH-Befundes: enh(1,2,6,8,10,11,12,14,18, 19,21,22); dim(3,4,5,7?,9,13,15,20?).

3.2.2.2 Fall Nr.12: c-ALL, männlich, 42 Jahre

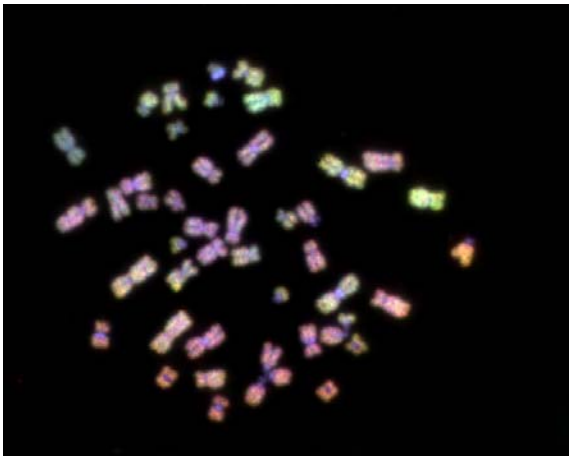


Abbildung 3.2.2.2.a: Metaphase nach CGH mit DNA von Fall 12. Eine eindeutige Zuordnung von Mehranfärbungen ist schwierig.

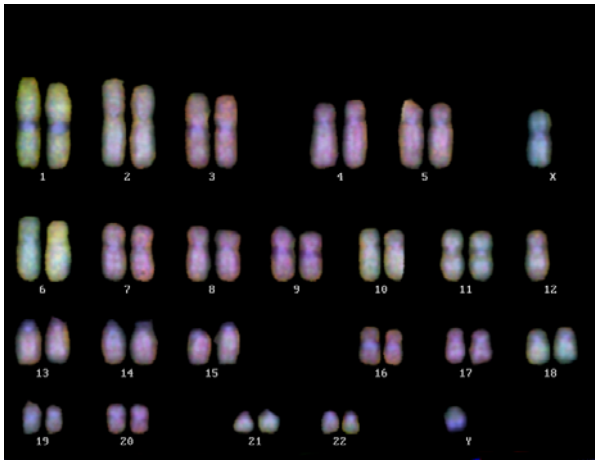


Abbildung 3.2.2.2.b: Im Karyogramm geordnete Chromosomen der in Abbildung 3.2.2.2.a dargestellten Chromosomen. Die Chromosomen 1, 6, 10, 11, 12, 18, 21 und 22 sind etwas grünlicher gefärbt. Dies deutet auf entsprechende Zugewinne im Tumorgenom hin.

CGH-Befund: enh(X,Y,1,2p15p23,2q13q33,6,10,11,12q13q23,18,21,22)
dim(9p)
(KM, fixierte Zellen, DOP-PCR)

Zytogenetischer Befund: 55-65[3/3]
(KM)

Interpretation:

In allen analysierten Metaphasen aus Knochenmarkkulturen lag ein hyperdiploider oder nahezu triploider Chromosomensatz vor. Zytogenetisch konnte die chromosomale Zusammensetzung bei dem männlichen Patienten nicht näher bestimmt werden. Die CGH konnte Zugewinne der Chromosomen X, Y, 1, 6, 10, 11, 18, 21 und 22 aufdecken. Für Chromosom 2 lagen über das gesamte Chromosom verteilt 4 Schwellenüberschreitungen für

eine Überrepräsentation bei sehr homogenem Ratioprofil vor. Sicher lag hier ein Zugewinn für das ganze Chromosom 2 vor. Auch Chromosom 12 zeigte eine partielle Schwellenüberschreitung bei sehr homogenem Ratioprofil. Der partielle Verlust im Bereich von 9p ließ sich anhand des Ratioprofils nachvollziehen. Interpretation des CGH-Befundes: enh(X,Y,1,2,6,10,11,12,18,21,22), dim(9p).

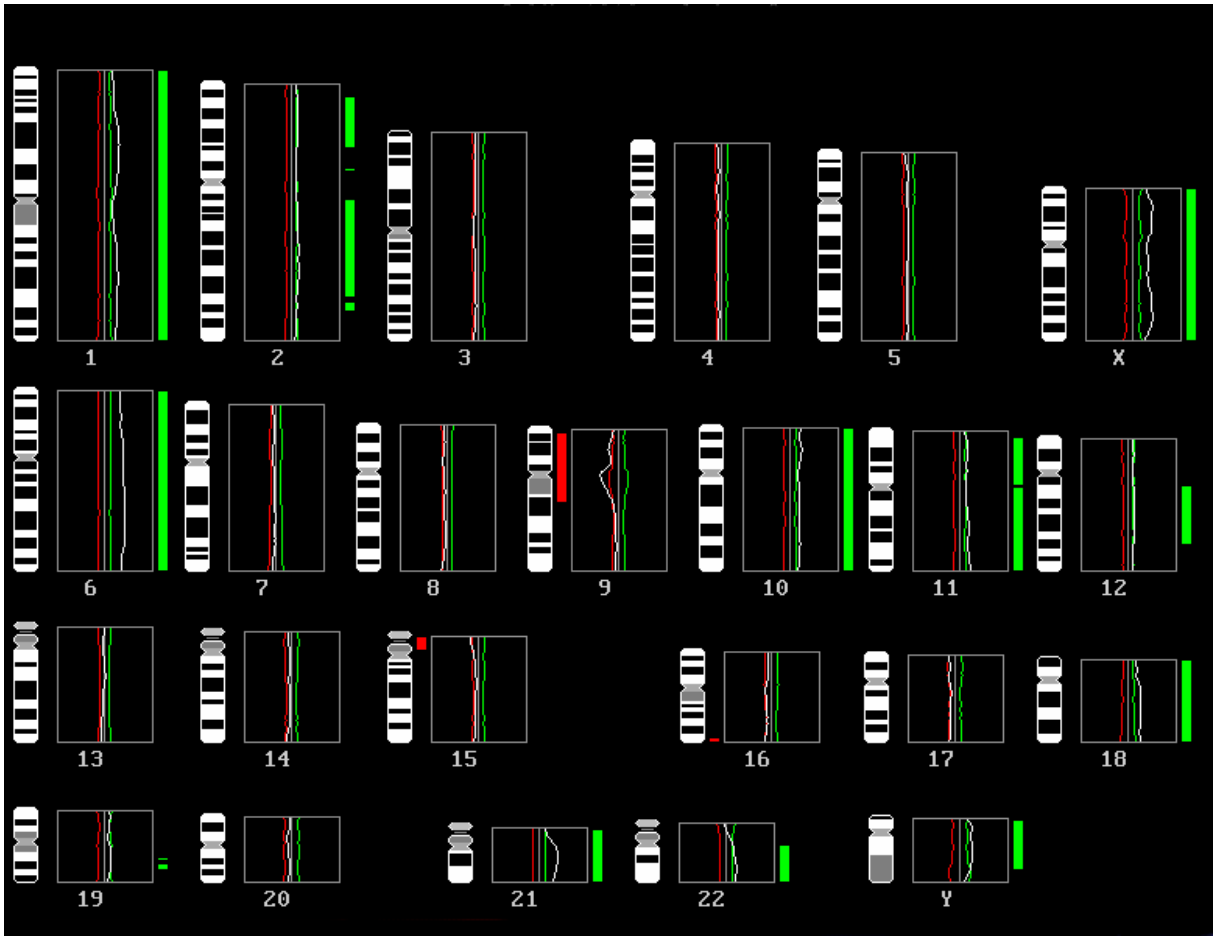


Abbildung 3.2.2.2.c: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 12. Es liegen Überrepräsentationen für die Chromosomen X, Y, 1, 6, 10, 11, 18, 21 und 22 vor. Die partiellen Zugewinne auf Chromosom 2 und 12 sind von homogenen Ratioprofilausschlägen über die gesamte Chromosomenlänge begleitet. Zusätzlich liegt ein partieller Verlust für den kurzen Arm von Chromosom 9 vor.

3.2.2.3 Fall Nr.13: c-ALL, männlich, 66 Jahre

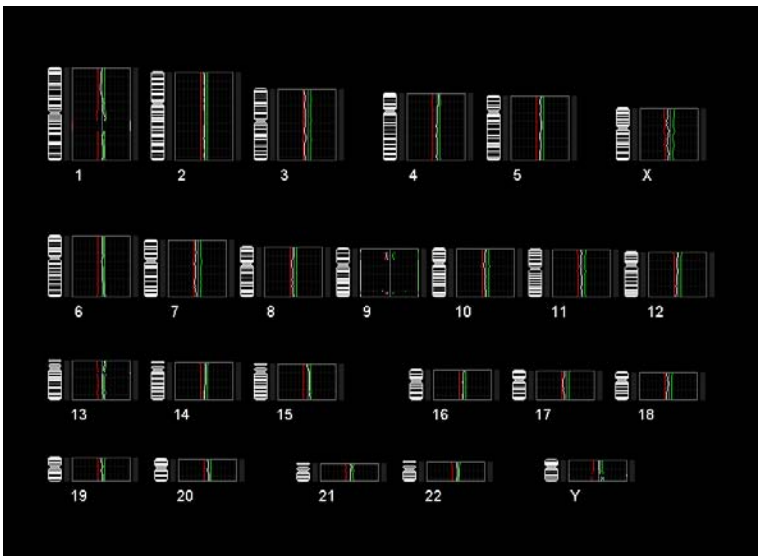


Abbildung 3.2.2.3: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 13. Es zeigt einen Normalbefund.

CGH-Befund:	normal (Blut, Säulenaufreinigung)
Zytogenetischer Befund:	69-70,XY,+X,+2 x del(1)(p21), +2 x add(8)(q2?4)inc(11/14) (KM)

Interpretation:

In 11 von 14 Metaphasen aus Knochenmarkkulturen wurde ein nahezu triploider Karyotyp gefunden. Die CGH-Analyse wurde aus DNA des Blutes durchgeführt und zeigte einen Normalbefund. Zytogenetisch wurden zwei überzählig vorliegende Chromosomen 1 mit Verlust von Teilen ihres kurzen Armes gesehen. Außerdem traten 2 zusätzliche Chromosomen 8 auf, die an ihrem langen Arm chromosomales Material unbekannter Herkunft angelagert hatten. Über die genaue Zusammensetzung und eventuelle genetische Imbalancen konnte aus dem inkompletten zytogenetischen Befund kein Rückschluss gezogen werden. Die CGH zeigte einen Normalbefund, sie konnte keine zusätzlichen Informationen liefern.

3.2.2.4 Fall Nr.14: ALL, männlich, 52 Jahre

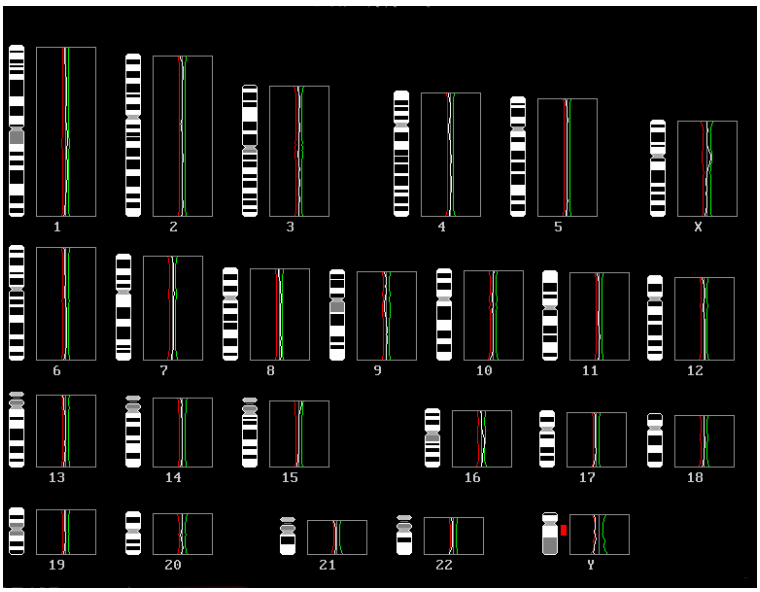


Abbildung 3.2.2.4: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 14.
Es zeigt einen Normalbefund.

CGH-Befund:	Normal (Blut, Säulenaufreinigung)
Zytogenetischer Befund:	46,XY[5/7] 71,XXY,+3,+?7,+?der(14)t(11;14) (q13;q23)[inc][2/7] (Blut)

Interpretation:

In 2 von 7 Zellen aus Blutkulturen wurde ein nahezu triploider Karyotyp gefunden. Die CGH aus Blut-DNA zeigte einen Normalbefund. Zytogenetisch wurden Chromosom 3 und 7 als überzählig gesehen. Ein im langen Arm verlängertes Chromosom 14 schien aus einer Translokation t(11/14) hervorgegangen zu sein. Die CGH konnte keine Aussagen über die vermuteten Veränderungen machen.

3.2.3 ALL im Bereich eines tetraploiden Chromosomensatzes mit 81-103 Chromosomen

3.2.3.1 Fall Nr.15: c-ALL, männlich, 27 Jahre

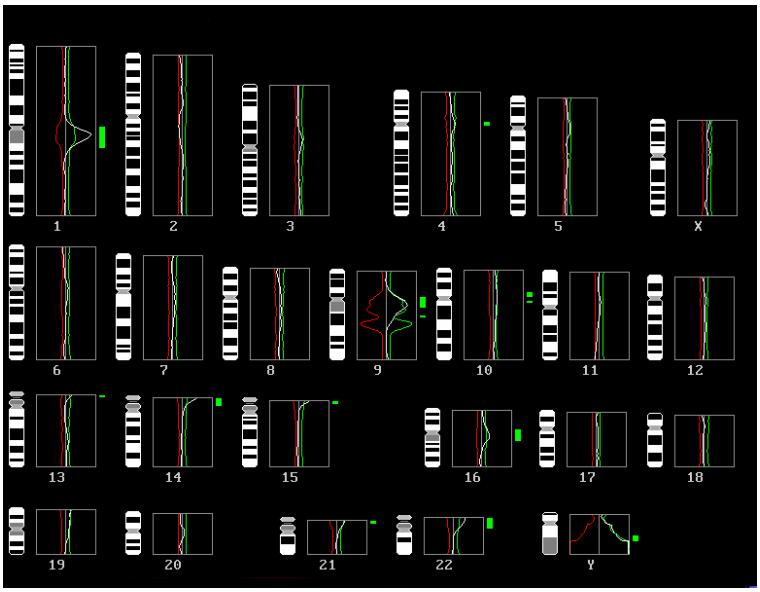


Abbildung 3.2.3.1.a:. Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 15. Es zeigt einen Normalbefund. Die Abweichungen in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen, in den Zentromer- und Telomerbereichen werden nicht als tumorassoziierte Veränderungen gewertet.

CGH-Befund:	Normal (KM, fixierte Zellen, DOP-PCR)
Zytogenetischer Befund:	92,XXYY (10/16) (KM)

Interpretation:

In 10 von 16 untersuchten Metaphasen aus Knochenmarkkulturen bestand ein tetraploider Karyotyp mit der genau vierfachen Chromosomenzahl eines haploiden Satzes.

Die CGH-Analyse mit DNA aus Knochenmarkkulturen erbrachte einen Normalbefund ohne genetische Imbalancen.

3.2.3.2 Fall Nr.16: ALL, männlich, 40 Jahre

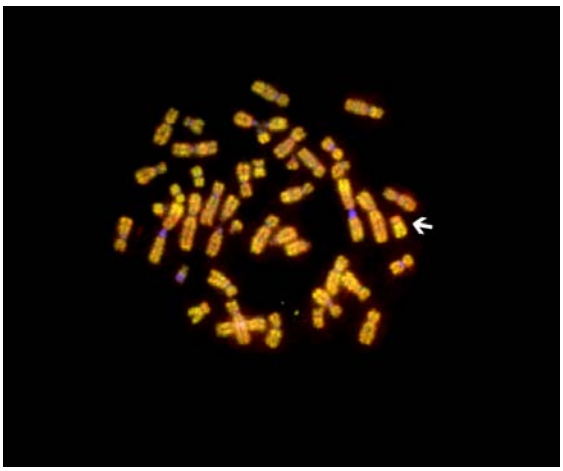


Abbildung 3.2.3.2.a: Metaphase nach CGH mit DNA von Fall 16. Chromosom 17 zeigt im kurzen Arm eine rötliche und im langen Arm eine grünliche Färbung (Pfeil).

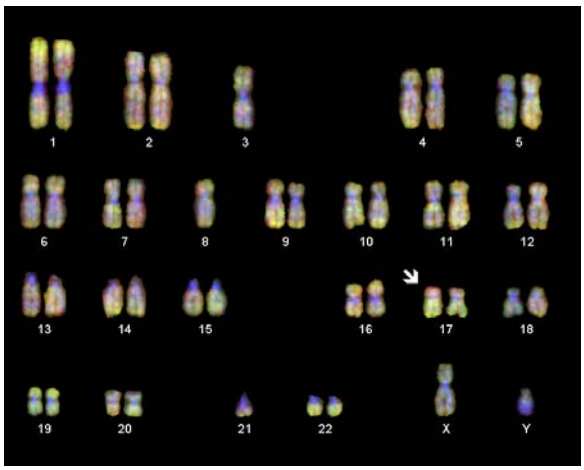


Abbildung 3.2.3.2.b: Im Karyogramm geordnete Chromosomen der in Abbildung 3.2.3.2.a dargestellten Chromosomen. Auch hier zeigt sich im kurzen Arm von Chromosom 17 eine rötliche Anfärbung , im langen Arm eine grünliche Anfärbung.

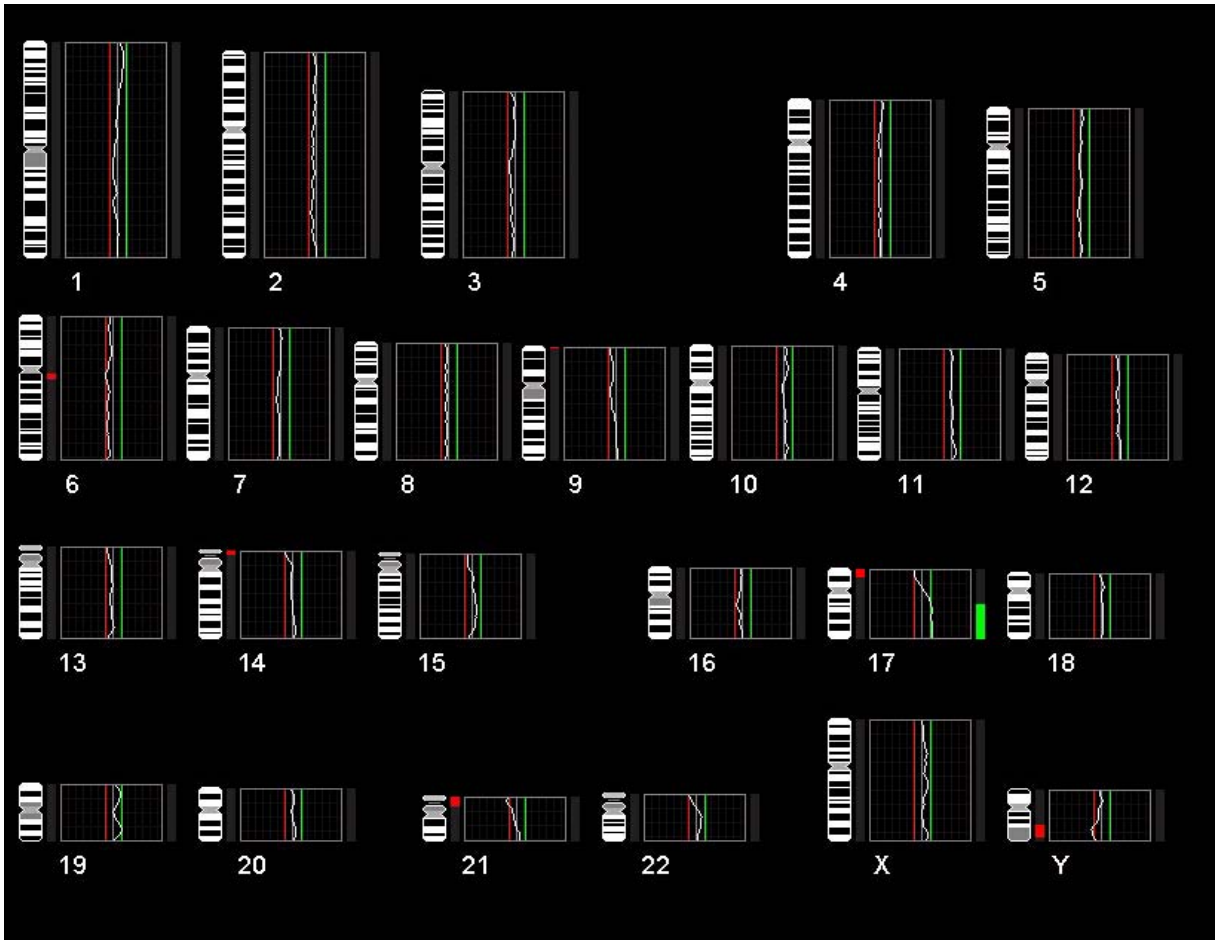


Abbildung 3.2.3.2.c: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 16. Für Chromosom 17 findet sich ein Zugewinn im langen Arm und ein Verlust im kurzen Arm. Der Ratioprofilausschlag, entsprechend einer Unterrepräsentation, beginnt bereits in der Zentromerregion. Die Unterrepräsentationen in den Telomeren, Zentromeren und im Heterochromatinbereich des Y-Chromosoms werden nicht gewertet (vgl. Abschnitt 2.4.9).

CGH-Befund:	enh(17q)
	dim(17p13)
	(Blut, Säulenaufreinigung)
Zytogenetischer Befund:	46,XY[3/10]
	88-92[7/10]
	Blut/KM

Interpretation:

In sieben von 10 untersuchten Metaphasen lag ein nahezu tetraploider Chromosomensatz vor. Die genaue chromosomale Zusammensetzung konnte nicht näher bestimmt werden. In der CGH aus Blut-DNA wurde ein partieller Zugewinn in 17q und ein Verlust im Segment 17p13 detektiert. Im Ratioprofil bestand für beide Regionen eine deutliche Abweichung. Bereits ab der Zentromerregion von 17p lag ein Profilausschlag vor, der möglicherweise einen Verlust des ganzen kurzen Armes von Chromosom 17 andeutet (Abbildung 3.2.3.2.c). Im Metaphasenbild und im Karyogramm zeigte sich auf Chromosom 17 deutlich eine Mehranfärbung mit grüner Tumor-DNA im langen Arm und eine Rotfärbung im gesamten kurzen Arm als Zeichen eines Verlustes von grüner Tumor-DNA. Der Befund wäre zum Beispiel mit einem Isochromosom 17q vereinbar, bei dem bei einem Chromosom 17 der kurze Arm durch den langen Arm, unter Verlust des kurzen Armes, ersetzt ist.

3.2.4 2 Fälle von Non-Hodgkin-Lymphomen

3.2.4.1 Fall Nr.17: T-NHL, weiblich, 60 Jahre

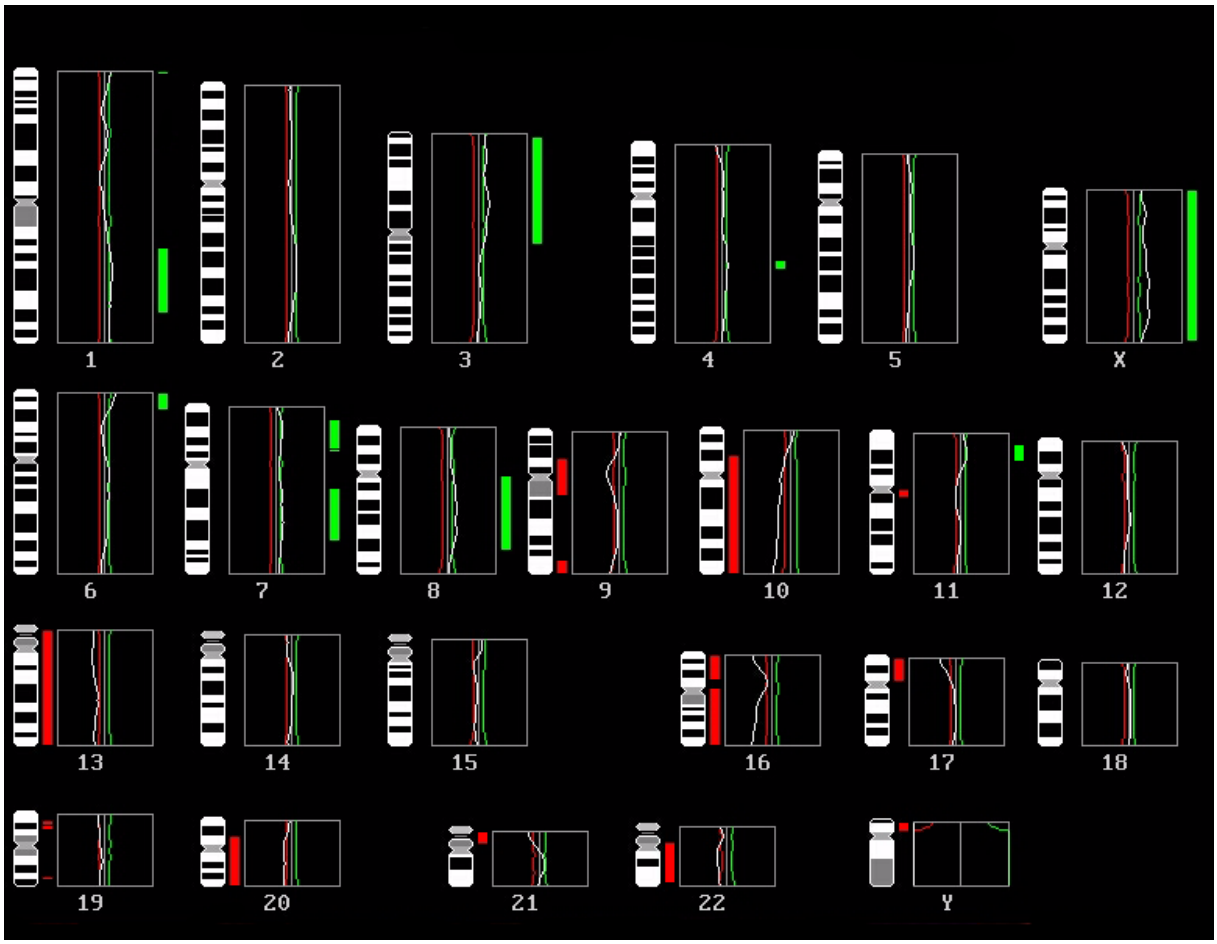


Abbildung 3.2.4.1.a: Metaphase nach CGH mit DNA von Fall 17. Es bestehen Vermehrungen in den Bereichen von 1q22q32, 3p und eines Teils des langen Armes von Chromosom 8. Für Chromosom 7 zeigen sich 2 Schwellenüberschreitungen für Zugewinne, die von einem homogenen Ratioprofilausschlag über die gesamte Chromosomenlänge begleitet sind. Unterrepräsentationen liegen für die Bereiche 10p12qter, 13, 16q, 17p und 20p11qter vor. Die Imbalancen in den Telomerbereichen und Zentromerregionen von Chromosom 6, 9, 11 und 21 werden nicht gewertet. Ebenso Verluste im Bereich von Chromosom 16p und 19 (vgl. Abschnitt 2.4.9).

