

Untersuchungen zur Verbesserung der zytogenetischen Diagnostik bei Lymphomen und Leukämien

Dissertation

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur
Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D 386)

Vorgelegt von
Dipl.-Biol. Katrin Kießner

Kaiserslautern 2004

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23. März 2004

Prüfungskommission:

Vorsitz:	Prof. Dr. H. J. Schmidt
Betreuer:	Prof. Dr. Dr. H. Zankl
Korreferent:	Prof. Dr. J. A. Cullum

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Heinrich Zankl. Neben der bereitwilligen Übernahme der „Doktorvaterschaft“, der Vergabe des interessanten Themas, der freundlichen Betreuung und wertvollen Hilfestellung zur Verfassung der vorliegenden Arbeit, ging sein Engagement weit über deren Problematik hinaus. Seine Diskussionsbereitschaft hat immer wieder zu neuen Ideen und Anregungen geführt.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Wolfgang Peter für die stetigen Probenlieferungen aus Dortmund, die Nachforschungen bezüglich der Diagnosen und die guten Denkanstöße.

Dem Fachbereich Physik, insbesondere Dr. Hans-Jochen Foth und Dirk Hüttenberger, ein großes Dankeschön für die gute Zusammenarbeit und den vielen Hilfestellungen beim Umbau des technischen Mikroskops für die SKY-Anwendung.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Genetik, insbesondere bei dem Laborleiter Dr. Bernhard Thiele, für die vertrauensvollen Einblicke in die Patientendaten und den vielen fachspezifischen Diskussionen. Bei Frank Glaab, Ines Hofmann, die mir auch beim Korrekturlesen tatkräftig zur Seite stand, und Annette Wodsack für die stete Bereitschaft Untersuchungsmaterial und Befunde an mich weiterzuleiten. Ihre Kommunikationsfreudigkeit und Bemühungen Daten ausfindig zu machen, haben mir die Arbeit erheblich erleichtert.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Humanbiologie und Humangenetik bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung und interessanten Erfahrungsaustausche, die immer wieder zur Verfeinerung des Methodenteils führten.

Ganz besonders danke ich Robert Lahr, der neben dem unendlichen Korrekturlesen besonders durch seine PC-Fachkenntnisse unersetzbar war. Unserer gemeinsamen Tochter ein liebes Dankeschön für die schöne Abwechslung.

Einen herzlichen Dank auch an meine Eltern und Freunde, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Tochter Leonie und
ihrem spaßigen Papa

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
EINFÜHRUNG	1
FRAGESTELLUNGEN.....	3
1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
1.1 Maligne Entartung des blutbildenden Systems.....	4
1.2 Maligne Entartung des lymphatischen Systems.....	5
1.3 Leukämie	7
1.3.1 Diagnostik von Leukämien	7
1.3.2 Myeloische Leukämien.....	8
1.3.3 Lymphatische Leukämien.....	11
1.4 Maligne Lymphome	11
1.4.1 Diagnostik von Lymphomen.....	12
1.4.2 Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphomen	12
1.5 Die chronisch lymphatische Leukämie (B-CLL)	14
1.5.1 Klinische Symptomatik.....	14
1.5.2 Diagnostik.....	15
1.5.3 Verlauf und Prognose.....	15
1.5.4 Pathogenese	16
1.5.5 Zellkinetik	17
1.5.6 Molekulare Alteration von B-CLL-Zellen	17
1.5.7 Immunregulation in B-CLL-Zellen	18
1.5.8 Adhäsionsmoleküle.....	19

1.6	Tumorzytogenetik.....	19
1.6.1	Die Zytogenetik von Leukämien und Lymphomen.....	19
1.6.2	Die häufigsten Chromosomenaberrationen bei Leukämien und Lymphomen	20
1.6.2.1	Charakteristische zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei akuten myeloischen Leukämien (AML)	21
1.6.2.2	Charakteristische zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei myelodysplastischen Syndromen (MDS).....	21
1.6.2.3	Charakteristische zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML)	23
1.6.2.4	Charakteristische zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe	24
1.6.3	Die Trisomie 12 bei der B-CLL.....	26
1.7	Methoden der Zytogenetik	28
1.7.1	Konventionelle Bänderungs-Zytogenetik.....	28
1.7.2	Molekulare Zytogenetik.....	29
1.7.2.1	Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	29
1.7.2.2	Die Interphasezytogenetik mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung.....	30
1.7.2.3	FICTION-Technik (Fluorescence-Immunophenotyping and Interphase Cytogenetic as a Tool for Investigation of Neoplasms)	30
1.7.2.4	Vielfarben-FISH Verfahren.....	30
1.7.2.5	<i>Spectral Karyotyping</i> (SKY)	32
1.8	Kultivierung von Tumorzellen	34
1.8.1	Kultivierung von malignen B-Zellen	35
1.8.2	Thioredoxin	36
2	MATERIAL UND METHODEN	37
	Schwerpunkt: FICTION.....	37
2.1	Numerische Chromosomenanalyse des Chromosoms 12 in CD20 positiven B-Zellen mittels FICTION-Technik.....	37

2.1.1	Untersuchungsmaterial und Patientenprofile.....	37
2.1.2	Verwendete Materialien und Geräte	39
2.1.3	Verwendete Reagenzien	40
2.1.4	Durchführung der FICTION-Technik.....	41
2.1.4.1	Präparateherstellung	41
2.1.4.2	Immunfärbung mit dem CD20 Antikörper zur Markierung der B-Zellen.....	41
2.1.4.3	FISH mit der Chromosomen 12 α -Satelliten-Sonde (D12Z3)	42
	Schwerpunkt: SKY	44
2.2	Einsatz der SKY-Technik zur Analyse verschieden aberranter Karyotypen	44
2.2.1	Untersuchungsmaterial und Patientenprofile.....	44
2.2.2	Verwendete Materialien und Geräte	46
2.2.3	Verwendete Reagenzien	46
2.2.4	Durchführung des Spectral Karyotyping (SKY).....	47
2.2.4.1	Herstellung der Präparate	47
2.2.4.2	Hybridisierung.....	47
	Schwerpunkt: KULTIVIERUNG.....	50
2.3	Kultivierungsversuche an malignen B-Zellen von NHL-Patienten	50
2.3.1	Untersuchungsmaterial und Patientenprofile.....	50
2.3.2	Kultivierungsschemen	52
2.3.3	Verwendete Materialien und Geräte	53
2.3.4	Verwendete Reagenzien	54
2.3.5	Durchführung der Kultivierungsversuche.....	54
2.3.5.1	Herstellung von konditioniertem ISCOVE-Medium mit MP-6-Zellen	55
2.3.5.2	Lebend-Tot-Bestimmung mit Ethidiumbromid/Acridinorange	55
2.3.5.3	Kulturansätze	56
2.3.5.4	Zellaberntung und Herstellung von Metaphasenpräparaten.....	56

3	ERGEBNISSE	58
	Schwerpunkt: FICTION	58
3.1	FICTION-Analyse	58
3.1.1	Ermittlung des cut off levels hinsichtlich der Anzahl der Chromosomen 12 in CD20 positiven B-Zellen	58
3.1.2	Ergebnisse der Signalanzahl für die Chromosomen 12 in CD20 positiven Zellen der Patientenproben	60
3.1.3	Beobachtung der Entwicklung eines Trisomie 12 Klons über ein Jahr	62
	Schwerpunkt: SKY	63
3.2	SKY-Analyse	63
3.2.1	Etablierung der SKY-Technik	63
3.2.2	Ergebnisse der SKY-Analysen	63
3.2.3	Die Ergebnisse der SKY-Analysen im Überblick	109
	Schwerpunkt: KULTIVIERUNG	110
3.3	Kultivierungsversuche	110
3.3.1	Ergebnisse der Lebend-Tot-Bestimmungen - Gruppe I	110
3.3.2	Ergebnisse des Mitoseindices in den einzelnen Kulturen - Gruppe I	112
3.3.3	Vergleich der Anzahl numerisch unauffälliger und aberranter Metaphasen in den Kulturansätzen B und D bei zytogenetischen Mosaikbefunden	114
3.3.4	Ergebnisse des Mitoseindices in den einzelnen Kulturen - Gruppe II	116
4	DISKUSSION	118
	Schwerpunkt: FICTION	118
4.1	Die FICTION-Technik und ihr Einsatzgebiet	118
4.1.1	Ermittlung des cut off levels für die FICTION-Methode zur Detektion einer Trisomie oder Monosomie 12	121
4.1.1.1	Ausschluss einer Monosomie 12 bei B-CLL Patienten mittels FICTION	121

4.1.1.2	Untersuchung der Trisomie 12 bei B-CLL Patienten mittels FICTION	122
4.1.2	Die Trisomie 12 in atypischen B-CLL-Fällen	123
4.1.3	Beobachtung der Entwicklung der Trisomie 12 über die Zeit	124
4.1.4	Trisomie 12, eine primäre oder sekundäre Aberration?	126
4.1.5	Weitere Aberrationen im Zusammenhang mit dem Chromosom 12	126
4.1.6	Die Trisomie 12 und ihre Assoziation zur UM (nicht mutierte)-CLL	127
	Schwerpunkt: SKY	128
4.2	Die SKY-Technik in der Tumorzytogenetik	128
4.2.1	Die SKY-Technik verspricht zusätzliche zytogenetische Informationen ...	128
4.2.1.1	Anwendung der SKY-Analyse bei komplex aberranten Karyotypen	129
4.2.1.2	Korrektur des G-Bandenbefundes nach der SKY-Analyse	130
4.2.1.3	Identifizierung von Markerchromosomen mittels SKY	132
4.2.1.4	SKY deckt bei aberranten Karyotypen weitere zytogenetische Aberrationen auf	134
4.2.2	SKY-Analyse bei B-Zell Neoplasien	134
4.2.3	Limitation der SKY-Technik	135
4.2.3.1	SKY-Analyse bei intrachromosomalen Veränderungen	135
4.2.3.2	SKY-Analyse bei Translokationen mit subtilen Chromosomensegmenten	137
4.2.4	Identifizierung neuer Chromosomenaberrationen mittels SKY	139
4.2.4.1	Die Translokation t(3;21)(q26;q22) in myeloischen Neoplasien	140
4.2.4.2	Die Translokation t(3;17) bei der B-CLL	141
4.2.5	Methodenvergleich: Konventionelle Zytogenetik - Spectral Karyotyping	141
4.2.5.1	SKY-Analysen zur Erweiterung zytogenetischer Befunde	141
4.2.5.2	Einsatz von SKY in der Routine	142
	Schwerpunkt: KULTIVIERUNG	144
4.3	Kultivierung von B-CLL-Zellen	144
4.3.1	Kultivierung mit konditioniertem Medium	144

4.3.2	Kultivierung von B-Zellen mit MP-6 Zellen konditioniertem ISCOVE-Medium und dem Phorbolster TPA.....	145
4.3.3	Thioredoxin verlängert das Überleben von B-CLL-Zellen	147
4.3.4	Lebend-Tot-Bestimmung vor und nach der Kultivierung von B-Zellen....	148
4.3.5	Stimulation der neoplastischen B-Zellen.....	149
4.3.6	B-Zellen Proliferation nach optimaler Mitogenstimulation	149
5	ZUSAMMENFASSUNG	151
6	AUSBLICK	153
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	155
8	WERDEGANG	173
9	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	175

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen	
a.dest	Aqua dest
Abb	Abbildung
aCLL	Atypische chronische lymphatische Leukämie
aCML	Atypische chronische myeloische Leukämie
add	Addition
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANLL	Akute nicht lymphatische Leukämie
ATM	Ataxia teleangiectasia
B-CLL	Chronisch lymphatische Leukämie der B-Zellreihe
B-NHL	Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
BSF	B-cell stimulatory factor
BT	Bicarbonat-Tween
bzw.	Beziehungsweise
CCD	Charge coupled devise
CD	Cluster of differentiation (Zelloberflächenantigene)
CGH	Comparative genomic hybridization
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMML	Chronische myelomonocytäre Leukämie
CMPE	Chronisch myeloproliferative Erkrankungen
CPL	Chronische Prolymphozytenleukämie
csb	Chromosomenbruch
Cy	Carbocyanin
Cys	Cystein
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
del	Deletion
der	Derivatchromosom
dic	dizentrisch
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
dmin	Double minutes
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure

dup	Duplikation
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EST	Unspezifische Esterase
ET	Essentielle Thrombocythämie
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FAB	French-american-british-cooperative group
FGF basic	Basic fibroblast growth factor
FICTION	Fluorescence-Immunophenotyping and Interphase Cytogenetic as a Tool for Investigation of Neoplasms
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Follikuläre Lymphome
G	Giemsa
g	Gramm
GCT	Giant cell tumor
geb.	geboren
GL	Gebrauchslösung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen colony stimulating factor
GTG	Giemsa-Trypsin-Giemsa
GZ	Gesamtzahl
Hb	Hämoglobin
i	Isochromosom
ID	Identifikation
I-FISH	Interphase-FISH
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ins	Insertion
inv	Inversion
JMML	Juvenile myelomonocytäre Leukämie
KM	Knochenmark
Ko	Kontrolle
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide von Escherichia coli
Lsg.	Lösung
m	männlich
MALT	Mucosa-Associated Lymphatic Tissue
mar	Markerchromosom
M-CLL	Hypermutierte CLL

MDS	Myelodysplastische Syndrome
M-FISH	multicolor-FISH
MHC	Major histocompatibility complex
MI	Mitoseindex
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NEZ	Nicht-erythroetische Zellen
OMC	Optimal mitogen combination
OPD	Optical path difference
OSM/OMF	Osteomyelosklerose/ Osteomyelofibrose
OT	Objektträger
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
PAS	Perjodschiffsäure
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potentia Hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
POX	Peroxidase
PV	Polycythämia vera
q	Langer Arm eines Chromosoms
Q	Quinacrin
r	reverse
R	Rezeptormolekül
RA	Refraktäre Anämie
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenbildung
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RCMD	Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie
REAL	Revised European American Lymphoma
RGB	Rot/grün/blau
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transkriptase-polymerase chain reaction
sAML	Sekundäre akute myeloische Leukämie
SCAN	Spectral color banding
SKY	Spectral Karyotyping
SSC	Saline sodium citrat
ST	Stammlösung
t	Translokation
Tab	Tabelle
t-AML	Therapie-resistente AML
ter	terminal

TNF	Tumor necrosis factor
TPA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (Phorbol ester)
TRX	Thioredoxin
UM-CLL	Nicht mutierte CLL
Upm	Umdrehungen pro Minute
V.a.	Verdacht auf
vgl.	vergleiche
V _H	Variable Domäne der schweren Kette der Immunglobuline
w	weiblich
WBC	White blood cell count
WHO	World health organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
Maße und Einheiten	
%	Prozent
>	Größer als
<	Kleiner als
μ	Mikro
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	Tag
Da	Dalton
dl	Deziliter
h	Stunden
k	kilo
kb	kilobasenpaare
l	Liter
M	Molar
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
sec	Sekunde

EINFÜHRUNG

Krebs ist keine einheitliche Krankheit, sondern ein Oberbegriff für mehr als hundert verschiedene Formen bösartiger maligner Erkrankungen. Nahezu jedes Gewebe unseres Körpers kann krebsartige Entartungen in mehreren unterschiedlichen Typen hervorbringen, wobei jede Erkrankung ihre eigenen Merkmale hat.

Trotz dieser Verschiedenartigkeit entstehen alle Tumore offenbar durch recht ähnliche grundlegende Prozesse. Die Ursache liegt in einer Veränderung des Erbguts von Körperzellen, die zu einer Fehlsteuerung des Zellwachstums oder des programmierten Zelltodes (Apoptose) führen.

Ein Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen und Krebs wurde bereits zu Beginn des vorherigen Jahrhunderts von Theodor Boveri vermutet. Mit seiner 1914 veröffentlichten Publikation „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“ hat er bereits ein Konzept entworfen, wonach ein Gleichgewicht der auf den Chromosomen lokalisierten Vererbungseinheiten die Voraussetzung für die Normalfunktion von Zellen und Organismen ist. Störungen dieses Gleichgewichts, z.B. durch Chromosomenaberrationen, die wiederum eine Genveränderung bewirken, können zur Tumorentstehung führen.

Drei große Gruppen von Genen sind dazu in der Lage: die **Protoonkogene**, deren Aktivierung das Krebswachstum begünstigen, die **Tumorsuppressorgene**, deren Ausfall den apoptotischen Zelltod verhindern und die **Mutatorgene**, deren Mutation zu einem Tumor führt. Mutatorgene haben eine übergeordnete Funktion für ein geordnetes Zusammenspiel im Gesamtgenom. Sie führen zu Veränderungen in der Replikation oder DNA-Reparatur. Typische Protoonkogene haben mit dem Zellwachstum und Zellzyklus zu tun. Zumeist handelt es sich um Gene, die Zelloberflächenrezeptoren, Zellzyklen, Signaltransduktionsproteine, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren bzw. deren Regulatoren kodieren. Tumorsuppressorgene hemmen normalerweise durch ihr Genprodukt die Zellproliferation. Sie kodieren für Transkriptionsfaktoren und Apoptose-Inhibitoren (Buselmaier, 1999).

Für das therapeutische Vorgehen und der prognostischen Einschätzung einer Krebserkrankung ist eine exakte Diagnose unerlässlich. Inzwischen gehört die tumorzytogenetische Untersuchung von Leukämien und Lymphomen zur Basisdiagnostik.

Ihre Geburtsstunde erfuhr die zytogenetische Tumordiagnostik mit der Identifizierung des Philadelphiachromosoms bei der chronisch myeloischen Leukämie im Jahre 1960. Die erste charakteristische Chromosomentranslokation eines malignen Lymphoms, die Translokation t(8;14), wurde 1976 beschrieben. Seitdem sind die Möglichkeiten der Chromosomenanalyse

von Leukämien und Lymphomen vielfältig verfeinert worden. Neben den klassischen Bändermethoden stehen heute eine Vielzahl spezifischer, molekularzytogenetischer Methoden zur Verfügung, mit deren Hilfe eine Reihe tumorassoziierter Chromosomenveränderungen identifiziert werden können. Diesen Chromosomenaberrationen wird als Diagnose- und Prognosefaktor zunehmend ein großer klinischer Stellenwert beigemessen. Insbesondere die Einführung der Vielfarben-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (1997) mit chromosomenspezifischen Painting- und Telomersonden eröffnete der Tumorzytogenetik neue Einblicke und Möglichkeiten bei der Dechiffrierung komplexer Karyotypanomalien. Es ist zu erwarten, dass dadurch das Spektrum der diagnostizierbaren krankheitsspezifischen Anomalien erheblich erweitert werden kann.

Dennoch ist die Tumorzytogenetik auch heute noch mit schwierigen technischen, analytischen und interpretatorischen Problemen konfrontiert. So setzt eine erfolgreiche Analyse eine Anreicherung von Metaphasen der entsprechenden Zellpopulationen voraus, die durch spezifische Stimulation erreicht werden kann. Auf Grund der speziellen Erfordernisse verschiedener Tumorgewebe an Wachstumsfaktoren ist die Schaffung selektiver Kulturbedingungen jedoch auch heute noch schwierig. Viele der neueren Methoden sind nach wie vor von der Metaphasengewinnung abhängig, so dass insbesondere die spezifische Zellkultivierung weiter verbessert und optimiert werden muss. Es sollte sichergestellt sein, dass die analysierten Metaphasen von der entsprechend stimulierten neoplastischen Zellpopulation stammen, so dass der erstellte Karyotyp auch tatsächlich dem der Tumorzellen entspricht.

FRAGESTELLUNGEN

Die vorliegende Arbeit sollte der Verbesserung der tumorzytogenetischen Lymphom- und Leukämiediagnostik dienen. Neuere molekularzytogenetische Untersuchungsmöglichkeiten wie die FICTION- und SKY-Technik kamen hierbei zum Einsatz. Auch eine neue Kultivierungsmöglichkeit zur Steigerung der Proliferationsaktivität maligner B-Zellen wurde entwickelt. Demnach gliedert sich die Arbeit in die folgenden drei Themenschwerpunkte:

- Schwerpunkt ***Fluorescence-Immunophenotyping and Interphase Cytogenetic as a Tool for Investigation of Neoplasms (FICTION)***:

Die FICTION-Technik wurde als Analyseverfahren zur Detektion der Trisomie 12 eingesetzt. Die Methode wurde an Blut-Ausstrichpräparaten von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (B-CLL) etabliert, um die Häufigkeit der Trisomie 12 in der ausgewählten Patientengruppe zu bestimmen und den Anteil des Trisomie 12 tragenden Klon unter den gesamten B-Zellen bei Trisomie 12 positiven B-CLL-Patienten zu ermitteln. Bei einem Patienten wurde der Trisomie 12 Klon über einen Zeitraum von einem Jahr wiederholt untersucht, um die Entwicklung des Klon beobachten zu können. Neben der Trisomie 12 wurde auch in dem ausgewähltem Patientenkollektiv ein mögliches Vorliegen einer Monosomie 12 untersucht.

- Schwerpunkt ***Spectral Karyotyping (SKY)***:

Nach Etablierung der SKY-Technik wurde sie zur Untersuchung komplex aberranter Karyotypen, sowie Karyotypen mit Markerchromosomen und Karyotypen mit fraglichen Aberrationen von Leukämie- und Lymphomzellen eingesetzt.

Ziel dabei war die Identifikation zusätzlicher und neuer Aberrationen, sowie der direkte Methodenvergleich zwischen der G-Bandenanalyse und dem *Spectral Karyotyping*. Der Vergleich der Möglichkeiten und Grenzen der SKY-Technik gegenüber der konventionellen G-Bandenanalyse war von besonderem Interesse, um den Einsatzbereich der SKY-Analyse bei tumorzytogenetischen Untersuchungen abzustecken.

- Schwerpunkt **Kultivierung**:

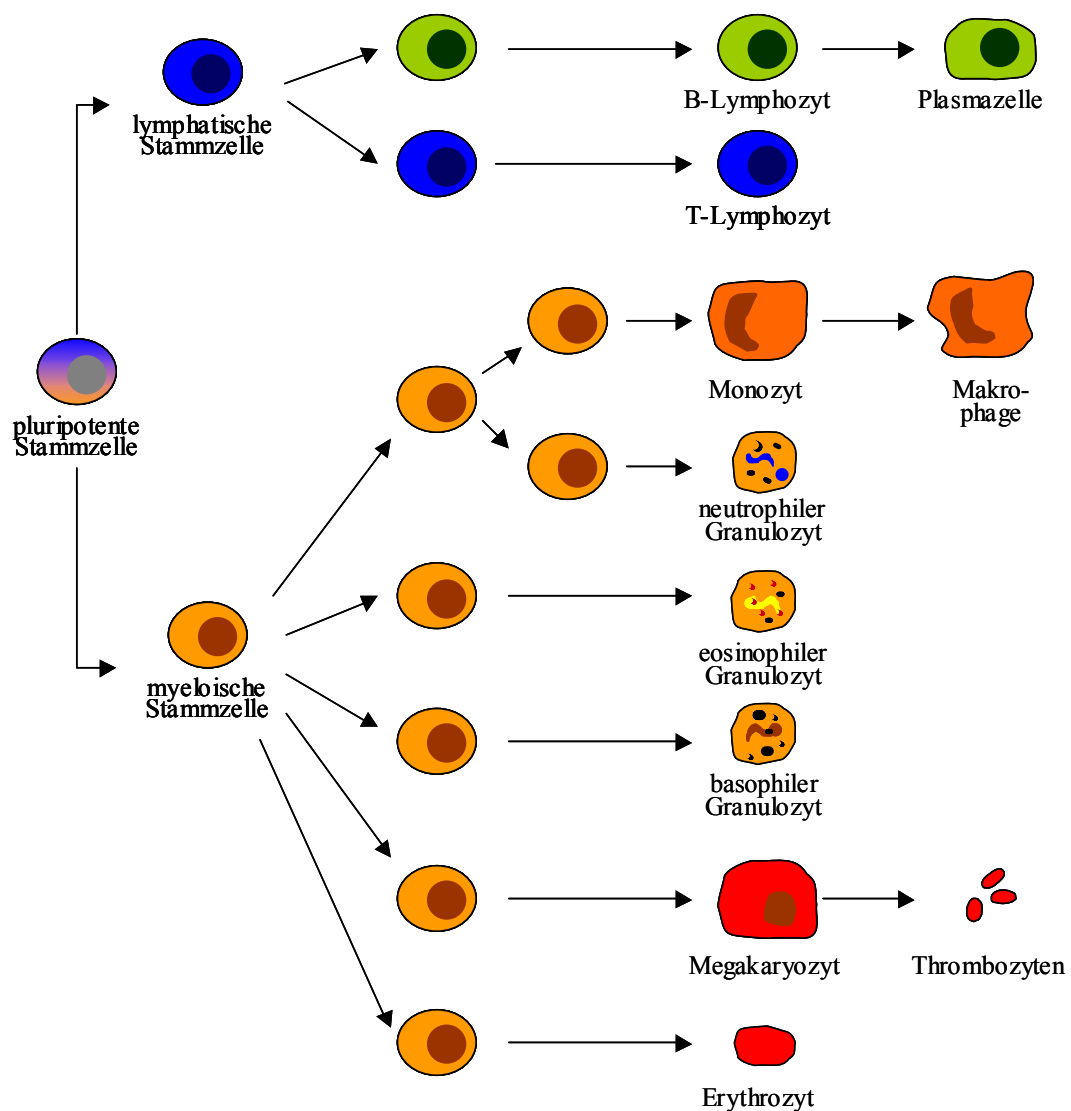
Hier sollte eine Kultivierungsmethode entwickelt werden, die selektiv die Proliferation maligner B-Zellen (insbesondere von B-CLL-Patienten) steigert. Hierzu wurde konditioniertes Medium unter Zugabe des Phorbolesters TPA eingesetzt. Damit sollte die Proliferationsaktivität maligner B-Zellen so gesteigert werden, dass genügend Metaphasen für eine zytogenetische Analyse gewonnen werden können.

1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1.1 Maligne Entartung des blutbildenden Systems

Als Hämatopoese wird der Prozess der Blutzellbildung im Knochenmark bezeichnet. Ausgehend von pluripotenten Stammzellen werden über mehrerer Differenzierungs- und Reifeprozesse eine Vielzahl unterschiedlicher Blutzellen gebildet. Von der hämatopoetischen, pluripotenten Stammzelle im Knochenmark leiten sich zwei Hauptlinien ab, die myeloische und die lymphatische Zelllinie. Die Zellen der myeloischen Reihe entwickeln sich zu Monozyten, Granulozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten (rote Blutkörperchen). Aus der lymphatischen Reihe entstehen T- und B-Lymphozyten (Abbildung 1.1).

Abb 1.1 Schematische Darstellung der Hämatopoese (Kirchner et al., 1994; Janeway 1997; modifiziert)



Unter dem Begriff Leukozyten (weiße Blutkörperchen) werden die Granulozyten und Lymphozyten zusammengefasst. Die meisten reifen Blutzellen haben eine sehr kurze Lebensdauer von nur wenigen Stunden oder Wochen, bevor sie zerstört und abgebaut werden. Deshalb werden sie ständig vom Organismus ersetzt (Baake und Gilles, 1994; Kirchner et al., 1994; Roth und Glasmach, 2002).

Im Embryo findet die Blutbildung zunächst in der Wand des Dottersacks, später in der Leber und Milz statt. Gegen Ende der Foetalentwicklung geht die Blutbildung auf das Knochenmark über. Dieses netzartige, lockere und stark durchblutete Gewebe füllt die Hohlräume im Inneren der Knochen aus und unterscheidet sich in rotes Mark, Ort der Blutbildung, und gelbes Fettmark. Beim Erwachsenen findet sich rotes Mark in den Enden der langen Röhrenknochen, in den Rippen und in den platten Knochen wie z.B. Schädel, Brustbein und Beckenkamm (Janeway, 1997).

Für einen geregelten Ablauf der Hämatopoese ist ein kompliziertes Netzwerk löslicher Stimulatoren und Inhibitoren sowie zelluläre Interaktionen erforderlich. Fehlfunktionen in diesem System können zu schweren Erkrankungen wie Anämie und Leukämie führen.

Leukämie („Blutkrebs“) stellt eine bösartige Erkrankung der im Knochenmark gebildeten Blutzellen dar. Im Unterschied zu anderen Krebserkrankungen betreffen Leukämien von Anfang an den ganzen Körper, weshalb sie auch als Systemerkrankungen bezeichnet werden. Leukämie bedeutet übersetzt „weißes Blut“, denn bei diesen Erkrankungen ist die Zahl der weißen Blutkörperchen im Blut meist stark erhöht. Im Knochenmark liegen die Blutzellen in einer Vielzahl unterschiedlicher Entwicklungsstufen vor. Je nach betroffenem Zelltyp werden die Leukämien in viele Typen und Subtypen untergliedert. Diese differieren bezüglich ihrer Häufigkeit, Ursachen, Behandlungsmöglichkeiten und Heilungsaussichten zum Teil stark voneinander.

1.2 Maligne Entartung des lymphatischen Systems

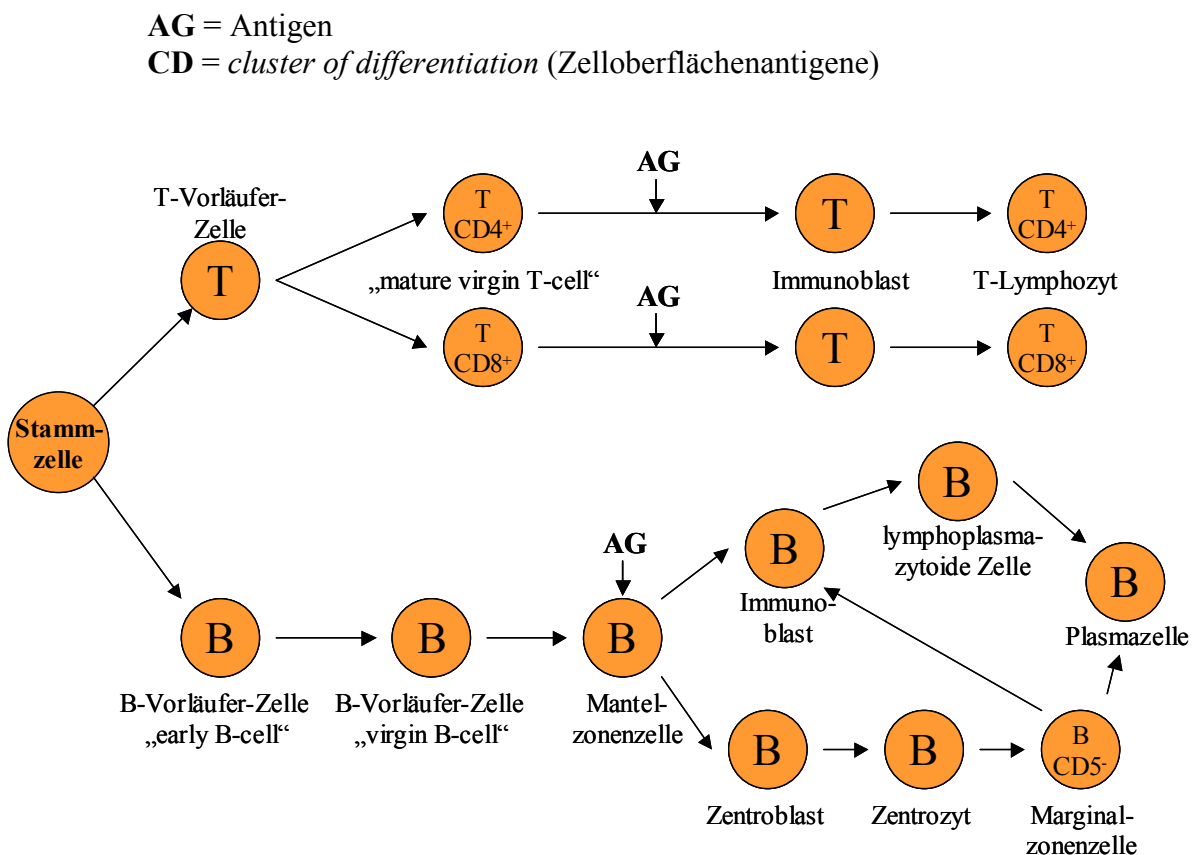
Das lymphatische System ist kein einzelnes Organ, sondern mit seinen Funktionen und Zellen über den ganzen Körper verteilt. Dies setzt ein feinmaschiges Transportsystem und eine Organisation der Zellen in lymphatischen Organen voraus. Es steht in engem Zusammenhang mit dem Immunsystem und dem blutbildenden System im Knochenmark.

Zu den primären lymphatischen Organen gehören beim erwachsenen Menschen das Knochenmark und der Thymus. Sie dienen der Bildung, Entwicklung und Reifung der Immunzellen. Milz, Lymphknoten und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute, wie z.B. Tonsillen des Rachens und die Peyerschen-Plaques im Darm werden zu den sekundären lymphatischen

Organen zusammengefasst. In ihnen findet die Auseinandersetzung der Immunzellen, vorallem der Lymphozyten, mit Fremdstoffen statt (Kirchner et al., 1994, Janeway, 1997).

Nach ihrer Funktion und Entwicklung werden zwei Hauptklassen von Lymphozyten: die **B-Lymphozyten** und **T-Lymphozyten** unterschieden (Abbildung 1.2). Die Stammzellen aller Lymphozyten entstehen im Knochenmark. Während die B-Lymphozyten dort zu funktions-tüchtigen Abwehrzellen heranreifen, erfolgt die Ausreifung der T-Lymphozyten im Thymus (Baake und Gilles, 1994; Janeway, 1997). Untersuchungen haben gezeigt, dass nur etwa 5-10% aller Zellen, welche die B-Zell-Entwicklung eingeschlagen haben, das Knochenmark als reife B-Zellen verlassen. Die übrigen 90-95% werden eliminiert (Kirchner et al., 1994).

Abb 1.2 Schematische Darstellung der Entwicklungsstufen lymphatischer Zellen (Zetz et al., 2000)



Wie jede Körperzelle können auch Zellen des lymphatischen Gewebes in Folge von bestimmten Veränderungen im Erbgut entarten und Ausgangspunkt einer Krebsentstehung werden.

Geht der Ursprung der entarteten lymphatischen Zellen auf das Knochenmark zurück, so spricht man von einer lymphatischen Leukämie, findet die maligne Entartung in einem der lymphatischen Organe statt, so bezeichnet man diese Krankheitsform als Lymphom. Der

Übergang zwischen diesen beiden Formen ist meist sehr fließend, da die malignen Zellen des Knochenmarks häufig auch die lymphatischen Organe besiedeln.

1.3 Leukämie

Leukämien sind im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen wie z.B. Brust-, Dickdarm- oder Lungenkrebs vergleichsweise selten. In Deutschland erkranken jährlich ca. 10 von 100.000 Einwohnern an einer Leukämie. Wobei fast drei Viertel zum Zeitpunkt der Diagnose über 60 Jahre sind.

Je nach Verlauf der Erkrankung unterscheidet man zwischen chronischer und akuter Leukämie. Hierbei grenzt sich die chronische Form durch einen eher schleichenden, symptomarmen Beginn und einem langsamen Fortschreiten von der sich rasch entwickelnden, in der Regel mit schweren Krankheitssymptomen verlaufenden, akuten Form ab. Unbehandelt führt die akute Form innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tode.

Dieser stark unterschiedliche Krankheitsverlauf ist auf die Entwicklungsstufe der betroffenen entarteten Zellen zurückzuführen. Während die malignen Zellen der chronischen Leukämien relativ ausgereift sind, liegen bei akuten Leukämien unreife oder undifferenzierte Zellen vor. Das bedeutet, dass die Entartung der malignen Zellen der akuten Form auf einer früheren Stufe im Reifungsprozess der Blutzellen stattgefunden hat.