CGH-Befund:	enh(**1q22q32**,3p,7p12p21,7q21q31,8q11q23,11p14p15) dim(10p12qter,13,16q,17p,20p11qter) (Blut, Säulenaufreinigung)
Zytogenetischer Befund:	71-75,XX,+X,+**2xadd(1)(p1?1)**,+2x?del(3)(p?)inc[19/19] [12/19]aus KM und [7/19]aus Blut

Interpretation:

In allen untersuchten Zellen aus Blut- und Knochenmarkkulturen wurde ein nahezu triploider Chromosomensatz gefunden. Zytogenetisch waren 2 zusätzliche vorhandene Chromosomen 1 gefunden worden. Beide hatten an den kurzen Armen chromosomales Material unbekannter Herkunft angelagert, wobei der kurze Arm der Chromosomen vollständig durch das unbekannte Material ersetzt zu sein schien. Dieser Befund geht mit einer partiellen Überrepräsentation des langen Armes von 1q einher. In der CGH zeigte sich über dem langen Arm von Chromosom 1 eine Überrepräsentation für den Bereich 1q22q32, das Ratioprofil zeigte eine homogene Dosissteigerung für den gesamten langen Arm von Chromosom 1 an. Somit bestätigte die CGH diesen Befund. Weiterhin waren zytogenetisch zwei zusätzliche Chromosomen 3 mit Deletion ihres kurzen Armes vermutet worden, ein Befund, der mit einer partiellen Überrepräsentation 3q einher gehen könnte. Die CGH konnte dies nicht bestätigen, sondern zeigte eine Überrepräsentation für 3p. Die CGH zeigte für Chromosom 7 partielle Imbalancen für den kurzen und den langen Arm an. Das Ratioprofil zeigte dabei eine gleichbleibende Abweichung von der Mittellinie über das ganze Chromosom an. Ein Zugewinn des ganzen Chromosoms 7 scheint wahrscheinlich. Deutliche partielle Schwellenüberschreitungen zeigten sich für den langen Arm von Chromosom 10 und den kurzen Arm von Chromosom 17.

3.2.4.2 Fall Nr.18: zentrozytisches NHL, männlich, 59 Jahre

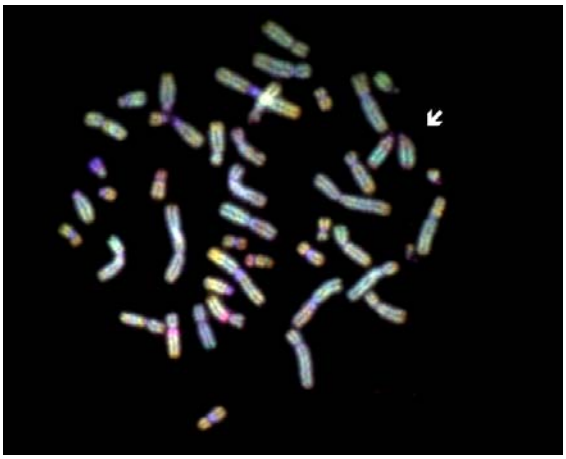


Abbildung 3.2.4.2.a: Metaphase nach CGH mit DNA von Fall 18. Die DNA wurde aus fixierten Zellen mittels Chelex® und DOP-PCR gewonnen. Man erkennt deutlich die partielle Imbalance auf Chromosom 13 (Pfeil).

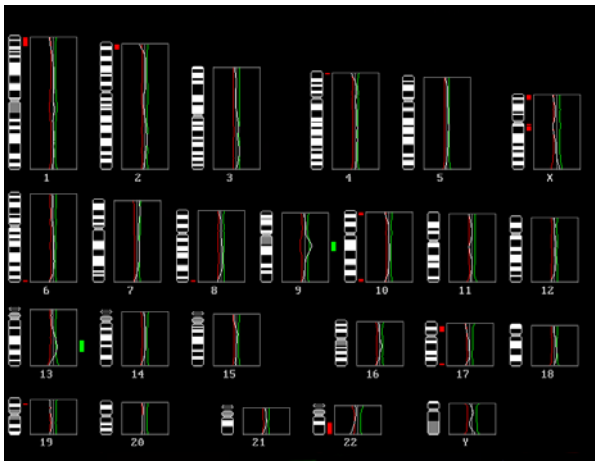


Abbildung 3.2.4.2.b: Im Karyogramm geordnete Chromosomen der in Abbildung 3.2.4.2.a dargestellten Chromosomen. Die CGH aus Zellsuspensionen des Knochenmarks nach Chelex® und DOP-PCR zeigt nur in 13q21q31 einen Zugewinn. Die anderen kurzen Schwellenüberschreitungen werden nicht gewertet.

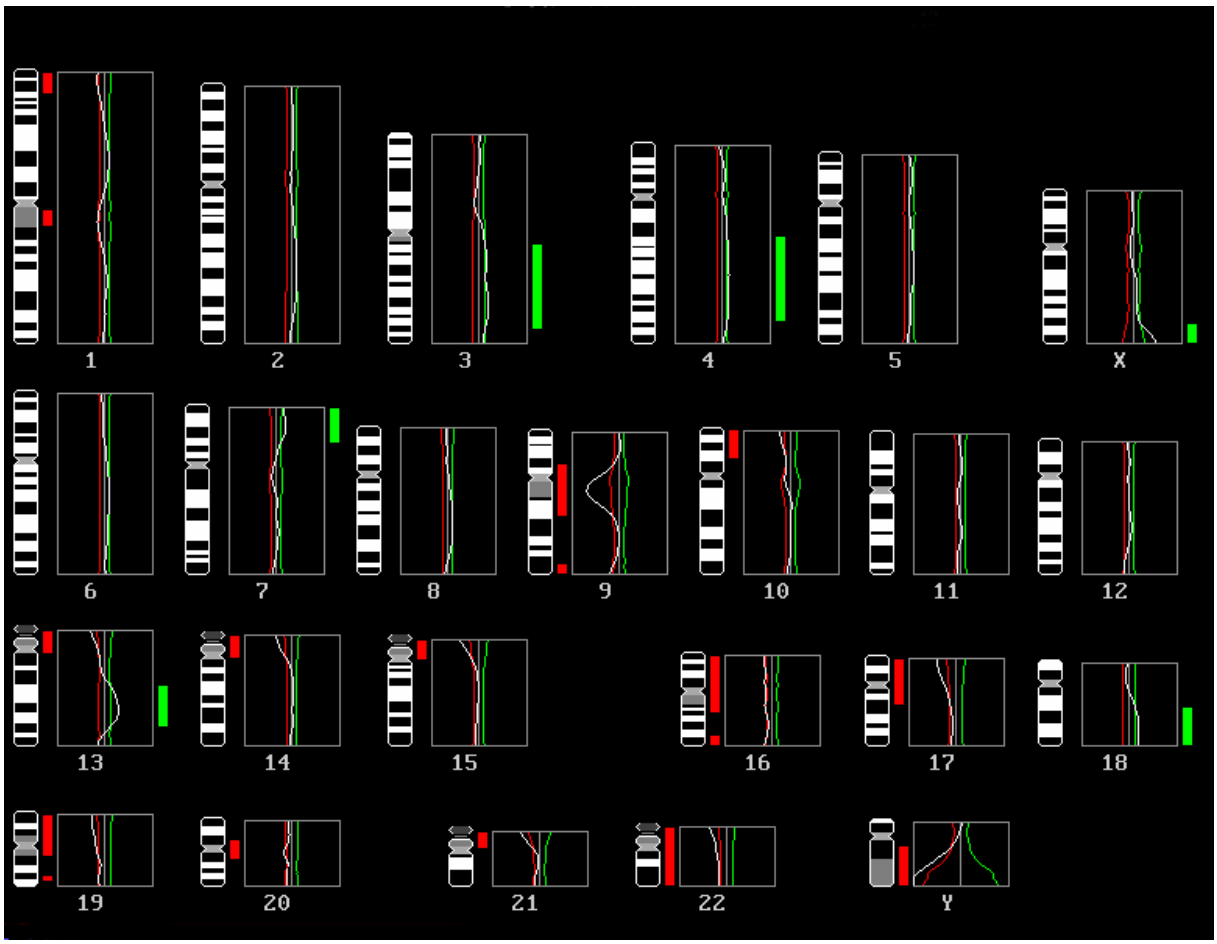


Abbildung 3.2.4.2.c: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 18. CGH-Ergebniss nach DNA-Gewinnung durch Säulenaufreinigung aus Blut. Es finden sich Überrepräsentationen im Bereich Xq26qter, 3q, 4q22q32, 7p13pter, 13q14q31 und 18q21qter. Ausserdem Verluste in den Bereichen 10p12pter und 17q12pter. Die partiellen Verluste in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen, in den Zentromer- und Telomerbereichen sowie die Unterrepräsentationen in den Bereichen 1p32pter, 16p, 19 und 22 werden nicht gewertet (vgl. Abschnitt 2.4.9).

CGH-Befund:	enh(Xq26qter,**3q**,4q22q32,7p13pter,13q14q31,18q21qter) dim(10p12pter,17q12pter) (Blut, Säulenaufreinigung) enh(13q21q31) (KM, fixierte Zellen, DOP-PCR)
Zytogenetischer Befund:	46,XY [38/52] 83-86,XXYY,+**2x?add(3)(p11)**,+2xadd(6)(q27), +2x?add(7)(p22),+2xadd(13)(q3?),+4-6mar, inc[14/52] (KM)

Interpretation:

Von 52 Zellen aus Knochenmarkkulturen wiesen 14 einen nahezu tetraploiden Chromosomensatz zwischen 81 und 103 Chromosomen auf. Der zytogenetische Befund bestand aus einer Reihe von Chromosomen, an die unbekanntes Material angelagert war, sowie einigen Markerchromosomen. Zytogenetisch bestand der Verdacht auf zwei überzählig vorliegende Chromosomen 3, an deren kurzen Arm chromosomales Material unbekannter Herkunft angelagert war. Dabei schien der ganze kurze Arm von Chromosom 3 verloren gegangen zu sein. Daraus resultiert eine partielle Imbalance 3q. In der CGH fanden sich keine Zugewinne ganzer Chromosomen, sondern eine Vielzahl von partiellen Imbalancen. Der Zugewinn 3q in der CGH bestätigte dabei die zytogenetische partielle Imbalance 3q. Auch im terminalen Bereich von Chromosom X zeigte sich ein deutliches Überschreiten der Schwelle. Eine deutliche Unterrepräsentation zeigte sich im kurzen Arm von Chromosom 17. In diesem Fall führte ich zusätzlich eine CGH aus Zellsuspension von Knochenmarkkulturen mit Chelex® und DOP-PCR durch. Hier war durch die CGH nur ein Zugewinn für 13q21q31 zu detektieren.

3.2.5 2 Fälle mit akuter myeloischer Leukämie

3.2.5.1 Fall Nr.19: AML, M 5, männlich, 76 Jahre

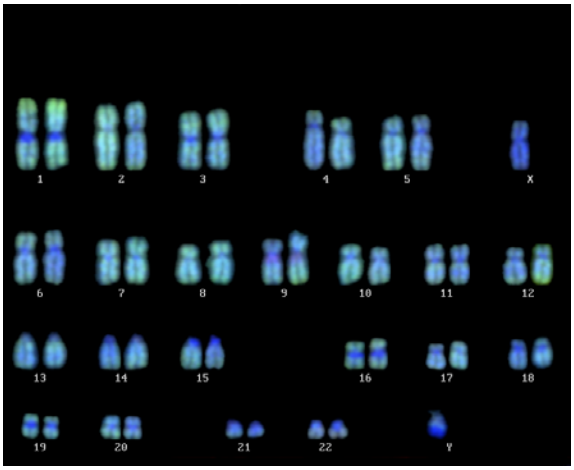


Abbildung 3.2.5.1.a: Im Karyogramm geordnete Chromosomen der CGH von Fall 19. Es zeigt sich eine gleichmässige Anfärbung aller Chromosomen.

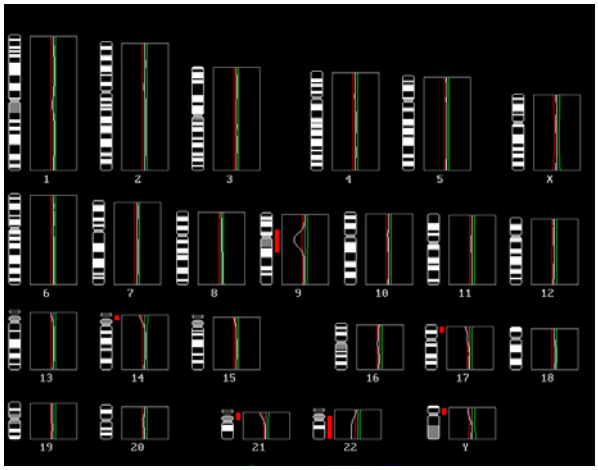


Abbildung 3.2.5.1.b: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 19. In der Ratioprofilauswertung ergibt sich ein Normalbefund. Die kurzen Unterrepräsentationen werden entsprechend den CGH-Konventionen nicht gewertet (vgl Abschnitt 2.4.9).

CGH-Befund: normal
(Blut, Säulenaufreinigung)

Zytogenetischer Befund: 62,XX,-Y,+1,+?18 inc[13/21]
(KM)

Interpretation:
In 13 von 21 untersuchten Zellen aus KM-Kulturen wurde ein nahezu triploider Satz mit 62 Chromosomen gefunden. Hier schien, bezogen auf den triploiden Karyotyp, regelmäßig Chromosom 1 hinzugewonnen. Die CGH mit Blut-DNA zeigte für alle auswertbaren Regionen einen Normalbefund.

3.2.5.2 Fall Nr.20: AML, M0, männlich, 44 Jahre

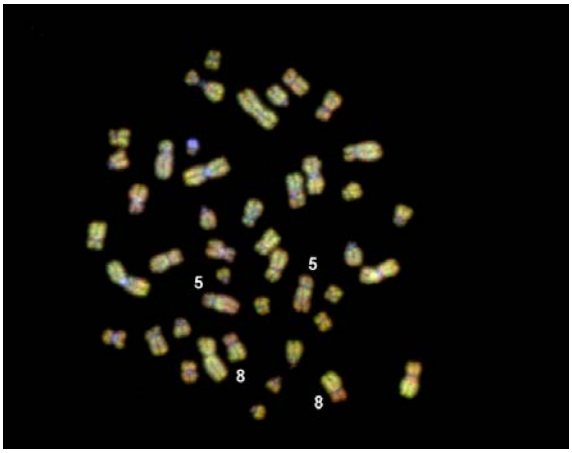


Abbildung 3.2.5.2.a: Metaphase nach CGH mit DNA von Fall 20. Im langen Arm von Chromosom 5 zeigt sich ein Verlust der grünen Test-DNA, d.h. eine rötliche Färbung. Auch im kurzen Arm von Chromosom 8 zeigt sich ein Verlust der grünen Tumor-DNA, wohingegen im langen Arm des Chromosoms 8 eine deutliche Grünfärbung vorliegt.

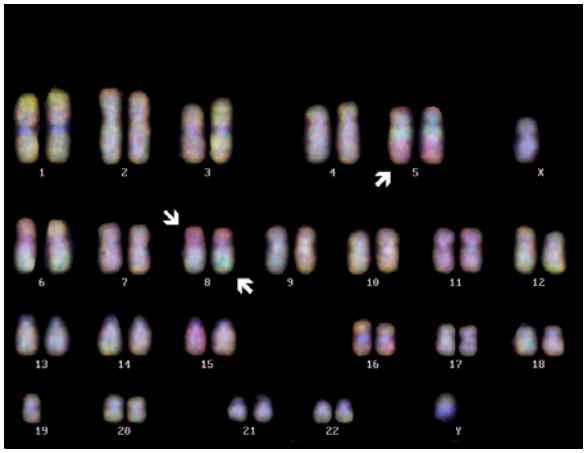


Abbildung 3.2.5.2.b: Im Karyogramm geordnete Chromosomen der Abbildung 3.2.5.2.a dargestellten Chromosomen. Auch hier ist ein Verlust im langen Arm von Chromosom 5 und im kurzen Arm von Chromosom 8 sowie ein Zugewinn grüner Tumor-DNA im langen Arm von Chromosom 8 erkennbar (Pfeile).

CGH-Befund: enh(6q22q27,8q21qter)
dim(5q21qter,6q22qter,8p,11p,11q23q25,15q24q26,16q13q24)
(Blut, Säulenaufreinigung)

Zytogenetischer Befund: 69-87[17/26]
(KM)

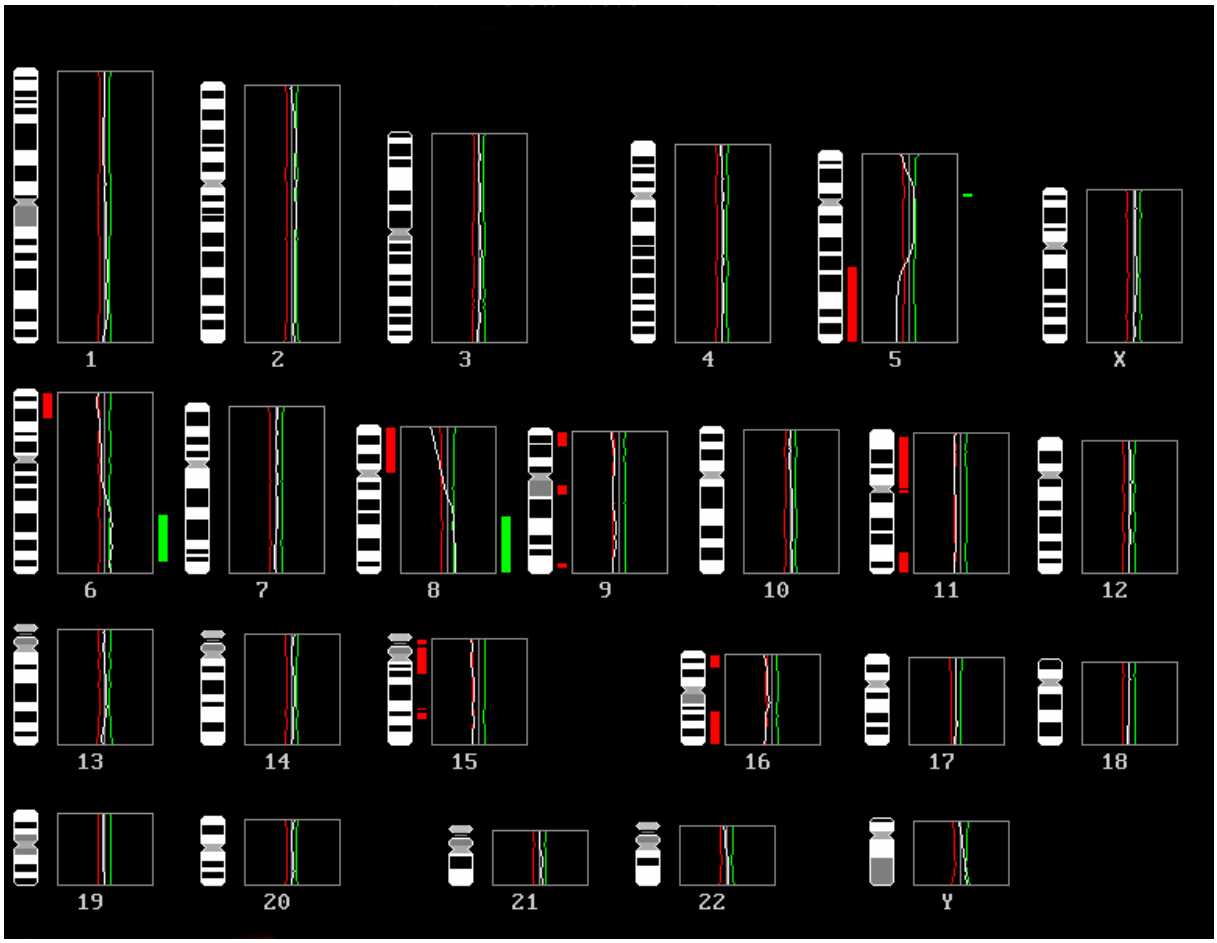


Abbildung 3.2.5.2.c: Profil der Fluoreszenz-Verhältnisse von Fall 20. Es finden sich Mehranfärbungen mit Tumor-DNA in den Bereichen 6q22q27 und 8q21qter. Ausserdem finden sich Unterrepräsentationen des Tumorgenoms in den Bereichen 5q21qter, 6q22qter, 8p, 11p, 11q23q25, 15q24q26 und 16q13q24. Auf Chromosom 11 und 15 zeigen sich in den Ratioprofilen Verluste über die gesamte Länge der Chromosomen. Die kurzen Unterrepräsentationen im Bereich der Telomere und des Zentromers von Chromosom 9 und 16 werden entsprechend den Konventionen nicht gewertet.

Interpretation:

In 17 von 26 untersuchten Zellen aus KM-Kulturen fanden sich zwischen 69 und 87 Chromosomen. Meist waren 79 Elemente vorhanden, was einem nahezu triploiden Satz entspricht. Die chromosomale Zusammensetzung ließ sich nicht sicher feststellen.

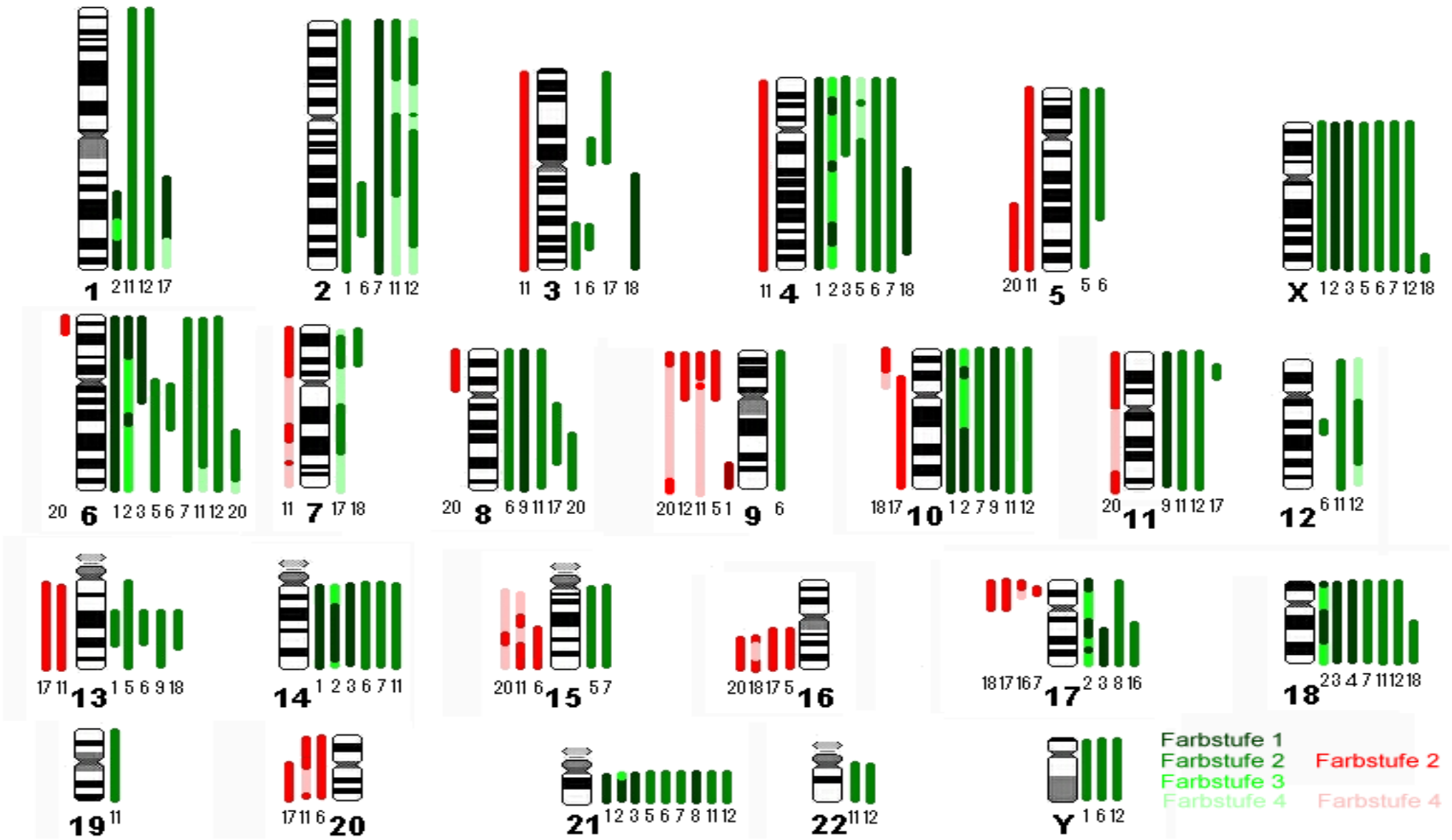
Deutliche Schwellenüberschreitungen zeigte die CGH bei den Chromosomen 5 und 8: Bei Chromosom 5 bestand ein Verlust im distalen Bereich des langen Armes, bei Chromosom 8 ein Verlust des kurzen und ein Zugewinn im Bereich des langen Armes. Diese Befunde liessen sich schon im Nativkaryogramm vermuten und im Ratioprofil eindeutig nachvollziehen. Auch die Überrepräsentation im Bereich des langen Arms von Chromosom 6 ging mit einem deutlichen Profilausschlag einher. Die partiellen Verluste von Chromosom 11, 15 und 16 sind schwieriger zu interpretieren. Die Ratioprofile lassen an Verluste der ganzen Chromosomen denken: enh(6q22q27,8q21qter), dim(5q21qter,6q22qter?,8p,11,15,16).

3.2.6 Tabelle 10: CGH-Befund und Chromosomenbefund im Vergleich bei den 20 untersuchten Patienten.
(Übereinstimmungen sind fett unterlegt).

Fall	Material/ Aufbereitungsmethode	CGH-Befund	Chromosomen-befund	Kritische Auswertung/ Interpretation
Fall 1	KM, Säulenaufreinigung	enh(X,2,3q24qter,**4,6**,**10,14,21**) dim(**9q32qter**)	57,XY,**+4,+6**,+?7,+**der(9)t(9;?)(q3?4;?)**,+**10**, +?12**,+14**,+?18,+**21,+21**, der(22)?t(**9**;22)(**q3**4;q11)+der(22) [6/6] KM	Der CGH-Befund aus fixierten Zellen unterschied sich vom CGH-Befund aus Nativmaterial durch: enh(13q21q31). Die CGH bestätigte Zugewinne ganzer Chromosomen und partielle Zugewinne durch eine Strukturaberration.
	KM, fixierte Zellen, DOP-PCR	enh(X,2,3q24qter,**4,6,10**,13q21q31,**14,21**) dim(**9q32qter**)		
Fall 2	Blut, Säulenaufreinigung	enh(**X**,**1**q24q36,**1**q41qter,**4**p13p15,**4**q21q22, **4**q31q32,**6**p21pter,**6**q16q21,**10**p12,**10**q22qter, 14q13q32,**17**p12pter,**17**q12q21,**18**q11q21, **21**q21qter)	55,XY,+**X**,+**4**,+**6**,+**10**,der(14)t(**1**;14)(**q11**;p13), +**17**,+**18**,+19,+**21**,+**21** [21/22] KM	Die CGH lieferte ein komplexes Bild. In der Zusammenschau aus CGH-Befund, Ratioprofil-verlauf und zytogenetischem Befund ergab sich: enh(**X,1q,4,6,10,14,17,18,21**).
Fall 3	Blut, Säulenaufreinigung	enh(**X**,4pterq21,6pterq14,**14**,**17q21qter**,**18,21**)	51-53,XY,+**X**,der(2)t(2;**17**)(q3?7;**q1?1**), +?del(6)(q1?),+**14**,+**14**,+**18**,+**21**,+**21** [19/19] Blut	Die CGH bestätigte sämtlichen Zugewinne und die Strukturaberrationen (durch partielle Zugewinne).
	Blut, fixierte Zellen, DOP-PCR	enh(**X**,4pterq21,6pterq11,**14**,**17q21qter**,**18,21**)		
Fall 4	Blut, Säulenaufreinigung	enh(**18**)	51-52,XX,+1,add(9)(p?),+12, t(14;18)(q32;q21),+**18**,+**der(18)t(**14**;18**),+21, +mar[6/30] Blut	Die CGH lieferte deutlich weniger Information als der zytogenetische Befund.
Fall 5	Blut, Säulenaufreinigung	enh(X,4q,5,6q,13,15,21) dim(9p,16)	57-58,2xder?(22)t(9;22)inc [5/6] Blut	Aufgrund des Ratioprofilverlaufs möglicherweise Zugewinn des ganzen Chromosom 4.
Fall 6	KM, fixierte Zellen , DOP-PCR	enh(X,Y,2q21q32,3p12p13,3q24q26,4,5pterq31, 6q11q21,8,9,12q14q21,13q21q32,14,21) dim(15q22qter,20)	50-54[2/2]	Eindeutige Befunde, die durch den Ratio-profilverlauf und die Anfärbung im Fluoreszenz-bild bestätigt wurden, waren: enh(X,Y,4,5pterq31, 8,9,14,21). Die übrigen Schwellenüberschrei-tungen waren aufgrund der starken Schwankungen im Profilverlauf schwieriger zu beurteilen.