Je nach betroffener Zellreihe, aus der die Leukämiezellen hervorgegangen sind, werden die Erkrankungen in myeloische und lymphatische Formen unterschieden. Neben diesen Formen gibt es noch verschiedene seltenere Leukämieformen und Leukämievorstufen, wie z.B. die myelodysplastischen Syndrome, die aber nicht in eine echte Leukämie übergehen müssen.

1.3.1 Diagnostik von Leukämien

Eine exakte Diagnose des Leukämietyps und die Erkennung biologischer Subtypen, deren klinisches Erscheinungsbild und therapeutische Beeinflussbarkeit differieren, ist insbesondere für das therapeutische Vorgehen und der prognostischen Einschätzung unerlässlich (Ludwig und Thiel, 1993; Fonatsch und Krämer, 2002).

Die Möglichkeiten der Methoden zur Diagnose und Klassifizierung von Leukämien haben sich in den vergangenen Jahren erheblich verfeinert. Neben der Basisdiagnostik, wie die morphologische Begutachtung, die Immunphänotypisierung und die Zytogenetik stehen eine Reihe von neueren Methoden der erweiterten Diagnostik zur Verfügung. Der zytogenetische Nachweis struktureller Chromosomenanomalien in Leukämiezellen war richtungsweisend für molekularbiologische Untersuchungen wie die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH-Technik), Southernblotanalyse und Polymerasekettenreaktion (PCR) (Bartl, 1997). Diese

konnten zeigen, dass im Bereich leukämieassoziiertes chromosomaler Bruchpunkte eine Vielzahl von Genen lokalisiert sind, deren Proteinprodukte für die Regulation von Proliferation und Differenzierung der normalen hämatopoetischen Zellen und der Leukämiezellen von Bedeutung sind (Ludwig und Thiel, 1993).

1.3.2 Myeloische Leukämien

Zu den myeloischen Leukämien gehören die chronisch myeloische Leukämie (CML) und die akute myeloische Leukämie (AML), die sich nach der **FAB-Klassifikation** (*french-american-british-cooperative group*) entsprechend dem Differenzierungsweg und dem Grad der Reifung der entarteten Zellen in acht AML-Subtypen (M0-M7) untergliedert (Tabelle 1.1).

Tab 1.1 Einteilung der AML-Subtypen nach der FAB-Klassifikation (Bartl, 1998; Flaßhove et al., 2000)

AML-Subtyp	Häufigkeit	Morphologie	Zytochemie	Zytogenetik
M0 Akute myeloblastische Leukämie ohne Differenzierung	2-3%	Blasten mit minimaler myeloischer Differenzierung	POX – EST – PAS –	
M1 Akute myeloblastische Leukämie mit geringer Differenzierung	15-20%	> 90% NEZ sind Typ I/II-Blasten mit, < 3% Promyelozyten, < 10% ausreifende Granulopoese	POX ± EST – PAS –	
M2 Akute myeloblastische Leukämie mit Ausreifung	25-30%	30-89% der NEZ sind Typ I/II-Blasten mit promyelozytärer Granulierung > 10% der NEZ sind reifere Zellen, Auerstäbchen sind selten	POX ++ EST – PAS –	~ 50% mit Translokation t(8 ;21)
M3 Akute Promyelozytenleukämie	5-10%	Überwiegend hypergranulierte Promyelozyten, Auerstäbchen	POX +++ EST ± PAS ±	Translokation t(15 ;17)
M3V Variante der Promyelozytenleukämie		Überwiegend mikrogranulierte, Auerstäbchen, Zytochemie und Zytogenetik wie M3		

AML-Subtyp	Häufigkeit	Morphologie	Zytochemie	Zytogenetik
M4 Akute myelomonozytäre Leukämie	20-30%	Leukämische Zellen im Blut zeigen myeloische sowie auch monozytäre Differenzierung, im KM sind > 30-80% der NEZ Myeloblasten, Promyelozyten oder reifere Stufen der Granulopoese	POX ++ EST ++ PAS ±	
M4Eo M4 mit Eosinophilie		Zu den Kriterien der M4 besteht im KM eine Eosinophilie ≥ 5%	POX ++ EST ++ PAS ±	Inversion inv(16)
M5 Akute Monozytenleukämie	2-9%	M5a: Monoblastenleukämie, Blasten dominieren ≥ 80% der monozoiden Zellen M5b: Monozytenleukämie, differenzierte monozytäre Zellen überwiegen, mehr als 20% der abnormen Zellen sind als Promonozyten oder als reifere Formen, oft mit Atypien, erkennbar	POX ± EST +++ PAS ±	
M6 Akute Erythrozytenleukämie	3-5%	≥ 50% dysplastische Erythroblasten, ≥ 30% Typ I/II-Blasten der NEZ	POX ++ EST ± PAS +++	
M7 Akute Megakaryoblastenleukämie	3-12%	Undifferenzierte Blasten, atypische Megakaryozyten	POX – EST ± PAS ±	

POX = Peroxidase; EST = unspezifische Esterase; PAS = Perjodschißsäure; KM = Knochenmark; NEZ = nicht-erythro-poetische Zellen

Neuerdings werden zur Diagnosestellung der AML-Subtypen neben morphologischen auch immunologische, zytogenetische und molekulargenetische Befunde mit einbezogen. Die WHO (*world health organisation*) hat hierfür eine neue Klassifikation vorgestellt (Tabelle 1.2). Ferner zählen auch die myelodysplastischen Syndrome dazu. Unter chronisch myeloproliferativen Erkrankungen (CMPE) werden demnach die chronisch myeloische Leukämie (CML), die Polycythämia vera (PV), die Osteomyelosklerose/Osteomyelofibrose (OSM/OMF) und die essentielle Thrombocythämie zusammengefasst (Harris et al., 1999; Vardiman et al., 2002).

Die CMPE zeichnen sich durch eine hohe Zahl reifer Granulozyten im peripheren Blut aus. In der chronischen Phase ist noch keine Reifungsstörung zu beobachten, die erst in der Akzeler-

tion und in der Blastenkrise in Erscheinung tritt. Die MDS sind in ihrem Erscheinungsbild heterogen, betreffen aber stets blutbildende Stammzellen und sind mit einer sowohl funktionell als auch morphologisch gestörten Hämatopoese verbunden (Fonatsch und Krämer, 2002). Die myeloischen Leukämien gehen von den Vorläuferzellen der Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten aus. Die entarteten Zellen teilen sich unkontrolliert, verdrängen und zerstören die gesunde Hämatopoese und können über die Blutbahnen auch alle anderen Körperorgane und selbst das Gehirn besiedeln.

Die AML zeichnen sich durch eine exzessive Anhäufung von unreifen, nicht lymphatischen Knochenmark-Vorläuferzellen (Blasten) im Knochenmark selbst, im peripheren Blut und manchmal auch in anderen Geweben aus. Dies beruht entweder auf einer erhöhten Proliferationsaktivität oder auf einem reduzierten Zelltod. Die de novo AML werden den sekundären AML (sAML) gegenübergestellt. Die sAML sind auf äußere mutagene Einflüsse physikalischer oder chemischer Natur zurückzuführen, oder haben sich aus einem über mehr als 6 Monaten bestehenden myelodysplastischen Syndrom entwickelt (Fonatsch und Krämer, 2002). Häufig entstehen sie als Zweitneoplasie nach vorangegangener Radio- und/oder Chemotherapie-Behandlung einer malignen Erkrankung. Hinsichtlich ihres Krankheitsverlaufs zeigen diese Leukämien eine rasche Progression, die mit einer Therapieresistenz einhergeht (Jehn, 1997).

Tab 1.2 Die WHO-Klassifikation der myeloischen Neoplasien (Harris et al., 1999; Vardiman et al., 2002)

Chronische myeloproliferative Erkrankungen (CMPE)

- Chronische myeloische Leukämie (CML), Philadelphia-Chromosom positiv
- Polycythämia vera (PV)
- Osteomyelosklerose/Osteomyelofibrose (OMS/OMF)
- Essentielle Thrombocythämie (ET)

Myelodysplastische/myeloproliferative Erkrankungen

- Chronische myelomonocytäre Leukämie (CMML)
- Juvenile myelomonocytäre Leukämie (JMML)
- Atypische chronische myeloische Leukämie (aCML)

Myelodysplastische Syndrome (MDS)

- Refraktäre Anämie (RA)
- Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)

- Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)
- Refraktäre Anämie mit Blastenbildung (RAEB)
- 5q- Syndrom
- MDS, unklassifizierbar

Akute myeloische Leukämien (AML)

AML mit spezifischen zytogenetischen Veränderungen

- AML mit t(8;21)(q22;q22)
- Akute Promyelozytenleukämie t(15;17)(q22;q21)
- AML mit abnormen Eosinophilen inv16(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22)
- AML mit 11q23-Aberrationen

AML mit multilinärer Dysplasie

- Mit MDS-Vorstadium
- Ohne MDS-Vorstadium

AML und MDS sekundär (therapieinduziert)

AML ohne weitere Kategorisierung

Akute biphänotypische Leukämien

1.3.3 Lymphatische Leukämien

Die lymphatischen Leukämien gliedern sich in die chronisch lymphatische Leukämie (B-CLL) und die akute lymphatische Leukämie (ALL), die die häufigste bösartige Erkrankung im Kindesalter darstellt. Bei den Erwachsenen gehört die ALL mit 5 Erkrankungen pro 1.000.000 Einwohnern in der Altersgruppe von 35-45 Jahren eher zu den selteneren Malignomen. Die B-CLL wurde früher auch als Lymphadenose bezeichnet und zählt zu den niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphomen, also eine Form des Lymphknotenkrebses.

Die lymphatischen Leukämien und Lymphome gehen von Vorläufern der Lymphozyten aus. Je nachdem auf welcher Stufe der Zellreifung die Entartung stattgefunden hat, ist zunächst entweder das Knochenmark oder das lymphatische System betroffen.

1.4 Maligne Lymphome

Der Begriff „malignes Lymphom“ bedeutet „bösartiges Lymphknotengeschwulst“ und fasst eine histopathologische und klinisch heterogene Gruppe von Neoplasien lymphatischen Ursprungs zusammen. Grob unterscheidet man das Hodgkin-Lymphom (Lymphogranulomatose

oder Morbus Hodgkin) von der großen Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome, die alle bösartigen Lymphome die kein Hodgkin-Lymphom sind einschließt.

Ähnlich wie die Leukämien kommen maligne Lymphome im Vergleich zu anderen Krebsformen eher selten vor. Sie machen zusammen etwa 5% aller Krebsfälle aus. Jährlich erkranken in Deutschland etwa 9000 Menschen an Non-Hodgkin-Lymphome und etwa 2000 an Morbus Hodgkin.

Die Geschichte der Klassifikation der malignen Lymphome beginnt mit der Hodgkin-Krankheit im Jahre 1832. Das mikroskopische Erkennungszeichen des Hodgkin-Lymphoms sind die Sternberg-Riesenzellen, die bei Non-Hodgkin-Lymphomen nicht auftreten. Es vergingen mehr als 90 Jahre, bis das follikuläre Lymphom als erstes Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) abgegrenzt wurde (Stein und Hiddemann, 1999).

1.4.1 Diagnostik von Lymphomen

Die Komplexität der verschiedenen Lymphomkrankheiten stellt hohe Anforderungen an deren Diagnostik. Die Anwendung neuer diagnostischer Verfahren, insbesondere der Immunphänotypisierung, d.h. die Bestimmung des Antigenprofils der Tumorzellen, ergänzen die konventionelle morphologische Analyse. Auch dem Nachweis genotypischer Veränderungen kommt bei einigen Lymphomkrankheiten bereits ein fester Platz in der Diagnostik zu. Es ist abzusehen, dass sich die Palette molekularpathologischer Tests in den nächsten Jahren erheblich vergrößern wird und dadurch die Lymphomdiagnostik weiter optimiert werden kann (Stein und Hiddemann, 1999). Da die Diagnostik der Lymphome im Hinblick auf Erfahrung und Verfügbarkeit von Spezialmethoden kompliziert ist, wurden in Deutschland Konsultations- und Referenzzentren für die Lymphomdiagnostik (Berlin, Frankfurt, Kiel, Lübeck, Ulm und Würzburg) mit Unterstützung der Deutschen Krebshilfe eingerichtet.

1.4.2 Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphomen

Eine weltweit akzeptierte Klassifikation der malignen Lymphome wurde im Oktober 1997 durch eine von der WHO eingesetzten internationalen Expertengruppe festgelegt. Die neue WHO-Klassifikation stellt die aktualisierte Fassung der R.E.A.L. (*Revised European American Lymphoma*)-Klassifikation von 1994 dar (Tabelle 1.3). Neu ist, dass im Gegensatz zu der in den USA und anderen englischsprachigen Ländern eingesetzten *Working Formulation* und der in Europa angewendeten Kiel-Klassifikation auf den Malignitätsgrad als übergeordnetes Einteilungsprinzip verzichtet wird (Stein und Hiddemann, 1999).

Entsprechend der zellulären Herkunft erfolgt die Einteilung der NHL in zwei hierarchischen Ebenen:

- Zugehörigkeit zur B-Zellreihe (etwa 90% der Fälle)
- Zugehörigkeit zur T-Zellreihe (etwa 10% der Fälle)

Innerhalb dieser Ebenen wird zwischen Vorläuferzell-Lymphomen und peripheren (reifzellig) Lymphomen und deren Differenzierungs- bzw. Reifungsformen unterschieden (Stein und Hiddemann, 1999).

Zwischen dem R.E.A.L.-System und der neuen WHO-Klassifikation finden sich lediglich dort Abweichungen, wo in der WHO-Klassifikation - entsprechend dem Fortschritt seit 1994 - neue Lymphomentitäten eingefügt und die Terminologie bekannter Lymphoproliferationen dem neuen Erkenntnisstand angepasst wurden.

Tab 1.3 B-Zell Neoplasmen nach der R.E.A.L.- und WHO-Klassifikation (Stein und Hiddemann, 1999)

B-Zell Neoplasmen	
Revised European American Lymphoma Classification 1994 (R.E.A.L.)	New WHO Lymphoma Classification* Preliminary Version, 1998
<u>Neoplasmen der Vorläufer-B-Zellen</u> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Lymphoblastische bzw. Vorläufer-B-Zell- Lymphom/Leukämie 	<u>Precursor B-Cell Disease</u> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Precursor B-lymphoblastic leukemia**/lymphoma
<u>Neoplasmen reifer (peripherer) B-Zellen</u> <ul style="list-style-type: none"> ➤ B-Zellen -chronisch lymphatische Leukämie/ -prolymphozytische Leukämie/ -kleinzelliges lymphozytisches Lymphom B-CLL-Variante: mit plasmazytoide Differenzierung ➤ Lymphoplasmazytoides Lymphom ➤ Mantelzell-Lymphom ➤ Follikelzentrums-Lymphom, folliculär Grad I, Grad II ➤ Follikelzentrums-Lymphom (kleinzellig und gemischtzellig) ➤ Follikelzentrums-Lymphom, folliculär Grad III ➤ Extranodales Maginalzonen-B-Zell-Lymphom (MALT-Typ) ➤ Nodales Maginalzonen-B-Zell-Lymphom 	<u>Peripheral B-Cell Diseases</u> <ul style="list-style-type: none"> ➤ B-cell chronic lymphocytic/ small lymphocytic lymphoma B-CLL-Variant: with monoclonal gammopathy/ plasmacytoid differentiation ➤ B-cell prolymphocytic leukaemia ➤ Lymphoplasmacytic lymphoma ➤ Mantle cell lymphoma Variant: blastic ➤ Follicular lymphoma Variants: Grade 1,2 ➤ Follicular lymphoma Variant Grade 3 ➤ Cutaneous follicle center lymphoma ➤ Maginal zone B-cell lymphoma of MALT type (<u>M</u>ucosa-<u>A</u>ssociated <u>L</u>ymphatic <u>T</u>issue) ➤ Nodal maginal zone B-cell Lymphoma

<ul style="list-style-type: none">➤ Splenisches Maginalzonen-B-Zell-Lymphom➤ Haarzelleukämie➤ Plasmazytom/Myelom➤ Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom ➤ Primäres mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom ➤ Burkitt-Lymphom➤ Hochgradiges B-Zell-Lymphom, ähnlich Burkitt	<ul style="list-style-type: none">➤ Splenic maginal zone B-cell lymphoma➤ Hair cell leukaemia➤ Plasma cell myelom/Plasmacytoma➤ Diffuse large B-cell lymphoma Variants: Centroblastic, immunoblastic, T-cell or histiocyte-rich, anaplastic large cell<ul style="list-style-type: none">○ Subtype: Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma○ Subtype: Intravascular large B-cell lymphoma○ Subtype: Primary effusion lymphoma➤ Burkitt lymphoma➤ Atypical (pleomorphic) Burkitt lymphoma
<p>*Offizielle Übersetzung liegt noch nicht vor **Häufigste Lymphome in Fettdruck</p>	

1.5 Die chronisch lymphatische Leukämie (B-CLL)

Die chronisch lymphatische Leukämie (B-CLL) ist ein leukämisches Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe. Mit einer Inzidenz von 3/100.000 Einwohner pro Jahr ist sie nicht nur das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom (11%), sondern auch die häufigste Leukämie in den westlichen Ländern (Hallek et al., 2002). Das mediane Erkrankungsalter beträgt 65 bis 70 Jahre. Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit steigendem Lebensalter zu, wobei Männer häufiger als Frauen erkranken (Verhältnis Männer zu Frauen 2:1) (Oduncu et al., 2000).

Die Ätiologie der B-CLL ist unklar. Der Einfluss von Umweltproblemen wird diskutiert, ist aber nicht gesichert, wohingegen genetische Faktoren eine Rolle spielen: Kinder von B-CLL-Patienten haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko an einer B-CLL oder einer anderen lymphatischen Neoplasien zu erkranken (Yuille et al., 2000).

Der klinische Verlauf einer B-CLL Erkrankung ist sehr heterogen. Einige Patienten versterben nur wenige Monate nach der Diagnosestellung, andere überleben 20 Jahre oder mehr (Rozman und Montserrat, 1995).

1.5.1 Klinische Symptomatik

Wie bei anderen Lymphomen gibt es auch bei der chronisch lymphatischen Leukämie kein verlässliches Leitsymptom. In frühen Stadien ist die B-CLL meist asymptomatisch. Das häufigste Symptom ist das Auftreten vergrößerter Lymphknoten. Im fortgeschrittenen Stadium

kommt es darüber hinaus zu Beschwerden wie herabgesetzter Leistungsfähigkeit, B-Symptomen (Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß) und Infekten.

1.5.2 Diagnostik

Zur Diagnose der B-CLL sind zwei Untersuchungen erforderlich: Die Beurteilung des Blutbildes und des Blutausstriches sowie die Immunphänotypisierung (CD5, CD19 und CD23 positiv) der Leukämiezellen des peripheren Blutes (Cheson et al., 1996). Darüber hinaus ist die histopathologische Begutachtung eines vergrößerten Lymphknotens in diagnostischen Zweifelsfällen wichtig.

Weitere Untersuchungen dienen der Früherkennung von Komplikationen, der Einschätzung der Prognose, der Feststellung der Ausbreitung der Leukämie sowie der Verlaufsbeurteilung unter oder nach der Therapie. Bei der zytogenetischen Untersuchung finden sich prognoseassoziierte chromosomale Veränderungen (vgl. 1.6 Tumorzytogenetik).

1.5.3 Verlauf und Prognose

Die B-CLL verläuft schleichend. Die mittlere Überlebenszeit ab dem Diagnosezeitpunkt variiert abhängig vom Stadium zwischen zwei und mehr als zehn Jahren. Zur Abschätzung der Prognose werden die Stadieneinteilungen von Binet et al., 1981 und Rai et al., 1975 (Tabelle 1.4 und 1.5) verwendet. Sie stützen sich auf das durch Palpation erfasste Ausmaß der Lymphadenopathie, Splenomegalie, Hepatomegalie und die mittels Blutbild bestimmte Anämie und Thrombozytopenie.

Tab 1.4 Stadieneinteilung der B-CLL nach Rai (1975)

Risiko	Stadium	Definition	Medianes Überleben
Niedriges Risiko	0	Lymphozytose > 15000/mm ³ Knochenmarkinfiltration > 40%	> 10 Jahre
Intermediäres Risiko	I	Lymphozytose und Lymphadenopathie	7 Jahre
	II	Lymphozytose und Hepatomegalie und/oder Splenomegalie (mit/ohne Lymphadenopathie)	
Hochrisiko	III	Lymphozytose und Anämie (Hb < 11,0 g/dl) mit/ohne Lymphadenopathie und/oder Organomegalie	2-3,5 Jahre
	IV	Lymphozytose und Thrombozytopenie (< 100.000/mm ³) mit/ohne Anämie, Lymphadenopathie, Organomegalie	

Tab 1.5 Stadieneinteilung der B-CLL nach Binet (1981)

Risiko	Stadium	Definition	Medianes Überleben
Niedriges Risiko	A	Hb > 10,0 g/dl; Thrombozytenzahl normal; < 3 vergrößerte Lymphknotenregionen*	> 10 Jahre
Intermediäres Risiko	B	Hb > 10,0 g/dl; Thrombozytenzahl normal; ≥ 3 vergrößerte Lymphknotenregionen	7 Jahre
Hochrisiko	C	Hb < 10,0 g/dl und/oder Thrombozytenzahl < 100.000 x 10 ⁹ /l unabhängig von der Zahl der befallenen Regionen	2-3,5 Jahre

*Zervikale, axilläre und inguinale Lymphknotenvergrößerungen unilateral oder bilateral sowie Leber- und Milzvergrößerungen gelten als je eine Region

Daneben zeigen folgende Parameter unabhängig vom Stadium einen ungünstigen Verlauf (Hallek et al., 1997; Zwiebel et al., 1998; Hallek et al., 2002):

- Eine Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als zwölf Monaten
- Eine erhöhte Serum-LDH-Aktivität
- Eine erhöhte Serum-β₂-Mikroglobulinkonzentration
- Eine erhöhte Serum-Thymidinkinase-Aktivität
- Ein erhöhter Serumspiegel des löslichen CD23
- Aberrationen der Chromosomen 11(11q-) und 17(17p-)
- Fehlen von somatischen Hypermutationen der Immunglobulin-V_H-Genregion
- CD38-Positivität der B-CLL-Zellen
- Ein diffuses oder nichtnoduläres Knochenmarkinfiltrationsmuster

Die Gewichtung dieser Prognosefaktoren wird derzeit in Studien ermittelt.

1.5.4 Pathogenese

Die B-CLL ist eine monoklonale B-Zell-Erkrankung. Kennzeichnend ist die Akkumulation morphologisch reifer und funktionell unreifer B-Zellen mit langsamer Proliferationsrate. Durch unterschiedliche Mechanismen entziehen sich die B-CLL Zellen der Induktion der Apoptose (Bannerji et al., 2000). Die B-CLL-Zellen akkumulieren im Blut, Knochenmark, Lymphknoten und Milz und führen zu Organvergrößerungen und Knochenmarkinsuffizienz. Im Gegensatz zu normalen, peripheren B-Lymphozyten zeigen B-CLL-Zellen immunphänotypisch nur sehr wenig membranständige Immunglobuline, meistens vom IgM- oder IgD-Typ, und eine Immunglobulin-Leichtketten-Restriktion (Kappa oder Lambda) als Ausdruck ihrer Monoklonalität.

1.5.5 Zellkinetik

B-CLL-Zellen zeigen eine geringe Proliferation, die meisten Zellen verweilen in der G₀-Phase des Zellzykluses. In der Milz finden sich die proliferierenden B-CLL-Zellen bevorzugt in der weißen Pulpa. Erst im späteren Verlauf der Krankheit ist auch die rote Pulpa infiltriert (Lampert et al., 1999). Die meisten im Blut vorkommenden B-CLL-Zellen befinden sich nicht im mitotischen Zellzyklus (Andreeff et al., 1980). Kennzeichnend für B-CLL-Zellen ist auch ihre lange Lebenszeit, die durch Umgehen der Apoptose erzielt wird. Transferiert man humane B-CLL-Zellen in Mäuse, so können sie über mehrere Wochen dort überleben (Kobayashi et al., 1992).

1.5.6 Molekulare Alteration von B-CLL-Zellen

Im Vergleich zur CML und den follikulären Lymphomen, die hinreichend charakterisierbar sind, stellt die B-CLL eine wesentlich komplexere Erkrankung dar. Die B-CLL-Zellen sind inzwischen durch eine Vielzahl notwendiger biologischer Veränderungen gekennzeichnet, wobei das Vorliegen einer solchen Veränderung nicht zwingend eine B-CLL-Erkrankung belegt (Brittinger et al., 1997; Meinhardt et al., 1999).

Das Tumorsuppressorgen p53 ist das häufigst mutierte Gen in humanen Neoplasien. Es codiert einen Transkriptionsfaktor und ist am Chromosom 17 (17p13) lokalisiert. Das Proteinprodukt reguliert wichtige Signalproteine die zelluläre Prozesse wie die Proliferation (p21^{WAF1/CIP1}), DNA-Reparatur (GADD45) und Apoptose (Fax, Bax, Bcl-2) steuern. Darüber hinaus interagiert p53 mit weiteren wichtigen Signalproteinen wie E2F-1, Retinoblastoma Protein, Wilms Tumor 1 Protein 1, DP-1 und c-Abl (Oduncu et al., 2000).

Eine Mutation des p53 Gens findet sich bei 10-20% der B-CLL-Patienten. Patienten mit dieser Mutation haben ein erhöhtes Progressionsrisiko und zeigen ein schlechtes Ansprechen auf eine Therapie mit Alkyl- oder Purinanaloga (Bannerji und Byrd, 2000). Regulatorgene von p53 haben einen großen Einfluss auf die klinische Progression der B-CLL-Patienten. So ist die Überexpression des p53-bindenden, transkriptioninhibierenden Proteins Mdm2 (auf dem Chromosom 12 lokalisiert) möglicherweise mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium assoziiert (Bannerji und Byrd, 2000; Oduncu et al., 2000).

An Hand von Studien an follikulären Lymphomen konnte Mitte der achtziger Jahre der Einfluß des anti-Apoptose Bcl-2 Onkogens in malignen B-Zellen nachgewiesen werden. Durch die in diesen Lymphomen häufig auftretende Translokation t(14;18) gelangt das Bcl-2 Gen, das normalerweise auf Chromosom 18 lokalisiert ist, unter die Regulation des auf dem Chromosom 14 lokalisiertem Genlocus, der die schwere-Kette (H-Kette) der Immunglobuline kodiert. Dadurch wird das Bcl-2 Gen überexprimiert (Bannerji und Byrd, 2000). Obwohl die

B-CLL im Gegensatz zu den folliculären Lymphomen in der Regel keine Translokation t(14;18) aufweist, ist dennoch die Überexpression des anti-Apoptose Bcl-2 Onkogens ein häufiges Charakteristikum dieser Krankheit. Handa et al. (1993) zeigten, dass in 95% der B-CLL-Fällen der bcl-2-Proteingehalt um das 1,7-25 fache höher ist als in normalen Lymphozyten. Diese Überexpression wird nicht durch ein Genrearrangement, sondern durch eine Hypomethylierung der Bcl-2 DNA-Promotorregion verursacht.

Ein weiteres Charakteristikum der neoplastischen B-Zellen von B-CLL-Patienten sind ein hoher Gehalt des antiapoptotisch wirkenden Proteins bcl-x_L und ein verminderter Gehalt des pro-apoptotisch wirkenden Proteins bax oder bcl-x_S. Bcl-2- und bax-Proteine bilden Homodimere und Heterodimere, wodurch die Apoptoseinduktion moduliert werden kann (Kipps, 2000a). Überwiegen die bcl-2-Homodimere oder bcl-2/bax-Heterodimere, überlebt eine Zelle, überwiegen jedoch die bax-Homodimere, so wird der apoptotische Zelltod eingeleitet (Deckwerth et al., 1998).

1.5.7 Immunregulation in B-CLL-Zellen

Die Progression einer B-CLL Erkrankung geht mit einer Dysfunktion des Immunsystems einher. Diese Defekte betreffen alle zellulären Komponenten des Immunsystems (Kay et al., 2002). Patienten mit B-CLL zeigen eine starke Neigung zu Infekten. Verantwortlich hierfür sind zahlreiche Faktoren wie Hypogammaglobulinämie, defektes Komplementsystem, veränderte Expression des Haupt-Histokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex* MHC) Klasse II Antigen, veränderte Granulozytenfunktion, funktionsdefekte T-Zellen und veränderte Expression des T-Zell-Rezeptors. Die Leukämiezellen stellen einen immunsuppressiven Faktor dar (Kipps, 2000a).

Die B-CLL geht aus CD5 positiven B-Zellen hervor. Inzwischen ist bekannt, dass zwei Formen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus der V_H Gene (variable Domäne der schweren Kette der Immunglobuline) existieren (Dyer und Oscier 2002; Karhu et al., 2003):

- Bei < 98% Homologie mit der Keimbahnsequenz liegt eine hypermutierte = M-CLL vor
- Bei ≥ 98% Homologie mit der Keimbahnsequenz liegt eine nicht mutierte = UM-CLL vor

Untersuchungen zeigten, dass in beiden Formen Chromosomenaberrationen vorliegen können (83% in M-CLL und 82% in UM-CLL) (Karhu et al., 2003). Eine Assoziation zwischen der CD38 Expression, dem V_H Mutationsstatus und der Überlebenszeit wird derzeit kontrovers diskutiert (Kröber et al., 2002).

1.5.8 Adhäsionsmoleküle

Die Expression von Adhäsionsmolekülen in B-CLL-Zellen beeinflusst das Potenzial zur Ausschwemmung der Zellen in unterschiedliche Organe und korreliert mit dem Krankheitsstadium. Interaktionen zwischen den Zellen und zwischen Zellen und Matrix durch Oberflächenadhäsionsmoleküle verhindern das Absterben von B-CLL-Zellen bei der Kultivierung und vermutlich auch *in vivo* (Collins et al., 1989).

Eine wichtige Molekülgruppe oder -familie unter den Adhäsionsmolekülen sind die Integrine. Dabei handelt es sich um Rezeptoren mit einer heterodimeren Struktur, d.h. sie bestehen aus zwei Untereinheiten, einer α - und einer β -Kette. De Rosi et al. (1993) untersuchte bei 74 B-CLL-Patienten unter anderem die Expression von $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ Integrine. Das Fehlen der β -Integrin Expression zeigte sich als klinisch vorteilhafter Phänotyp.

1.6 Tumorzytogenetik

Die Tumorzytogenetik beschäftigt sich mit der Analyse von erworbenen Chromosomenanomalien bei hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren. Da ihr Auftreten ursächlich mit der neoplastischen Transformation assoziiert ist, kommen solche Veränderungen ausschließlich im neoplastischen Gewebe vor.

Die Tumorzytogenetik basiert einerseits auf dem Bandenverfahren der klassischen Zytogenetik und andererseits auf der molekularen Zytogenetik, die sich Verfahren wie der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), Polymerase chain reaction (PCR), Comparative genomic Hybridisierung (CGH) und der kürzlich entwickelten DNA *micro-chip array*-Technik zu Nutze macht.

1.6.1 Die Zytogenetik von Leukämien und Lymphomen

Im Jahre 1960 gelang es Nowell und Hungerford zum ersten Mal eine spezifische Chromosomenanomalie in Verbindung mit einem menschlichen Tumor nachzuweisen – das Philadelphia-Chromosom bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML). Sie wiesen im Knochenmark von Patienten mit CML ein kleines, wie sie meinten deletiertes Chromosom (Philadelphia-Chromosom) nach. Rowley (1973) konnte mittels Chromosomen-Bänderungstechniken zeigen, dass es sich bei dem Philadelphia-Chromosom um ein Chromosom 22 handelt, das nicht durch eine Deletion, sondern durch eine reziproke Translokation mit einem Chromosom 9 entsteht. Erst 1984 gelang es Groffen et al., den molekulargenetischen Hintergrund der Philadelphia-Translokation durch die Identifizierung des Fusionsgens zwischen dem ABL-Onkogen (9q34) und BCR-Gen (*breakpoint cluster region*) (22q11) aufzuklären.

Inzwischen steht fest, dass Chromosomenanomalien bzw. Genveränderungen einen wesentlichen Faktor in der Tumorbildung darstellen. Dafür spricht auch, dass bei Mutagen induzierter und angeborener Chromosomeninstabilität, die zu Chromosomenbrüchen und -umbauten führt, eine erhöhte Tumorfrequenz zu beobachten ist. In der Mehrzahl maligner Tumore lassen sich Chromosomenanomalien, bzw. Genmutationen, -verluste und -amplifikationen nachweisen.

Heute stellt der zytogenetische Befund einen wichtigen Faktor in der Diagnose, Prognose und im Therapieplan vor allem von Leukämien und Lymphomen, aber zunehmend auch von soliden Tumoren dar. Aufbauend auf den zytogenetischen Daten wurden intensive molekulargenetische Analysen mit folgenden Fragestellungen durchgeführt (Fonatsch, 2002):

- Welche Gene sind von den strukturellen Chromosomenanomalien betroffen?
- Ob bzw. welche Genveränderungen, unabhängig von den im Mikroskop nachweisbaren zytogenetischen Aberrationen, treten in Tumoren auf?

Als eine der ersten spezifischen molekularen Umlagerungen in Verbindung mit einer etablierten Translokation wurde beim Burkitt Lymphom, später auch beim follikulären Lymphom, das Rearrangement des c-MYC-Onkogens (in 8q24 lokalisiert) mit dem Gen, das für die H-Kette der Immunglobuline kodiert (in 14q32), beschrieben (Dalla-Favera et al., 1982).

Die zytogenetische bzw. molekulargenetische Analyse ist nicht nur bei der Diagnose und Feststellung des Subtyps einer Leukämie oder eines MDS wichtig, sondern auch für die Stadienfestlegung, z.B. für die Früherkennung einer herannahenden Blastenkrise bei der CML. Des Weiteren dient sie als Verlaufkontrolle, der Remissionsüberprüfung und der Erfassung von Resterkrankungen (Fonatsch und Krömer, 2002).

1.6.2 Die häufigsten Chromosomenaberrationen bei Leukämien und Lymphomen

Generell kann man zwischen einfachen, krankheitsspezifischen Chromosomenaberrationen und sehr komplexen, relativ unspezifischen Aberrationen unterscheiden. Des Weiteren werden primäre von sekundären Chromosomenanomalien unterschieden. Die primären Anomalien treten zuerst auf und sind mit der Krankheitsentstehung und dem histologischen Subtyp eng assoziiert. Zumeist handelt es sich hierbei um balancierte Translokationen oder Inversionen, die zu einer Aktivierung von Onkogenen führen.

Sekundäre Chromosomenanomalien sind mit der Progression des Krankheitsverlaufes und mit dem Resistenzwerden gegenüber Therapien verknüpft. Sie bestehen überwiegend aus unbalancierten Veränderungen wie Verluste und Zugewinne von Chromosomensegmenten (Haas, 1999; Fonatsch, 2002). Im folgenden sind die häufigsten, klinisch relevanten Chromosomenanomalien bei Leukämien und Lymphomen dargestellt.

1.6.2.1 Charakteristische zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei akuten myeloischen Leukämien (AML)

Die Angaben zur Häufigkeit klonaler Chromosomenanomalien bei den akuten myeloischen Leukämien variieren zwischen 60 und 90%, wobei verschiedene dieser Anomalien ausschließlich bei den AML, andere sowohl bei AML als auch bei MDS beobachtet werden. Die häufigsten numerischen Chromosomenveränderungen, die alleine oder in Kombination mit strukturellen Aberrationen auftreten können, sind ein zusätzliches Chromosom 8 (Trisomie 8) bzw. 21 (Trisomie 21) oder der Verlust von Chromosom 7 (Monosomie 7) bzw. des Y-Chromosoms.