Fall	Material/ Aufbereitungsmethode	CGH-Befund	Chromosomenbefund	Kritische Auswertung/ Interpretation
Fall 7	Blut; Säulenaufreinigung	enh(X,**2**,4,6,10,14,15,18,21) dim(17p11p12?)	51-56,XY,+**2**,der(22)t(9;22), inc [16/18] Blut	
Fall 8	Blut; Säulenaufreinigung	enh(17,**21**)	55,XY,+X,+5,+6,+7,+12,+16,+19,+**21**,+21 [5/5] Blut	
Fall 9	Blut; Säulenaufreinigung	enh(**8,10,11**,13q21qter)	51,XY,**+8,+10,+11**,+?14,+?22 [11/13] KM	
Fall 10	KM, fixierte Zellen, DOP-PCR	Normalbefund	51-55[5/14] Blut/ KM	
Fall 11	KM, fixierte Zellen, DOP-PCR	enh(1,2p16pter,2q11q24,6q24pter,8,10,11,12,14, 18,19,21,22) dim(3,4,5,7p,7q31,7q35,9p,13,15q21q22, 15q24qter,20p,20q13.3**)**	46,XX [24/44] 36 [9/44]→72 [11/44] Blut/ KM	Bei den meisten Chromosomen lagen partielle Schwellenüberschreitungen bei insgesamt homogenen Ratioprofilabweichungen über ganze Chromosomen vor. Mögliche Interpretation deshalb als Zugewinne ganzer Chromosomen: enh(1,2,6,8,10,11,12,14,18,19,21,22) dim(3,4,5,7?,9,13,15,20?).
Fall 12	KM, fixierte Zellen, DOP-PCR	enh(X,Y,1,2p15p23,2q13q33,6,10,11,12q13q23, 18,21,22) dim(9p)	55-65[3/3] KM	Im Ratioprofil zeigte sich ein homogener Zugewinn für die ganzen Chromosomen 2 und 12. Dim(9p) war auch im Ratioprofil nachvollziehbar: enh(X,Y,1,2,6,10,11,12?,18,21,22), dim(9p).
Fall 13	Blut, Säulenaufreinigung	Normalbefund	69-70,XY,+X,del(1)(p21),+del(1)(p21), add(8)(q2?4),+add(8)(q2?4), inc [11/14] KM	
Fall 14	Blut, Säulenaufreinigung	Normalbefund	71,XXY,+3,+?7,+?der(14)t(11;14) (q13;q23), inc [2/7] Blut	
Fall 15	KM, fixierte Zellen, DOP-PCR	Normalbefund	92,XXYY [10/16] KM	

Fall	Material/ Aufbereitungsmethode	CGH-Befund	Chromosomenbefund	Kritische Auswertung/ Interpretation
Fall 16	Blut, Säulenaufreinigung	enh(17q) dim(17p13)	88-92 [7/10] Blut/ KM	Anhand der Nativbilder von Metaphase und Karyogramm Interpretation als: enh(17q) dim(17p): V.a. Isochromosom 17q.
Fall 17	Blut, Säulenaufreinigung	enh(**1q22q32**,3p,7p12p21,7q21q31,8q11q23, 11p14p15) dim(10p12→10qter,13,17p,20p11qter)	71-75,XX,+X,+**2xadd(1)(p1?1**),+2x?del(3)(p?), inc [19/19] [12/19] KM, [7/19] Blut	Die partielle Imbalance auf Chromosom 1 bestätigte den zytogenetischen Befund. Bei homogenem Ratioprofil V.a. Zugewinn des ganzen Chromosoms 7.
Fall 18	Blut, Säulenaufreinigung	enh(Xq26qter,**3q**,4q,7p13pter,13q14q31, 18q21qter) dim(10p, 17p)	46,XY [38/52] 83-86,XXYY,+**2x?add3(3)(p11**),+2xadd(6)(q27), +2x?add(7)(p22),+2xadd(13)(q3?),+4-6mar, inc [14/52] KM	Die CGH aus Blut bestätigte den zytogenetischen Verdacht auf einen Zugwinn von 3q durch add3(3)(p11). Die CGH aus Nativblut und die CGH aus fixierten Zellen zeigten einen unterschiedlichen Befund.
	KM, fixierte Zellen, DOP-PCR	enh(13q21q31)		
Fall 19	Blut, Säulenaufreinigung	Normalbefund	46,XY [8/21] 62,XX,-Y,+1,+?18, inc [13/21] KM	
Fall 20	Blut, Säulenaufreinigung	enh(6q21q27,8q21q24) dim(5q21qter,6q22qter,8p11p23,11q,11q23q25, 15q24q26,16q13q24)	46,XY [9/26] 69-87 [17/26] KM	Die partiellen Verluste von Chromosom 11, 15 und 16 ließen sich anhand der Profile als Verluste ganzer Chromosomen interpretieren.



3.2.7 Übersichtsgraphik: Überblick über alle genetischen Imbalancen der 20 untersuchten Fälle. Zugewinne sind grün, Verluste sind rot unterlegt. Es wurden vier verschiedene Farbstufen gewählt, um die Befunde zu gewichten: Farbstufe 1 (dunkel): CGH-Befunde, die zytogenetisch durch entsprechende Imbalancen untermauert wurden. Farbstufe 2: CGH-Befunde die nur in der CGH, nicht zytogenetisch gesehen wurden. Farbstufe 3: CGH-Befunde, die durch entsprechende Ratioprofilausschläge, jedoch nicht durch Schwellenüberschreitungen gekennzeichnet waren; als Bestätigung des Ratioprofilbefundes zeigte sich allerdings eine entsprechende Imbalance in der zytogenetischen Diagnostik. Farbstufe 4 (hell): Ratioprofilausschläge der CGH ohne Schwellenüberschreitung, die als chromosomale Imbalancen gewertet wurden, da homogene Profilausschläge über längere Strecken oder ganze Chromosomen vorlagen, diese aber nur zu kurzfristigen Schwellenüberschreitungen geführt haben; entsprechende Imbalancen in der zytogenetischen Befundung fanden sich nicht (vgl. Abschnitt 2.4.11).

4 Auswertung und Diskussion

4.1 Auch bei Leukämien ist es möglich, aus archiviertem Material DNA für eine CGH-Studie zu gewinnen

Durch DNA-Vermehrung mit der DOP-PCR ist es möglich, auch aus sehr kleinen Proben noch ausreichende DNA-Mengen für ein CGH-Experiment zu gewinnen. Auch aus fixiertem und archiviertem Tumormaterial können, nach DOP-Amplifikation der extrahierten DNA, CGH-Untersuchungen erfolgreich durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde DNA aus Leukämie-Zellen, die für die zytogenetische Diagnostik aufbereitet und in Carnoy´s Fixativ fixiert waren, für die CGH amplifiziert. Dadurch ist es möglich, auch bei Leukämien große Mengen an vorhandenem Archivmaterial retrospektiv mittels CGH auf genetische Imbalancen zu untersuchen. Da bisher keine Berichte und Protokolle über erfolgreiche CGH-Experimente aus in Carnoy´s Fixativ archivierten Leukämiezellen vorlagen, führte ich Kontrollexperimente mit verschiedenen DNA-Aufbereitungsmethoden durch.

4.1.1 Bei Zellsuspensionen und Chelexaufbereitung ist eine Amplifikation mittels DOP-PCR sowohl der Test- als auch der Referenz-DNA notwendig

In den von mir durchgeführten Kontrollexperimenten mit Test-DNA des Falles 280/93 mit unterschiedlichen DNA-Aufbereitungsmethoden zeigten sich nach DNA-Extraktion aus Zellsuspensionen durch Chelex® und anschließender DOP-PCR Hybridisierungsergebnisse, die wesentlich von den Ergebnissen nach DNA-Gewinnung durch Säulenaufreinigung ohne anschließende DOP-Amplifikation abwichen. Wurde eine DOP-amplifizierte DNA gegen eine nicht amplifizierte DNA hybridisiert, entstanden wesentliche Abweichungen des Hybridisierungsmusters. Dabei traten keine falsch negativen Ergebnisse auf, alle genetischen Imbalancen konnten nachgewiesen werden. Das Ergebnis war jedoch durch eine Vielzahl falsch positiver Befunde verfälscht. In zwei unterschiedlichen Experimenten mit jeweils neu aufbereiteter DNA stimmten dabei die Regionen mit falsch positiven Befunden weitgehend überein: Abweichungen im Hybridisierungsmuster zeigten sich bei beiden Versuchen in den Regionen 1p, 2q22q24, 4q, 5q13q22, 6q, 9q32qter, 13q, 16p, 17 und 20q. Auch die Regionen 1pter, 9q12 und 16p, 19 und 22 zeigten abweichende Muster, die jedoch als Unterrepräsentationen nach den CGH-Konventionen nicht ausgewertet wurden. Valide Ergebnisse, die den zytogenetisch detektierten Imbalancen entsprachen, waren nur bei Amplifikation sowohl der Test- als auch der Referenz-DNA zu erzielen (Vgl. Kapitel 3.1.2.1). Diese Problematik wurde anfangs in CGH-Studien, bei denen Test-DNA mittels DOP-PCR vermehrt wurde, nicht beachtet. Aufmerksamkeit wurde vor allem der Frage gewidmet, ob

alle ursprünglich vorhandenen Veränderungen auch im Amplifikat nachzuweisen waren, ob es also zu falsch negativen Ergebnissen kam (Speicher et al. 1993; Cheung und Nelson 1996; Kuukasjarvi et al. 1997; Huang et al. 2000). Erst in späteren Veröffentlichungen wurde berücksichtigt, dass bei einseitiger Amplifikation der Test-DNA Abweichungen im Hybridisierungsmuster entstehen und die Gefahr falsch positiver Befunde erhöht ist (Weiss et al. 1999; Voullaire et al. 1999; Klein et al. 1999; Lichter et al. 2000).

Eine neuere systematische Studie, in denen verschiedene Kombinationen von DNA-Aufbereitungen verglichen wurden, kam zu Ergebnissen, die meinen Beobachtungen entsprechen: Amplifikation durch DOP-PCR von nur einer der beiden DNA´s des Hybridisierungsgemisches führte zu falsch positiven Befunden. Interessanterweise waren die Regionen mit falsch positiven Unter- oder Überrepräsentationen in dieser Studie weitgehend mit meinen Befunden übereinstimmend (fett gedruckt sind Übereinstimmungen mit meinen Befunden): **1p33pter,** 1q12, **2q22q32**, **4q13q32, 5q14q23, 6q**, 7p22, **8q**, **9q12**, **9q34**, 11q22qter, **16p**, **17, 19** und **22** (Huang et al. 2000). Eine im Jahr 2001 veröffentlichte Studie erbrachte Abweichungen in den Regionen **2q**, **13q**, 18q und **20q** bei Verwendung einer Kombination hochmolekularer genomischen DNA und einer DNA nach Amplifikation mit DOP-PCR (Larsen et al. 2001).

Diese Ergebnisse sprechen für eine spezifische durch DOP-PCR verursachte Fehlerquelle. Die genauere Analyse der in diesen Fällen betroffenen falsch positiven Regionen könnte Hinweise auf diese Fehlerquelle geben: So waren die Regionen 1p32pter, 16p, Chromosom 19 und 22, die routinemäßig wegen der Gefahr falsch positiver Imbalancen aus der CGH-Befundung ausgeschlossen werden, auch durch die DOP-Verfälschungen betroffen. Bezüglich dieser Regionen konnte gezeigt werden, dass hier unterschiedliche sterische Hybridisierungseigenschaften durch unterschiedliche Methoden der DNA-Markierung zu falsch positiven Unterrepräsentationen führen können. Interessanterweise kam es bei den entsprechenden Experimenten auch zu falsch positiven Befunden in den Regionen **4q13q21, 9q34** und **13q**, also Regionen, die auch durch DOP-Amplifikation verfälscht werden können (Kallioniemi et al. 1994b; James 1999). Auch zwischen DOP-amplifizierter und nicht amplifizierter DNA könnten unterschiedliche sterische Hybridisierungseigenschaften aufgrund unterschiedlicher Fragmentlängen entstehen. Hochmolekulare, durch Säulenaufreinigung gewonnene DNA hat eine Fragmentlänge zwischen 50 und 100kb (Qiagen Genomic DNA Handbook 1995). Nach der Nicktranslation liegt die durchschnittliche Fragmentlänge dann zwischen 300 und 3000 bp (Fa. Vysis). Die durchschnittliche Fragmentlänge niedermolekularer DNA nach Chelexpräparation beträgt nur 500 bp (Fa.

Promega). Die DOP-PCR liefert dann Fragmente ab 100 bp Länge, die danach noch in die Nicktranslation eingesetzt werden (Cheung und Nelson 1996). Solche Unterschiede in den Fragmentlängen nach unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden können die Hybridisierungseigenschaften wesentlich beeinflussen und gerade in den G/C-reichen Regionen 1pter, 19 und 22 zu falsch positiven Befunden führen (De Vries et al. 1995; Leitch und Schwarzacher 2000).

Die heterochromatinreichen Regionen mit hochrepetitiven DNA-Sequenzen wie Zentromere (insbesondere von Chromosom 9) und die kurzen Arme der akrozentrischen Regionen waren in meinen Kontrollexperimenten durch besonders deutliche, falsch positive Schwellenüberschreitungen gekennzeichnet (Abbildung 3.1.2.1.b und Abbildung 3.1.2.1.d). Diese heterochromatinreichen Regionen waren auch in Kontrollexperimenten DOP-amplifizierter Normal-DNA gegenüber nicht amplifizierter Normal-DNA häufig falsch positiv (Voullaire et al. 1999). Vor der Hybridisierung werden diese unspezifischen hochrepetitiven DNA-Sequenzen durch Zugabe von Cot1-DNA unterdrückt. Die Dynamik dieses Preannealing wird durch die Basenabfolge und die Länge der DNA-Fragmente bestimmt. Liegen nun Test- und Referenz-DNA in deutlich unterschiedlichen Fragmentlängen vor, so könnte sich die Effektivität des Preannealing und der Supprimierung hochrepetitiver Sequenzen für Test- und Referenz-DNA wesentlich unterscheiden (Voullaire et al. 1999; Klein et al. 1999).

Es muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass die DOP-PCR die genomische DNA nicht gleichmäßig amplifiziert, sondern bestimmte Regionen stärker als andere vermehrt. Es fiel auf, dass bei den von mir durchgeführten Vergleichsexperimenten mit unterschiedlicher Aufbereitung von Referenz-DNA, die Ratioprofile insgesamt stärkere Ausschläge zeigten als CGH-Profile bei Aufbereitung von Test- und Referenz-DNA mit der gleichen Methode, was ein Hinweis für bevorzugte Amplifikation bestimmter DNA-Regionen durch die DOP-PCR sein könnte (siehe Abbildung 3.1.1.2.b, Abbildung 3.1.2.1.b und Abbildung 3.1.2.1.d). Es wurde beobachtet, dass bei bereits vorliegenden genomischen Amplifikationen eine bevorzugte Vermehrung gerade dieser Regionen durch die DOP-PCR erfolgte (Kim et al. 1999). Möglicherweise sind hochrepetitive, heterochromatinreiche Sequenzen im Amplifikationsprodukt überrepräsentiert, da sie vermehrt von der DOP-PCR vervielfältigt werden, weshalb empfohlen wurde, bei CGH nach DOP-Amplifikation die Menge der Cot-1 DNA zu erhöhen (Cheung und Nelson 1996; Larsen et al. 2001).

4.1.2 Auch aus sehr wenig Ausgangsmaterial archivierter Zellsuspensionen mit fixierten Zellen kann noch genügend DNA für ein CGH-Experiment gewonnen werden

Im von mir verwendeten CGH-Protokoll war eine Mindestkonzentration der DNA-Ausgangslösung für die Nicktranslation von 60ng/µl nötig. 400ng markierter Test-DNA wurden dann in 15µl Hybridisierungsmix (27ng/µl) für ein CGH-Experiment eingesetzt. In Standardprotokollen werden meist 200ng Test-DNA in 10µl Hybridisierungsmix (20ng/µl) eingesetzt (Kallioniemi et al. 1994b; De Vries et al. 1995).

Nach DNA-Extraktion aus archivierten Zellsuspensionen mit Chelex® und anschließender DOP-PCR konnte ich teilweise nur DNA-Konzentrationen von 10 ng/µl erreichen. Auch aus Proben mit mehr Zellmaterial waren keine höheren Endkonzentrationen zu erzielen. Maximal standen mir für die Herstellung eines Hybridisierungsgemisches markierte DNA aus 150ng Proben-DNA zur Verfügung. Bei 15µl Hybridisierungsgemisch resultierte also höchstens die halbe DNA-Konzentration wie in den gängigen Protokollen. In den von mir durchgeführten Kontrollexperimenten führte ich CGH-Experimente mit DNA aus Zellsuspensionen nach Chelexaufbereitung und DOP-PCR durch und verglich sie mit den Ergebnissen eines CGH-Experimentes aus mittels Säulenaufreinigung aus Blut gewonnener DNA desselben Falles. Auch bei sehr geringen DNA-Ausgangskonzentrationen nach der DOP-Amplifikation und geringen DNA-Mengen im Hybridisierungsgemisch zeigten sich dabei identische CGH-Ergebnisse (Vgl. Kap. 3.1.2.2). Somit konnte ich zeigen, dass es auch bei Leukämien möglich ist, aus archiviertem Material ausreichende Mengen DNA für ein CGH-Experiment zu isolieren.

Problematisch war jedoch der geringe Präparationserfolg, d.h. der hohe Anteil an DNA-Präparationen, aus denen in der Elektrophorese kein Amplifikat nachweisbar war. So konnte nur aus ungefähr der Hälfte der erfolgreichen Chelexpräparationen nach der DOP-PCR durch Elektrophorese ein ausreichendes genomisches Amplifikat nachgewiesen werden (Vgl. Kap. 3.1.2.2 und Abb. 2.3.5.a und b). Wahrscheinlich lagen in den verwendeten Zellsuspensionen zu wenig Zellen vor, um ein ausreichende Repräsentation des Genoms zu gewährleisten. Mit den gängigen DOP-PCR Protokollen ist es möglich, aus nur 50-100pg DNA, enthalten in 10-20 Zellen, ausreichende Mengen DNA für ein CGH-Experiment zu gewinnen. Praktisch muss man allerdings von einer wesentlich höheren Anzahl von Zellen ausgehen, da insbesondere bei der konventionellen DNA-Isolierung große Mengen verloren gehen können (Speicher et al. 1993; James und Varley 1996; Kuukasjarvi et al. 1997; Huang et al. 2000). Insgesamt ist die Möglichkeit, DNA mittels DOP-PCR beliebig zu vermehren, begrenzt. Als maximal

erreichbare Endkonzentrationen sind etwa 140ng/µl beschrieben, etwa doppelt so hoch wie ich sie erreichen konnte. Dabei ist der limitierende Faktor die Konzentration der taq-Polymerase. Höhere Konzentrationen können zwar die Amplifikationsrate erhöhen, gleichzeitig steigt allerdings die Rate unerwünschter Nebenprodukte („primer-related products“) an (Telenius et al. 1992).

Inzwischen gibt es für die CGH optimierte DOP-PCR-Protokolle. Beispielsweise kann die Test-DNA schon während der DOP-PCR mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden markiert werden, auf den Schritt der Nicktranslation also verzichtet werden (Kuukasjarvi et al. 1997). Mit den neueren Protokollen sind noch höhere Amplifikationsraten zu erzielen. So wurde beschrieben, dass aus 15pg DNA, enthalten in 1-3 Zellen, noch ausreichend DNA für ein CGH-Experiment gewonnen werden konnte (Huang et al. 2000). Inzwischen sind mehrere Studien veröffentlicht, bei denen eine einzige Zelle mittels CGH auf genetische Imbalancen untersucht wurde (Wells et al. 1999; Voullaire et al. 1999). Bei der akuten myeloischen Leukämie wurden aus wenigen einzelnen Zellen, die vom Objektträger isoliert wurden, nach Amplifikation mittels DOP-PCR CGH-Analysen durchgeführt (Heller et al. 2000).

Durch modifizierte, speziell für die CGH entwickelte und vereinfachte DOP-PCR-Protokolle wären deshalb möglicherweise bessere DNA-Präparationserfolge zu erzielen, wodurch CGH-Experimente aus archivierten Leukämiezellen im Rahmen der Laborroutine vereinfacht wären.

4.2 CGH-Befunde bei 16 Patienten mit ALL$^{>50}$

4.2.1 Chromosomale Zusammensetzung der vorliegenden Fälle mit ALL$^{>50}$

In der vorliegenden Untersuchung konnte die CGH wesentlich zur Aufdeckung der chromosomalen Zusammensetzung der ALL$^{>50}$ bei Erwachsenen beitragen. In 11 der 16 untersuchten Fälle mit ALL$^{>50}$ konnte die CGH Zugewinne ganzer Chromosomen detektieren (Fälle Nr.1/2/3/4/5/6/7/8/9/11/12). In 5 dieser Fälle (Nr.5/6/7/11/12) konnte die zytogenetische Diagnostik keinerlei oder nur wenig Aussagen über die hinzugewonnenen Chromosomen machen. Die CGH konnte dagegen bei letzteren mehrere chromosomale Zugewinne erkennen und damit wesentlich zur Klärung der chromosomalen Zusammensetzung der ALL$^{>50}$ beitragen.

Bei den CGH-Ergebnissen traten in einigen Fällen jedoch Interpretationsschwierigkeiten auf. Im Fall Nr. 2 kann eine unkritische Auswertung des CGH-Ergebnisses zur Annahme führen, es lägen eine Reihe von partiellen Imbalancen vor. Die Zusammenschau aus zytogenetischem Befund, Ratioprofilverlauf und CGH-Befund legen aber die Interpretation der meisten Imbalancen als Zugewinne ganzer Chromosomen nahe. Für eine adäquate Interpretation der Balkendiagramme sollte daher möglichst der Ratioprofilkurvenverlauf und der Karyotyp herangezogen werden. Gerade bei einem semiquantitativen Verfahren wie der CGH darf die Auswertung in Form von Balkendiagrammen durch das Computerprogramm nicht dazu führen, die Information, welche im Ratioprofil vermittelt wird, zu übergehen (Du Manoir et al. 1993; Arranz et al. 2000). In den Fällen Nr.2/5/11/12 wurden partielle Schwellenüberschreitungen deshalb entsprechend diskutiert und interpretiert. Oft lagen in betroffenen Chromosomen mehrere Schwellenüberschreitungen sowohl im langen als auch im kurzen Arm vor. Durch den Einsatz von Zentromersonden in einem FISH-Experiment könnte in diesen Fällen der Verdacht auf Zugewinne der ganzen Chromosomen zusätzlich bestätigt werden (Moorman et al. 1996). So wird nach einer zytogenetischen Diagnostik einer numerischen Aberration die CGH zur Befundung chromosomaler Zugewinne und anschließend die FISH zur Bestimmung der Kopienzahl und Erhärtung der Befunde empfohlen (Haas et al. 1996).

Die chromosomale Zusammensetzung der Blasten mit mehr als 50 Chromosomen könnte eine stärkere diagnostische Bedeutung haben als eine alleinige Klassifizierung nach der modalen Chromosomenzahl. So könnten Unterschiede in der chromosomalen Zusammensetzung die schlechtere Prognose der ALL$^{>50}$ des Erwachsenen im Vergleich zu Kindern erklären. Auch könnte die chromosomale Zusammensetzung Hinweise auf unterschiedliche biologische Sub-

entitäten bei der $ALL^{>50}$ liefern. Da es sich bei der $ALL^{>50}$ im Bereich eines hoch-hyperdiploiden und triploiden Bereiches möglicherweise um unterschiedliche biologische Einheiten handelt, sollen diese beiden Gruppen getrennt voneinander betrachtet werden.

4.2.1.1 Chromosomale Zusammensetzung der ALL mit hoch-hyperdiploidem Chromosomensatz

Der hoch-hyperdiploide Karyotyp bei Kindern ist überwiegend durch Zugewinne der Chromosomen 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 und des X-Chromosoms charakterisiert. Bei zytogenetischer Bestimmung des Karyotyps ist dabei Chromosom 21 am häufigsten hinzugewonnen, in der Häufigkeit des Auftretens folgen dann die Chromosomen 6, X, 14, 4, 17, 18 und 10 (Raimondi et al. 1996). Werden bei der kindlichen ALL mit 51-57 Chromosomen die hinzugewonnen Chromosomen mittels CGH bestimmt, so ergibt sich eine ähnliche Verteilung. Besonders häufig sind die Chromosomen 21 (82,9%), X (80,5%), 18 (80,5), 14 (70,7%), 4 (69,5%), 10 (69,5%), 6 (67,1%) und 17 (62,2%) hinzugewonnen (Karhu et al. 1997; Paszekvigier et al. 1997; Wong et al. 1998; Haas et al. 1998; Larramendy et al. 1998a; Larramendy et al. 1998b; Rice et al. 2000; Jarosova et al. 2000; Scholz et al. 2001).

In der vorliegenden Untersuchung waren 10 Fälle mit einer Chromosomenzahl von 51-57 enthalten. Die Übersichtsgraphik 3.2.7 gibt einen graphischen Überblick über die durch die CGH detektierten Zugewinne und Verluste. Dabei lagen für folgende Chromosomen in mehr als einem Fall Zugewinne über das gesamte Chromosom vor: 21 (6/10), X (6/10), 14 (4/10), 4 (3/10), 18 (3/10), 10 (3/10), 6 (2/10), 8 (2/10), 15 (2/10), 19 (2/10), 2 (2/10). Wie oben diskutiert waren in den Fällen 2 und 5 partielle Schwellenüberschreitungen einzelner Chromosomen möglicherweise durch Zugewinne ganzer Chromosomen hervorgerufen. In der Übersichtsgraphik 3.2.7 sind entsprechende Imbalancen hellgrün ergänzt. Legt man diese Auswertung zugrunde, so ergibt sich keine Änderung im Häufigkeitsmuster hinzugewonnener Chromosomen: 21 (7/10), X (6/10), 14 (5/10), 4 (5/10), 18 (4/10), 10 (4/10), 6 (3/10), 17 (2/10), 15 (2/10),19 (2/10); 2 (2/10) (Tabelle 11, Spalte 4: Erwachsene CGH, kritisch). Somit zeigen sich in der vorliegenden Untersuchung bei Erwachsenen in der Gruppe der hyperdiploiden ALL mit 51-57 Chromosomen die gleichen chromosomalen Zugewinne wie bei Kindern mit 51-57 Chromosomen. Sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern sind in dieser Gruppe die Chromosomen 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 und X mit etwa dem gleichen Häufigkeitsmuster hinzugewonnen.

Dem überzähligen Vorhandensein der Chromosomen 4, 6, 10, 17 und 21 wurde in verschiedenen Studien eine besondere, prognostisch günstige Bedeutung beigemessen (Jackson et al. 1990; Harris et al. 1992; Bannier et al. 1998; Heerema et al. 2000). Die

vorliegenden Ergebnisse lassen nicht erkennen, dass unterschiedliche Verteilungsmuster hinzugewonnener Chromosomen die prognostischen Unterschiede der hyperdiploiden ALL von Kindern und Erwachsenen erklären kann.

Die CGH korrigierte die Häufigkeit, mit der zytogenetisch Zugewinne einzelner Chromosomen detektiert wurden. Betrachtet man die zytogenetischen Daten der vorliegenden 10 Fälle mit ALL[51-57], so ergibt sich ein interessanter Unterschied zwischen zytogenetischem Befund und CGH-Befund. Zytogenetisch waren folgende Häufigkeiten hinzugewonnener Chromosomen bestimmt worden: 21 (5/10), 18 (4/10), 6 (3/10), 10 (3/10), 12 (3/10), X (2/10), 4 (2/10), 14 (2/10), 7 (2/10), 19 (2/10). Die Chromosomen X, 4 und 14 konnten zytogenetisch nur in wenigen Fällen als überzählig identifiziert werden. In der CGH-Untersuchung zeigte sich, dass sie zu den am häufigsten hinzugewonnenen Chromosomen zählten (Tabelle 11). Dies ist insofern von Bedeutung als gerade das Vorliegen von Chromosom 4 von prognostischer Relevanz sein könnte (Harris et al. 1992). Auch die Häufigkeit eines Zugewinns von Chromosom 12 wurde zytogenetisch häufiger diagnostiziert als durch die CGH. Nur die CGH-Untersuchung der chromosomalen Zusammensetzung erbrachte also in der vorliegenden Untersuchung ein Häufigkeitsmuster chromosomaler Zugewinne, welches dem der kindlichen ALL[51-57] entspricht.

Auch bezüglich Chromosom 6 zeigte sich ein interessanter Unterschied für die beiden Verfahren. Sowohl bei den Befunden für Kinder aus der Literatur, als auch in den vorliegenden Fällen bei Erwachsenen zeigte sich, dass zytogenetisch ein Zugewinn von Chromosom 6 relativ häufig detektiert wurde, in der CGH dieses Chromosom jedoch im Vergleich zu anderen Chromosomen relativ seltener als überzählig detektiert wurde (Tabelle 11). Auch dies ist insbesondere dadurch von Bedeutung, dass ein überzählig vorliegendes Chromosom 6 von prognostischer Bedeutung ist und mit einer ausgezeichneten Prognose verbunden zu sein scheint (Jackson et al. 1990).

Tabelle 11: Übersicht über die Häufigkeit, mit der einzelne Chromosomen bei der hoch-hyperdiploiden ALL hinzugewonnen sind.

Kinder Zytogenetik	Kinder CGH	Erwachsene CGH	Erwachsene CGH, kritisch	Erwachsene Zytogen.
21 (96,0%)	21 (82,9%)	21 (6/10)	21 (7/10)	21 (5/10)
6 (81,4%)	**X** (80,5%)	**X** (6/10)	**X** (6/10)	18 (4/10)
X (80,8%)	18 (80,5%)	**14** (4/10)	**14** (5/10)	6 (3/10)
14 (77,5%)	**14** (70,7%)	**4** (3/10)	**4** (5/10)	10 (3/10)
4 (72,2%)	**4** (69,5%)	18 (3/10)	18 (4/10)	12 (3/10)
17 (66,2%)	10 (69,5%)	10 (3/10)	10 (4/10)	**X** (2/10)
18 (63,6%)	6 (67,1%)	6 (2/10)	6 (3/10)	**14** (2/10)
10 (50,3%)	17 (62,2%)	8 (2/10)	17 (2/10)	**4** (2/10)
8 (27,2%)	8 (32,9%)	15 (2/10)	15 (2/10)	19 (2/10)
		19 (2/10)	19 (2/10).	7 (2/10)

Bei den Häufigkeiten für Kinder in den ersten zwei Spalten handelt es sich um Auszählungen dokumentierter Fälle aus der Literatur. Kinder, Zytogenetik in Spalte 1: (Raimondi et al. 1996); Kinder, CGH in Spalte 2: (Karhu et al. 1997; Paszekvigier et al. 1997; Wong et al. 1998; Haas et al. 1998; Larramendy et al. 1998a; Larramendy et al. 1998b; Rice et al. 2000; Jarosova et al. 2000; Scholz et al. 2001). Bei den letzten 3 Spalten handelt es sich um Häufigkeiten bei den von mir untersuchten 10 Fällen mit einer ALL im hoch-hyperdiploiden Bereich (Erklärung im Text).

4.2.1.2 Chromosomale Zusammensetzung der ALL mit nahezu triploidem Chromosomensatz

Unter den von mir untersuchten Patienten waren 4 ALL-Patienten (Nr.11-14) mit einem nahezu triploiden Karyotyp. Nur bei 2 dieser Patienten (Nr.11 und 12) konnte die CGH Aussagen über hinzugewonnene Chromosomen machen. Bezüglich der hinzugewonnen Chromosomen zeichnete sich trotz der geringen Fallzahl ein atypisches Verteilungsmuster ab. In beiden Fällen, in denen die CGH ein Ergebnis erzielte, waren unter anderem die Chromosomen 1, 11 und 12 überzählig vorhanden. In beiden Fällen bestand anhand der Ratioprofile zusätzlich der Verdacht auf ein hinzugewonnenes Chromosom 2. Die Chromosomen 1, 2, 11 und 12 gehören nicht zu den häufig überzählig vorliegenden Chromosomen bei der hoch-hyperdiploiden ALL, werden aber bei der ALL im nahezu triploiden Bereich zusätzlich als häufig überzählig vorliegend beschrieben (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996; Nordgren et al. 1997).

Im Fall Nr. 11 zeigte die zytogenetische Untersuchung Chromosomen mit 36 Elementen und solche mit der genau doppelten Anzahl von Chromosomen, nämlich 72 Chromosomen. Das gleichzeitige Vorliegen von 2 Klonen mit genau verdoppelter Chromosomenzahl deutet auf

die Entstehung der triploiden Zellen aus den hypodiploiden Zellen durch Verdopplung des Chromosomensatzes hin (Shabtai et al. 1979; Pui et al. 1990b; Onodera et al. 1992a; Onodera et al. 1992b; Charrin et al. 1996). Im Fall Nr. 11 konnte die CGH viele Über- und Unterrepräsentationen detektieren. Die CGH detektiert chromosomale Zugewinne in Relation zur mittleren Kopienzahl des Satzes. Liegen bei einem triploiden Chromosomensatz alle Chromosomen in dreifacher Kopienzahl vor, kann die CGH keine Imbalancen detektieren. Bezogen auf eine Kopienzahl von 3 für alle Autosomen in einem nahezu triploiden Chromosomensatz mit 72 Elementen, weist ein chromosomaler Zugewinn in der CGH also auf eine 4/3-Fache, ein chromosomaler Verlust auf eine 2/3-fache Kopienzahl des betreffenden Chromosoms hin. Basierend auf dem untersuchten triploiden Karyotyp im Fall Nr.11 kann das CGH-Ergebnis also dahingehend interpretiert werden, dass die unterrepräsentierten Chromosomen in zwei- und die überrepräsentierten in vierfacher Kopie vorlagen. Ein Verteilungsmuster mit dem Überwiegen von zwei- und vierfachen Kopien bestimmter Chromosomen spricht für die Entwicklung des nahezu triploiden Chromosomensatzes aus einem hypodiploiden Satz mit ein- und zweifacher Kopienzahl durch Verdopplung des Chromosomensatzes (Onodera et al. 1992a; Nordgren et al. 1997). Die CGH-Untersuchung erhärtet also die Vermutung, dass im vorliegenden Fall Nr.11 ein nahezu triploider Karyotyp durch Verdopplung aus einem hypodiploiden Satz entstanden ist. Bei Kindern und Erwachsenen ist ein hypodiploider Chromosomensatz mit einer ungünstigen Prognose verbunden (Pui et al. 1987; Secker-Walker et al. 1997; Heerema et al. 1999a). Diese ungünstige Prognose scheint bei Verdopplung des Karyotyps erhalten zu bleiben (Charrin et al. 1996).

Möglicherweise könnte der Entstehungsmechanismus durch Chromosomenverdopplung mit der Überrepräsentation untypischer Chromosomen, zum Beispiel Chromosom 1 verbunden sein. So gehörte Chromosom 1 bei Erwachsenen mit nahezu triploider ALL wie im vorliegenden Fall mehrfach zu den Chromosomen, welche in vierfacher Kopienzahl überzählig vorlagen. Dabei wurde vermutet, dass in vielen dieser Fälle ein nahezu triploider Karyotyp durch die Verdopplung eines hypodiploiden Satzes entstanden ist (Charrin et al. 1996). Die Verdopplung eines hypodiploiden Satzes mit einem diplosomen Chromosom 1 führt zu einem Karyotyp mit vierfach vorliegendem Chromosom 1 (Shabtai et al. 1979).

Möglicherweise trägt also das häufigere Auftreten nahezu triploider Chromosomensätze verbunden mit dem möglichen Entstehungsmechanismus dieser Gruppe aus hypodiploiden Zellen und daraus resultierender unterschiedlicher Chromosomenverteilung zur schlechten Prognose der $ALL^{>50}$ des Erwachsenen bei. Eine kombinierte Untersuchung der hoch-

hyperdiploiden und nahezu triploiden ALL mittels CGH und nachfolgend FISH-Untersuchung zur genauen Bestimmung des chromosomalen Verteilungsmuster könnte die Suche nach den Entstehungsmechanismen der nahezu triploiden ALL vereinfachen. Zusätzlich könnten molekulargenetische Überprüfungen der Allelverteilung zur weiteren Abklärung beitragen.

4.2.2 Partielle Imbalancen der vorliegenden Fälle mit ALL$^{>50}$

In 10 der 16 untersuchten Fälle mit ALL$^{>50}$ (Nr.1/2/3/5/6/7/9/11/12/16) konnte die CGH partielle Imbalancen detektieren. Wie im vorigen Abschnitt diskutiert muss in einem Teil der Fälle davon ausgegangen werden, dass bei Zugewinnen ganzer Chromosomen in der CGH partielle Überschreitungen der entsprechenden Schwellen vorlagen. Neuere Veröffentlichungen betonen das Risiko falsch positiver Befunde bei der CGH auch im Zusammenhang mit DOP-PCR (Lichter et al. 2000). Die kritische Auswertung partieller Imbalancen muss also die Möglichkeit falsch positiver partieller Befunde berücksichtigen.

Zusätzliche Befunde und Informationen können das Vorliegen echter partieller Imbalancen bei partiellen Schwellenüberschreitungen des CGH-Profils bestätigen. In einigen Fällen bestätigten die partiellen Imbalancen in der CGH-Untersuchung zytogenetisch detektierte strukturelle Chromosomenaberrationen. Dies war in drei Fällen mit ALL$^{>50}$ der Fall (Nr.1/2/3). In weiteren 3 Fällen (Nr.3/6/16) lagen bereits fluoreszenzmikroskopisch erkennbare partielle Imbalancen vor, die im Ratioprofil mit einem eindeutigen Profilausschlag einher gingen. In diesen Fällen konnte also mit größerer Sicherheit von partiellen Imbalancen ausgegangen werden als in den übrigen Fällen, in denen keine bekräftigenden Zusatzbefunde vorlagen (Fälle Nr.5/7/9/11/12). Eine kritische CGH-Auswertung muss also den zytogenetischen Befund, die Nativ-CGH-Bilder und den Ratioprofilverlauf in die Befundung mit einbeziehen (Du Manoir et al. 1993; Kallioniemi et al. 1994b).

4.2.2.1 Anteil struktureller Chromosomenaberrationen

Das Vorliegen struktureller Aberrationen ist ein wichtiger prognostischer Faktor. Zusätzliche strukturelle Aberrationen in einem hyperdiploiden Chromosomensatz wirken sich negativ auf die Heilungsrate aus. Zytogenetisch konnten bei Kindern in bis zu 64% der ALL-Fälle mit mehr als 50 Chromosomen strukturelle Veränderungen nachgewiesen werden (Pui et al. 1989; Raimondi et al. 1996). Bei Erwachsenen lag der Anteil an Blasten mit zusätzlichen strukturellen Veränderungen in der Gruppe ALL$^{>50}$ bei bis zu 70% (Rieder et al. 1993; Charrin et al. 1996). Möglicherweise ist also der Anteil struktureller Veränderungen bei

Erwachsenen in dieser Gruppe höher, und die schlechtere Gesamtprognose der Erwachsenen mit hyperdiploider ALL darauf zurückzuführen.

Die CGH bietet die Möglichkeit, strukturelle Veränderungen zu detektieren, wenn eine unbalancierte strukturelle Aberration vorliegt und damit eine partielle Imbalance resultiert. Partielle Imbalancen in der CGH können somit Hinweise für strukturelle Aberrationen liefern, die zytogenetisch nicht erkannt wurden. Da die CGH balancierte strukturelle Veränderungen nicht diagnostizieren kann, gibt die alleinige Abschätzung des Anteils struktureller Aberrationen aus der Häufigkeit der partiellen Imbalancen die Verhältnissse nur unvollständig wieder. Die kombinierte zytogenetische und CGH-Auswertung kann die Sensitivität für strukturelle Aberrationen jedoch wesentlich erhöhen.

Bei den vorliegenden 16 erwachsenen Patienten mit $ALL^{>50}$ wurden durch zytogenetische Diagnostik in 8 Fällen (50%) strukturelle Veränderungen aufgedeckt (Fälle Nr. 1/2/3/4/5/7/13/14). Die CGH konnte in weiteren 5 Fällen, in denen zytogenetisch kein Anhalt für strukturelle Veränderungen bestand, partielle Imbalancen detektieren (Fälle Nr. 6/9/11/12/16). In der kombinierten Auswertung durch Zytogenetik und CGH konnten also in 13 der 16 Fälle (81,3%) strukturelle Veränderungen nachgewiesen werden.

In CGH-Untersuchungen bei Kindern wurde in der Gruppe der $ALL^{>50}$ in 27 von 97 Fällen (27,8%) zytogenetisch eine Strukturaberration diagnostiziert. Die CGH konnte zusätzlich in 13 Fällen partielle Imbalancen als Zeichen einer Strukturaberration erkennen. In der kombinierten CGH- und zytogenetischen Auswertung fanden sich also nur in 41,2% der Fälle (40 von 97) mit $ALL^{>50}$ strukturelle Aberrationen (Karhu et al. 1997; Paszekvigier et al. 1997; Wong et al. 1998; Haas et al. 1998; Larramendy et al. 1998a; Larramendy et al. 1998b; Rice et al. 2000; Jarosova et al. 2000; Scholz et al. 2001). Dies könnte bedeuten, dass sich Erwachsene von Kindern durch eine etwa doppelt so hohe Rate struktureller Aberrationen bei $ALL^{>50}$ unterscheiden. Dieser höhere Anteil struktureller Aberrationen könnte die schlechtere Prognose dieser Gruppe bei Erwachsenen erklären.

Wie bereits dargestellt muss in der vorliegenden Untersuchung in einigen Fällen partieller Imbalancen der Verdacht auf falsch positive Befunde geäußert werden. Dies würde bedeuten, dass in der vorliegenden Untersuchung durch die CGH der Anteil struktureller Veränderungen überschätzt wurde. Werden nur solche partiellen Imbalancen ausgewertet, in denen zusätzliche Hinweise für partielle Aberrationen im zytogenetischen Befund, im Nativ-CGH-Bild, oder im Ratioprofil vorliegen, so können nur die CGH-Befunde im Fall Nr. 6 und 16 als zusätzliche Hinweise für strukturelle Aberrationen gewertet werden.

Wendet man diese kritische Betrachtungweise bezüglich der Auswertung struktureller Veränderungen an, so ergeben sich in 10 von 16 Fällen (62,5%) in der kombinierten zytogenetischen und CGH-Auswertung strukturelle Veränderungen. Immer noch ein im Vergleich zu Kindern erhöhter Anteil.

4.2.2.2 Bedeutung der detektierten partiellen Imbalancen

4.2.2.2.1 Partielle Überrepräsentation des langen Armes von Chromosom 1

Im Fall Nr.2 fand sich in der CGH eine Überrepräsentation im langen Arm von Chromosom 1. Ein Zugewinn 1q war in CGH-Studien bei kindlicher ALL der häufigste partielle Zugewinn überhaupt (Larramendy et al. 1998b). Dabei war ein Zugewinn von 1q in der Gruppe der $ALL^{>50}$ mit 10,3% (10 von 97) etwas häufiger als in den restlichen Fällen (7%, 19 von 272) (Karhu et al. 1997; Paszekvigier et al. 1997; Wong et al. 1998; Haas et al. 1998; Larramendy et al. 1998a; Larramendy et al. 1998b; Rice et al. 2000; Jarosova et al. 2000; Scholz et al. 2001). Bei Erwachsenen mit ALL waren zytogenetisch partielle Überrepräsentationen von Chromosom 1q in 3% der Fälle vertreten (Rieder et al. 1993). Vermehrungen von 1q sind als sekundäre chromosomale Veränderungen bei hämatologischen Neoplasien im Rahmen der Tumorprogression beschrieben (Rowley 1978; Mamaeva et al. 1983; Morris et al. 1984; Pui et al. 1994; Johansson et al. 1994).

Ein Zugewinn des langen Armes von Chromosom 1 kann wie im vorliegenden Fall Ausdruck einer unbalancierten Translokation sein: der(14)t(1;14)(q11;p12). Häufiger kommt es zu einer Vermehrung von 1q durch eine Duplikation des langen Armes von Chromosom 1. Bei kindlicher $ALL^{>50}$ stellt solch eine Duplikation sogar die häufigste strukturelle Aberration überhaupt dar (Raimondi et al. 1996). Außerdem entsteht ein Zugewinn 1q häufig durch eine unbalancierte Translokation t(1;19)(q23;p13). Bei etwa 75% der Fälle ist die Translokation unbalanciert, indem neben 2 normalen Chromosomen 1 ein Chromosom 19 vorliegt, das durch das translozierte Material von Chromosom 1 im kurzen Arm verlängert ist. Dadurch besteht eine partielle Trisomie von 1q23qter. Bei Kindern wird solch eine t(1;19)(q23;p13) in 5-6% der Fälle gefunden (Shikano et al. 1986).

4.2.2.2.2 Weiterer Beleg für eine primäre Chromosomenaberration dup(2)(q21q31)

Im Fall Nr.6 bestand eine Überrepräsentation des Segmentes 2q21q32. In diesem Fall lagen insgesamt unregelmäßige Ratioprofile mit starken Abweichungen in den kritischen CGH-Regionen vor. Deshalb müssen die partiellen Imbalancen dieses Falles kritisch betrachtet werden. Es sind jedoch zwei Patienten mit common-ALL beschrieben, bei denen die konventionelle Chromosomenanalyse eine Duplikation eines Teils des langen Armes von Chromosom 2 ergab. Dieser umfasste mit der Region 2q21q31 ein ähnliches Segment wie im vorliegenden Fall und stellte bei einem Patienten die einzige Chromosomenveränderung dar (Rieder et al. 1993). Somit unterstützte der CGH-Befund die Vermutung, dass es sich bei einer Duplikation dup(2)(q21q31) um eine primäre Chromosomenveränderung bei der ALL handeln könnte.

4.2.2.2.3 Zugewinne im langen Arm von Chromosom 3

In 2 von 16 untersuchten ALL-Fällen (Nr. 1 und 6) detektierte die CGH eine Überrepräsentation im langen Arm von Chromosom 3. Dabei war in beiden Fällen die Region distal von 3q24 betroffen.

Zugewinne im langen Arm von Chromosom 3 oder strukturelle Veränderungen in dieser Region gehören nicht zu den wiederkehrenden Aberrationen bei der ALL (Raimondi 1993; Faderl et al. 1998). Im Rahmen der CGH-Untersuchungen der kindlichen ALL war nur bei einem von insgesamt 369 dokumentierten Fällen ein partieller Zugewinn 3q beschrieben (Karhu et al. 1997; Paszekvigier et al. 1997; Wong et al. 1998; Haas et al. 1998; Cao et al. 1998; Larramendy et al. 1998a; Larramendy et al. 1998b; Rice et al. 2000; Jarosova et al. 2000; Scholz et al. 2001).

Zugewinne im Bereich 3q24qter gehören jedoch bei vielen malignen Tumoren zu den häufig durch die CGH detektierten Imbalancen. Eine Reihe von relevanten Onkogenen liegen in dieser Region (Knuutila et al. 1998). Bei NHL gehören Zugewinne im langen Arm von Chromosom 3 zu den häufigsten Veränderungen (Knuutila et al. 1998). Auch bei der akuten myeloischen Leukämie gehören strukturelle Veränderungen am langen Arm von Chromosom 3 zu den wiederkehrenden Aberrationen (Horsman et al. 1995). Möglicherweise handelt es sich bei Zugewinnen im Bereich 3q24q26 also um eine relevante genetische Veränderung, die bei der $ALL^{>50}$ des Erwachsenen häufiger auftritt als bei der ALL des Kindes.

4.2.2.2.4 Partielle Imbalancen auf Chromosom 6

Im Fall Nr. 3 bestand in der zytogenetischen Untersuchung der Verdacht auf ein überzählig vorliegendes Chromosom 6 mit einer Deletion des langen Armes. Die CGH bestätigte diesen Verdacht, da sie eine Überrepräsentation des kurzen Armes von Chromosom 6 detektierte. Ein überzähliges 6p in der CGH kann also ein überzählig vorliegendes, im langen Arm deletiertes Chromosom 6 präsentieren.

Solche 6q-Deletionen gehören zu den häufigen Veränderungen bei ALL und werden zytogenetisch in etwa 4-13% der Fälle beobachtet (Kowalczyk et al. 1985; Bloomfield et al. 1986; Hayashi et al. 1990; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1993; Johansson et al. 1993). In den CGH-Untersuchungen der kindlichen ALL wurden 6q-Verluste in bis zu 9% der Fälle gefunden (Karhu et al. 1997; Larramendy et al. 1998b; Scholz et al. 2001). Auch überzählig vorliegende $6q^-$-Chromosomen wurden in einzelnen Fällen von $ALL^{>50}$ beschrieben (Mitelman 1994). Im langen Arm von Chromosom 6 wird der Sitz eines oder mehrerer Tumorsuppressorgene vermutet, welche an der Entstehung der ALL beteiligt sein könnten (Menasce et al. 1994; Gerard et al. 1997; Sherratt et al. 1997; Takeuchi et al. 1998; Zhang et al. 2000). Nach der klassischen Definition eines Tumorsuppressorgens reicht schon ein funktionsfähiges Allel aus, um die Tumorentstehung zu unterdrücken (Weinberg 1994). Im Falle eines Chromosoms $6q^-$ müsste ein noch vorliegendes Chromosom 6 dann eine zytogenetisch nicht nachweisbare Deletion oder eine andere genetische Veränderung aufweisen, die mit dem Funktionsverlust des anderen Allels verbunden ist. Solche submikroskopischen Veränderungen sind weitaus häufiger als sie zytogenetisch gesehen werden (Merup et al. 1998). Im Falle eines überzähligen $6q^-$ bei einem hyperdiploiden Chromosomensatz mit 2 normalen Chromosomen 6 würde dies bedeuten, dass beide vorliegenden normalen Chromosomen 6 eine solche Veränderung tragen müssten, damit die Aberration $6q^-$ relevant wäre. Dies wäre am ehesten bei Verdopplung eines Chromosoms, das bereits einen solchen Defekt aufweist, möglich. Der Verlust eines Chromosoms 6 mit gleichzeitiger Verdopplung seines Homologons wurde bei lymphoblastoiden Zelllinien beobachtet (Nooij-van Dalen et al. 1998). Verluste von Chromosomen durch Fehlverteilung während der Mitose und anschließende Verdopplung verbliebener Chromosomen wäre ein möglicher Mechanismus (Stamberg et al. 1986). Wie bereits beschrieben gehört solch ein Mechanismus zu den möglichen Entstehungsmechanismen der hyperdiploiden und triploiden ALL (Shabtai et al. 1979; Onodera et al. 1992a; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996). Somit könnte es durchaus sein, dass in den vorliegenden Fällen ein

mutmaßliches Tumorsuppressorgen auf dem langen Arm von Chromosom 6 an der Entstehung der Krankheit beteiligt ist.

In 2 meiner 16 untersuchten ALL-Fälle fand sich ein Zugewinn 6q. Zugewinne im langen Arm von Chromosom 6 wurden bei Kindern mit ALL nur in einem von 369 Fällen gefunden (Karhu et al. 1997; Paszekvigier et al. 1997; Wong et al. 1998; Haas et al. 1998; Cao et al. 1998; Larramendy et al. 1998a; Larramendy et al. 1998b; Rice et al. 2000; Jarosova et al. 2000; Scholz et al. 2001). Auch bei anderen Tumoren spielen Zugewinne im langen Arm von Chromosom 6 keine wesentliche Rolle (Knuutila et al. 1998).

4.2.2.2.5 9p-Verluste

Bei 3 von 16 Patienten mit $ALL^{>50}$ zeigte sich ein Verlust des kurzen Armes von Chromosom 9 (Fälle Nr.5/11/12). Im Fall Nr.11 kann aufgrund des Ratioprofils die partielle Imbalance auf Chromosom 9 als Verlust des ganzen Chromosoms gewertet werden. Verluste im Bereich 9p können durch Deletionen, aber auch unbalancierte Translokationen oder Isochromosombildung entstehen. Solche 9p-Veränderungen werden zytogenetisch in 7-13% aller Fälle mit akuter lymphatischer Leukämie gefunden (Raimondi 1993; Faderl et al. 1998). Die kritische Region bei 9p Abnormalitäten ist die Region 9p21, auf der das Tumorsupressorgen p16 liegt, dessen Rolle bei der Tumorentstehung ich in der Einleitung beschrieben habe (Aguiar et al. 1997). 9p21 Deletionen oder andere Aberrationen, die zu einer Inaktivierung dieser Region führen, scheinen bei der Leukämieentstehung sehr viel häufiger beteiligt zu sein als dies durch die zytogenetische Diagnostik zu erkennen ist (Faderl et al. 1999).

Die CGH kann bei der Aufdeckung zytogenetisch nicht erkannter 9p-Verluste sehr hilfreich sein (Jarosova et al. 2000). 9p-Verluste gehören zu den häufigsten durch CGH detektierten partiellen Imbalancen bei der ALL des Kindes. Sie wird in bis zu 18% der Fälle gefunden. Von 23 dokumentierten ALL-Fällen mit 9p-Verlust im CGH-Befund bestand aber nur in 4 Fällen im zytogenetischen Befund ein Anhalt für solch eine Veränderung (Wong et al. 1998; Larramendy et al. 1998a; Jarosova et al. 2000).

Unter 16 Fällen mit $ALL^{>50}$ fand ich bei Erwachsenen in 2 Fällen (12,5%) in der CGH einen Verlust von 9p. Auch in diesen 2 Fällen bestand zytogenetisch kein Anhalt für solch eine Veränderung. Möglicherweise stellen 9p-Verluste sogar eine Besonderheit der $ALL^{>50}$ des Erwachsenen dar, denn bei Kindern mit $ALL^{>50}$ wurde solch eine Veränderung nur in 3 von 97 Fällen (3,1%) in der CGH diagnostiziert.

Bei Kindern mit 9p-Veränderungen konnte gezeigt werden, dass sie schlechter auf die Therapie ansprechen und ein höheres Rückfallrisiko aufweisen als Patienten ohne diese Veränderung (Rivera et al. 1991; Heerema et al. 1999b). Somit zeigt die vorliegende Untersuchung erneut, dass durch die CGH genetische Imbalancen von potenzieller prognostischer Relevanz aufgedeckt werden können, die durch eine alleinige zytogenetische Diagnostik leicht übersehen werden.

4.2.2.2.6 Häufiger Zugewinn im langen Arm von Chromosom 13

Von 16 Fällen mit ALL$^{>50}$ wiesen 4 (1/5/6/9) eine Vermehrung von Material von Chromosom 13 auf. Nur bei einem Patienten lag das komplette Chromosom 13 überzählig vor, bei allen anderen war das Segment 13q21q32-ter überrepräsentiert. Ein mögliches zytogenetisches Korrelat wäre eine Duplikation im langen Arm von Chromosom 13. Ein Beispiel für solch einen Mechanismus ist Fall Nr.18, ein Patienten mit leukämischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei dem in der CGH ebenfalls eine Überrepräsentation im Segment 13q21qter auftrat. Bei diesem Fall lag zytogenetisch eine Verlängerung des langen Armes von Chromosom 13 durch Material unbekannter Herkunft vor, und in der CGH zeigte sich dann eine Überrepräsentation 13q14q31. Es könnte sich um eine Duplikation dieses Segmentes und daraus folgende Verlängerung des langen Armes von Chromosom 13 handeln.

Eine Duplikation des langen Armes von Chromosom 13, dup(13)(?q14q22), wurde auch bei einem anderen Patienten mit hyperdiploider ALL beschrieben (Behm et al. 1993). Im Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer sind Verlängerungen des langen Armes von Chromosom 13 bei ALL mehrfach beschrieben (Mitelman 1994). In CGH-Studien bei Kindern treten Zugewinne im langen Arm von Chromosom 13 sehr selten auf. Bei nur einem Patienten von insgesamt 369 dokumentierten Fällen trat ein Zugewinn 13q21q22 auf. Es lag kein hyperdiploider Chromosomensatz vor (Karhu et al. 1997; Paszekvigier et al. 1997; Wong et al. 1998; Haas et al. 1998; Larramendy et al. 1998a; Larramendy et al. 1998b; Rice et al. 2000; Jarosova et al. 2000; Scholz et al. 2001). In der Studie von Jarosova et al. gehörten dagegen Verluste im Bereich 13q mit 9% zu den häufigen Unterrepräsentationen (Jarosova et al. 2000). Der hohe Anteil von Überrepräsentationen der Region 13q21q32 bei der ALL$^{>50}$ (4 von 16, 25%) in meiner Untersuchung könnte also darauf hindeuten, dass es sich dabei um eine neue, wiederkehrende Veränderung handelt, die typisch für die ALL$^{>50}$ des Erwachsenen ist.