Zu den häufigsten spezifischen strukturellen Chromosomenveränderungen gehören die reziproken Translokationen zwischen den Chromosomen 8 und 21 ($t(8;21)(q22;q22)$) und zwischen den Chromosomen 15 und 17 ($t(15;17)(q22;q11-12)$), sowie Anomalien des Chromosoms 16 Bande q22, insbesondere die perizentrische Inversion 16 ($inv(16)(p13q22)$). Nach den bisher vorliegenden klinischen Ergebnissen haben Patienten mit einer dieser drei Anomalien eine bessere Prognose als AML-Patienten mit normalem Karyotyp oder mit partieller oder totaler Monosomie 5 oder 7. Ein weiteres schlechtes Ansprechen auf eine Therapie signalisieren 11q23-Anomalien, 3q-Aberrationen und komplexe zytogenetische Veränderungen. Auch die Translokation $t(6;9)(p23;q34)$ geht mit einer schlechten Prognose einher (Tabelle 1.6) (Ludwig und Thiel, 1993; Heim und Mitelman, 1995; Fonatsch und Krömer, 2002).

1.6.2.2 Charakteristische zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei myelodysplastischen Syndromen (MDS)

Etwa 40-60% der MDS-Patienten zeigen mittels Bandenanalyse einen Normalkaryotyp im Knochenmark. Dies ist allerdings keineswegs stets mit einer guten Prognose assoziiert, da bei diesen Patienten spezifische molekulargenetische Veränderungen vorliegen können. Wie bereits erwähnt, treten die meisten Karyotyp-Veränderungen, die bei MDS beobachtet werden, auch bei den akuten myeloischen Leukämien auf. Allerdings treten bei MDS sehr häufig Verluste von ganzen Chromosomen oder von einzelnen Teilen auf, während bei de novo AML balancierte Translokationen, seltener Inversionen im Vordergrund stehen. Eine besonders häufige Strukturaberration bei MDS (15-20%) ist das Auftreten eines isolierten Verlustes von einem Stück des langen Arms von Chromosom 5 (5q-Syndrom), der mit einem milden Krankheitsverlauf assoziiert ist. Bei 10-15% der Patienten kann eine partielle oder totale Monosomie 7 oder eine Trisomie 8 nachgewiesen werden. Je 5% der Patienten zeigen eine (partielle) Trisomie 1q, (partielle) Monosomie 20, Trisomie 21, 12p-Anomalien und (partielle) Monosomie 18. Seltener (bei 3-5%) werden 3q- und 17p-Anomalien, sowie Trisomie 11 und Trisomie 13 beschrieben. Mit einer Häufigkeit von 15-20% der Patienten wird ein komplex

aberranter Karyotyp nachgewiesen (Tabelle 1.6) (Heim und Mitelman, 1995; Fonatsch und Krömer, 2002).

Tab 1.6 Zytogenetische und molekulargenetische Anomalien (unauffällige und komplex aberrante Karyotypen werden nicht berücksichtigt) bei AML und MDS (zusammengestellt aus Ludwig und Thiel, 1993; Heim und Mitelman, 1995; Fonatsch und Krömer, 2002)

Chromosomenanomalie	Involvierte Gene	Vorkommen
Deletionen/ Verluste/ Zugewinne		
+1q	?	MDS
+4(±dmin)	?(CMYC)	AML
-5/del(5q)	?	AML/MDS
-7/del(7q)	?	AML/MDS
+8	?	AML/MDS
+9	?	AML/MDS
del(9q)	?	AML
+11	MLL?	AML/MDS
del(11q23)	MLL	AML/(MDS)
del(12p)	ETV6/TEL	AML/MDS
del(13q)	?	MDS
+13	?	AML/MDS
+14	?	AML/MDS
-18/del(18q)	?	MDS
+19	?	MDS
del(20q)	?	AML/MDS
+21	?	AML/MDS
-X, -Y	?	AML/MDS
Derivatchromosomen/ Inversionen/ Isochromosomen/ Translokationen		
t(1;3)(p36;q21)	MEL1; ?	AML/(MDS)
der(1)t(1;7)(q10;p10)	?	AML/(MDS)
t(1;11)(q21;q23)	AF4; MLL	AML
t(1;22)(p13;q13)	OTT; MAL	AML
inv(3)(q21q26), t(3;3)(q21;q26)	?	AML/MDS
t(3;5)(q25.1;q34)	MLF1; NPM	AML
t(3;21)(q26;q22)	EVI1/EAP/MDS1; AML1	AML/(MDS)
t(5;11)(q35;p15)	NSD1; NUP98	AML
t(5;12)(q33;p13)	PDGFRB; ETV6/TEL	MDS

t(6;9)(p23;q34)	CAN; DEK	AML/MDS
t(6;11)(q27;q23)	AF6; MLL	AML
t(7;11)(p15;p15)	HOXA9; NUP98	AML
t(8;16)(p11;p13)	MOZ; CBP	AML
t(8;21)(q22;q22)	ETO; AML1	AML
t(9;11)(p22;p15)	LEDGF; NUP98	AML
t(9;11)(p23;q23)	AF9; MLL	AML
t(9;22)(q34;q11)	ABL; BCR	AML/(MDS)
t(10;11)(p13;q14)	AF10; CALM	AML
t(10;11)(p12;q23)	AF19; MLL	AML
t(11;17)(q23;q21)	MLL; AF17	AML
t(11;17)(q23;q21)	PLZF; RARA	AML
t(11;17)(q23;q25)	MLL; MSF	AML/MDS
t(11;19)(q23;p13.1)	MLL; ELL	AML
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL; ENL	AML
t(11q23)	MLL	AML/(MDS)
t(12p)	ETV6/TEL	AML/MDS
t(15;17)(q22;21)	PML; RARA	AML
inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q22)	MYH11; CBFβ	AML/(MDS)
t(16;21)(p11;q22)	FUS; ERG	AML
i(17)(q10), del(17p)	TP53?	AML/MDS

1.6.2.3 Charakteristische zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML)

In 95% der CML-Fälle ist die Philadelphia-Translokation (t(9;22)(q34;q11)) in den Knochenmarkzellen nachweisbar. Davon zeigen 2-8% eine Variante dieser Translokation, bei denen entweder das Chromosom 9 nicht als Partner des Chromosoms 22 vorliegt, oder bei denen neben den Chromosomen 9 und 22 noch weitere Chromosomen involviert sind. Etwa 5% der CML-Patienten zeigen einen Normalkaryotyp, jedoch lässt sich mittels FISH oder RT-PCR ein BCR-ABL-Rearrangement nachweisen. Diese Form der CML wird als Philadelphia-chromosom-negativ, aber BCR-ABL-positiv bezeichnet.

Zusätzlich zur Philadelphia-Translokation können weitere spezifische Chromosomenanomalien wie ein überzähliges Chromosom 8 (Trisomie 8), 19 (Trisomie 19), ein zusätzliches Derivatchromosom 22 oder ein Isochromosom der langen Arme von Chromosom 17 auftreten. Entwickeln sich diese zusätzlichen Anomalien erst während des Krankheitsverlaufs, so deutet dies auf das Herannahen einer Blastenkrise hin und ist somit von prognostischer

Bedeutung. Im Rahmen der Krankheitsprogression treten bei 75-85% der Patienten solche zusätzliche Karyotypveränderungen auf, während nur 10-20% der Patienten bereits in der chronischen Phase sekundäre Chromosomenanomalien zeigen (Melo, 1996; Fonatsch und Krömer, 2002).

1.6.2.4 Charakteristische zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe

Die primären Chromosomenaberrationen sind eng mit bestimmten morphologischen Lymphomsubtypen assoziiert, so dass ihrem Nachweis eine hohe differentialdiagnostische Bedeutung zukommt. Nachfolgend werden die typischen krankheitsassoziierten Chromosomenveränderungen der Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe, insbesondere die der B-CLL, vorgestellt.

Die charakteristische Chromosomenveränderung der **follikulären Lymphomen** (FL) ist die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$. Sie ist zytogenetisch bei 70-80% der FL der Grade 1 und 2 und 3a nachweisbar, aber lediglich nur bei 20% der FL mit dem Grad 3b. Ca. 40% der FL gehen im Verlauf der Erkrankung in ein **diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom** (DLBCL) über. Etwa 1/3 aller DLBCL zeigen zytogenetisch die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$. Bezüglich der sekundären Aberrationen treten bei der FL Grad 3b und bei DLBCL Verluste im langen Arm von Chromosom 6, ein Zugewinn des Chromosoms 1 sowie überzählige Chromosomen 7 auf (Katzenberger et al., 2000; Horsman et al., 2001). Bei $t(14;18)(q32;q21)$ -negativen FL-Patienten findet sich häufig eine Trisomie 3, 18 und eine Translokation $t(3;14)(q27;q32)$.

Mantelzell-Lymphome haben meist einen aggressiven, letztendlich therapieresistenten Verlauf und deshalb die schlechteste Prognose aller maligner Lymphome. Charakteristisch ist das Vorliegen der Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, die auch bei ca. 14% der Patienten mit Plasmazytom und sehr selten bei Patienten mit B-CLL vorkommt. Sie ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die häufigsten sekundären Aberrationen zu dem Vorliegen einer $t(11;14)(q13;q32)$ sind Verluste der Chromosomen Y, 9 und 13 sowie eine Trisomie 3 (Zietz et al., 2000; Harder und Grote, 2002).

Die Diagnose eines **Burkitt-Lymphoms** gilt durch den Nachweis der typischen Burkitt-Translokation $t(8;14)(q24;q32)$ oder ihre Varianten $t(2;8)(p11;q24)$ und $t(8;22)(q24;q11)$ als gesichert. Sie treten sowohl bei Epstein-Barr-Virus (EBV)-positiven als auch bei EBV-negativen Burkitt-Lymphomen auf (Siebert et al., 1998). Als sekundäre Chromosomenanomalien finden sich am häufigsten Zugewinne im langen Arm von Chromosom 1 und 7 sowie Verluste im langen Arm von Chromosom 6, 11, 13 und im kurzen Arm von Chromosom 17.

Beim **Plasmozytom** finden sich häufiger zytogenetische Aberrationen als in den multiplen Myelomen. Dennoch liegen bisher vergleichsweise wenig Daten über genetische Veränderungen der malignen Plasmazellen vor, so dass prognostische Faktoren auf genetischer Ebene, die zu therapeutischen Konsequenzen führen könnten, zur Zeit noch in klinischen Studien überprüft werden. Grund hierfür ist die schwierige Metaphasengewinnung, da die Plasmazellen *in vitro* nur sehr langsam proliferieren und häufig ein niedriger Infiltrationsgrad des Knochenmarks mit malignen Plasmazellen vorliegt (Schoch und Haferlach, 2002). Die häufigsten numerischen Anomalien sind die Monosomie 13 und die Trisomie 9. Auch Zugewinne der Chromosomen 1, 3, 5, 7, 11, 15 und 19 sowie der Verlust von Chromosom X und Y sind beschrieben (Seong et al., 1998). Häufig beobachtet wurden strukturelle Veränderungen von Chromosom 1 und 13 (Deletion 13q), sowie der Chromosomenbanden 14q32 und 11q13-q23 (Michaux, 1997; Schoch und Haferlach, 2002). Eine Assoziation zwischen aberranten Karyotyp und kürzerer Überlebenszeit wurde beschrieben (Weh et al., 1993; Lai et al., 1995). Ferner wurde eine kürzere Überlebenszeit von Patienten mit 13q-Deletionen beobachtet (Tricot et al., 1995; Vesole et al., 1996; Seong et al., 1998). Auch eine 11q-Aberration stellt einen ungünstigen prognostischen Faktor dar (Tricot et al., 1995; Vesole et al., 1996).

Noch anfangs der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden niedrige Raten chromosomaler Aberrationen im Zusammenhang mit **B-CLL** Erkrankungen publiziert. Die am häufigsten gefundene Aberration war die Trisomie 12, weniger häufig fanden sich Veränderungen an den Chromosomen 13q, 11q und 14q. Mit der Verbesserung der Technik zum Nachweis chromosomaler Aberrationen und insbesondere durch die Einführung der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung, können inzwischen bei über 80% der B-CLL-Fällen chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden (Tabelle 1.7) (Kipps, 2000; Oduncu et al., 2000).

Bei der B-CLL sind Chromosomentranslokationen eher selten, wohingegen Deletionen die am stärksten vertretenen Karyotypanomalien darstellen. Bisher ist über die molekulare Pathologie und damit über die betroffenen Gene der Subtypen der B-CLL wenig bekannt. Dennoch zeigte sich, dass bestimmte klonale Chromosomenaberrationen als Prognosefaktor sowie zur Klassifikation der B-CLL in klinisch unterschiedliche Einheiten herangezogen werden können (Novak et al., 2002).

Die derzeit am häufigsten gefundene Anomalie ist eine Deletion im langen Arm des Chromosoms 13, die in 50-60% der Fälle auftritt. Zweidrittel dieser Patienten haben eine Deletion 13q14-q22 oder 13q12-q14, während bei einem Drittel das Chromosomensegment 13q14 in eine Translokation involviert ist. Diese ist meist sehr komplex und betrifft zwei oder mehr Partnerchromosome, wobei genetisches Material von der Region 13q14 verloren geht (Oscier,

1999). Die Deletion 13q14 kann nach den bisherigen Studien als prognostisch günstig bewertet werden. Das hier liegende potenzielle Tumorsuppressorgen wurde bisher noch nicht eindeutig charakterisiert (Kalachikov et al., 1997; Dalla-Favera, 1998).

Das Vorkommen einer Trisomie 12 variiert zwischen 10-20% mittels konventioneller zytogenetischer Analyse und 15-45% mittels Interphase-FISH. Die prognostische Relevanz der isolierten Trisomie 12 ist noch nicht eindeutig geklärt. In weiteren 20% der Fälle treten Deletionen am langen Arm des Chromosoms 11 (11q23) auf, die als prognostisch ungünstig gelten. Die deletierte Region von 2-3 MB (Megabasenpaare) betrifft das ATM-Gen (Ataxia teleangiectasia). Eine Deletion im langen Arm von Chromosom 6 (6q21-23) kommt in 7-9% der Fälle vor. Sie wird prognostisch als günstig eingestuft (Oscier, 1999; Oduncu et al., 2000).

Bei ca. 7% der B-CLL-Fälle kann eine Deletion des p53-Gens in der Chromosomenregion 17p13 nachgewiesen werden. Es besteht dann häufig eine Therapieresistenz mit entsprechend ungünstiger Prognose und kurzem Gesamtüberleben (Harder und Grote, 2002).

Tab 1.7 Molekularzytogenetisch nachweisbare Aberrationen bei der B-CLL (nach Harder und Grote, 2002 und Oduncu et al., 2000)

Aberration	Häufigkeit (%)	Involvierte Gene	Prognose
Deletion 13q14	50-60	unbekannt	günstig
Trisomie 12	15-45	unbekannt	ungeklärt
Deletion 11q23	20	ATM	ungünstig
Deletion 6q21-23	7-9	unbekannt	günstig
Deletion 17p13	7	p53	ungünstig

1.6.3 Die Trisomie 12 bei der B-CLL

1980 wurde erstmals die Trisomie 12 als erste Chromosomenaberration bei B-CLL-Patienten von Gahrton et al. beobachtet. Anfang und Mitte der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die Trisomie 12 als häufigste Chromosomenaberration mit ungünstigem prognostischem Wert beschrieben (Juliussen et al., 1990). Die Häufigkeit der Trisomie 12 bei B-CLL-Fällen wurde mit 11-54% angegeben (Juliussen et al., 1990; Anastasi et al., 1992; Raghoebier et al., 1992; Bienz et al., 1993; Que et al., 1993). Nach neueren Studien stellt sie die häufigste numerische Aberration bei der B-CLL dar. Eine partielle Trisomie 12, die auf eine kritische Genregion dieses Chromosoms hindeuten könnte, wurde bisher nur in wenigen B-CLL-Fällen

beobachtet (Döhner et al., 1993). Das duplizierte Segment enthielt stets die Region 12q13-q21.2, die vermutlich die Gene enthält, die im Zusammenhang mit der Pathogenese von B-CLL-Tumoren mit Trisomie 12 stehen (Döhner et al., 1999).

Mittels der Interphase-Zytogenetik wird die Trisomie 12 häufiger detektiert als mit der konventionellen Chromosomen-Bandentechnik. Für die Interphase-FISH eignen sich DNA-Sonden, die die repetitiven Sequenzen der Zentromer- und Perizentromer-Region markieren. Die Häufigkeit der Trisomie 12 wird mit dieser Technik zwischen 11-30% (Döhner et al., 1999) und 15-45% (Oscier, 1999) angegeben. Gelegentlich lässt sich die Trisomie 12 nicht zum Zeitpunkt der Diagnose nachweisen und scheint erst später von den leukämischen Zellen erworben zu werden. Betroffene Patienten zeigen vergleichbar dem Richter-Syndrom (seltenen Übergang einer niedrigmalignen B-CLL in eine Verlaufsform von höherer Malignität) einen aggressiven Krankheitsverlauf (Brynes et al., 1995; Shahidi et al., 1997; Solé et al., 1997).

Mit der Interphase-FISH stellte sich heraus, dass die Trisomie 12 meistens nicht in allen leukämischen Zellen nachweisbar ist (Garcia-Marco et al., 1994; Mould et al., 1996) und sich vermutlich mit fortschreitendem Krankheitsverlauf ausbreitet (Garcia-Marco, et al., 1997).

Dennoch wurde die Trisomie 12 auch bei Patienten mit Krankheitsstadium A gefunden und häufig als erste chromosomale Anomalie im Krankheitsverlauf nachgewiesen (Kipps, 2000b). Die Trisomie 12 wird vermehrt im Zusammenhang mit einer morphologisch und immunphänotypisch atypischen B-CLL beschrieben (Criel et al., 1994; Knauf et al., 1995; Matutes et al., 1996). Die atypischen B-CLL-Zellen haben, verglichen mit typischen gut differenzierten B-CLL-Lymphozyten, einen größeren Durchmesser, eine weniger gerundete Form und ein eingeschnürtes Chromatin. Weitere Untersuchungen zeigten, dass B-CLL-Zellen mit Trisomie 12 tendenziell vermehrt Immunglobuline exprimieren als B-CLL-Zellen ohne diese zytogenetische Aberration (Kipps, 2000b). Fälle mit Trisomie 12 exprimieren im Gegensatz zu Fällen mit anderen zytogenetischen Aberrationen, wie z.B. die Deletion 13q, eine nicht mutierte IgV-(immunglobulin variable) Genregion (Oscier et al., 1997).