In den von mir untersuchten Fällen gab es jedoch auch Hinweise dafür, dass es sich bei den Überrepräsentationen im Bereich 13q21qter um falsch positive Befunde handeln könnte. Im

Fall Nr.1 trat eine Vermehrung von 13q21qter in der CGH-Analyse aus DNA auf, die ich aus KM-Zellsuspensionen durch Chelexaufbereitung und anschließender DOP-Amplifikation gewonnen hatte, nicht jedoch in der CGH aus KM-DNA, die mit Säulenaufreinigung gewonnen war. Auch in Fall Nr.6, welcher sich durch starke Imbalancen und falsch positive Befunde in nicht supprimierten heterochromatinreichen DNA-Regionen auszeichnet, trat eine Überrepräsentation von 13q21qter auf. Im Fall Nr.18 war enh(13q21q31) der einzige Befund in der CGH mit DOP-amplifizierter DNA, alle übrigen Imbalancen, die an Nativmaterial erhoben wurden, wurden hier nicht detektiert. In meinen Kontrollversuchen mit RiFo280 gehörte die Region 13q21q31 zu den Regionen, die als falsch positive Amplifikationen bei alleiniger Aufbereitung der Test-DNA durch DOP-PCR auftraten.
In einer 2001 veröffentlichten Studie wurden falsch positive Befunde in der Region 13q auch als DOP-Amplifikationsartefakt bei Amplifikation sowohl der Referenz- als auch der Test-DNA beschrieben (Barth et al. 2000; Larsen et al. 2001). In einer anderen Studie wurden die Hybridisierungseigenschaften unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe verglichen. Auch hierbei zeigten sich abhängig von der verwendeten Markierungsmethode falsch positive Überrepräsentationen im Bereich 13q21qter. Von den Autoren wurde auch die Tatsache, dass die Tumor-DNA aus gefrorenem Material und die Referenz-DNA aus nicht archiviertem Blut gewonnen wurde, als Ursache möglicher falsch positiver Ergebnisse in Betracht gezogen (Larramendy et al. 1998c). Bei der vorliegenden partiellen Imbalance 13q21qter zeigt sich also exemplarisch, dass die Auswertung von CGH-Befunden sehr kritisch erfolgen muss. Möglicherweise handelt es sich bei den vorliegenden Überrepräsentationen im Bereich 13q um falsch positive Überrepräsentationen.

4.2.2.2.7 Hinweise für ein Isochromosom 17q bei einem tetraploiden Karyotyp

In 2 der 16 untersuchten Fälle mit ALL (Nr. 7 und 16) diagnostizierte die CGH Verluste im kurzen Arm von Chromosom 17. Im Fall Nr.16 lag ein tetraploider Karyotyp vor, und in der CGH zeigte sich ein Zugewinn des langen Armes und ein Verlust im kurzen Arm von Chromosom 17. Die Metaphasebilder, das Nativ-Karyogramm und das Ratioprofil lassen die Interpretation von dim(17p13) als Verlust des gesamten kurzen Armes von Chromosom 17 zu. Solch eine Imbalance könnte durch ein Isochromosom 17q hervorgerufen werden.
Ein i(17q) gehört zu den häufigsten Isochromosomen bei Leukämien und anderen malignen Tumoren. Bei der kindlichen ALL wird es in knapp 1% aller Fälle gefunden (Pui et al. 1992; Mertens et al. 1994). Es ist mit einem hyperdiploiden Karyotyp assoziiert und kommt in dieser Gruppe mit 5% wesentlich häufiger vor als in den restlichen Fällen (Raimondi et al.

1996). Dabei scheint es auch in Fällen mit hyperdiploidem Satz eher mit einer schlechten Prognose verbunden zu sein (Pui et al. 1988).

Ein Isochromosom 17q geht mit einem Verlust des Tumorsuppressorgens TP53 auf der Bande 17p13.1 einher. Das p53 Protein spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus. Seine wichtigste Rolle spielt es bei der Antwort der Zelle auf Schädigungen der DNA. So verhindert es bei DNA-Schäden die Anhäufung genetischer Mutationen, indem es am Ende der G1-Phase den Zellzyklus stark verlangsamt, damit die Zelle DNA-Reparaturen durchführen kann, bevor die DNA in der S-Phase repliziert wird. Ein Verlust der Funktion des TP53 prädisponiert eine Zelle, genetische Mutationen in einer Geschwindigkeit anzuhäufen, die weit über der normalen Mutationsrate liegt, sie wird genetisch instabil (Somasundaram 2000). Bei vielen Tumoren konnte gezeigt werden, dass der Verlust des TP53 mit einer Tumorprogression verbunden ist (Shackney et al. 1989). Auch mit der Ausbildung eines tetraploiden Chromosomensatzes scheint der Verlust des TP53 assoziiert zu sein (Galipeau et al. 1996). Ein intaktes TP53 kann Zellen, bei denen die Spindelfunktion gestört ist, davon abhalten, im Zellzyklus fortzufahren. Fehlt das p53-Gen, können Zellen, die aufgrund einer gestörten Spindelfunktion ihre Chromosomen während der Mitose nicht getrennt haben, im Zellzyklus fortfahren und tetraploide Tochterzellen bilden (Meek 2000). Von Wong et al wurde ein weiterer Fall beschrieben, bei dem bei einer ALL mit tetraploidem Karyotyp in der CGH ein Befund entsprechend einem Isochromosom 17q vorlag (Wong et al. 1998). In einem Fall von hyperdiploider ALL und i(17q) kam es im Rahmen der Progression zur Verdopplung des Karyotyps unter Ausbildung eines hyper-tetraploiden Satzes (Abe et al. 1985). Möglicherweise kam es also im vorliegenden Fall durch die Bildung eines Isochromosoms 17q aufgrund des Verlustes von TP53 zur Ausbildung eines tetraploiden Karyotyps.

Allerdings konnte in molekulargenetischen Untersuchungen an Fällen von Leukämie und Isochromosom 17q in der Mehrzahl der Fälle keine Mutation des TP53 nachgewiesen werden, und es wurde vermutet, dass andere Tumorsuppressorgene auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 pathogenetisch relevant sind (Fioretos et al. 1999). Auf der anderen Seite könnten natürlich auch Überrepräsentationen von bisher unbekannten Onkogenen im langen Arm von Chromosom 17 beim Iochromosom 17q von pathogenetischer Bedeutung sein (Pui et al. 1988).

4.3 CGH-Befunde bei 2 Patienten mit leukämischem Non-Hodgkin-Lymphom

Die beiden von mir untersuchten Fälle von Non-Hodgkin-Lymphomen wiesen Chromosomensätze im tri- und tetraploiden Bereich auf. Beide zeigten eine leukämische Verlaufsform. Die CGH konnte eine Reihe genetischer Imbalancen aufdecken. Viele der von mir detektierten Imbalancen sind in anderen CGH-Studien an Non-Hodgkin-Lymphomen ebenfalls gefunden worden und mit bestimmten diagnostischen Gruppen, klinischen Parametern und Verlaufsformen in Zusammenhang gebracht worden.

4.3.1 17p-Unterrepräsentationen bei beiden Patienten mit lymphoblastischem Non-Hodgkin-Lymphom

In beiden Fällen mit leukämisch verlaufendem Non-Hodgkin-Lymphom bestand eine Unterrepräsentation des kurzen Armes von Chromosom 17 (Fall Nr.17 und 18). 17p-Verluste wurden auch bei anderen Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom durch CGH nachgewiesen (Avet-Loiseau H et al. 1997; Dierlamm et al. 1997b; Monni et al. 1998; Bea et al. 1999; Martinez-Climent et al. 2001). Im kurzen Arm von Chromosom 17, auf der Bande 17p13 liegt das Tumorsupressorgen TP53 (Isobe et al. 1986). Veränderungen von TP53 spielen bei der Transformation von niedrig malignen zu aggressiven und lymphoblastischen Lymphomen eine Rolle (Ichikawa et al. 1992; Sander et al. 1993; Lo Coco et al. 1993; Chang et al. 1994; Du et al. 1995; Clodi et al. 1997). Die von mir nachgewiesenen 17p-Verluste weisen also auf ein fortgeschrittenes, aggressives Stadium der Erkrankung hin und könnten mit dem lymphoblastischen und leukämischen Verlauf der beiden Erkrankungen zusammenhängen. Auch in anderen CGH-Studien an Lymphomen hat sich gezeigt, dass 17p Verluste mit aggressiveren Formen von Non-Hodgkin-Lymphomen assoziiert sind (Dierlamm et al. 1997b; Monni et al. 1998; Bea et al. 1999).

Wie im Abschnitt 4.2.2.2.7 im Zusammenhang mit i(17q) beschrieben, scheint ein Verlust des TP53 auch mit der Ausbildung polyploider Chromosomensätze verbunden zu sein. Auch bei Lymphomen sind tri- und tetraploide Chromosomensätze mit Verlusten des TP53 in Verbindung gebracht worden (Yamaguchi et al. 1999; Atkin 2000). Die in der vorliegenden Untersuchung bei beiden NHL detektierte Unterrepräsentation 17p könnte also mit den vorliegenden tri- und tetraploiden Karyotypen assoziiert sein und kann als diagnostischer Hinweis für eine aggressive NHL-Variante gewertet werden.

4.3.2 Ein Zugewinn von 3q könnte mit einem leukämischen Verlauf assoziiert sein

Bei Fall Nr.18, einem zentrozytischen B-Zelllymphom (≅ Mantelzelllymphom) detektierte die CGH einen Zugewinn im langen Arm von Chromosom 3. 3q-Überrepräsentationen wurden bei B-Zelllymphomen in bis zu 50% der Fälle gefunden (Monni et al. 1996; Monni et al. 1997; Dierlamm et al. 1997b; Peters et al. 2000). Bei Mantelzelllymphomen ist ein Zugewinn 3q die häufigste durch CGH detektierte Imbalance (Monni et al. 1998; Bea et al. 1999; Bentz et al. 2000; Martinez-Climent et al. 2001).

Dabei konnten Konsensusregionen im Bereich von 3q21q29 und 3q27-29 eingegrenzt werden. In diesen Regionen liegen einige potentielle Onkogene, die von Interesse sind (Dierlamm et al. 2000). Auf der Bande 3q27 liegt zum Beispiel das Gen BCL6, welches bei vielen Non-Hodgkin-Lymphomen durch Translokation aktiviert wird (Ong und Le Beau 1998).

Auch im Zusammenhang mit der leukämischen Verlaufsform des vorliegenden NHL ist der Zugewinn 3q von besonderem Interesse: In zytogenetischen Untersuchungen an leukämisch transformierten Non-Hodgkin-Lymphomen wurden in 30% der Fälle strukturelle Veränderungen im Segment 3q21 gefunden. Es war die häufigste zusätzliche, mit einem leukämischen Verlauf assoziierte Aberration (Khokhar et al. 1995).

4.3.3 Zugewinne im langen Arm von Chromosom 13

Bei dem von mir untersuchten zentrozytischen NHL (≅ Mantelzelllymphom) lag eine Überrepräsentation im langen Arm von Chromosom 13 im Bereich 13q14q31 vor. In der Zweituntersuchung desselben Falles aus Zellsuspension war enh(13q21q31) die einzige Imbalance. Wie oben diskutiert, besteht bei dieser Region der Verdacht, dass, vor allem im Zusammenhang mit der DOP-PCR, gehäuft falsch positive partielle Imbalancen auftreten.

Interessanterweise werden Zugewinne in diesem Bereich bei den NHL jedoch im Unterschied zur ALL häufig gefunden, nämlich in 9 von 60 Fällen. Dabei ließ sich eine Konsensusregion im Bereich 13q22q31 feststellen. Auch höhergradige Amplifikationen fanden sich in dieser Region (Monni et al. 1998; Bea et al. 1999; Bentz et al. 2000). Zytogenetisch bestand im vorliegenden Fall eine Verlängerung des langen Armes von Chromosom 13 durch Material unbekannter Herkunft, es könnte sich hier also um eine Duplikation dieses Segments und eine daraus folgende Verlängerung des langen Armes von Chromosom 13 handeln.

Sowohl zytogenetisch als auch durch veröffentlichte CGH-Studien an NHL wird also die Interpretation dieser Imbalance als valider Befund einer wiederkehrenden Veränderung und möglicher Sitz eines bisher unbekannten Onkogens unterstützt.

4.3.4 18q Überrepräsentation

Bei einem Patienten mit NHL wurde eine Vermehrung im langen Arm von Chromosom 18 durch die CGH aufgedeckt. Überrepräsentationen im Bereich von 18q sind ein häufiger CGH-Befund bei NHL. Eine Konsensusregion stellt dabei das Segment 18q21q23 dar (Monni et al. 1996; Werner et al. 1997; Avet-Loiseau H et al. 1997; Monni et al. 1997; Dierlamm et al. 1997b; Rao et al. 1998; Bea et al. 1999; Weber et al. 2000). Auf der Bande 18q21 liegt das BCL2 Gen, das in vielen NHL durch die strukturelle Aberration t(14;18) aktiviert wird (Ong und Le Beau 1998). Durch CGH-Studien konnte gezeigt werden, dass das BCL2 Gen nicht nur durch Translokation, sondern auch durch Amplifikation aktiviert werden kann (Monni et al. 1997).

4.3.5 In der Region Xq26-28 wird ein für NHL relevantes Onkogen vermutet

Bei einem der von mir untersuchten Fälle von NHL fand die CGH eine Vermehrung im Bereich Xq26qter. Auch in bereits veröffentlichten CGH-Studien an Lymphomen wurden Zugewinne dieser Region mehrfach gefunden (Joos et al. 1996; Monni et al. 1996; Werner et al. 1997; Bea et al. 1999). In der Bande Xq28 wird ein Onkogen vermutet, welches an der Entstehung von Non-Hodgkin-Lymphomen beteiligt ist (Goyns et al. 1993; Vineis et al. 1999). Der von mir gefundene Befund ist also ein weiterer Hinweis für ein potentielles Onkogen in dieser Region.

4.3.6 Zugewinne im Bereich 1q verweisen auf aggressiven und leukämischen Verlauf

Bei einem Patient fand sich eine Überrepräsentation im langen Arm von Chromosom 1. Auch Zugewinne von 1q wurden in weiteren CGH-Studien an Non-Hodgkin-Lymphomen gefunden. Sie waren mit aggressiven Verläufen und schlechter Prognose assoziiert (Dierlamm et al. 1997b; Rao et al. 1998). 1q-Zugewinne können durch Duplikationen des langen Armes von Chromosom 1 entstehen. Solche Duplikationen stellen eine häufige sekundäre Chromosomenaberration bei hämatologischen Neoplasien dar und sind bei Non-Hodgkin-Lymphomen mit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung verbunden (Morris et al. 1984; Johansson et al. 1995). Bei leukämischen Verläufen von NHL sind Veränderungen im langen

Arm von 1q als typische sekundäre Aberrationen beschrieben (Lawler et al. 1990; Criel et al. 1992).

4.3.7 Zugewinne im langen Arm von von Chromosom 8

Auch eine Vermehrung des langen Armes von Chromosom 8 wie in Fall Nr.17 stellt einen häufigen CGH-Befund bei Lymphomen dar. In vielen Fällen war dabei das MYC Onkogen in der Bande 8q22q24 betroffen (Avet-Loiseau H et al. 1997; Dierlamm et al. 1997b; Rao et al. 1998; Bea et al. 1999; Martinez-Climent et al. 2001). Ähnlich wie die Vermehrung 1q lag dieser Befund gehäuft bei aggressiven und leukämisch transformierten Lymphomen vor (Lawler et al. 1990; Dierlamm et al. 1997b; Rao et al. 1998).

4.3.8 Zugewinne im Bereich von Chromosom 7

Auch die Vermehrung des kurzen Armes von Chromosom 7 wie in Fall Nr.18 war bei Mantelzelllymphomen mit der aggressiveren blastischen Variante verbunden (Bea et al. 1999). Im Fall Nr. 17 liegt ein Zugewinn von Chromosom 7 vor. Solche Zugewinne von Chromosom 7 sind als typische sekundäre Veränderungen bei fortgeschrittenen Lymphomen beschrieben (Johansson et al. 1995).

Somit zeigten sich in beiden von mir untersuchten Non-Hodgkin-Lymphomen in der CGH partielle Imbalancen, die typisch für diese Erkrankung und diagnostisch bedeutsam sind. Die CGH deckte genetische Parameter auf, die prognostisch relevant sind: Die meisten der von mir detektierten Imbalancen waren in anderen CGH-Studien mit aggressiveren Verlaufsformen in Verbindung gebracht worden. Die CGH-Untersuchung detektierte Imbalancen, die wichtige Informationen über die Biologie der Erkrankung liefern können. So wurden von mir Imbalancen gefunden, die mit der Polyploidisierung des Chromosomensatzes und der leukämischen Verlaufsform der Lymphome in Verbindung stehen könnten.

4.4 CGH-Befunde bei 2 untersuchten Patienten mit AML

Bei den zwei von mir untersuchten Patienten mit $AML^{>50}$ konnte die CGH nur bei einem Patienten (Fall Nr.20) Befunde liefern. Zytogenetisch wurden im Fall Nr.20 sowohl Metaphasen im tri- als auch im tetraploiden Bereich gefunden. In der CGH fand sich auf Chromosom 5 ein Verlust im langen Arm. Für Chromosom 8 bestand ein Verlust im kurzen und ein Zugewinn im langen Arm. Außerdem bestand auf Chromosom 6 eine partielle Imbalance, die Schwellenüberschreitungen auf Chromosom 11, 15 und 16 schienen eher auf Verluste der ganzen Chromosomen hinzuweisen.

5q Deletionen stellen eine häufige zytogenetische Veränderung bei der akuten myeloischen Leukämie dar (Walker et al. 1994; Leblanc und Berger 1997; Martinez-Climent und Garcia-Conde 1999; Mrozek et al. 2000). In CGH-Studien bei AML wurden 5q-Verluste in bis zu 44% der Fälle gefunden (Nacheva et al. 1995; El-Rifai et al. 1997; Castuma et al. 2000). Im langen Arm von Chromosom 5q wird im Segment 5q31 ein Tumorsuppressorgen für myeloische Neoplasien vermutet (Fairman et al. 1995; Hejlik et al. 1997; Jaju et al. 1998; Zhao et al. 1998; Mahlknecht et al. 1999; Horrigan et al. 2000). Patienten mit Deletionen 5q sind häufig älter und weisen eine schlechte Prognose auf (Walker et al. 1994; Grimwade et al. 1998). Außerdem werden 5q Deletionen häufig bei sekundären, durch toxische Einflüsse hervorgerufenen, akuten myeloischen Leukämien gefunden und mit der Behandlung durch Zytostatika, vor allem alkylierenden Substanzen, in Zusammenhang gebracht (Pedersen-Bjergaard et al. 1990; Le Beau 1992; Pedersen-Bjergaard et al. 1995). In einer CGH-Studie bei sekundärer AML wurden 5q Deletionen in 30% der Fälle gefunden (Heller et al. 2000).

Die vorliegende Überrepräsentation im langen Arm von Chromosom 8, verbunden mit einer Unterrepräsentation des kurzen Armes von Chromosom 8 könnte durch ein Isochromosom 8q hervorgerufen worden sein. Dies ist eine seltene Veränderung bei AML und wurde bisher nur in 24 Fällen beschrieben. In 14 dieser Fälle trat zusätzlich eine Deletion 5q auf. Zusätzlich war bei 7 dieser Patienten eine sekundäre AML diagnostiziert worden. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass es sich bei einem Isochromosom 8q um einen Marker für eine sekundäre myeloische Leukämie handeln könnte (Wong und Kwong 2000; Ferro et al. 2000).

Bei mehreren Fällen von sekundären myeloischen Leukämien wurde das Vorhandensein eines tetraploiden Chromosomensatzes beschrieben (Zelante et al. 1988; Kaplan et al. 1998; Lemez et al. 1998; Laurenti et al. 2000). Dabei wurde vermutet, dass eine zytostatische Behandlung bei der Induktion eines tetraploiden Karyotyps beteiligt sein könnte (Laurenti et al. 2000).

Über die klinische Vorgeschichte des vorliegenden Falles gibt es keine Angaben. Es liegen jedoch 3 Befunde vor, bei denen ein Zusammenhang mit der sekundären AML beschrieben ist. Der CGH-Befund einer Unterrepräsentation 5q, zusammen mit einer Überrepräsentation im langen Arm von Chromosom 8 und einer Unterrepräsentation im kurzen Arm von Chromosom 8 bei einem tetraploiden Karyotyp könnte also ein weiterer Hinweis dafür sein, dass es sich bei einem Isochromosom 8q um einen Marker für sekundäre myeloische Leukämien handelt und es im Rahmen einer sekundären AML zu einer Polyploidisierung des Chromosomensatzes gekommen war.

4.5 In einigen Fällen kann die CGH keinen auffälligen Befund erheben

In 5 (Nr.10/13/14/15/19) der von mir untersuchten Fälle ergab sich in der CGH ein Normalbefund, obwohl zytogenetisch chromosomale Zugewinne ermittelt wurden. In 2 weiteren Fällen (Nr.4 und 8) ergab die CGH unzureichende Befunde, die weit hinter dem Informationsgehalt der Zytogenetik zurückblieben. Aufgrund der methodischen Eigenheiten der CGH können verschiedene Gründe zu falsch negativen Befunden führen:

4.5.1 Gerade bei numerischen Veränderungen mit Änderungen des Ploidiegrades verliert die CGH an Sensitivität

Bei 4 der 5 Fälle (Nr.13/14/15/19) mit möglicherweise falsch negativem Normalbefund in der CGH-Auswertung lag die modale Chromosomenzahl der untersuchten Zellen im Bereich eines tri- oder tetraploiden Chromosomensatzes.

Beim Patient Nummer 15 lag ein tetraploider Karyotyp mit 92 Chromosomen vor, alle Chromosomen lagen in vierfacher Kopienzahl vor. Dies führt bei der CGH-Analyse zu keiner Mehranfärbung der Chromosomen mit Tumor-DNA, da sich in der Tumor-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA keine Ungleichverteilung der Chromosomen ergibt. Bei Vervielfachungen des Chromosomensatzes detektiert die CGH Abweichungen von der mittleren Kopienzahl, d.h. vom mittleren Ploidiegrad, eines Genoms (Piper et al. 1995). Diese Abweichungen von der mittleren Kopienzahl sind bei einem nahezu tetraploiden oder triploiden Chromosomensatz geringer als bei einem nahezu diploiden Satz: Der Zugewinn eines Chromosoms in einem diploiden Satz (von 2 auf 3 Chromosomen) führt zu einer Änderung der Fluoreszenzverhältnisse um 50% von 1 auf 1,5. In einem triploiden Chromosomensatz führt die Zunahme der Kopienzahl von 3 auf 4 nur zu einer Änderung um 33% von 1 auf 1,3 (Kallioniemi et al. 1994b; Du Manoir et al. 1995b; Weiss et al. 1999). Dies äußert sich in einem zunehmenden Sensitivitätsverlust der CGH gegenüber chromosomalen Zugewinnen bei

höheren Ploidiegraden. Auch wenn nicht genau ganzzahlige Vielfache, also der Zugewinn eines vollständigen Satzes oder die Verdoppelung des Chromosomensatzes vorliegen, wird dadurch die Empfindlichkeit der CGH für chromosomale Imbalancen im nahezu triploiden und nahezu tetraploiden Bereich vermindert. In den Fällen 13, 14 und 19 lagen jeweils Chromosomensätze im nahezu triploiden Bereich vor und die CGH war nicht in der Lage, chromosomale Imbalancen zu erkennen.

Es wurden verschiedene Methoden vorgeschlagen, um die Sensitivität der CGH für Imbalancen in diesem Bereich zu verbessern: In einer weiteren Studie ist ein Fall mit triploidem Chromosomensatz und einem Normalbefund in der CGH beschrieben worden. Dieser Studie wurden fixe Schwellen für Imbalancen zugrunde gelegt, die auf Ratiowerten von 1,5 für chromosomale Zugewinne, entsprechend einem Zugewinn in einem diploidem Satz, beruhen (Wong et al. 1998). Es wurde vorgeschlagen, diese Schwellen bei bekannter mittlerer Kopienzahl dem Ploidiegrad anzupassen und die Schwellen bei triploiden entsprechend enger zu fassen, indem man der Schwellenberechnung die theoretischen Fluoreszenzverschiebungen von 3 auf 4, mit Ratiowerten von 1,3 zugrunde legt (Du Manoir et al. 1995b). Mit dieser Methode konnten bei Kindern mit nahezu triploiden Chromosomensätzen in allen Fällen CGH-Befunde erhoben werden (Larramendy et al. 1998a; Larramendy et al. 1998b).

In der vorliegenden Studie wurde für alle Patienten eine statistische Grenze für genetische Imbalancen verwendet, die auf der 3-fachen Standardabweichung, entsprechend einem 99% Konfidenzintervall beruhen (ISIS CGH Algorithms, Fa. Metasystems). Damit konnte ich bei den insgesamt 10 Fällen (Nr.11-20) mit nahezu tri-/tetraploiden Sätzen in 6 Fällen (Nr.11/12/16/17/18/19/20) einen auffälligen CGH-Befund erheben. Schwellen, die auf der 2-fachen Standardabweichung, entsprechend einem 95% Konfidenzintervall, beruhen, würden eine höhere Sensitivität für chromosomale Imbalancen mit kleineren Ausschlägen aufweisen. Dadurch wäre jedoch auch die Gefahr falsch positiver Ergebnisse erhöht (Du Manoir et al. 1995b).

Der kritische Punkt während des CGH-Auswertungsverfahrens bezüglich des Ploidiegrades stellt der Schritt der Normalisierung dar. Hier werden die Basislinien für Abweichung genetischer Imbalancen gesetzt. Nach diesem Schritt ist nicht mehr nachvollziehbar, welchem Ploidiegrad ein Ratioprofilwert von 1 entspricht. Es wurde deshalb vorgeschlagen, bei Chromosomensätzen mit höhergradigen Zugewinnen zur Berechnung der normalisierten Profile mehrere Normalisierungen mit verschiedenen Bezugspunkten zu berechnen. Indem zusätzlich auch Auswertungen mit Normalisierungen nur über solche Chromosomen, deren

(gleiche) Kopienzahl bekannt ist, berechnet werden, stehen Auswertungen zur Verfügung, bei denen eindeutige und reelle Bezugspunkte vorliegen. Dadurch sind genauere Auswertungen auch bei höheren Ploidiegraden möglich (Rosenberg et al. 1997).

4.5.2 Bei einem geringen Anteil maligner Zellen in der Probe verliert die CGH an Sensitivität

Bei zwei Fällen mit möglicherweise falsch negativem Normalbefund in der CGH (Nr.10 und 14) war der Anteil aberranter Metaphasen an den zytogenetisch analysierten Zellen gering: 35% (Nr.10) und 28% (Nr.14). Die für die CGH präparierte genomische DNA enthält die DNA aller Zellen in der Probe. Darin sind nicht nur Blasten des malignen Klons, sondern auch normale Lymphozyten und andere Zellen ohne genetische Imbalancen enthalten. Diese verdünnen die genetischen Imbalancen des malignen Klones, wodurch es zu einer Annäherung des Ratiowertes zur Mitte hin kommt. Eine Trisomie in einem diploiden Chromosomensatz führt zu einem theoretischen Ratiowert von 1,5. Liegt die Trisomie nur in 50% der Zellen vor, resultiert daraus ein Ratiowert von 1,25. Da in beiden Fällen die Tumor-DNA für die CGH-Untersuchung aus dem gleichen Material wie die Metaphasen für die zytogenetische Untersuchung gewonnen wurde, lag der Anteil von Zellen des Tumorklons in der untersuchten Test-DNA vermutlich also ähnlich niedrig wie im zytogenetischen Analysematerial.

In diesem Zusammenhang ist der Fall Nr.4 interessant: in 6 von 30 Zellen (20%) lag ein aberranter Karyotyp vor. Dabei lag ein überzähliges Chromosom 18 und zusätzlich ein Derivatchromosom 18 vor. Nur der zweifache Zugewinn eines Chromosoms reichte bei diesem geringen Anteil aberranter Zellen für eine Überschreitung der Schwellenwerte aus, und nur für Chromosom 18 konnte eine Überrepräsentation nachgewiesen werden.

4.5.3 Untersuchungsmaterial und maligner Klon

Im Fall Nr.19 konnte in 13 von 21 untersuchten Metaphasen (61%) ein aberranter Befund erhoben werden. Es lag ein nahezu triploider Satz mit 62 Chromosomen vor. Beide Befunde begünstigen wie oben verdeutlicht einen Normalbefund in der CGH. Eine weitere Tatsache könnte eine wichtige Rolle spielen: In diesem Fall wurde die CGH nicht aus dem gleichen Material gewonnen wie die Zellen für die zytogenetische Befundung. Die Zytogenetik wurde an Zellen aus KM-Kulturen, die CGH aus DNA des Blutes durchgeführt.

Dies könnte darauf hindeuten, dass der Anteil maligner Zellen mit genetischen Veränderungen im Blut wesentlich geringer war als in Zellen des Knochenmarkes. Stewart und Secker-Walker berichten von 25 Patienten mit klonalen Chromosomenaberrationen, von

denen Knochenmark und Blut untersucht wurden. Bei 48% der Fälle waren Chromosomenveränderungen nur im Knochenmark zu finden, und bei 24% zeigten die Blutkulturen nur normale Metaphasen, während in den Knochenmarkzellen eine Chromosomenaberration nachgewiesen werden konnte (Stewart und Secker-Walker 1986). Smets verglich bei 20 Kindern mit hyperdiploider ALL den Anteil an hyperdiploiden Zellen in Blut und Knochenmark. Dabei lag der Anteil an hyperdiploiden Zellen im Knochenmark bei 92,2% und im Blut nur bei 42,2% (Smets et al. 1985). Eine CGH-Analyse sollte also vorrangig aus demselben Material wie die zytogenetische Untersuchung durchgeführt werden. Dabei ist DNA aus Knochenmarkzellen vorzuziehen.

4.5.4 Die CGH verpasst partielle Imbalancen, die weniger als 10-20 Mb umfassen

In 5 Fällen (Nr.1/2/3/17/18) konnte die CGH unbalancierte Strukturaberrationen durch entsprechende genetische Imbalancen bestätigen. In 3 dieser Fälle handelte es sich dabei um Aberrationen, die mit Imbalancen eines ganzen Chromosomenarmes verbunden waren. In 2 Fällen (Nr. 2 und 3) waren Deletionen sehr kurzer, terminaler Chromosomenregionen vorhanden. Bei Fall Nr.2 bestand eine unbalancierte Translokation der(9)t(9;?)(q3?4;?), wobei der distale Anteil des langen Armes von Chromosom 9 verloren gegangen schien. Die CGH konnte eine Unterrepräsentation im distalen Anteil von Chromosom 9, im Segment 9q32qter aufdecken. Das Auflösungsvermögen der CGH bezüglich chromosomaler Verluste liegt etwa bei 10-20Mb, wenn der Anteil aberranter Zellen in der Probe 50% übersteigt (Bentz et al. 1998). Dies entspricht etwa der Fragmentgröße des Stückes 9q32qter, die im Fall Nr.2 unterrepräsentiert war.

Im Fall Nr.3 bestand ein Derivatchromosom der(2)t(2;17)(q3?7;q1?1). Hier bestätigte die CGH eine partielle Trisomie 17q, konnte aber einen Stückverlust des distalen Bereiches von 2q nicht nachweisen. Der Bruchpunkt im langen Arm von Chromosom 2 würde in 2q3?7 sehr weit distal liegen und den Verlust einer Region bedeuten, die deutlich kleiner wäre als 10-20 Mb, also außerhalb des Auflösungsvermögens der CGH liegen.

Das theoretische Auflösungsvermögen der CGH für Deletionen dürfte höher liegen: Das Auflösungsvermögen einer DNA-Hybridisierung eines FISH-Experimentes liegt bei 3-5 Mb (Kallioniemi et al. 1994b; Piper et al. 1995). Bei der CGH werden jedoch Hybridisierungen mehrerer Chromosomen und Metaphasen miteinander verrechnet. Im Rahmen der Längennormalisierung werden dabei Chromosomen mit unterschiedlichen Kondensationszuständen miteinander verglichen. Dadurch kann eine vermehrte Unschärfe diskreter Signale auftreten, indem nach der Auswertung mehrerer Chromosomen eine größere

Ausdehnung der errechneten Imbalancen über das jeweilige Chromosomensegment erfolgt als sie in den jeweiligen Einzelmetaphasen vorhanden ist. Dadurch können Über- und Unterrepräsentationen in der Ausdehnung verschoben sein oder sogar ganz verloren gehen (Kallioniemi et al. 1993; Nacheva et al. 1998). Möglicherweise kann deshalb das Auflösungsvermögen für partielle Imbalancen durch die Auswertung von wenigen, aber qualitativ hochwertigen Metaphasen verbessert werden. Ich wertete durchschnittlich 20 Chromosomen aus 10 verschiedenen Metaphasen aus. Kallioniemi wertete in Versuchen zur Qualitätskontrolle der CGH nur 5 Chromosomen aus. Die partielle Monosomie im langen Arm von Chromosom 9 des Falles Nr.2 schien in der CGH länger als zytogenetisch vermutet. Dabei könnte die Unschärfe der CGH eine Rolle spielen. Mit der Auswertung von mehreren Metaphasen ist prinzipiell zu erwarten, dass die Sicherheit des Nachweises zunimmt. Entscheidend ist dabei die Wahl einheitlicher Metaphasechromosomen.

Indem Metaphasechromosomen durch DNA-Fragmente als Zielsequenzen ersetzt werden, z.B. bei der sogenannten Array-CGH, kann man inzwischen wesentlich höhere Auflösungsvermögen erreichen (Kraus et al. 1997; Solinastoldo et al. 1997; Pinkel et al. 1998).

5 Zusammenfassung

Bei der Tumorentstehung spielen neben Genmutationen umschriebener Gene, z.B. durch Strukturaberrationen, auch komplexe Veränderungen des Genoms mit Zugewinnen und Verlusten von Chromosomen oder Chromosomenteilen eine große Rolle. Gerade bei diesen komplexen Veränderungen stößt die klassische Zytogenetik an ihre Grenzen. Mit der CGH (Comparative Genomische Hybridisierung) steht eine Methode zur Verfügung, die es erlaubt, in einem einzigen Experiment einen Überblick über vorliegende genetische Imbalancen eines Genoms zu bekommen. Mit der CGH ist es möglich, archiviertes Tumormaterial zu untersuchen, da es nicht notwendig ist, Metaphasen der zu untersuchenden Tumorzellen zu gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die CGH zur Charakterisierung komplexer Tumorkaryotypen bei hämatologischen Neoplasien mit mehr als 50 Chromosomen beitragen kann. Erstmals wurden in dieser Arbeit CGH-Untersuchungen bei der ALL des Erwachsenen durchgeführt und aus archivierten Zellsuspensionen von Leukämien DNA für die CGH gewonnen. Es wurden 20 Fälle hämatologischer Neoplasien mit Chromosomensätzen aus über 50 Elementen bei Erwachsenen mittels CGH untersucht. Dabei handelte es sich in 16 Fällen um eine ALL und in je zwei Fällen um eine AML oder ein NHL. Bei acht der 20 Patienten wurde die DOP-PCR nach Chelexaufbereitung eingesetzt, um aus archivierten Zellsuspensionen DNA für die CGH zu gewinnen.

Durch die vorliegende Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es auch bei Leukämien möglich ist, aus archiviertem Zellmaterial CGH-Untersuchungen durchzuführen. Es wurde deutlich, dass sowohl die Referenz- als auch die Test-DNA mittels DOP-PCR aufbereitet werden muss, um falsch positive Ergebnisse zu verhindern, und dass es sich bei diesen falsch positiven Befunden um wiederkehrende Ereignisse handelt, die für eine spezifische, durch die DOP-PCR verursachte Fehlerquelle sprechen.

Die $ALL^{>50}$ des Erwachsenen besitzt im Gegensatz zur $ALL^{>50}$ des Kindesalters keine ausgezeichnete Prognose. Die vorliegende CGH-Untersuchung ließ nicht erkennen, dass unterschiedliche Verteilungsmuster hinzugewonnener Chromosomen diese Unterschiede bezüglich der Heilungsrate erklären. Bei den vorliegenden Fällen mit hyperdiploider ALL waren die Chromosomen 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 und X mit etwa den gleichen Häufigkeitsmustern wie bei Kindern hinzugewonnen. Die CGH konnte wesentlich zur Klärung der chromosomalen Zusammensetzung beitragen und korrigierte die Zytogenetik bezüglich der Häufigkeitsverteilung hinzugewonnener, prognostisch relevanter Chromosomen.

Partielle Imbalancen in der CGH lassen Rückschlüsse auf unbalanciert vorliegende strukturelle Aberrationen zu. Bei der ALL$^{>50}$ des Erwachsenen fand sich in der kombinierten Auswertung von zytogenetischem Befund und CGH ein im Vergleich zu Kindern erhöhter Anteil an strukturellen Veränderungen, was eine Ursache für die schlechtere Prognose der ALL$^{>50}$ bei Erwachsenen sein könnte. Die CGH konnte bei der ALL$^{>50}$ partielle Imbalancen aufdecken, die zytogenetisch nicht gesehen wurden und die von prognostischer Bedeutung sind: Die CGH konnte 9p-Verluste detektieren, von denen bekannt ist, dass sie auf eine schlechtere Prognose hindeuten und dass sie zytogenetisch häufig nicht erkannt werden. In den Regionen 2q21q31, 3q24q26 und 13q21q32 fanden sich partielle Zugewinne, bei denen es sich möglicherweise um spezifische, wiederkehrende Aberrationen der ALL$^{>50}$ des Erwachsenen handelt.

Die CGH konnte zur Aufklärung der Entstehungsmechanismen chromosomaler Zugewinne bei der ALL beitragen: Bei einem Fall mit einem nahezu triploiden Chromosomensatz erhärtete die CGH die Vermutung, dass dieser durch Verdopplung aus einem hypodiploiden Chromosomensatz hervorgegangen ist. Bei einem tetraploiden Fall detektierte die CGH partielle Imbalancen entsprechend einem Isochromosom 17q, das zytogenetisch nicht erkennbar war. Dies deutet auf die Entstehung des tetraploiden Karyotyps durch Verlust des Tumorsuppressorgens TP53 und nachfolgender Verdopplung des Karyotyps hin.

Bei den zwei untersuchten Fällen mit leukämischen Non-Hodgkin-Lymphomen konnte die CGH Imbalancen detektieren, die zytogenetisch nicht erkennbar waren und die mit aggressiven Verlaufsformen, leukämischem Verlauf oder der Ausbildung tetraploider Karyotypen assoziiert sind: Verluste im Bereich 17p, Zugewinne im Bereich 1q, 3q, 8q, 13q und 18q. In der Region Xq28 fand sich ein weiterer Hinweis für ein in dieser Region vermutetes Onkogen für Non-Hodgkin-Lymphome.

Bei einem tetraploiden Fall von AML konnte die CGH Befunde liefern, die nahe legen, dass es sich bei einem Isochromosom 8q um einen Marker für eine sekundäre myeloische Leukämie handelt, und es im Rahmen einer sekundären Leukämie zu einer Polyploidisierung des Chromosomensatzes kam.

Einschränkend fand sich erneut die limitierte Aussagekraft der CGH bei einem geringen Anteil von Leukämiezellen in der Probe und ganzzahligen Vermehrungen des Chromosomensatzes. Im Rahmen der vergleichenden Auswertung von zytogenetischen und CGH-Befunden wurde zusätzlich deutlich, dass eine kritische Auswertung der CGH die zytogenetischen Befunde und den Ratioprofilverlauf der CGH heranziehen sollte, um die Gefahr falsch positiver Befunde so gering wie möglich zu halten.

6 Literaturverzeichnis

1. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (2003) http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer.

2. Abe R, Raza A, Preisler HD, Tebbi CK, and Sandberg AA (1985) Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. LIV. Near-tetraploidy in acute leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 14 (1-2): 45-59.

3. Aguiar RCT, Sill H, Goldman JM, and Cross NCP (1997) The commonly deleted region at 9p21-22 in lymphoblastic leukemias spans at least 400 kb and includes p16 but not p15 or the IFN gene cluster. Leukemia 11: 233-238.

4. Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, and Pinkel D (2000) Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. Nat.Genet. 25 (2): 144-146.

5. Alqahtani MH, Hammond DW, Goepel JR, and Goyns MH (1999) Cytogenetic analysis of non Hodgkin's lymphomas by ratio-painting and comparative genomic hybridization reveals unsuspected chromosomal abnormalities. Leuk.Lymphoma 35 (3-4): 325-337.

6. Ankathil R, Geetha N, Remani P, Gangadharan VP, Pillai GR, and Nair MK (1996) Clinical implications of cytogenetic classification in adult acute lymphoblastic leukaemia patients. J.Cancer Res.Clin.Oncol. 122 (6): 370-373.

7. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi O-P, Trent JM, and Meltzer PS (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. Science 277: 965-968.

8. Arranz E, Martinez-Delgado B, Richart A, Osorio A, Cebrian A, Robledo M, Rivas C, and Benitez J (2000) Identification by comparative genomic hybridization of genetic changes involved in tumoral progression of a T-cell non-Hodgkin lymphoma. Cancer Genet.Cytogenet. 117 (1): 41-44.

9. Arthur DC, Berger R, Golomb HM, Swansbury GJ, Reeves BR, Alimena G, Van den Berghe H, Bloomfield CD, de la Chapelle A, Dewald GW, Garson OM, Hagemeijer A, Kaneko Y, Mitelman F, Pierre RV, Ruutu T, Sakurai M, Lawler SD, and Rowley JD (1989) The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 40 (2): 203-216.

10. Atkin NB (2000) Chromosomal doubling: the significance of polyploidization in the development of human tumors: possibly relevant findings on a lymphoma. Cancer Genet.Cytogenet. 116 (1): 81-83.

11. Au WY, Ma SK, Chan AC, Liang R, Lam CC, and Kwong YL (1998) Near tetraploidy in three cases of acute myeloid leukemia associated with mediastinal granulocytic sarcoma. Cancer Genet.Cytogenet. 102 (1): 50-53.

12. Autio K, Aalto Y, Franssila K, Elonen E, Joensuu H, and Knuutila S (1998) Low number of DNA copy number changes in small lymphocytic lymphoma. Haematologica 83 (8): 690-692.

13. Avet-Loiseau H, Vigier M, Moreau A, Mellerin MP, Gaillard F, Harousseau JL, Bataille R, and Milpied N (1997) Comparative genomic hybridization detects genomic abnormalities in 80% of follicular lymphomas. Br.J.Haematol. 97 (1): 119-122.

14. Baikie AG, Brown WMC, Jakobs PA, and Milne JS (1959) Chromosome studies in human leukaemia. Lancet 2: 425-428.

15. Bain BJ and Catovsky D (1995) The leukaemic phase of non-Hodgkin's lymphoma. J.Clin.Pathol. 48 (3): 189-193.

16. Bannier E, Degen B, Mittler U, Zintl F, Reiss T, Rieske K, Bruckner R, Kropf S, and Wieacker P (1998) Chromosomenvervielfachung und primäre Leukozytenzahl bei Kindern mit einer ALL und hyperdiploidem Chromosomensatz. Klin.Padiatr. 210 (6): 395-399.

17. Barlogie B, Stass S, Dixon D, Keating M, Cork A, Trujillo JM, McCredie KB, and Freireich EJ (1987) DNA aneuploidy in adult acute leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 28 (2): 213-228.

18. Barrett AJ, Horowitz MM, Ash RC, Atkinson K, Gale RP, Goldman JM, Henslee-Downey PJ, Herzig RH, Speck B, Zwaan FE, and Bortin MM (1992) Bone marrow transplantation for Philadelphia chromosome- positive acute lymphoblastic leukemia. Blood 79: 3067-3070.

19. Barth TF, Benner A, Bentz M, Dohner H, Moller P, and Lichter P (2000) Risk of false positive results in comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes.Cancer 28 (3): 353-357.

20. Barth TFE, Dohner H, Werner CA, Stilgenbauer S, Schlotter M, Pawlita M, Lichter P, Moller P, and Bentz M (1998) Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. Blood 91 (11): 4321-4330.

21. Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, Garcia JL, Flores T, Gonzalez M, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miro R, and Campo E (1999) Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. Blood 93 (12): 4365-4374.

22. Becher R (1994) Chromosomale Anomalien bei akuter myeloischer Leukämie-Korrelation zu Phänotyp und Prognose. In Becher R (ed) Genetische Anomalien bei Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren.W.Zuckerschwerdt Verlag München.

23. Behm FG, Raimondi SC, Schell MJ, Look AT, Rivera GK, and Pui C-H (1993) CD45 expression and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. Response. Blood 81: 563-563.

24. Belkov VM, Krynetski EY, Schuetz JD, Yanishevski Y, Masson E, Mathew S, Raimondi S, Pui C-H, Relling MV, and Evans WE (1999) Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: A mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. Blood 93 (5): 1643-1650.

25. Bene CM, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, and Van 't Veer MB (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. Leukemia 9: 1783-1786.

26. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, and Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukemias: French-American-British (FAB) Co-operative Group. Br.J.Haematol. 33: 451-458.

27. Bentz M, Dohner H, Huck K, Schutz B, Ganser A, Joos S, du MS, and Lichter P (1995a) Comparative genomic hybridization in the investigation of myeloid leukemias. Genes Chromosomes.Cancer 12 (3): 193-200.

28. Bentz M, Dohner H, Werner CA, Huck K, Baudis M, Joos S, Schlegelberger B, Trumper LH, Feller AC, and Pfreundschuh M (1995b) Identification of genetic imbalances in malignant lymphoma using comparative genomic hybridization. Stem Cells 13 Suppl 3: 83-87.

29. Bentz M, Plesch A, Bullinger L, Stilgenbauer S, Ott G, Muller-Hermelink HK, Baudis M, Barth TF, Moller P, Lichter P, and Dohner H (2000) t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Genes Chromosomes.Cancer 27 (3): 285-294.

30. Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Döhner H, and Lichter P (1998) Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. Gene Chromosome.Cancer 21 (2): 172-175.

31. Bentz M, Werner CA, Döhner H, Joos S, Barth TFE, Siebert R, Schroder M, Stilgenbauer S, Fischer K, Moller P, and Lichter P (1996) High incidence of chromosomal imbalances and gene amplifications in the classical follicular variant of follicle center lymphoma. Blood 88: 1437-1444.

32. Bialy H (1998) Aneuploidy and cancer: vintage wine in a new bottle? [news]. Nat.Biotechnol. 16 (2): 137-138.

33. Bloomfield CD and de la Chapelle A (1987) Chromosome abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: clinical and biologic significance. Semin.Oncol. 14 (4): 372-383.

34. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, Berger R, Borgström GH, Brandt L, Catovsky D, de la Chapelle A, Dewald GW, Garson OM, Garwicz S, Colomb HM, Hossfeld DK, Lawler SD, Mitelman F, Nilsson P, Pierre RV, Philip P, Prigogina E, Rowley JD, Sakurai M, Sandberg AA, Secker-Walker LM, Tricot G, Van den Berghe H, Van Orshoven A, Vuopio P, and Whang-Peng J (1986) Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. Blood 67: 415-420.

35. Bloomfield CD, Secker-Walker LM, Goldman AI, Van den Berghe H, de la Chapelle A, Ruutu T, Alimena G, Garson OM, Colomb HM, Rowley JD, Kaneko Y, Whang-Peng J, Prigogina E, Philip P, Sandberg AA, Lawler SD, and Mitelman F (1989) Six-year follow-up of the clinical significance of karyotype in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 40: 171-185.

36. Bloomfield CD, Shuma C, Regal L, Philip PP, Hossfeld DK, Hagemeijer AM, Garson OM, Peterson BA, Sakurai M, Alimena G, Berger R, Rowley JD, Ruutu T, Mitelman F, Dewald GW, and Swansbury J (1997) Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia: A third follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Cancer 80 (11 Suppl.): 2191-2198.

37. Boveri T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Fischer,G.

38. Braylan RC (1993) Flow-cytometric DNA analysis in the diagnosis and prognosis of lymphoma. Am.J.Clin.Pathol. 99 (4): 374-380.

39. Brinkley BR and Goepfert TM (1998) Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. Cell Motil.Cytoskeleton 41 (4): 281-288.

40. Britten RJ, Graham DE, and Neufeld BR (1974) Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. Methods Enzymol. 29 (0): 363-418.

41. Bruckert P, Kappler R, Scherthan H, Link H, Hagmann F, and Zankl H (2000) Double minutes and c-MYC amplification in acute myelogenous leukemia: Are they prognostic factors? Cancer Genet.Cytogenet. 120 (1): 73-79.

42. Buchner T (1997) Treatment of adult acute leukemia. Curr.Opin.Oncol. 9 (1): 18-25.

43. Cao Q, Wu Q, and Su X (1998) [Application of comparative genomic hybridization to hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia]. Zhonghua Xue.Ye.Xue.Za Zhi. 19 (7): 363-366.

44. Carter NP (1994) Cytogenetic analysis by chromosome painting. Cytometry 18 (1): 2-10.

45. Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmear AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, and Dyson HM (1992) Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. J.Med.Genet. 29 (5): 299-307.

46. Castuma MV, Rao PH, Acevedo SH, and Larripa IB (2000) Comparative genomic hybridization study of de novo myeloid neoplasia. Acta Haematol. 104 (1): 25-30.

47. Chan WY, Wong N, Chan AB, Chow JH, and Lee JC (1998) Consistent copy number gain in chromosome 12 in primary diffuse large cell lymphomas of the stomach. Am.J.Pathol. 152 (1): 11-16.

48. Chang H, Benchimol S, Minden MD, and Messner HA (1994) Alterations of p53 and c-*myc* in the clonal evolution of malignant lymphoma. Blood 83: 452-459.

49. Charrin C, Magaud JP, Sebban C, Fiere D, Dastugue N, Huguetrigal F, Attal M, Sie P, Lai JL, Jouet JP, Simon M, Zandecki M, Gregoire MJ, Witz F, Witz B, Barin C, Moraine C, Mugneret F, Favre B, Raynaud S, Gratecos N, Thyss A, Ayraud N, Lafage M, Amoulet C, Sainty D, Mozziconacci MJ, Stoppa AM, Bernard P, Reiffers J, Baranger L, Boasson M, Ifrah N, Vandenakker J, Perrot C, Bertheas MF, Vasselon C, Calmard P, Guyotat D, Talmant P, Uettwiller F, Malolsel F, Ruch JV, Oberling F, Weh HJ, Verellendumoulin C, Libouton JM, Delannoy A, Ferrant A, and etal. (1996) Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings and outcome. a collaborative study of the groupe francais de cytogenetique hematologique (vol 87, pg 3135, 1996). Blood 88: 2818-2818.

50. Chessells JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC, and Richards SM (1997) Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: results of MRC UKALL X. Br.J.Haematol. 99 (1): 93-100.

51. Cheung VG and Nelson SF (1996) Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93 (25): 14676-14679.

52. Clarke MR, Lynch EF, Contis LC, Sherer ME, and Shekhter-Levin S (1996) Near-tetraploidy in adult acute myelogenous leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 86 (2): 107-115.

53. Clodi K, Younes A, Goodacre A, Roberts M, Palmer J, Younes M, Cabanillas F, and Andreeff M (1997) Analysis of p53 gene deletions in patients with non- Hodgkin's lymphoma by dual-colour fluorescence in-situ hybridization. Br.J.Haematol. 98 (4): 913-921.

54. Copelan EA and McGuire EA (1995) The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. Blood 85: 1151-1168.

55. Cortes JE and Kantarjian HM (1995) Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. Cancer 76 (12): 2393-2417.

56. Creutzig U and Schrappe M (1996) [Acute leukemia in childhood. Classification--diagnosis--therapy--prognosis]. Internist (Berl) 37 (10): 982-993.

57. Criel A, Billiet J, Vandenberghe E, Van den Berghe H, Louwagie A, Hidajat M, and Vanhoof A (1992) Leukaemic intermediate lymphocytic lymphomas: Analysis of twelve cases diagnosed by morphology. Leuk.Lymphoma 8: 381-387.

58. Crossen PE, Morrison MJ, Rodley P, Cochrane J, and Morris CM (1999) Identification of amplified genes in a patient with acute myeloid leukemia and double minute chromosomes. Cancer Genet.Cytogenet. 113 (2): 126-133.

59. Cuneo A, Bigoni R, Roberti MG, Bardi A, Balsamo R, Piva N, and Castoldi G (1997) Detection of numerical aberrations in hematologic neoplasias by fluorescence in situ hybridization. Haematologica 82: 85-90.

60. Czepulkowski B and Rooney D (2001) Human Cytogenetics a Practical Approach : Malignancy and Acquired Abnormalities. Oxford Univ Pr (Sd) The Practical Approach Series.

61. Daniel M-T, Tigaud I, Flexor M-A, Nogueira M-E, Berger R, and Jonveaux P (1995) Leukaemic non-Hodgkin's lymphomas with hyperdiploid cells and t(11;14)(q13;q32): A subtype of mantle cell lymphoma. Br.J.Haematol. 90: 77-84.

62. De Vries S, Gray JW, Pinkel D, and Waldman FM (1995) Comparative Genomic Hybridization. Current Protocols in Human Genetics Supplement 6: 4.6.1-4.6.18.

63. Dierlamm J, Pittaluga S, Stul M, Wlodarska I, Michaux L, Thomas J, Verhoef G, Verhest A, Depardieu C, Cassiman JJ, Hagemeijer A, Wolf-Peeters C, and Van Den BH (1997a) BCL6 gene rearrangements also occur in marginal zone B-cell lymphoma. Br.J.Haematol. 98 (3): 719-725.

64. Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M, Pittaluga S, Wlodarska I, Michaux L, Dehaen M, Verhoef G, Thomas J, de Kelver W, Bakker-Schut T, Cassiman JJ, Raap AK, Wolf-Peeters C, Van Den BH, and Hagemeijer A (1997b) Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. Leukemia 11 (5): 747-758.

65. Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, Stefanova M, Hinz K, Van Den BH, Hagemeijer A, and Hossfeld DK (2000) Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. Hematol.Oncol. 18 (1): 1-13.

66. Dos Santos NR and Van Kessel AG (1999) Chromosomal abnormalities: detection and implications for cancer development. Anticancer Res. 19 (6A): 4697-4714.

67. Du Manoir S, Kallioniemi O-P, Lichter P, Piper J, Benedetti PA, Carothers AD, Fantes JA, García-Sagredo JM, Gerdes T, Giollant M, Hemery B, Isola J, Maahr J, Morrison H, Perry P, Stark M, Sudar D, Van Vliet LJ, Verwoerd N, and Vrolijk J (1995a) Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry 19: 4-9.

68. Du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, and Cremer T (1995b) Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry 19: 27-41.

69. Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, and Cremer T (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. Hum.Genet. 90: 590-610.

70. Du MQ, Peng HZ, Singh N, Isaacson PG, and Pan LX (1995) The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Blood 86: 4587-4593.

71. Duesberg P, Li R, Rasnick D, Rausch C, Willer A, Kraemer A, Yerganian G, and Hehlmann R (2000) Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. Cancer Genet.Cytogenet. 119 (2): 83-93.

72. Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, and Hehlmann R (1998) Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95 (23): 13692-13697.

73. Duque RE, Andreeff M, Braylan RC, Diamond LW, and Peiper SC (1993) Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in neoplastic hematopathology. Cytometry 14 (5): 492-496.

74. Eder M, Ottmann OG, Hansen-Hagge TE, Bartram CR, Falk S, Gillis S, Hoelzer D, and Ganser A (1992) In vitro culture of common acute lymphoblastic leukemia blasts: Effects of interleukin-3, interleukin-7, and accessory cells. Blood 79: 3274-3284.

75. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, and Chakraborty R (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. Genomics 12 (2): 241-253.

76. El-Rifai W, Elonen E, Larramendy M, Ruutu T, and Knuutila S (1997) Chromosomal breakpoints and changes in DNA copy number in refractory acute myeloid leukemia. Leukemia 11: 958-963.

77. Espinet B, Sole F, Woessner S, Florensa L, Besses C, and Sanssabrafen J (1998) Two new cases of near-tetraploidy in adult acute myeloid leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 102 (2): 131-134.