Hinsichtlich des prognostischen Werts der Trisomie 12 bzw. 12q sind die bisherigen Daten kontrovers. Frühe Studien assoziierten die Trisomie 12 mit einer schlechten Prognose, da die betroffenen Patienten eine kürzere behandlungsfreie Zeit und eine rasche Krankheitsprogression zeigten (Juliussin et al., 1990). Weitere Daten ließen auf einen schlechten Prognosefaktor bei typischen B-CLL-Fällen und auf prognostische Irrelevanz bei atypischen Fällen schließen (Criel et al., 1997). Da atypische B-CLL-Fälle unabhängig von einer Trisomie 12 einen schlechteren Krankheitsverlauf haben, ist die Morphologie in diesen Fällen ein zuverlässige-

rer Prognosefaktor als die Präsenz einer Trisomie 12 (Kipps, 2000b). Auer et al. (1999) konnten keinen Zusammenhang zwischen einer Trisomie 12 und einer kürzeren Überlebenszeit nachweisen. Oduncu et al. (2000) beschreiben die Prognose einer Trisomie 12 bei einer B-CLL sogar als günstig. Döhner et al. (2000) zeigten, dass B-CLL-Patienten mit einer Trisomie 12 eine kürzere Überlebenszeit haben, als B-CLL-Patienten mit einer isolierten 13q Deletion. In Zukunft muss durch weitere Studien die prognostische Relevanz der Trisomie 12 geklärt werden.

1.7 Methoden der Zytogenetik

Die Zytogenetik befasst sich mit der Darstellung des menschlichen Chromosomensatzes. Seit ihrer Einführung in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts wird sie ständig verbessert und mit neuen Techniken bereichert. Inzwischen lässt sie sich in die konventionelle Bänderungs-Zytogenetik und in die molekulare Zytogenetik untergliedern.

1.7.1 Konventionelle Bänderungs-Zytogenetik

Die konventionelle Bänderungs-Zytogenetik des ganzen Chromosomensatzes setzt für die Gewinnung der Metaphasen eine Zellkultivierung voraus. Diese ist gerade im Bereich der Tumorzytogenetik mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, da hierfür spezifische mitoseinduzierende Substanzen eingesetzt werden müssen. Neben einem häufig geringen Mitoseindex und klonaler Heterogenität der Tumorzellen erschweren auch Derivat- und Markerchromosomen die zytogenetische Tumoranalyse (Heim und Mitelman, 1995).

Verschiedene Behandlungs- und Färbemethoden führen zur reproduzierbaren Darstellung horizontaler, heller und dunkler Banden, welche die Identifikation und Beurteilung jedes einzelnen Chromosoms ermöglichen. Während sich die heterochromatischen Segmente als C-Banden darstellen lassen, kann man die euchromatischen Abschnitte durch verschiedene Bandentechniken untergliedern. Die gängigsten sind die G-, Q- und R-Bandentechniken (*G=Giemsa*, *Q=Quinacrin*, *R=reverse banding*), wobei das G-Bandenmuster komplementär zum R-Bandenmuster ist (Traut, 1991). Bei der Darstellung dieser Bandenmuster können in Abhängigkeit vom Kontraktionszustand der Chromosomen unterschiedliche Auflösungen erreicht werden. Die Analyse von Metaphasenchromosomen normaler Blutlymphozyten erreicht im Mittel eine Auflösung von gut 400 Banden, wohingegen bei der Chromosomenpräparationen aus Leukämiezellen die Auflösung häufig nur 150-300 Banden beträgt (Rieder und Bradtke, 2002).

1.7.2 Molekulare Zytogenetik

Die Entwicklung molekularzytogenetischer Techniken hat die Möglichkeiten der Detektion von Chromosomenaberrationen in Tumorzellen erheblich erweitert (Lichter et al., 1990 und 1995). Für diese Art von Untersuchungen sind spezifische DNA-Sonden notwendig

1.7.2.1 Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Arbeiten von Pardue und Gall (1969) sowie John et al. (1969) führten zur Einführung der FISH-Technik. Die FISH beruht auf dem Prinzip, dass sich Einzelstrang-DNA an komplementäre DNA-Sequenzen spezifisch anlagert. Die Ziel-DNA ist dabei die DNA von Metaphasen oder die nukleäre DNA von Interphasezellen. Während ursprünglich eine radioaktiv-markierte DNA-Sonde eingesetzt wurde, hat sich seit Anfang der achtziger Jahre die Markierung mittels Fluoreszenzfarbstoffen durchgesetzt (Lichter und Ried, 1994).

Die Hybridisierung mit genomischen DNA-Sonden ermöglicht die Identifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberration anhand von aberranten Fluoreszenzsignalen. Die Bruchpunkte von Translokationen werden durch ein gesplittetes Fluoreszenzmuster sichtbar (Morgan und Pratt, 1998). Die Sensitivität dieser Technik wird durch die DNA-Sonde und der Ziel-DNA begrenzt. Mittels der Chromosomenbandenanalyse können nur Aberrationen erkannt werden, bei denen das Rearrangement oder die Deletion eine Region von mehreren Megabasenpaare betrifft. Die FISH kann hingegen auch wesentlich kleinere Aberrationen identifizieren. Für eine ausreichende Hybridisierungseffizienz sollte das klonierte DNA-Fragment eine Größe von mindestens 30-40kb haben und z.B. in einem Cosmidvektor kloniert sein (Lichter et al., 1995). Das Auflösungsvermögen der FISH-Technik ist drei Zehnerpotenzen höher als das der *High-Resolution*-Bandentechnik (Schuffenhauer, 1999). Auf Grund ihrer hohen Sensitivität, der räumlichen Auflösung der Signale und der Möglichkeit, multiple Sonden zu kombinieren und differentiell in zellulären Präparaten nachzuweisen, ist die FISH-Technik besonders populär geworden (Lichter und Speicher, 1999).

Dennoch stellt die FISH-Technik zwar eine sehr gute Ergänzung, jedoch keinen Ersatz zur zytogenetischen Bandenanalyse dar. Mit dieser Technik lässt sich nur eine Aussage über die jeweiligen speziell untersuchten (markierten) Chromosomen- oder Genabschnitte machen, nicht jedoch über andere vorliegende Chromosomenaberrationen (Pachmann, 1997). Die FISH-Technik erlaubt eine Kombination verschiedener Sonden (multiplex FISH), so dass simultan unterschiedliche Aberrationen untersucht werden können (Morgan und Pratt, 1998). Die Vorzüge der FISH lassen sich wie folgt zusammenfassen (Drach, 1993):

- Rasche Testdurchführung
- Hohe Sensitivität und Spezifität

- Zytogenetische Daten lassen sich an nicht-teilenden oder terminal differenzierten Zellen erheben
- Analyse zytogenetischer Veränderungen an einer großen Zellzahl
- Möglichkeit der direkten Korrelation von Zytogenetik und Zellmorphologie

1.7.2.2 Die Interphasezytogenetik mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Analyse zytogenetischer Veränderungen an nicht-teilenden Zellen mittels FISH wird nach Cremer et al. (1986) als Interphasezytogenetik bezeichnet. Diese Interphasezytogenetik eignet sich besonders zur Untersuchung von Tumoren, aus denen sich nur schwierig Metaphasen gewinnen lassen, oder die Metaphasen nicht den leukämischen Klon repräsentieren (Döhner et al., 1999). Durch die Unabhängigkeit von Zellkultursystemen werden mögliche sekundäre genomischen Veränderungen, die mit den in vitro Kulturbedingungen assoziiert sind, ausgeschlossen. Die Interphasezytogenetik eignet sich zur Überwachung residualer maligner Zellen von Tumorpatienten während und nach einer Therapie (Remissionskontrolle). Hier spielt weniger der Nachweis, sondern mehr die Frequenz der Zellen mit bestimmten Tumor-assoziierten genomischen Veränderungen eine Rolle (Lichter und Speicher, 1999).

1.7.2.3 FICTION-Technik (Fluorescence-Immunophenotyping and Interphase Cytogenetic as a Tool for Investigation of Neoplasms)

Die FICTION-Technik ist eine Methode, mit der sich gleichzeitig der Immunphänotyp mittels Fluoreszenz-Immunfärbung und der Genotyp mittels Interphase-FISH darstellen lassen. Diese Methode wurde 1992 von Weber-Matthiesen et al. beschrieben und eignet sich zur Untersuchung von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen in einzelnen, immunphänotypisch definierten Zellen. Vorteile gegenüber der konventionellen Zytogenetik liegen in der Unabhängigkeit von mitotischen Zellen und in der selektiven Untersuchung von Tumor-assoziierten phänotypisch erkennbaren Zellen. Des Weiteren ist die Methode rasch durchführbar (Färbung und Auswertung an einem Tag möglich) und es kann auch eingefrorenes Material verwendet werden (Weber Matthiesen et al., 1993a). Die Technik kann mit drei Fluorochromen, zur simultanen Darstellung des Immunphänotyps und zwei unterschiedlichen numerischen Chromosomenaberrationen durchgeführt werden (Weber-Matthiesen et al., 1993b).

1.7.2.4 Vielfarben-FISH Verfahren

Die FISH-Methode stieß in der Vergangenheit immer wieder auf Kritik, da sie sehr von der Auswahl der DNA-Sonden abhängig ist und für eine sinnvolle Untersuchung Kenntnisse über die zu erwartenden Aberrationen erfordert. Um dies zu verbessern, versuchten zahlreiche Ar-

beitsgruppen die Anzahl der simultan hybridisierbaren DNA-Sonden zu erhöhen. Diese Forschungsarbeiten führten in den letzten Jahren zu einer Vielzahl unterschiedlicher Vielfarben-FISH-Techniken (Tabelle 1.8). Diese Vielfarben-FISH-Methoden haben einige diagnostische Ansätze grundsätzlich verändert, da sie nun erstmals die Abklärung verschiedener struktureller Auffälligkeiten mit nur einer Hybridisierung erlauben. Jedes der Vielfarben-FISH-Verfahren hat seine Vor- und Nachteile, so dass die meisten präferentiell für spezielle Fragestellungen eingesetzt werden sollten (Langer et al., 2001).

Tab 1.8 Übersicht über die derzeit verwendeten Vielfarben-FISH-Techniken und ihre Anwendungsgebiete (Langer et al., 2001)

Technik	Literatur	Präferentielle Anwendungsgebiet
multiplex-FISH (M-FISH)	Speicher et al., 1996	Karyotypisierung; Identifizierung von interchromosomalen Aberrationen; Bestimmung von Euchromatin in Markerchromosomen
Spectral karyotyping (SKY)	Schröck et al., 1996	
Combined Binary Ratio labelling (COBRA)	Tanke et al., 1999	
Colour-changing karyotyping (CCK)	Henegariu et al., 1999	
Chromosomenarm COBRA	Wiegant et al., 2000	
Arm-specific multicolour-FISH	Karhu et al., 2000	
M-FISH telomere integrity assay (8 Chromosomen)	Granow et al., 2000	Suche nach kryptischen Translokationen
M-TEL (12 Chromosomen)	Brown et al., 2001	
TM-FISH (24 Chromosomen)	Henegariu et al., 2001a	
cen M-FISH	Nietzel et al., 2001	Herkunft von Markerchromosomen
CM-FISH	Henegariu et al., 2000b	
Multicolour chromosome bar code/cross-species colour segmenting	Müller et al., 1997 Müller et al., 1998	Karyotypisierung; Analyse von inter- und intrachromosomalen Aberrationen
multicolour-banding (mBand)	Chudoba et al., 1999	Intrachromosomale Umbauten

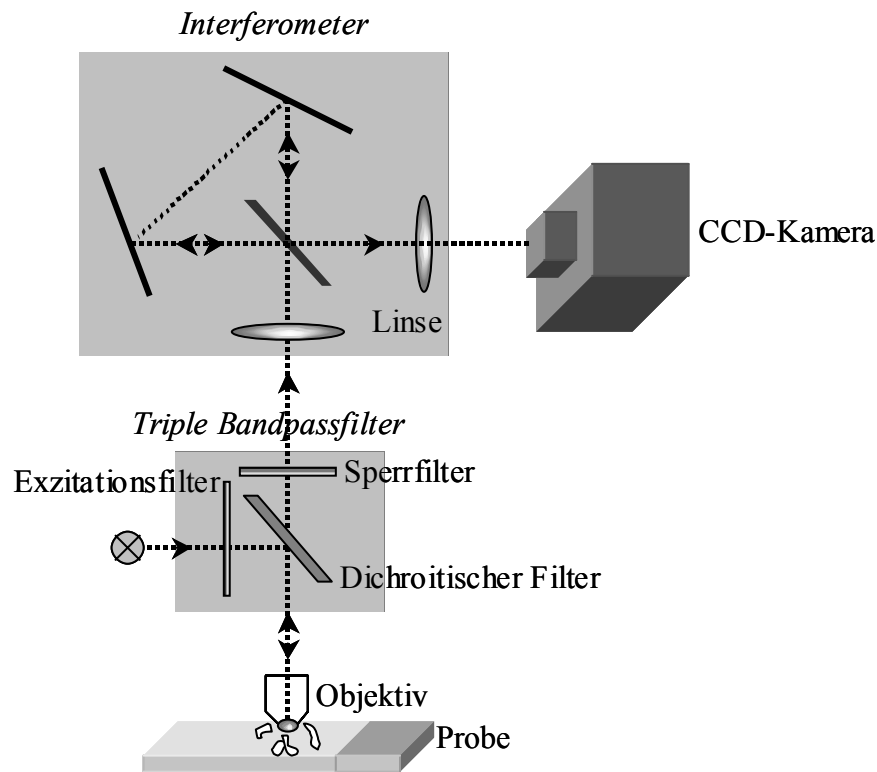
Der Aufschwung der Vielfarbentechniken begann mit den ersten 24-Farben-Methoden, die es ermöglichten, den menschlichen Chromosomensatz nach der spektralen Zusammensetzung von Fluorochromen zu klassifizieren und Karyotypen zu generieren. Die Ansätze hierfür gehen auf die Arbeiten von Speicher et al., 1996 (M-FISH) und Schröck et al., 1996 (SKY) zurück und werden seitdem ergänzt. All diese Techniken verwenden chromosomenspezifische Painting-Sonden, die jeweils ein gesamtes Chromosom anfärben. Sie unterscheiden sich im wesentlichen durch die Aufnahmetechniken und Fluorochrom-Markierungsstrategien (Langer et al., 2001).

1.7.2.5 *Spectral Karyotyping* (SKY)

Die Technik des *Spectral Karyotyping* basiert auf einer Kombination aus FISH mit Painting-Sonden, einem optischem Mikroskop und einer spektralen Bilddarstellung mit Chromosomenklassifikation (Garnini et al., 1996). SKY erlaubt die simultane Darstellung aller 24 humaner Metaphasechromosomen in 24 unterschiedlichen Farben. In einer Messung werden von einem SpectraCube System, das eine Kombination aus einem Interferometer und einer CCD-Kamera (*Charge-Coupled Device*) darstellt, das mit einem Epifluoreszenzmikroskop verbunden ist, das komplette Emissionsspektrum aller Bildpunkte aufgenommen und durch den Vergleich der gemessenen Spektren mit einem Referenzspektrum die Chromosomen klassifiziert. Die Messung ist größtenteils unabhängig von unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten und Hintergrund-Hybridisierungen (Koehler et al., 1999; Schröck et al., 1999) (Abbildung 1.3).

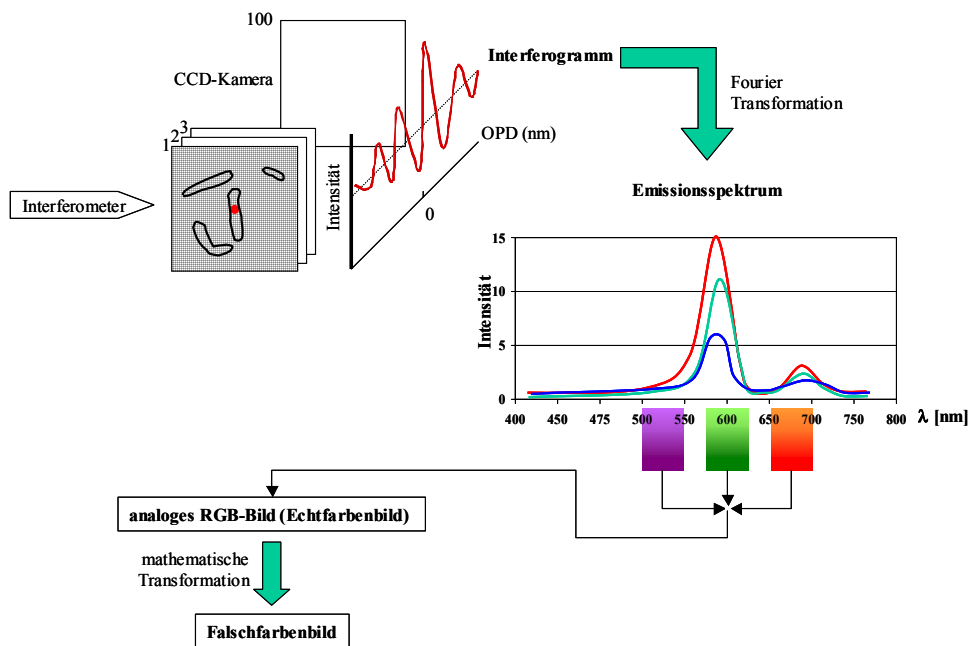
Für das *Spectral Karyotyping* werden 24 humane Chromosomensonden eingesetzt, die mit fünf unterschiedlichen Fluorochromen (1x grün (*Spectrum green*), 2x rot (Cy2 und Cy3), 2x Infrarot (*Texas Red* und Cy5)) markiert sind. Jedes Chromosom enthält eine einzigartige Kombination von Fluorochromen und hat dadurch ein charakteristisches Emissionsspektrum, das zur Klassifikation dient. Die Bildverrechnung wird mittels SpectraCube System realisiert und kann an fast jedes Fluoreszenzmikroskop installiert werden. Die Exzitation und Emission der Fluorochrome wird durch einen einzigen triple-band-pass Filter realisiert. Mit einer Messung wird das gesamte Spektrum des emittierten Lichts simultan von jedem Bildpunkt mit der CCD-Kamera aufgenommen (Koehler et al., 1999, Schröck et al., 1996).