78. Faderl S, Estrov Z, Kantarjian HM, Thomas D, Cortes J, Manshouri T, Chan CC, Hays KJ, Pierce S, and Albitar M (1999) The incidence of chromosome 9p21 abnormalities and deletions of tumor suppressor genes p15(INK4b)/p16(INK4a)/p14(ARF) in patients with acute lymphoblastic leukemia. Cytokines Cell Mol.Ther. 5 (3): 159-163.

79. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, and Estrov Z (1998) Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. Blood 91 (11): 3995-4019.

80. Fairman J, Chumakov I, Chinault AC, Nowell PC, and Nagarajan L (1995) Physical mapping of the minimal region of loss in 5q- chromosome. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 92 (16): 7406-7410.

81. Fearon ER and Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61 (5): 759-767.

82. Fenaux P, Lai JL, Morel P, Nelken B, Taboureau O, Deminatti M, and Bauters F (1988) Cytogenetics and their prognostic value in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) excluding L3. Hematol.Oncol. 7: 307-317.

83. Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Morel P, Beuscart R, and Bauters F (1989) Cytogenetics and their prognostic value in de novo acute myeloid leukaemia: a report on 283 cases. Br.J.Haematol. 73 (1): 61-67.

84. Ferrara F, Mirto S, Zagonel V, and Pinto A (1998) Acute myeloid leukemia in the elderly: a critical review of therapeutic approaches and appraisal of results of therapy. Leuk.Lymphoma 29 (3-4): 375-382.

85. Ferro MT, Vazquez-Mazariego Y, Ramiro S, Santiago MF, Garcia-Sagredo JM, Nunez R, Hernandez JM, and San Roman C (2000) Trisomy/ tetrasomy of chromosome 8 and +i(8q) as the sole chromosome abnormality in three adult patients with myelomonocytic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 120 (2): 163-165.

86. Fioretos T, Strombeck B, Sandberg T, Johansson B, Billstrom R, Borg A, Nilsson PG, Van Den BH, Hagemeijer A, Mitelman F, and Hoglund M (1999) Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations. Blood 94 (1): 225-232.

87. Fletcher JA, Tu N, Tantravahi R, and Sallan SE (1992) Extremely poor prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia with translocation (9;22): Updated experience. Leuk.Lymphoma 8: 75-79.

88. Fonatsch C, Schaadt M, Kirchner HH, and Diehl V (1980) A possible correlation between the degree of karyotype aberrations and the rate of sister chromatid exchanges in lymphoma lines. Int.J.Cancer 26: 749-756.

89. Ford CE, Jakobs PA, and Lajtha LG (1958) Human somatic chromosomes. Nature 181: 1565-1568.

90. Forestier E, Gustafsson G, Vonheideman A, Heim S, Hernell O, Mitelman F, Nordenson I, Swolin B, and Soderhall S (1997) Prognostic impact of bone marrow karyotype in childhood acute lymphoblastic leukaemia: Swedish experiences 1986-91. Acta Paediat. 86: 819-825.

91. Fritz B, Küster W, Örstavik KH, Naumova A, Happle R, Spranger J, and Rehder H (1998) Pigmentary mosaicism of the type of Ito. Further evidence for functional disomy of Xp. Hum.Genet. 103: 441-449.

92. Galipeau PC, Cowan DS, Sanchez CA, Barrett MT, Emond MJ, Levine DS, Rabinovitch PS, and Reid BJ (1996) 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93 (14): 7081-7084.

93. Gerard B, Cave H, Guidal C, Dastugue N, Vilmer E, and Grandchamp B (1997) Delineation of a 6 cM commonly deleted region in childhood acute lymphoblastic leukemia on the 6q chromosomal arm. Leukemia 11: 228-232.

94. Gorbsky GJ, Chen RH, and Murray AW (1998) Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. J.Cell Biol. 141 (5): 1193-1205.

95. Goyns MH, Hammond DW, Harrison CJ, Menasce LP, Ross FM, and Hancock BW (1993) Structural abnormalities of the X chromosome in non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia 7 (6): 848-852.

96. Gökbuget N and Hoelzer D (1998) Akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen. Onkologe 4: 778-790.

97. Greaves MF (1986) Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. Science 234: 697-704.

98. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, and Goldstone A (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. Blood 92 (7): 2322-2333.

99. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (1993) Collaborative study of karyotypes in childhood acute lymphoblastic leukemias. Leukemia 7: 10-19.

100. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (1996) Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: Correlations with hematologic findings and outcome. A collaborative study of the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. Blood 87: 3135-3142.

101. Haas OA, Henn T, Romanakis K, Du Manoir S, and Lengauer C (1996) Comparative genomic hybridization (CGH) is an excellent tool for determination of chromosome abnormalities in hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL). Eur.J.Hum.Genet. 4, suppl. 1 (suppl. 1): 53-53.

102. Haas OA, Henn T, Romanakis K, Dumanoir S, and Lengauer C (1998) Comparative genomic hybridization as part of a new diagnostic strategy in childhood hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 12 (4): 474-481.

103. Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, and Emmerich B (1992) Thymidine kinase: A tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. Ann.Hematol. 65: 1-5.

104. Hammond GD (1991) Leukemia cell DNA content: Predictor of late relapse in acute lymphoblastic leukemia. J.Clin.Oncol. 9: 1332-1333.

105. Hansemann D (1890) Ueber assymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. Virchows Arch.A Pathol.Anat.Hispathol. 119: 229-326.

106. Hardwick KG (1998) The spindle checkpoint. Trends Genet. 14 (1): 1-4.

107. Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, Look AT, Borowitz MJ, Crist WM, Nitschke R, Pullen J, Steuber CP, and Land VJ (1992) Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: A Pediatric Oncology Group study. Blood 79: 3316-3324.

108. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink H-K, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, and Warnke RA (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 84: 1361-1392.

109. Hawkins JM and Secker-Walker LM (1991) Evaluation of cytogenetic samples and pertinent technical variables in adult acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 52: 79-84.

110. Hayashi Y, Raimondi SC, Look AT, Behm FG, Kitchingman GR, Pui C-H, Rivera GK, and Williams DL (1990) Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 76: 1626-1630.

111. Heerema NA (1990) Cytogenetic abnormalities and molecular markers of acute lymphoblastic leukemia. Hematol.Oncol.Clin.North Am. 4: 795-821.

112. Heerema NA, Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Lee MK, Hutchinson R, Lange BJ, Steinherz PG, Bostrom B, Gaynon PS, and Uckun F (1999a) Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. Blood 94 (12): 4036-4045.

113. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Liu-Mares W, Lange BJ, Bostrom BC, Nachman JB, Steinherz PG, Hutchinson R, Gaynon PS, Arthur DC, and Uckun FM (1999b) Association of chromosome arm 9p abnormalities with adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Cancer Group. Blood 94 (5): 1537-1544.

114. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Zhang T, Hutchinson RJ, Nachman JB, Lange BJ, Steinherz PG, Bostrom BC, Reaman GH, Gaynon PS, and Uckun FM (2000) Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). J.Clin.Oncol. 18 (9): 1876-1887.

115. Heim S, Bekassy AN, Garwicz S, Heldrup J, Kristoffersson U, Mandahl N, Wiebe T, and Mitelman F (1990) Bone marrow karyotypes in 94 children with acute leukemia. Eur.J.Haematol. 44: 227-233.

116. Heinonen K and Mahlamäki E (1996) Detection of numerical chromosome abnormalities by FISH in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 87: 123-126.

117. Hejlik DP, Kottickal LV, Liang H, Fairman J, Davis T, Janecki T, Sexton D, Perry W, III, Tavtigian SV, Teng DH, and Nagarajan L (1997) Localization of SMAD5 and its evaluation as a candidate myeloid tumor suppressor. Cancer Res. 57 (17): 3779-3783.

118. Heller A, Chudoba I, Bleck C, Senger G, Claussen U, and Liehr T (2000) Microdissection based comparative genomic hybridization analysis (micro-CGH) of secondary acute myelogenous leukemias. Int.J.Oncol. 16 (3): 461-468.

119. Heselmeyer K, Schröck E, Du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, and Ried T (1996) Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93: 479-484.

120. Hiddemann W, Wormann B, Gohde W, and Buchner T (1986b) DNA aneuploidies in adult patients with acute myeloid leukemia. Incidence and relation to patient characteristics and morphologic subtypes. Cancer 57 (11): 2146-2152.

121. Hiddemann W, Wörmann B, Messerer D, Springefeld R, and Büchner T (1990) Analysis of the cellular DNA and RNA content in acute leukemias by flow cytometry. J.Cancer Res.Clin.Oncol. 116 (5): 507-512.

122. Hiddemann W, Wörmann B, Ritter J, Thiel E, Gohde W, Lahme B, Henze G, Schellong G, Riehm H, and Büchner T (1986a) Frequency and clinical significance of DNA aneuploidy in acute leukemia. Ann.N.Y.Acad.Sci. 468:227-40: 227-240.

123. Hoelzer D (1993a) Acute lymphoblastic leukemia--Progress in children, less in adults. N.Engl.J.Med. 329: 1343-1344.

124. Hoelzer D (1993b) Aggressive chemotherapy of ALL in elderly patients. Hematol.Oncol. 11 Suppl 1: 12-14.

125. Hoelzer D, Gökbuget N, Überla K, and Adelhard K (2001) Kompetenznetzwerk Leukämien-Leukämien des Erwachsenen. http://leukaemie.krebsinfo.de/.

126. Holliday R (1989) Chromosome error propagation and cancer. Trends Genet. 5 (2): 42-45.

127. Horrigan SK, Arbieva ZH, Xie HY, Kravarusic J, Fulton NC, Naik H, Le TT, and Westbrook CA (2000) Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidates for a tumor suppressor gene in malignant myeloid disorders on 5q31. Blood 95 (7): 2372-2377.

128. Horsman DE, Gascoyne RD, and Barnett MJ (1995) Acute leukemia with structural rearrangements of chromosome 3. Leuk.Lymphoma 16 (5-6): 369-377.

129. Houldsworth J and Chaganti RSK (1994) Comparative genomic hybridization: An overview. Am.J.Pathol. 145: 1253-1260.

130. Huang Q, Schantz SP, Rao PH, Mo J, McCormick SA, and Chaganti RS (2000) Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors [In Process Citation]. Genes Chromosomes.Cancer 28 (4): 395-403.

131. Hudis C, Offit K, Jhanwar S, Schluger A, Berman E, Clarkson B, and Chaganti R (1990) Prognostic significance of cytogenetic abnormalities in 126 adult patients with newly diagnosed lymphocytic leukemia. Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 31: 26-26.

132. Huhta T, Vettenranta K, Heinonen K, Kanerva J, Larramendy ML, Mahlamaki E, Saarinen-Pihkala UM, and Knuutila S (1999) Comparative genomic hybridization and conventional cytogenetic analyses in childhood acute myeloid leukemia. Leuk.Lymphoma 35 (3-4): 311-315.

133. Hungerford DA and Nowell PC (1962) Chromosome studies in human leukemia. III. Acute granulocytic leukemia. J.Natl.Cancer Inst. 29: 545-565.

134. Ichikawa A, Hotta T, Takagi N, Tsushita K, Kinoshita T, Nagai H, Murakami Y, Hayashi K, and Saito H (1992) Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. Blood 79: 2701-2707.

135. ISCN. 1995. ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F (ed). Basel: S. Karger.

136. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, and Croce CM (1986) Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. Nature 320 (6057): 84-85.

137. Ito C, Kumagai M, Manabe A, Coustan-Smith E, Raimondi SC, Behm FG, Murti KG, Rubnitz JE, Pui CH, and Campana D (1999) Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. Blood 93 (1): 315-320.

138. Jackson JF, Boyett J, Pullen DJ, Brock B, Patterson R, Land VJ, Borowitz MJ, Head D, and Crist WM (1990) Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphocytic leukemia correlates with extra chromosome 6. A Pediatric Oncology Group study. Cancer 66: 1183-1189.

139. Jaju RJ, Boultwood J, Oliver FJ, Kostrzewa M, Fidler C, Parker N, McPherson JD, Morris SW, Muller U, Wainscoat JS, and Kearney L (1998) Molecular cytogenetic delineation of the critical deleted region in the 5q- syndrome. Gene Chromosome.Cancer 22 (3): 251-256.

140. James GK, Horsman D, Connors JM, Klasa R, Wilson K, Argatoff L, and Gascoyne RD (1998) Clinicopathological analysis of follicular lymphoma with a polyploid karyotype. Leuk.Lymphoma 28 (3-4): 383-389.

141. James L and Varley J (1996) Preparation, labelling and detection of DNA from archival tissue sections suitable for comparative genomic hybridization. Chromosome.Res. 4 (2): 163-164.

142. James LA (1999) Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. J.Pathol. 187 (4): 385-395.

143. James LA, Mitchell ELD, Menasce L, and Varley JM (1997) Comparative genomic hybridisation of ductal carcinoma in situ of the breast: Identification of regions of DNA amplification and deletion in common with invasive breast carcinoma. Oncogene 14: 1059-1065.

144. Jarosova M, Holzerova M, Jedlickova K, Mihal V, Zuna J, Stary J, Pospisilova D, Zemanova Z, Trka J, Blazek J, Pikalova Z, and Indrak K (2000) Importance of using comparative genomic hybridization to improve detection of chromosomal changes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 123 (2): 114-122.

145. Johansson B, Mertens F, and Mitelman F (1993) Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci. Genes Chromosom.Cancer 8: 205-208.

146. Johansson B, Mertens F, and Mitelman F (1994) Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemias. Leukemia 8 (6): 953-962.

147. Johansson B, Mertens F, and Mitelman F (1995) Cytogenetic evolution patterns in non-Hodgkin's lymphoma. Blood 86 (10): 3905-3914.

148. Johansson B, Mertens F, and Mitelman F (1996) Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? Genes Chromosomes.Cancer 16 (3): 155-163.

149. Joos S, Otaño-Joos MI, Ziegler S, Brüderlein S, Du Manoir S, Bentz M, Möller P, and Lichter P (1996) Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the *REL* gene. Blood 87: 1571-1578.

150. Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, and Lichter P (1993) Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. Hum.Genet. 90 (6): 584-589.

151. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, and Waldman FM (1994a) Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91: 2156-2160.

152. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, and Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 258: 818-821.

153. Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, and Pinkel D (1994b) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. Genes Chromosom.Cancer 10: 231-243.

154. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, and Pinkel D (1993) Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. Semin.Cancer Biol. 4 (1): 41-46.

155. Kaneko Y, Rowley JD, Variakojis D, Chilcote RR, Check I, and Sakurai M (1982) Correlation of karyotype with clinical features in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res. 42: 2918-2929.

156. Kantarjian HM (1994) Adult acute lymphocytic leukemia: critical review of current knowledge. Am.J.Med. 97 (2): 176-184.

157. Kaplan SS, Rybka WB, Blom J, and Shekhter-Levin S (1998) Tetraploidy in acute myeloid leukemia secondary to large cell lymphoma. Leuk.Lymphoma 31 (5-6): 617-623.

158. Karhu R, Siitonen S, Tanner M, Keinanen M, Makipernaa A, Lehtinen M, Vilpo JA, and Isola J (1997) Genetic aberrations in pediatric acute lymphoblastic leukemia by comparative genomic hybridization. Cancer Genet.Cytogenet. 95: 123-129.

159. Kaspers GJL, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, van Wering ER, and Veerman AJP (1995) Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: Results of an in vitro study. Blood 85: 751-756.

160. Kersey JH (1997) Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. Blood 90 (11): 4243-4251.

161. Khokhar MT, Brito-Babapulle V, Matutes E, and Catovsky D (1995) Cytogenetic abnormalities in the leukemic phase of non-Hodgkin lymphoma. Cancer Genet.Cytogenet. 83 (1): 18-24.

162. Kim MH, Stewart J, Devlin C, Kim YT, Boyd E, and Connor M (2001) The application of comparative genomic hybridization as an additional tool in the chromosome analysis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. Cancer Genet.Cytogenet. 126 (1): 26-33.

163. Kim SH, Godfrey T, and Jensen RH (1999) Whole genome amplification and molecular genetic analysis of DNA from paraffin-embedded prostate adenocarcinoma tumor tissue. J.Urol. 162 (4): 1512-1518.

164. Kimby E, Nygren P, and Glimelius B (2001) A systematic overview of chemotherapy effects in acute myeloid leukaemia. Acta Oncol. 40 (2-3): 231-252.

165. Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, and Riethmuller G (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 (8): 4494-4499.

166. Knutsen T (1998) Cytogenetic changes in the progression of lymphoma. Leuk.Lymphoma 31 (1-2): 1-19.

167. Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist AM, El Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monni O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius VM, Wolf M, and Zhu Y (1999) DNA copy number losses in human neoplasms http://www.helsinki.fi/~lgl_www/CMG.html. Am.J.Pathol. 155 (3): 683-694.

168. Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, and Zhu Y (1998) DNA copy number amplifications in human neoplasms: Review of comparative genomic hybridization studies http://www.helsinki.fi/~lgl_www/CMG.html. Am.J.Pathol. 152 (5): 1107-1123.

169. Knuutila S, Vuopio P, Elonen E, Siimes M, Kovanen R, Borgstrom GH, and de la Chapelle A (1981) Culture of bone marrow reveals more cells with chromosomal abnormalities than the direct method in patients with hematologic disorders. Blood 58: 369-375.

170. Kobayashi H, Maseki N, Homma C, Sakurai M, and Kaneko Y (1994) Clinical significance of chromosome abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia in Japan. Leukemia 8: 1944-1950.

171. Kohler M, Johansson B, Ludvigsson J, Aman P, Heim S, and Mitelman F (1994) Acute myeloid leukemia (AML-M1) with multiple trisomies and t(8;21)(q22;q22). Cancer Genet.Cytogenet. 73 (1): 79-81.

172. Kowalczyk JR, Grossi M, and Sandberg AA (1985) Cytogenetic findings in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 15: 47-64.

173. Kraus J, Weber RG, Cremer M, Seebacher T, Fischer C, Schurra C, Jauch A, Lichter P, Bensimon A, and Cremer T (1997) High-resolution comparative hybridization to combed DNA fibers. Hum.Genet. 99: 374-380.

174. Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, and Isola J (1997) Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. Genes Chromosom.Cancer 18: 94-101.

175. Kwong YL, Lam CK, Chan AY, Lie AK, and Chan LC (1994) Cytogenetic triclonality in acute myeloid leukemia: a morphologic, immunologic and in situ hybridization study. Cancer Genet.Cytogenet. 72 (2): 86-91.

176. Kwong YL and Wong KF (1995) Hyperdiploid acute myeloid leukemia. Relationship between blast size and karyotype demonstrated by fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet.Cytogenet. 83 (1): 1-4.

177. Landegent JE, Jansen in dW, Dirks RW, Baao F, and van der PM (1987) Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. Hum.Genet. 77 (4): 366-370.

178. Larramendy ML, El-Rifai W, and Knuutila S (1998c) Comparison of fluorescein isothiocyanate- and Texas red- conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. Cytometry 31 (3): 174-179.

179. Larramendy ML, Huhta T, Heinonen K, Vettenranta K, Mahlamaki E, Riikonen P, Saarinen-Pihkala UM, and Knuutila S (1998b) DNA copy number changes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 83 (10): 890-895.

180. Larramendy ML, Huhta T, Vettenranta K, El-Rifai W, Lundin J, Pakkala S, Saarinen-Pihkala UM, and Knuutila S (1998a) Comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 12 (10): 1638-1644.

181. Larsen J, Ottesen AM, Lundsteen C, Leffers H, and Larsen JK (2001) Optimization of DOP-PCR amplification of DNA for high-resolution comparative genomic hybridization analysis. Cytometry 44 (4): 317-325.

182. Laurenti L, d'Onofrio G, Zini G, Sica S, Chiusolo P, and Leone G (2000) Near-tetraploid acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation [letter]. Haematologica 85 (4): 432-434.

183. Lawler SD, Khokar MT, Davies H, Williams GJ, and Powles R (1990) Cytogenetic studies of leukemic recurrence in recipients of bone marrow allografts. Cancer Genet.Cytogenet. 47: 249-263.

184. Le Beau MM (1990) Chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphomas. Semin.Oncol. 17 (1): 20-29.

185. Le Beau MM (1992) Deletions of chromosome 5 in malignant myeloid disorders. Cancer Surv. 15: 143-159.

186. Le Beau MM (1993) Detecting genetic changes in human tumor cells: Have scientists "gone fishing?". Blood 81: 1979-1983.

187. Leblanc T and Berger R (1997) Molecular cytogenetics of childhood acute myelogenous leukaemias. Eur.J.Haematol. 59: 1-13.

188. Leitch AR and Schwarzacher T (2000) In situ-Hybridisierung. Sprektrum Akademischer Verlag.

189. Lemez P, Jelinek J, Michalova K, Koubek K, Schwarz J, Malaskova V, Rypackova B, Jirasek A, Brezinova J, and Hrabanek J (1994) Near-tetraploid poorly differentiated acute myeloid leukemia M0 diagnosed by short-term cultures with a phorbol ester TPA. Leuk.Res. 18 (7): 493-497.

190. Lemez P, Michalova K, Zemanova Z, Marinov I, Trpakova A, Moravcova J, and Jelinek J (1998) Three cases of near-tetraploid acute myeloid leukemias originating in pluripotent myeloid progenitors. Leuk.Res. 22 (7): 581-588.

191. Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, and Pagano L (1999) The incidence of secondary leukemias. Haematologica 84 (10): 937-945.

192. Li R, Sonik A, Stindl R, Rasnick D, and Duesberg P (2000) Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97 (7): 3236-3241.

193. Li R, Yerganian G, Duesberg P, Kraemer A, Willer A, Rausch C, and Hehlmann R (1997) Aneuploidy correlated 100% with chemical transformation of Chinese hamster cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94 (26): 14506-14511.

194. Li YS, Le Beau MM, Mick R, and Rowley JD (1991) The proportion of abnormal karyotypes in acute leukemia samples related to method of preparation. Cancer Genet.Cytogenet. 52 (1): 93-100.

195. Lichter P, Joos S, Bentz M, and Lampel S (2000) Comparative genomic hybridization: uses and limitations. Semin.Hematol. 37 (4): 348-357.

196. Liesner R and Goldstone AH (1997) Treatment of childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia. J.Intern.Med.Suppl 740: 29-36.

197. Linker CA (1997) Risk-adapted treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Leukemia 11 Suppl 4: S24-S27.

198. Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RSK, and Dalla-Favera R (1993) p53 Mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. Blood 82: 2289-2295.

199. Look AT, Melvin SL, Williams DL, Brodeur GM, Dahl GV, Kalwinsky DK, Murphy SB, and Mauer AM (1982) Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. Blood 60 (4): 959-967.

200. Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui CH, Ochs J, Abromowitch M, Kalwinsky D, and Dahl GV (1985) Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 65 (5): 1079-1086.

201. Lowenberg B (1996) Treatment of the elderly patient with acute myeloid leukaemia. Baillieres Clin.Haematol. 9 (1): 147-159.

202. Mahlknecht U, Bucala R, Hoelzer D, and Verdin E (1999) High resolution physical mapping of human HDAC3, a potential tumor suppressor gene in the 5q31 region. Cytogenet.Cell Genet. 86 (3-4): 237-239.

203. Mamaeva SE, Mamaev NN, Jartseva NM, Belyaeva LV, and Scherbakova EG (1983) Complete or partial trisomy for the long arm of chromosome 1 in patients with various hematologic malignancies. Hum.Genet. 63 (2): 107-112.

204. Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, and Campana D (1992) Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood 79: 2370-2377.

205. Martin LJ, Blangero J, Rogers J, Mahaney MC, Hixson JE, Carey KD, Morin PA, and Comuzzie AG (2001) A quantitative trait locus influencing estrogen levels maps to a region homologous to human chromosome 20. Physiol Genomics 5 (2): 75-80.

206. Martinez-Climent JA and Garcia-Conde J (1999) Chromosomal rearrangements in childhood acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. J.Pediatr.Hematol.Oncol. 21 (2): 91-102.

207. Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan I, Benet I, Sole F, Rubio-Moscardo F, Terol MJ, Climent J, Sarsotti E, Tormo M, Andreu E, Salido M, Ruiz MA, Prosper F, Siebert R, Dyer MJ, and Garcia-Conde J (2001) Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. Blood 98 (12): 3479-3482.

208. Marx KA, Allen JR, and Hearst JE (1976) Characterization of the repetitious human DNA families. Biochim.Biophys.Acta 425 (2): 129-147.

209. Masson E, Relling MV, Synold TW, Liu Q, Schuetz JD, Sandlund JT, Pui CH, and Evans WE (1996) Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. A rationale for high-dose methotrexate. J.Clin.Invest 97 (1): 73-80.

210. Matherly LH and Taub JW (1999) Molecular and cellular correlates of methotrexate response in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leuk.Lymphoma 35 (1-2): 1-20.

211. Mauer AM (1993) Adult and childhood acute lymphocytic leukemia: Are they different diseases. Am.J.Hematol. 42: 127-131.

212. McGinnes K, Quesniaux V, Hitzler J, and Paige C (1991) Human B-lymphopoiesis is supported by bone marrow derived stromal cells. Exp.Hematol. 19: 294-298.

213. Meek DW (2000) The role of p53 in the response to mitotic spindle damage. Pathol.Biol.(Paris) 48 (3): 246-254.

214. Menasce LP, Orphanos V, Santibanez-Koref M, Boyle JM, and Harrison CJ (1994) Deletion of a common region on the long arm of chromosome 6 in acute lymphoblastic leukaemia. Genes Chromosomes.Cancer 10 (1): 26-29.

215. Mertens F, Johansson B, and Mitelman F (1994) Isochromosomes in neoplasia. Genes Chromosomes.Cancer 10 (4): 221-230.

216. Mertens F, Johansson B, and Mitelman F (1996) Dichotomy of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia on the basis of the distribution of gained chromosomes. Cancer Genet.Cytogenet. 92: 8-10.

217. Merup M, Moreno TC, Heyman M, Ronnberg K, Grander D, Detlofsson R, Rasool O, Liu Y, Soderhall S, Juliusson G, Gahrton G, and Einhorn S (1998) 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. Blood 91 (9): 3397-3400.

218. Micallef-Eynaud PD, Eden OB, Grace E, and Ellis PM (1993) Cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Pediatr.Hematol.Oncol. 10 (1): 25-30.

219. Michael PM, Garson OM, Ekert H, Tauro G, Rennie GC, and Pilkington GR (1988) Prospective study of childhood acute lymphocytic leukemia: hematologic, immunologic, and cytogenetic correlations. Med.Pediatr.Oncol. 16 (3): 153-161.

220. Mitelman F. 1994. Catolog of chromosome aberrations in cancer. 5 ed. New York: Liss,A.R.

221. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. 1998. Catalog of chromosome aberrations in cancer ´98 CD-ROM. New York: Wiley-Liss.

222. Mitelman F, Johansson B, and Mertens F (2001) Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman.

223. Mohamed AN, Macoska JA, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman F, Ratanatharathorn V, and Wolman SR (1993) Extrachromosomal gene amplification in acute myeloid leukemia; characterization by metaphase analysis, comparative genomic hybridization, and semi-quantitative PCR. Genes Chromosomes.Cancer 8 (3): 185-189.

224. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, and Knuutila S (1997) BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. Blood 90 (3): 1168-1174.

225. Monni O, Joensuu H, Franssila K, and Knuutila S (1996) DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma - Comparative genomic hybridization study. Blood 87: 5269-5278.

226. Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H, and Knuutila S (1998) Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. Genes Chromosomes.Cancer 21 (4): 298-307.

227. Moorman AV, Clark R, Farrell DM, Hawkins JM, Martineau M, and Secker-Walker LM (1996) Probes for hidden hyperdiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. Genes Chromosomes.Cancer 16 (1): 40-45.

228. Morris CM, Fitzgerald PH, Neville MA, Wyld PJ, and Beard ME (1984) Does multisomy of chromosome 1q confer a proliferative advantage in B-cell acute lymphoblastic leukemia? Cancer 54 (1): 48-53.

229. Mrozek K, Heinonen K, and Bloomfield CD (2000) Prognostic value of cytogenetic findings in adults with acute myeloid leukemia. Int.J.Hematol. 72 (3): 261-271.

230. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, and Erlich H (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. BioTechnology 24: 17-27.

231. Mülhardt C. 1999. Der Experimentator: Molekularbiologie.G.Fischer-Verlag.

232. Nacheva E, Grace C, Holloway TL, and Green AR (1995) Comparative genomic hybridization in acute myeloid leukemia. A comparison with G-banding and chromosome painting. Cancer Genet.Cytogenet. 82 (1): 9-16.

233. Nacheva EP, Grace CD, Bittner M, Ledbetter DH, Jenkins RB, and Green AR (1998) Comparative genomic hybridization: A comparison with molecular and cytogenetic analysis. Cancer Genet.Cytogenet. 100 (2): 93-105.

234. Nooij-van Dalen AG, Buuren-van Seggelen VH, Lohman PH, and Giphart-Gassler M (1998) Chromosome loss with concomitant duplication and recombination both contribute most to loss of heterozygosity in vitro. Genes Chromosomes.Cancer 21 (1): 30-38.

235. Nordgren A, Nordenskjold M, Soderhall S, Porwitmacdonald A, and Blennow E (1997) A case of acute lymphoblastic leukemia, near-triploidy, and poor outcome: Characterization by fluorescence in situ hybridization using chromosome-specific libraries from all human chromosomes. Cancer Genet.Cytogenet. 99 (2): 93-96.

236. Nowell PC (1960) Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20: 462-466.

237. Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194 (4260): 23-28.

238. Nowell PC and Hungerford DA (1960) A minute chromosome in human granulocytic leukemia. Science 132: 1497-1497.

239. Ong ST and Le Beau MM (1998) Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. Semin.Oncol. 25 (4): 447-460.

240. Onodera N, McCabe NR, Nachman JB, Johnson FL, Le Beau MM, Rowley JD, and Rubin CM (1992b) Hyperdiploidy arising from near-haploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes.Cancer 4 (4): 331-336.

241. Onodera N, McCabe NR, and Rubin CM (1992a) Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 80: 203-208.

242. Ostendorf P and Seeber S (1997) Hämatologie/Onkologie. Urban & Schwarzenberg.

243. Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Muller JG, and Mullerhermelink HK (1997) Blastoid variants of mantle cell lymphoma: Frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. Blood 89: 1421-1429.

244. Paszekvigier M, Talmant P, Mechinaud F, Garand R, Harousseau JL, Bataille R, and Avetloiseau H (1997) Comparative genomic hybridization is a powerful tool, complementary to cytogenetics, to identify chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Br.J.Haematol. 99 (3): 589-596.

245. Pedersen-Bjergaard J and Andersen MK (1998) Secondary or therapy-related MDS and AML and their chromosome aberrations: important to study but difficult to establish causality. Haematologica 83 (6): 481-482.

246. Pedersen-Bjergaard J, Pedersen M, Roulston D, and Philip P (1995) Different genetic pathways in leukemogenesis for patients presenting with therapy-related myelodysplasia and therapy-related acute myeloid leukemia. Blood 86 (9): 3542-3552.

247. Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Larsen SO, Jensen G, and Byrsting K (1990) Chromosome aberrations and prognostic factors in therapy-related myelodysplasia and acute nonlymphocytic leukemia. Blood 76 (6): 1083-1091.

248. Perentesis JP (1997) Why is age such an important independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia? Leukemia 11 Suppl 4: S4-S7.

249. Peters K, Zettl A, Starostik P, Greiner A, Rosenwald A, Katzenberger T, Ott G, and Muller-Hermelink HK (2000) Genetic imbalances in primary gastric diffuse large B-cell lymphomas: comparison of comparative genomic hybridization, microsatellite, and cytogenetic analysis. Diagn.Mol.Pathol. 9 (1): 58-65.

250. Pihan GA and Doxsey SJ (1999) The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. Semin.Cancer Biol. 9 (4): 289-302.

251. Pinkel D (1992) Therapy of acute lymphoid leukemia in children. Leukemia 6 Suppl. 2: 127-131.

252. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, and Albertson DG (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat.Genet. 20 (2): 207-211.

253. Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Waldman FM, Gray JW, and Pinkel D (1995) Computer image analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry 19: 10-26.

254. Promega, ReadyAmp Genomic DNA Purification System, Cat.A7710. 1995. *Technical Bulletin.*

255. Pui C-H (1995) Childhood leukemias--current status and future perspective. Chung Hua Min Kuo Hsiao.Erh Ko I.Hsueh Hui.Tsa Chih 36 (5): 322-327.

256. Pui C-H, Behm FG, and Crist WM (1993) Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 82: 343-362.

257. Pui C-H, Crist WM, and Look AT (1990a) Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 76: 1449-1463.

258. Pui C-H, Raimondi SC, Dodge RK, Rivera GK, Fuchs LAH, Abromowitch M, Look AT, Furman WL, Crist WM, and Williams DL (1989) Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploidy (>50 chromosomes) acute lymphoblastic leukemia. Blood 73: 1963-1967.

259. Pui C-H, Raimondi SC, Hancock ML, Rivera GK, Ribeiro RC, Mahmoud HH, Sandlund JT, Crist WM, and Behm FG (1994) Immunologic, cytogenetic, and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1;19)(q23; p13) or its derivative. J.Clin.Oncol. 12: 2601-2606.

260. Pui CH, Carroll AJ, Head D, Raimondi SC, Shuster JJ, Crist WM, Link MP, Borowitz MJ, Behm FG, and Land VJ (1990b) Near-triploid and near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia of childhood. Blood 76 (3): 590-596.

261. Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC, Schell MJ, Head DR, Shuster JJ, Crist WM, Borowitz MJ, Link MP, Behm FG, and . (1992) Isochromosomes in childhood acute lymphoblastic leukemia: a collaborative study of 83 cases. Blood 79 (9): 2384-2391.

262. Pui CH, Raimondi SC, and Williams DL (1988) Isochromosome 17q in childhood acute lymphoblastic leukemia: an adverse cytogenetic feature in association with hyperdiploidy? Leukemia 2 (4): 222-225.

263. Pui CH, Williams DL, Raimondi SC, Rivera GK, Look AT, Dodge RK, George SL, Behm FG, Crist WM, and Murphy SB (1987) Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 70 (1): 247-253.

264. Qiagen Genomic DNA Handbook. 1995.

265. Ragione FD and Iolascon A (1997) Inactivation of cyclin-dependent kinase inhibitor genes and development of human acute leukemias. Leuk.Lymphoma 25 (1-2): 23-35.

266. Raimondi SC (1993) Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 81: 2237-2251.

267. Raimondi SC, Pui C-H, Hancock ML, Behm FG, Filatov L, and Rivera GK (1996) Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 10: 213-224.

268. Raimondi SC, Roberson PK, Pui CH, Behm FG, and Rivera GK (1992) Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. Blood 79 (12): 3245-3252.

269. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, Louie DC, Popplewell L, Offit K, Jhanwar SC, and Chaganti RS (1998) Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. Blood 92 (1): 234-240.

270. Rasnick D and Duesberg PH (1999) How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer Achtung Duesberg. Biochem.J. 340 (Pt 3): 621-630.

271. Rew DA (1994) Significance of aneuploidy. Br.J.Surg. 81 (10): 1416-1422.

272. Rice M, Breen CJ, O'Meara A, Breatnach F, O'Marcaigh AS, and Stallings RL (2000) Comparative genomic hybridization in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatr.Hematol.Oncol. 17 (2): 141-147.

273. Rieder H, Ludwig W-D, Gassmann W, Thiel E, Löffler H, Hoelzer D, and Fonatsch C (1993) Chromosomal abnormalities in adult ALL: Results of the BMFT ALL/AUL study group. Recent Results Cancer Res. 131: 133-147.

274. Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, and Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J.Mol.Biol. 113 (1): 237-251.

275. Ritterbach J, Hiddemann W, Beck JD, Schrappe M, Jankaschaub G, Ludwig WD, Harbott J, and Lampert F (1998) Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescence in situ hybridization (FISH). Leukemia 12 (3): 427-433.

276. Rivera GK, Raimondi SC, Hancock ML, Behm FG, Pui CH, Abromowitch M, Mirro J, Ochs JS, Look AT, Williams DL, and . (1991) Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. Lancet 337 (8733): 61-66.

277. Rohatiner AZS and Lister TA (1993) The challenge of acute lymphoblastic leukaemia in adults. Br.J.Haematol. 85: 641-645.

278. Rosenberg C, Schut TB, Mostert MC, Tanke HJ, Raap AK, Oosterhuis JW, and Looijenga LH (1997) Comparative genomic hybridization in hypotriploid/hyperdiploid tumors. Cytometry 29 (2): 113-121.

279. Rowley JD (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. Nature 243: 290-293.

280. Rowley JD (1978) Abnormalities of chromosome No. 1: significance in malignant transformation. Virchows Arch.B Cell Pathol. 29 (1-2): 139-144.

281. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 (4839): 487-491.

282. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230 (4732): 1350-1354.

283. Salisbury JL, Whitehead CM, Lingle WL, and Barrett SL (1999) Centrosomes and cancer. Biol.Cell 91 (6): 451-460.

284. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, and Raffeld M (1993) p53 Mutation is associated with progression in follicular lymphomas. Blood 82: 1994-2004.

285. Schlegelberger B, Himmler A, Godde E, Grote W, Feller AC, and Lennert K (1994) Cytogenetic findings in peripheral T-cell lymphomas as a basis for distinguishing low-grade and high-grade lymphomas. Blood 83 (2): 505-511.

286. Scholz I, Popp S, Granzow M, Schoell B, Holtgreve-Grez H, Takeuchi S, Schrappe M, Harbott J, Teigler-Schlegel A, Zimmermann M, Fischer C, Koeffler HP, Bartram CR, and Jauch A (2001) Comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia: correlation with interphase cytogenetics and loss of heterozygosity analysis. Cancer Genet.Cytogenet. 124 (2): 89-97.

287. Secker-Walker LM (1990) Prognostic and biological importance of chromosome findings in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 49: 1-13.

288. Secker-Walker LM, Chessells JM, Stewart EL, Swansbury GJ, Richards S, and Lawler SD (1989) Chromosomes and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukaemia: a long-term follow-up. Br.J.Haematol. 72: 336-342.

289. Secker-Walker LM, Lawler SD, and Hardisty RM (1978) Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia. BMJ2: 1529-1530.

290. Secker-Walker LM, Prentice HG, Durrant J, Richards S, Hall E, and Harrison G (1997) Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. Br.J.Haematol. 96: 601-610.

291. Sen S (2000) Aneuploidy and cancer. Curr.Opin.Oncol. 12 (1): 82-88.

292. Sen S, Zhou H, and White RA (1997) A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. Oncogene 14 (18): 2195-2200.

293. Shabtai F, Lewinski UH, Har-Zahav L, Gafter U, Halbrecht I, and Djaldetti M (1979) A hypodiploid clone and its duplicate in acute lymphoblastic leukemia. Am.J.Clin.Pathol. 72 (6): 1018-1024.

294. Shackney SE, Smith CA, Miller BW, Burholt DR, Murtha K, Giles HR, Ketterer DM, and Pollice AA (1989) Model for the genetic evolution of human solid tumors. Cancer Res. 49 (12): 3344-3354.

295. Sherratt T, Morelli C, Boyle JM, and Harrison CJ (1997) Analysis of chromosome 6 deletions in lymphoid malignancies provides evidence for a region of minimal deletion within a 2- megabase segment of 6q21. Chromosome.Res. 5: 118-124.

296. Shikano T, Kaneko Y, Takazawa M, Ueno N, Ohkawa M, and Fujimoto T (1986) Balanced and unbalanced 1;19 translocation-associated acute lymphoblastic leukemias. Cancer 58 (10): 2239-2243.

297. Smets LA, Homan-Blok J, Hart A, de Vaan G, Behrendt H, Hahlen K, and de Waal FJ (1987) Prognostic implication of hyperdiploidy as based on DNA flow cytometric measurement in childhood acute lymphocytic leukemia--a multicenter study. Leukemia 1 (3): 163-166.

298. Smets LA, Slater R, van Wering ER, Does-van den Berg A, Hart AA, Veerman AJ, and Kamps WA (1995) DNA index and %S-phase cells determined in acute lymphoblastic leukemia of children: a report from studies ALL V, ALL VI, and ALL VII (1979-1991) of the Dutch Childhood Leukemia Study Group and The Netherlands Workgroup on Cancer Genetics and Cytogenetics. Med.Pediatr.Oncol. 25 (6): 437-444.

299. Smets LA, Slater RM, Behrendt H, Van't Veer MB, and Homan-Blok J (1985) Phenotypic and karyotypic properties of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia of childhood. Br.J.Haematol. 61: 113-123.

300. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, Gelber R, Heerema N, Korn EL, Link M, Murphy S, Pui C-H, Pullen J, Reaman G, Sallan SE, Sather H, Shuster J, Simon R, Trigg M, Tubergen D, Uckun F, and Ungerleider R (1996) Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. J.Clin.Oncol. 14: 18-24.

301. Snow EC (1997) The role of c-myc during normal B cell proliferation, and as B cells undergo malignant transformation. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 224: 211-220.

302. Solinastoldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, and Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. Gene Chromosome.Cancer 20 (4): 399-407.

303. Somasundaram K (2000) Tumor suppressor p53: regulation and function. Front Biosci. 5: D424-D437.

304. Speicher MR, Du Manoir S, Schröck E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, and Ried T (1993) Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin- embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. Hum.Mol.Genet. 2: 1907-1914.

305. Stamberg J, Shende A, and Lanzkowsky P (1986) Somatic shift to homozygosity for a chromosomal polymorphism in a child with acute lymphoblastic leukemia. Blood 67: 350-353.

306. Stary J, Hrodek O, Hausner P, Petrakova A, Goetz P, and Kreuger A (1990) The importance of blast cell DNA content for prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. Neoplasma 37 (3): 293-299.

307. Stein H, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, and Foss H-D (1997) Non-Hodgkin-Lymphome. Der lange Weg zu einer weltweit einheitlichen Klassifikation. Onkologe 5 (3): 488-497.

308. Stewart EL and Secker-Walker LM (1986) Detection of the chromosomally abnormal clone in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 23: 25-35.

309. Swansbury GJ, Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM, Sallan SE, Garson OM, and Sakurai M (1981) Chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia of childhood: an independent prognostic factor. Lancet 2 (8240): 249-250.

310. Synold TW, Relling MV, Boyett JM, Rivera GK, Sandlund JT, Mahmoud H, Crist WM, Pui CH, and Evans WE (1994) Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. J.Clin.Invest 94 (5): 1996-2001.

311. Takeuchi S, Koike M, Seriu T, Bartram CR, Schrappe M, Reiter A, Park S, Taub HE, Kubonishi I, Miyoshi I, and Koeffler HP (1998) Frequent loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6: identification of two distinct regions of deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res. 58 (12): 2618-2623.

312. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Collins C, Stokke T, Karhu R, Kowbel D, Shadravan F, Hintz M, Kuo W-L, Waldman FM, Isola JJ, Gray JW, and Kallioniemi O-P (1994) Increased copy number at 20q13 in breast cancer: Defining the critical region and exclusion of candidate genes. Cancer Res. 54: 4257-4260.

313. Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder B, and Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics 13: 718-725.

314. Testa JR, Oguma N, Pollak A, and Wiernik PH (1983) Near-tetraploid clones in acute leukemia. Blood 61 (1): 71-78.

315. Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia (1981b) Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia, 1980 - Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia: structural and numerical changes in 234 cases. Cancer Genet.Cytogenet. 4: 101-110.

316. Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia (1981a) Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia, 1980 - Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 4: 111-137.

317. Tosi S, Ritterbach J, Maglia O, Harbott J, Riehm H, Masera G, Biondi A, and Lampert F (1994) Double target in situ hybridization applied to the study of numerical aberrations in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 73: 103-108.

318. Trueworthy R, Shuster J, Look T, Crist W, Borowitz M, Carroll A, Frankel L, Harris M, Wagner H, Haggard M, Mosijczuk A, Pullen J, Steuber P, and Land V (1992) Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: A Pediatric Oncology Group study. J.Clin.Oncol. 10: 606-613.

319. Trujillo JM, Cork A, Drewinko B, Hart JS, and Freireich EJ (1971) Case report: tetraploid leukemia. Blood 38 (5): 632-637.

320. Tsuchiya H, Matsuda I, and Kaneko Y (1991) Why does childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperdiploidy show a favorable prognosis. Cancer Genet.Cytogenet. 50: 273-275.

321. Tsutsui T, Maizumi H, and Barrett JC (1984) Colcemid-induced neoplastic transformation and aneuploidy in Syrian hamster embryo cells. Carcinogenesis 5 (1): 89-93.

322. Tura S, Mazza P, Lauria F, Fiacchini M, Pileri S, Poletti G, Gherlinzoni F, Cantore M, and Bandini G (1985) Non-Hodgkin's lymphomas in leukaemic phase: incidence, prognosis and therapeutic implications. Scand.J.Haematol. 35 (2): 123-131.

323. Van der Plas DC, Hählen K, and Hagemeijer A (1992) Prognostic significance of karyotype at diagnosis in childhood acute lymphoblastic anemia. Leukemia 6: 176-184.

324. Verma A and Stock W (2001) Management of adult acute lymphoblastic leukemia: moving toward a risk-adapted approach. Curr.Opin.Oncol. 13 (1): 14-20.

325. Vineis P, Masala G, and Costantini AS (1999) Does a gene in the Xq28 region increase the risk of non-Hodgkin's lymphomas? Working Group for the Epidemiology of Hematolymphopoietic Malignancies in Italy. Ann.Oncol. 10 (4): 471-473.

326. Visani G, Bernasconi P, Boni M, Castoldi GL, Ciolli S, Clavio M, Cox MC, Cuneo A, Del Poeta G, Dini D, Falzetti D, Fanin R, Gobbi M, Isidori A, Leoni F, Liso V, Malagola M, Martinelli G, Mecucci C, Piccaluga PP, Petti MC, Rondelli R, Russo D, Sessarego M, Specchia G, Testoni N, Torelli G, Mandelli F, and Tura S (2001) The prognostic value of cytogenetics is reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia--analysis of 848 patients. Leukemia 15 (6): 903-909.

327. Voullaire L, Wilton L, Slater H, and Williamson R (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. Prenat.Diagn. 19 (9): 846-851.

328. Walker H, Smith FJ, and Betts DR (1994) Cytogenetics in acute myeloid leukaemia. Blood Rev. 8 (1): 30-36.

329. Walsh PS, Metzger DA, and Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 10 (4): 506-513.

330. Walters R, Kantarjian HM, Keating M, Estey E, Beran M, Andersson BS, Koller C, and Freireich E (1987) Response and prognosis related to pretreatment bone marrow cytogenetics in adult acute lymphocytic leukemia. Blood 70 ((abstr. suppl 1)): 212a.

331. Walters R, Kantarjian HM, Keating MJ, Estey EH, Trujillo J, Cork A, McCredie KB, and Freireich EJ (1990) The importance of cytogenetic studies in adult acute lymphoblastic leukemia. Am.J.Med. 89: 579-587.

332. Weber RG, Scheer M, Born IA, Joos S, Cobbers JMJL, Hofele C, Reifenberger G, Zoller JE, and Lichter P (1998) Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy material from oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection, universal DNA amplification, and comparative genomic hybridization. Am.J.Pathol. 153 (1): 295-303.

333. Weber T, Weber RG, Kaulich K, Actor B, Meyer-Puttlitz B, Lampel S, Buschges R, Weigel R, Deckert-Schluter M, Schmiedek P, Reifenberger G, and Lichter P (2000) Characteristic chromosomal imbalances in primary central nervous system lymphomas of the diffuse large B-cell type. Brain Pathol. 10 (1): 73-84.

334. Weinberg RA (1994) Oncogenes and tumor suppressor genes. CA Cancer J.Clin. 44 (3): 160-170.

335. Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, and van Diest PJ (1999) Comparative genomic hybridisation. Mol.Pathol. 52 (5): 243-251.

336. Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, and Delhanty JD (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. Nucleic Acids Res. 27 (4): 1214-1218.

337. Werner CA, Dohner H, Barth TF, Stilgenbauer S, Plesch A, Lichter P, and Bentz M (1998) Molecular cytogenetic analysis of low-grade B-cell neoplasias: a comparative genomic hybridization study. Recent Results Cancer Res. 144: 53-60.

338. Werner CA, Döhner H, Joos S, Trumper LH, Baudis M, Barth TFE, Ott G, Moller P, Lichter P, and Bentz M (1997) High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-Cell neoplasms. Am.J.Pathol. 151: 335-342.

339. Whitehead VM, Vuchich MJ, Cooley LD, Lauer SJ, Mahoney DH, Shuster JJ, Payment C, Koch PA, Akabutu JJ, Bowen T, Kamen BA, Ravindranath Y, Emami A, Look AT, Beardsley GP, Pullen DJ, and Camitta B (1998) Accumulation of methotrexate polyglutamates, ploidy and trisomies of both chromosomes 4 and 10 in lymphoblasts from children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group study. Leuk.Lymphoma 31 (5-6): 507-519.

340. Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ, Mahoney D, Carroll AJ, Shuster JJ, Esseltine DW, Payment C, Look AT, and Akabutu J (1992) Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. Blood 80 (5): 1316-1323.

341. Willard JM, Lee DA, and Holland MM (1998) Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. Methods Mol.Biol. 98: 9-18.

342. Williams DL, Harber J, Murphy SB, Look AT, Kalwinsky DK, Rivera GK, Melvin SL, Stass S, and Dahl GV (1986) Chromosomal translocations play a unique role in influencing prognosis in childhood acute leukemia. Blood 68: 205-212.

343. Williams DL, Harris A, Williams KJ, Brosius MJ, and Lemonds W (1984) A direct bone marrow chromosome technique for acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 13: 239-257.

344. Williams DL, Raimondi S, Rivera G, George S, Berard CW, and Murphy SB (1985) Presence of clonal chromosome abnormalities in virtually all cases of acute lymphoblastic leukemia [letter]. N.Engl.J.Med. 313 (10): 640-641.

345. Williams DL et al (1990) Evolving chromosome patterns and new cytogenetic concepts in childhood acute lymphoblastic leukemia. In Gale RP, Hoelzer D (eds) Acute Lymphoblastic Leukemia - UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, new ser., v. 108, 1 ed. New York: Liss.

346. Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, Look AT, Melvin SL, Bowman WP, Kalwinsky DK, Rivera GK, and Dahl GV (1982) Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. Blood 60: 864-871.

347. Williams JF (1989) Optimization strategies for the polymerase chain reaction. BioTechniques 7 (7): 762-769.

348. Wilmanns W (1967) Die Thymidinkinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen. Klin.Wschr. 45: 505-511.

349. Wong KF and Kwong YL (2000) Isochromosome 8q is a marker of secondary acute myeloid leukemia [letter]. Cancer Genet.Cytogenet. 120 (2): 171-173.

350. Wong N, Chen SJ, Cao Q, Su XY, Niu C, Wu QW, Leung TT, Wickham N, Johnson PR, and Chen Z (1998) Detection of chromosome over- and underrepresentations in hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia by comparative genomic hybridization. Cancer Genet.Cytogenet. 103 (1): 20-24.

351. Xue Y, He J, Wang Y, Guo Y, Xie X, He Y, Chai Y, and Ruan Z (2000) Secondary near-pentaploidy and/or near-tetraploidy characterized by the duplication of 8;21 translocation in the M2 subtype of acute myeloid leukemia. Int.J.Hematol. 71 (4): 359-365.

352. Xue Y, Pan Y, Liu Z, Li J, Guo Y, and Xie X (1996) Tetraploid or near-tetraploid clones characterized by two 8;21 translocations and other chromosomal abnormalities in two patients with acute myeloblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet. 92 (1): 18-23.

353. Yamaguchi H, Inokuchi K, Hanawa H, Tanosaki S, Shinozawa I, Matuoka H, and Dan K (1999) Establishment of a near-triploid human B-cell lymphoma cell line with t(14;18) and a p53 gene point mutation. Br.J.Haematol. 105 (3): 764-767.

354. Zelante L, Perla G, Bodenizza C, Greco MM, Carotenuto M, and Dallapiccola B (1988) Tetraploidy (92,XXYY) in an acute nonlymphocytic leukemia (M1) patient following autologous bone marrow transplantation. Cancer Genet.Cytogenet. 36 (1): 69-75.

355. Zhang L, Taub JW, Williamson M, Wong SC, Hukku B, Pullen J, Ravindranath Y, and Matherly LH (1998) Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. Clin.Cancer Res. 4 (9): 2169-2177.

356. Zhang Y, Matthiesen P, Harder S, Siebert R, Castoldi G, Calasanz MJ, Wong KF, Rosenwald A, Ott G, Atkin NB, and Schlegelberger B (2000) A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. Genes Chromosomes.Cancer 27 (1): 52-58.

357. Zhao N, Lai F, Fernald AA, Eisenbart JD, Espinosa R, Wang PW, and Le Beau MM (1998) Human CDC23: cDNA cloning, mapping to 5q31, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. Genomics 53 (2): 184-190.

358. Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, and Sen S (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation [see comments]. Nat.Genet. 20 (2): 189-193.

359. Zitzelsberger H, Lehmann L, Werner M, and Bauchinger M (1997) Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. Histochem.Cell Biol. 108 (4-5): 403-417.

360. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, and Kirschner MW (1999) Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis [see comments]. Science 285 (5426): 418-422.

7 Anhang

7.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Achim Teichgraeber
Wohnort:	Gerberstr. 29
	77652 Offenburg
Geburtstag und-ort:	10.04.1970 in Stuttgart
Familienstand:	ledig, keine Kinder

Schulbildung

1976–1980	Grundschule in Schwäbisch Gmünd und Waiblingen
1980–1989	Staufer-Gymnasium Waiblingen
26.04.1989	Abitur

Studium und Berufsausbildung

09/1989–11/1991	Biologiestudium an der Universität Tübingen
18.11.1991	Vordiplom in Biologie
12/1991–02/1993	Klavierstudium an der Musikakademie Tübingen
03/1993–03/1999	Medizinstudium an der Universität Marburg
04/1999–05/2000	Praktisches Jahr im Bürgerhospital Stuttgart:
	Psychiatrie bei Prof. Dr. Täschner
	Innere bei Prof. Dr. Wedler
	Chirurgie bei Prof. Dr. Strosche im Krankenhaus Feuerbach
3.05.2000	3.Staatsexamen
11/2000-10/2001	AiP in der Abteilung für Neurologie des Städtischen Klinikum Pforzheim bei Prof. Dr. Kaiser
12/2001-5/2002	AiP in der Psychosomatischen Klinik Kinzigtal in Gengenbach
seit 7/2002	Assistenzarzt in der Psychosomatischen Klinik Kinzigtal in Gengenbach

7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Beato, Berger, Bien, Beato, Blankenburg, Brilla, Daume, Daut, Drenckhahn, Effendy, Emons, Fruhsdorfer, Ganz, Gemsa, Geus, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Grzeschik, Happle, Havemann, Hilgermann, Himmelmann, Joseph, Kaffarnik, Kern, Kleinsasser, Klose, Koolmann, Krause, Kretschmer, Drieg, Kummer, Kuni, Kußmann, Lang, Lange, Lauer, Lennartz, Lorenz, Lührmann, Maisch, Mannheim, Mannherz, Moosdorf, Netter, Oertel, Pfab, Pohlen, Rehder, Remschmidt, Richter, Rieder, Riedmiller, Rieger, Rothmund, Schäfer, Schmidt-Rohde, Schmitz-Moormann, Schneider, Schüffel, Seitz, Slenzka, Steiniger, Sturm, Thomas, Unsicker, v. Wichert, Voigt, Wiegand, Zwiorek.

7.3 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei

- PD Dr. Harald Rieder für die Überlassung des Themas und die fachlich und menschlich großartige Betreuung.
- allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Institut für Klinische Genetik für die freundliche Aufnahme und das gute Arbeitsklima, besonders Harald Balz, Alice Warnowitz und Ina Bachmann für die geduldige Einarbeitung, die Hilfe bei der Chromosomen- und DNA-Aufbereitung und die Hilfe bei allen computertechnischen Dingen.
- meinen Eltern, die mich auf meinen bisherigen Wegen und Umwegen immer unterstützt und begleitet haben, meinem Vater für das Korrekturlesen.
- Jutta für die Geduld und alles andere.

7.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) zur Aufklärung genomischer Imbalancen bei hämatologischen Neoplasien mit Chromosomensätzen über 50 Elemente“ im Med. Zentrum für Humangenetik, Abteilung für Tumorzytogenetik unter der Leitung von PD Dr. Harald Rieder ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.