Abb 1.3: Schematische Darstellung des *Spectral Imaging Systems* (Koehler et al., 1999, modifiziert)



Von der spektralen Information eines jeden Bildpunktes wird mittels Fourier Transformation des Interferogramms (Garini et al., 1996; Malik et al., 1996) von jedem Pixel des Spektralbildes eine Emissionskurve generiert, die die Fluoreszenzintensität pro Wellenlänge angibt. Die Visualisations-Software zeigt diese Daten in einem RGB (rot/grün/blau) „Echtfarben“ Bild an (Abbildung 1.4). Aus diesem Bild lassen sich Informationen über die Hybridisierungsparameter, wie die Signalintensität, die Hybridisierungshomogenität und die Suppression repetitiver DNA-Regionen entnehmen. Das menschliche Auge erlaubt nur bedingt die Analyse dieses Echtfarbenbildes, deshalb werden die Daten über die Emissionsspektren mittels mathematischer Algorithmen in ein „Falschfarben-Bild“ umgewandelt (Macville et al., 1997).

Abb 1.4 Schematische Darstellung der Visualisierung des Interferogramms (Schröck et al., 1996, modifiziert)



Parallel zum Spektralbild wird die analysierte, auch DAPI gefärbte Metaphase mit einem DAPI-Filter aufgenommen. Das anschließend elektronisch invertierte DAPI-Bild erreicht fast G-Banden Qualität und ergänzt die Interpretation der SKY Daten.

Aufbauend auf der von Schröck et al. (1996) beschriebenen molekularzytogenetischen SKY-Technik, wird derzeit im Rahmen eines Projektes der Uni Kiel (Interdisziplinäres Zentrum für klinische Krebsforschung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel; <http://www.uni-kiel.de/izkf>) eine neue Methode - spectral-FICTION - etabliert. Sie verbindet die Vorteile der FICTION- und SKY-Technik, um simultan mehrere immunphänotypische Marker und genetische Veränderungen in Interphasezellen untersuchen zu können.

1.8 Kultivierung von Tumorzellen

Die Tumorzytogenetik ist mit wesentlich schwierigeren technischen Problemen konfrontiert als die prä- und postnatale Zytogenetik. Eine erfolgreiche Tumoranalyse setzt die Anreicherung von Metaphasen der entsprechenden Zellpopulationen voraus, welche durch spezifische Stimulierung erreicht wird. Auf Grund spezieller Erfordernissen verschiedener Tumorgewebe an Wachstumsfaktoren ist es jedoch auch heute noch teilweise sehr schwierig, die entsprechenden selektiven Kulturbedingungen zu schaffen (Haas, 1999).

1.8.1 Kultivierung von malignen B-Zellen

Die Kultivierung maligner B-Zellen wird durch verschiedene Probleme erschwert. Die malignen B-Zellen zeigen eine sehr geringe spontane mitotische Aktivität. Im Körper liegen sie überwiegend in der G₀-Phase des Zellzykluses vor und akkumulieren über die Zeit. Die Stimulation von malignen B-Zellen ist problematisch, da sie einerseits häufig sehr schlecht auf Mitogene reagieren und andererseits im Vergleich zur guten Stimulation von T-Zellen durch Phytohämagglutinin (PHA), derzeit noch kein entsprechender Stimulator gefunden wurde. Die gängigsten B-Zell-Aktivatoren sind das Epstein-Barr virus (EBV), Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* (LPS), Protein A und Phorbolester (TPA) (Heim und Mitelman, 1995). Diese Wachstumsfaktoren steigern die mitotische Aktivität der malignen B-Zellen, regen meist aber auch die normalen B-Zellen zur Teilung an, die dann die malignen B-Zellen überlagern und eine zytogenetische Analyse erschweren können (Schlegelberger et al., 1999).

Die meisten zytogenetischen Studien verwenden zur Stimulation von B-CLL-Zellen TPA, wodurch sich in 50% der untersuchten Fällen eine klonale Chromosomenanomalie nachweisen lässt. Neuere Studien erzielen mit der Kombination verschiedener Mitogene wie TNF α (tumor necrosis factor α), IL2 (Interleukin 2) und TPA Chromosomenanomalien in bis zu 80% der Fälle (Oscier, 1999a). Die Verwendung eines Mitogen-Cocktails aus PHA und IL2 wird von Morgan et al. (1999) als ein effizienter Stimulator von Non-Hodkin-Lymphomen und der chronisch lymphatischen Leukämie beschrieben. In allen, im Rahmen dieser Studie untersuchten 57 Fällen (35 NHL, 22 CLL), konnten in den PHA/IL2 stimulierten Kulturen zytogenetisch abnorme Klone nachgewiesen werden. Die T-Zellaktivierung durch das PHA scheint indirekt stimulierend auf die B-Zellen zu wirken (Knuutila und Kovanen, 1987). Interleukin 2 ist als Wachstumsfaktor für T-Zellen bekannt, aber auch in B-CLL-Zellen konnten IL2- Rezeptormoleküle (IL2-R) nachgewiesen werden (de Toter et al., 1995). Weitere Untersuchungen von McMillan et al. (1995) und Paietta et al. (1997) lassen vermuten, dass die IL2-R Expression ein Charakteristikum der meisten humanen malignen Zellen ist und deswegen IL-2 eine Rolle in der malignen Zellproliferation zukommt.

Auch der Einsatz von konditioniertem Medium wird für die Zellkultivierung bei hämatologischen Erkrankungen beschrieben. Wason und Richkind (1992) konditionierten Medium mit Wachstumsfaktoren von exprimierenden GCT-Zellen (*giant cell tumor*), die auf das Wachstum von Knochenmarkzellen hämatologischer Erkrankungen stimulierend wirken. Rosén et al. etablierte 1986 eine Zelllinie (MP6), bestehend aus einem Hybridklon aus humanem T-Zell Lymphom MOLT4 (HPRT⁻-Variante) und normalen humanen CD4⁺ T-Helfer-Zellen, die unter anderem einen B-Zellen Stimulationsfaktor (*B-cell stimulatory factor* (BSF)) produ-

ziert. Der B-CLL Klon I83 reagierte auf die Kultivierungen mit MP-6 konditioniertem Medium unter der Zugabe von Phorbolster TPA mit Zelldifferenzierung und signifikanter DNA-Synthese. Bei einer Kultivierung ohne konditioniertem Medium unter Zugabe von TPA fand nur eine Zelldifferenzierung statt (Carlsson et al., 1988). Der 12kDa schwere BSF konnte als Thioredoxin (Trx) identifiziert werden (Rosen et al., 1995).

1.8.2 Thioredoxin

Thioredoxin ist ein redoxaktives und multifunktionelles Molekül mit niedrigem Molekulargewicht (12kDa). Das aktive Zentrum enthält zwei benachbarte Cysteinreste (Cys-X-X-Cys), welche in der reduzierten Form zwei Sulfhydrylgruppen und in der oxidierten Form eine Disulfidbindung (Dithio-/Disulfid-Austauschaktivität) besitzen (Holmgren, 1985; Powis et al., 1995; Nakamura et al., 1997). Die reversible Disulfid-Reduktion wird durch eine NADPH-abhängige Trx-Reduktase, ein Selenprotein, katalysiert (Holmgren und Björnstedt, 1995). In eukaryontischen Zellen, besonders in Lymphozyten, wird die Wachstumskontrolle über die Änderung des Redoxpotenzials reguliert (Alberini et al., 1990; Wakasugi et al., 1990; Yodoi und Tursz, 1991; Ericson et al., 1992;). Verschiedene extrazelluläre Cytokinaktivitäten wie *IL-1 like factor*, *B-cell stimulator factor*, *IL-2R inducing factor*, *eosinophil cytotoxicity enhancing factor* und *chemotactic factor* können Trx zugeordnet werden (Wollman et al., 1988; Silberstein et al., 1989; Tagaya et al., 1989; Rosén et al., 1995; Bertini et al., 1999). Thioredoxin ist ein wachstumsstimulierendes Redoxprotein, das in zahlreichen humanen Neoplasien überexprimiert wird. In B-CLL-Zellen ist die Trx-Expression sehr gering, aber induzierbar (Ericsson et al., 1992).

Die nachfolgenden Kapitel Material und Methoden, Ergebnisse und Diskussion sind jeweils in die drei Themenschwerpunkte FICTION, SKY und Kultivierung untergliedert.

2 MATERIAL UND METHODEN

Schwerpunkt: FICTION

2.1 Numerische Chromosomenanalyse des Chromosoms 12 in CD20 positiven B-Zellen mittels FICTION-Technik

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte FICTION-Technik diente der numerischen Chromosomenanalyse des Chromosoms 12 in CD20 positiven B-Zellen. Für die Untersuchung stand Blut von 53 Patienten mit der Verdachtsdiagnose oder Diagnose einer B-CLL zur Verfügung.

2.1.1 Untersuchungsmaterial und Patientenprofile

Die Untersuchung erfolgte an Ausstrichpräparate von peripherem Blut (EDTA- oder Heparin-Blut). Als Kontrolle (Ko) dienten Blutausstrichpräparate von sechs gesunden Probanden. Die entsprechenden Patientenprofile und Daten der Kontrollpersonen sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tab 2.1 Patientenprofile und Daten der Kontrollpersonen

ID	Alter/Geschlecht	Diagnose bei Probenannahme	Enddiagnose
Kontrollpersonen			
Ko 1	27/m	--	--
Ko 2	32/m	--	--
Ko 3	25/m	--	--
Ko 4	24/w	--	--
Ko 5	56/w	--	--
Ko 6	30/w	--	--
Patienten			
1	54/m	B-CLL	B-CLL
2	84/w	V.a. B-CLL	atypische B-CLL/ Prolymphozyten-Leukämie?
3	79/m	NHL	NHL
4	57/w	V.a. B-CLL	B-CLL
5	69/w	B-CLL	B-CLL
6	80/w	B-CLL	B-CLL
7	61/m	B-CLL	B-CLL
8	71/w	V.a. B-CLL	B-CLL mit atypischen B-Zellen

ID	Alter/Geschlecht	Diagnose bei Probenannahme	Enddiagnose
9	75/w	85% B-Zellen	B-NHL, B-CLL-Variante?
10	69/w	V.a. B-CLL	B-CLL
11	47/m	V.a. B-CLL	B-CLL
12	90/w		B-NHL, immunologisch nicht sicher einzuordnen, Mantelzell-Lymphom?
13	66/w	V.a. B-CLL	B-CLL
14	73/w	V.a. B-CLL	B-CLL
15	82/w	V.a. B-CLL	B-CLL
16	63/w	B-CLL	B-CLL
17	55/m	B-CLL	B-CLL
18	48/m	B-CLL	B-CLL
19	79/m	88% B-Zellen	keine typische B-CLL, Immunozytom?
20	70/m	B-CLL	B-CLL
21	80/w	B-CLL	B-CLL
22	68/m	B-CLL	B-CLL
23	69/w	B-CLL	B-CLL
24	71/m	B-CLL	B-CLL
25	39/m	B-CLL	B-CLL
26	56/m	B-CLL	B-CLL
27	61/m	B-CLL	B-CLL
28	60/w	V.a. B-CLL	B-CLL-Variante, PLL?, Immunozytom?
29	74/w	B-CLL	B-CLL
30	45/m	B-CLL	B-CLL
31	69/m	B-CLL	B-CLL
32	64/m	B-CLL	B-CLL
33	59/m	B-CLL	B-CLL
34	53/w	B-CLL?, Marginalzonenlymphom?	Marginalzonenlymphom, Immunozytom?
35	70/w	B-CLL	B-CLL
36	52/m	B-CLL	B-CLL
37	65/m	B-CLL	B-CLL
38	78/m	B-CLL	B-CLL
39	72/m	B-CLL	B-CLL
40	86/w	B-CLL	B-CLL
41	77/w	B-CLL	B-CLL
42	57/w	B-CLL	B-CLL

ID	Alter/Geschlecht	Diagnose bei Probenannahme	Enddiagnose
43	63/m	B-CLL	B-CLL
44	74/w	V.a. B-CLL	B-CLL
45	60/m	B-CLL	B-CLL
46	76/m	B-CLL	B-CLL
47	76/w	B-CLL	B-CLL
48	69/m	B-CLL	B-CLL
49	62/w	B-CLL	B-CLL
50	79/m	V.a. B-CLL	B-CLL
51	70/m	B-NHL	B-NHL
52	71/m	B-CLL	B-CLL
53	85/w	61% B-Zellen	keine nähere Typisierung

Von einer B-CLL-Patientin (ID 5) konnte zur Beobachtung der Entwicklung eines Trisomie 12 Klons wiederholt Blut untersucht werden. An Hand von Ausstrichpräparaten wurde mittels der FICTION-Technik die Anzahl der Chromosomen 12 in den CD20 positiven B-Zellen bestimmt (Tabelle 2.2).

Tab 2.2 Blutabnahmedaten von Patientin ID 5 über den Zeitraum eines Jahres

Material	Abnahmedaten
EDTA-Blut	Mai 2000
Heparin-Blut	November 2000
Heparin-Blut	März 2001
EDTA-Blut	Mai 2001
Heparin-Blut	Juni 2001

2.1.2 Verwendete Materialien und Geräte

a. Materialien

- Objektträger Superfrost (Menzel)
- Deckgläser (24 x 40mm²)
- Glasküvetten
- Fixogum (Marabu)
- Feuchte Kammer

- Immersionsöl (Serva)
- b. Geräte
 - Mikrowelle
 - Kühlschrank (4°C)
 - Tischzentrifuge (Qualitron)
 - Vortexer
 - Brutschrank (Forma Scientific)
 - Heizblock
 - Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss)
 - Monochrom-CCD-Kamera (Hamamatsu)
 - Rechner mit Software: digitales Farb-Fluoreszenz-Bildanalysesystem ISIS (Meta-system)

2.1.3 Verwendete Reagenzien

- Antikörper (AK)
 - Monoklonaler *mouse anti human* CD 20 AK, CBL 161 (dianova, Hamburg)
 - CyTM3 (rot)-konjugierter *rabbit anti-mouse* AK (dianova, Hamburg)
 - CyTM3 (rot)-konjugierter *donkey anti-rabbit* AK (dianova, Hamburg)
 - FITC (grün) markierter *sheep anti* Digoxigenin Fab-Fragmente (Boehringer, Mannheim)
- Sonde
 - Chromosome 12 α -Satellite (D12Z3), Digoxigenin markiert (Appligene/Oncor, Heidelberg)
- Hybrisol VI (65% Formamid in 2 x SSC) (Appligene/Oncor, Heidelberg)
- Aceton
- 10 x PBS: 0,13 M NaCl; 0,007 M Na₂HPO₄; 0,003 M NaH₂PO₄
 - 1 x PBS
 - 1 x PBS + 0,5% BSA (Rinderserum-Albumin)
 - 1 x PBS + 1% Formaldehyd
- 20 x SSC-Stammlösung: 3 M NaCl; 0,3 M Na₃-Citrat; pH 7,0
 - 2 x SSC
 - 0,25 x SSC
 - 70% Formamid in 2 x SSC
- Ethanol (EtOH) vergällt 70%, 80%, 100%

- BT-Puffer: 0,15 M NaHCO₃; 0,6 mM Na₃-Citrat; pH 8,0
- 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (Serva) in Vectashield (Vector Laboratories) 1:1000

2.1.4 Durchführung der FICTION-Technik

Die Durchführung der FICTION-Methode richtete sich nach dem Protokoll (modifiziert) von Weber-Matthiesen et al. (1993) und den Herstellerangaben von Appligene/Oncor zur FISH mit der D12Z3 Sonde (modifiziert). Von dem zu untersuchenden Material wurden Ausstrichpräparate angefertigt, auf denen die B-Zellen und die Chromosomen 12 simultan mittels der FICTION-Methode markiert wurden.

Die Immunfärbung zur Darstellung der B-Zellen wurde mit dem monoklonalen *mouse anti human* CD20 Antikörper durchgeführt. Das CD20 Antigen wird von allen normalen B-Zellen im peripheren Blut, in Lymphknoten, in der Milz, in den Tonsillen und im Knochenmark sowie von den meisten B-Zelllinien, B-NHL-Zellen, non T-ALL- und B-CLL-Zellen repräsentiert.

Simultan wurden mittels Interphase-FISH die Chromosomen 12 mit der Chromosom 12 α -Satelliten-Sonde markiert. Diese hybridisiert die repetitive alpha DNA im Zentromerbereich der humanen Chromosomen 12 und eignet sich daher zur numerischen Erfassung der Chromosomen 12.

2.1.4.1 Präparateherstellung

Von jeder Blutprobe wurden Ausstrichpräparate (meistens vier) angefertigt, die anschließend über Nacht bei Raumtemperatur (RT) gelagert und am nächsten Tag bis zur Durchführung der FICTION-Methode bei –20°C eingefroren wurden.

2.1.4.2 Immunfärbung mit dem CD20 Antikörper zur Markierung der B-Zellen

- Ausstrichpräparate kurz auftauen lassen
- Objektträger (OT) 10 min bei RT in Aceton fixieren
- OT 3 min bei RT in 1 x PBS + 0,5% BSA waschen
- OT mit 100 μ l Antikörper CD20 (monoklonaler *mouse anti human* CD20 AK) eindecken
Antikörper 1:30 in 1 x PBS + 0,5% BSA verdünnen
Inkubation 30 min in der feuchten Kammer bei 37°C
- OT 3 x 3 min bei RT in 1 x PBS + 0,5% BSA waschen
- OT mit 100 μ l Antikörper *rabbit anti-mouse* Cy3 eindecken

Antikörper 1:200 in 1 x PBS + 0,5% BSA verdünnen

Inkubation 30 min in der feuchten Kammer bei 37°C

- OT 3 x 3 min bei RT in 1 x PBS + 0,5 BSA waschen
- OT mit 100 µl Antikörper *donkey anti-rabbit Cy3* eindecken
Antikörper 1:200 in 1 x PBS + 0,5% BSA verdünnen
Inkubation 30 min in der feuchten Kammer bei 37°C
- OT 3x3 min bei RT in 1 x PBS + 0,5% BSA waschen
- Anschließend FISH durchführen

2.1.4.3 FISH mit der Chromosomen 12 α -Satelliten-Sonde (D12Z3)

a. Nachfixierung

- OT 3 x 3 min bei RT in 1 x PBS waschen
- OT 8 min bei RT in 1 x PBS + 1% Formaldehyd fixieren
- OT 3 x 3 min bei RT in 1 x PBS waschen

b. Vorbehandlung

- OT 30 min 2 x SSC (pH 7,0) bei 37°C
- OT für jeweils 2 min in 70%, 80%, 100% EtOH bei RT dehydrieren

c. Denaturierung

- OT mit 100 µl 70% Formamid/2 x SSC eindecken und bei 76°C für 2 min auf der Heizplatte denaturieren
- OT für jeweils 2 min in eiskaltem 70%, 80%, 100% EtOH dehydrieren und luft-trocknen lassen
- Sonde für 5 min bei 37°C erwärmen
- Sonde kurz vortexen und 2-3 sec abzentrifugieren
- 1,5 µl Sonde mit 30 µl Oncor Hybrisol VI in einem Tube mischen, kurz vortexen und für 5 min bei 72°C im Heizblock denaturieren
- Sonden-Mix 2-3 sec abzentrifugieren und bis zur Hybridisierung bei 4°C lagern

d. Hybridisierung

- Sondenmix auf den OT geben und mit einem 24 x 40 mm² Deckglas eindecken
- Deckglasränder mit Fixogum abdichten und OT in der feuchten Kammer bei 37°C über Nacht hybridisieren lassen

e. Waschen

- Deckglas vorsichtig vom OT entfernen
- OT 5 min in 0,25 x SSC bei 72°C waschen

- OT für 2 min in BT-Puffer bei RT waschen

f. Detektion

- OT mit 100 µl anti-Digoxigenin markierten Antikörper (*sheep* anti Dig Fab FITC-Fragmente) inkubieren
Antikörper 1:500 in BT-Puffer verdünnen
Inkubation 30 min in der feuchten Kammer bei 37°C
- OT 3 x 3 min in BT-Puffer bei RT waschen
- OT mit 18 µl DAPI/ Vectashield eindecken
- OT bis zur mikroskopischen Betrachtung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahren

g. Mikroskop

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte an einem Axioskop Fluoreszenzmikroskop (Zeiss), das mit 3 Einzelbandpass-Filtern (Chroma Technology) für blaue, grüne und rote Fluoreszenzanregung und einem Doppelbandpass-Filter für die gleichzeitige Anregung von roter und grüner Fluoreszenz ausgestattet ist (Pinkel-Filtersatz).

Die Präparate wurden unter der Verwendung von Immersionsöl (Serva) mikroskopiert. Die Bilddokumentation erfolgte mit einer hochempfindlichen Monochrom-CCD-Kamera (Hamamatsu) und dem digitalen Farb-Fluoreszenz-Bildanalytensystem ISIS (Metasystems).

h. Auswertung

Mittels der Immunfärbung wurden die CD20 positiven B-Zellen rot (Farbstoff Cy3) angefärbt. Die Zentromere der Chromosomen 12 waren grün (FITC) markiert. Pro Fall wurde die Signalanzahl der grünen Signale von mindestens 200 CD20 positiven B-Zellen ausgewertet.

Schwerpunkt: SKY

2.2 Einsatz der SKY-Technik zur Analyse verschieden aberranter Karyotypen

Mit Hilfe der SKY-Technik wurden 20 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, die in der G-Bandenanalyse einen aberranten Karyotyp (komplex aberrant, Markerchromosomen, fragliche Aberrationen) aufwiesen, untersucht.

2.2.1 Untersuchungsmaterial und Patientenprofile

Als Untersuchungsgruppe wurden bevorzugt Patienten mit einer Erkrankung der hämatologischen B-Zell-Reihe mit auffälligem zytogenetischen Befund ausgewählt. Insbesondere stark aberrante Karyotypen oder mittels GTG-Bänderung nicht vollständig abgeklärte zytogenetische Befunde waren von besonderem Interesse. Voraussetzung für eine SKY-Untersuchung war Probenmaterial, das eine ausreichende Metaphasenanzahl gewährleistete.

Die konventionelle G-Bandenanalyse wurde im Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserslautern nach der dortigen Standardmethode durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial wurde aus heparinisiertem Blut oder Knochenmark (KM) von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen gewonnen. Die Kultivierung wurde je nach der betroffenen Zellreihe der Erkrankung stimuliert. Für Erkrankungen der myeloischen Zellreihe wurden stimulierte Kurz- und Langzeitkulturen (24h und 72h) unter Zugabe von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen *colony stimulating factor*) angesetzt. War die B-Zellreihe von der Erkrankung betroffen wurde eine 24h unstimulierte Kultur und eine mit dem Phorbol ester TPA stimulierte 72h Kultur angesetzt. Bei nicht eindeutiger Diagnose wurde eine unstimulierte Kurzzeitkultur, eine GM-CSF und TPA stimulierte Langzeitkultur angelegt. Anschließend stand von den jeweiligen Fällen die restlichen in Methanol/Eisessig fixierten Zellsuspensionen aus den Kurz- und Langzeitkulturen der SKY-Untersuchung zur Verfügung. Pro Fall wurde die fixierte Zellsuspension ausgewählt, die in der G-Bandenanalyse die meisten aberranten Metaphasen zeigte. Die entsprechenden Patientenprofile sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tab 2.3 Patientenprofile der mit SKY untersuchten Fälle

ID	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Material	Kultur	Karyotyp der G-Bandenanalyse
1	67/m	AML/ M1	KM	24h/GM-CSF	Stark aberrant
2	45/w	AML/ M6	KM	72h/GM-CSF	45,XX, ?-7
3	65/w	AML rezidiv	KM	24h/GM-CSF 72h/GM-CSF	46,XX,-5,add(6)(p23?), +mar
4	50/m	B-CLL	KM (7/2000) KM (1/2001)	72h/TPA 24h/un- stimuliert	<u>Mosaik:</u> 46,XY/44-46 komplex aberrant <u>Mosaik:</u> 43-46 komplex aberrant/46,XY
5	43/w	V.a. schweres MDS	KM	72h/GM-CSF	45,XX,-5,-7,-12,-13,-17, +4mar
6	64/m	B-CLL	KM	72h/TPA	<u>Mosaik:</u> 46,XY,del(3)(p23?), add(17)(q24?)/46,XY
7	78/w	V.a. NHL rezidiv	KM	24h/un- stimuliert	41-44 numerisch und struk- turell aberrant; kein einheit- licher Karyotyp
8	69/w	B-CLL	KM	72h/TPA	<u>Mosaik:</u> 46,XX/47,XX,+12
9	65/m	B-CLL	KM	72h/TPA	<u>Mosaik:</u> 46,XY,+12,-18/ 46,XY
10	59/m	Nicht bekannt	KM	72h/TPA	<u>Mosaik:</u> 46,XY/46,XY,?add(1)(p36)
11	81/w	CML-Verlauf	KM	72h/GM-CSF	46,XX, komplexe struktu- relle Veränderungen
12	79/m	V.a. B-CLL	KM	72h/TPA	46,XY,-17,+12
13	69/m	B-CLL	KM	72h/ TPA	<u>Mosaik:</u> 46,XY/46,XY,-18, +mar
14	55/w	V.a. B-CLL	Blut	72h/TPA	46,XX,del(1)(q12),der(4) t(4;?),-13,+mar
15	62/w	V.a. Thrombo- zytose	KM	72h/TPA	46,XX,-8,+mar
16	81/m	V.a. MPS	KM	72h/GM-CSF	<u>Mosaik:</u> 46,XY,7q?/47,XY, +?21,7q?
17	58/w	V.a.lymphatische System- erkrankung	KM	72h/TPA	46,XX,-10,-13,-17,+3mar
18	64/m	NHL	KM	72h/TPA	<u>Mosaik:</u> 46,XY/49,XY, +12,+18,+19
19	66/w	CML, Blastenkrise	KM	72h/GM-CSF	<u>Mosaik:</u> 46,XX,add(2)(q?), t(9;22)/46,XX,add(2)(q?), t(9;22),i(17)(q10)
20	45/w	Leukopenie,	KM	24h/GM-CSF	46,XX,t(8;21),del(9)(q22)

2.2.2 Verwendete Materialien und Geräte

a. Materialien

- Silikonisierte Glaspasteurpipetten
- Objektträger
- Deckgläser (12 x 12mm²)
- Glasschneider
- ASI-Sonden-Kit
- Fixogum (Marabu)
- Feuchte Kammer

b. Geräte

- Kühlschrank (4°C)
- Zentrifuge (Heraeus)
- Heizplatte
- Umkehrmikroskop (Olympus, Hamburg)
- Heizblock
- Brutschrank (Forma Scientific)
- Wasserbad (ITS)
- Technisches Mikroskop (Zeiss Axiotech) mit Spektrometersystem spectra cube (*Applied Spectral Imaging*) und Anschluss an einen Rechner mit der Software: SkyView-Programm Version 1.6.1 (ASI)

2.2.3 Verwendete Reagenzien

- Fixans: Methanol/Eisessig (3:1)
- Pepsin-Stammlösung (10%): 100 mg/ml Pepsin in sterilem Wasser lösen, komplett gelöste Stammlösung aliquotieren und bei -20°C einfrieren
- 10 x PBS-Stammlösung: 0,13 M NaCl; 0,007 M Na₂HPO₄; 0,003 M NaH₂PO₄
 - 1 x PBS/MgCl₂: 25 ml 1 M MgCl₂ + 475 ml 1 x PBS
 - 1 x PBS/MgCl₂/1% Formaldehyd: 2,7 ml 37% Formaldehyd auf 100 ml mit 1 x PBS/MgCl₂
- Ethanol (EtOH) vergällt 70%, 80%, 100%
- 20 x SSC-Stammlösung: 3 M NaCl; 0,3 M Na₃-Citrat; pH 7,0
 - 70% Formamid in 2 x SSC
 - Waschlösung I (50% Formamid/2 x SSC): 15 ml 20 x SSC + 60 ml A.dest + 75 ml Formamid

- Waschlösung II (1 x SSC): 12,5 ml 20 x SSC + 237,5 ml A.dest
- Waschlösung III (4 x SSC/0,1% Tween 20): 100 ml 20 x SSC + 400 ml A.dest + 0,5 ml Tween 20
- 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (Serva) in Vectashield (Vector Laboratories) 1:1000

2.2.4 Durchführung des Spectral Karyotyping (SKY)

Die in Methanol/Eisessig fixierten Zellsuspensionen wurde bis zur Aufarbeitung bei 4°C gelagert. Die Durchführung der Hybridisierung richtete sich nach dem Protokoll - SkyPaint™ Hybridization and detection protocol - des Sonden-Kit-Herstellers ASI (*Applied Spectral Imaging*).

2.2.4.1 Herstellung der Präparate

Zum Pipettieren wurden stets silikonisierte Glaspasteurpipetten verwendet.

a. Waschen der Zellsuspension

- Fixierte Zellsuspension 10 min bei 1200 Upm zentrifugieren
- Überstand abziehen
- Zellpellet in etwa 10 ml Fixans aufnehmen und resuspendieren
- Erneut 10 min bei 1200 Upm zentrifugieren
- Überstand abziehen
- Zellpellet in etwa 0,5 ml Fixans aufnehmen und resuspendieren

b. Auftropfen auf Objektträger

- Zellsuspension auf einen sauberen, in A.dest geschwenkten Objektträger (OT) auftropfen (Tropfhöhe etwa 25 cm, Tropfmenge etwa 3-5 Tropfen)
- OT kurz auf der Heizplatte (60°C) trocknen
- OT im Umkehrmikroskop nach Metaphasen absuchen und eine geeignete Hybridisierungsstelle (genügend Metaphasen) mit einem Glasschneider markieren (der Bereich sollte die Größe eines 12 x 12mm Deckglases haben)
- OT für mindestens 3 Tage bei -20°C aufbewahren

2.2.4.2 Hybridisierung

a. Pepsin-Vorbehandlung

- OT kurz auftauen lassen
- OT 1 min in 50 ml 0,01 M HCl mit 3 µl Stammlsg. Pepsin bei 37°C
- OT 2 x 5 min in 1 x PBS bei RT waschen

- OT 5 min in 1 x PBS/MgCl₂ bei RT waschen
 - OT 10 min in 1 x PBS/MgCl₂/1% Formaldehyd bei RT fixieren
 - OT 5 min in 1 x PBS bei RT waschen
 - OT für jeweils 2 min in 70%, 80%, 100% EtOH bei RT dehydrieren
 - OT lufttrocknen lassen
- b. Chromosomendenaturierung
- OT mit 100 µl 70% Formamid/2 x SSC eindecken und bei 80°C für 2 min auf der Heizplatte denaturieren
 - OT für jeweils 2 min in eiskaltem 70%, 80%, 100% EtOH dehydrieren und lufttrocknen lassen
- c. Sondendenaturierung
- Tube # 1 vom ASI-Sonden-Kit kurz anzentrifugieren
 - 3 µl entnehmen und diese für 7 min bei 80°C im Heizblock denaturieren
 - Denaturierte Sonde 1 h im Brutschrank bei 37°C prähybridisieren
- d. Hybridisierung
- Sonde auf den OT geben und mit einem Deckglas (20 x 20mm) eindecken
 - Deckglasränder mit Fixogum abdichten und OT in der feuchten Kammer bei 37°C etwa 36 h hybridisieren
- e. Detektion
- Deckglas vorsichtig vom OT entfernen
 - OT 3 x 5 min in Waschlösung I (50% Formamid in 2 x SSC) bei 45°C im Wasserbad waschen
 - OT 5 min in Waschlösung II (1 x SSC) bei 45 °C im Wasserbad waschen
 - OT 2 min in Waschlösung III (4 x SSC/0,1% Tween 20) bei 45°C im Wasserbad waschen
 - OT mit 40 µl vom Tube # 2 (*blocking reagent*) vom ASI-Sonden-Kit eindecken, Inkubation 30 min in der feuchten Kammer bei 37°C
 - Deckglas vom OT abnehmen und Flüssigkeit ablaufen lassen
 - OT mit 40 µl Puffer vom Tube # 3 des ASI-Sonden-Kits eindecken, Inkubation 45 min in der feuchten Kammer bei 37°C
 - OT 3 x 3 min in Waschlösung III (4 x SSC/0,1% Tween 20) bei 45°C im Wasserbad waschen
 - OT mit 40 µl Puffer vom Tube # 4 des ASI-Sonden-Kit eindecken,

Inkubation 45 min in der feuchten Kammer bei 37°C

- OT 3 x 3 min in Waschlösung III (4 x SSC/0,1% Tween 20) bei 45°C im Wasserbad waschen
- OT kurz in Wasser waschen und lufttrocknen lassen
- OT mit 18 µl DAPI/Vectashield eindecken
- OT bis zur mikroskopischen Betrachtung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahren

f. Mikroskop

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte an einem technischem Mikroskop (Zeiss AxioTech), das durch den Einbau eines Objektträgertisches für die SKY-Anwendung genutzt werden konnte. Für die Anregung wurde eine Xenon-Lampe (XBO 75) verwendet. Das Filtersystem bestand aus einem einzigen Tripelbandpass-Filter (ASI) für die Anregung aller Fluorochrome und einem DAPI-Filter. Die Aufnahme des Emissionsspektrums erfolgte über ein Sagnac Interferometer durch eine hochauflösende Peltier gekühlte CCD-Kamera (Princeton Instruments, 512 x 512 Pixel, 12 Bit Auflösung). Die Bildverarbeitung wurde durch das SkyView-Programm Version 1.6.1 (ASI) realisiert.

Die Präparate wurden unter der Verwendung von Immersionsöl (Serva) mikroskopiert.

g. Auswertung

Von jeder in dem hybridisierten Bereich (12 x 12mm²) gefundenen Metaphase wurde eine SKY-Aufnahme (ein DAPI-Bild und ein SKY-Bild) gemacht. Je nach Hybridisierungs- und Metaphasenqualität wurde sie dann für die Untersuchung des Karyotyps herangezogen.

Schwerpunkt: KULTIVIERUNG

2.3 Kultivierungsversuche an malignen B-Zellen von NHL-Patienten

Zwei Kultivierungsschemen wurden zur Zellkultivierung maligner B-Zellen von NHL-Patienten angewendet. Das Kultivierungsschema I beinhaltete fünf Kulturansätze und wurde bei 20 Patientenproben (Gruppe I) eingesetzt, das Kultivierungsschema II setzte sich aus drei Kulturansätzen zusammen, die an 14 Patientenproben (Gruppe II) durchgeführt wurden.

2.3.1 Untersuchungsmaterial und Patientenprofile

Als Untersuchungsmaterial dienten Blut- und Knochenmarkproben von Patienten mit Verdachtsdiagnose bzw. Diagnose einer hämatologischen B-Zell-Erkrankung. Für das Kulturschema I stand Material von 19 Patienten, für das Kulturschema II von weiteren 14 Patienten zur Verfügung. Zunächst wurde aus dem Material der Routineansatz für die konventionelle zytogenetische Chromosomenanalyse im Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserslautern durchgeführt. Das nach dem Ansatz übrig gebliebene Material stand anschließend für die Kultivierungsversuche dieser Arbeit zur Verfügung. Bei dem Untersuchungsmaterial handelte es sich um Heparin-Knochenmark-, Heparin-Blut- und EDTA-Blut-Proben. Am Tag des Kultivierungsansatzes lag das Probenalter zwischen 0 und 7 Tagen. Die Patientenprofile der Gruppe I sind in Tabelle 2.4, die der Gruppe II in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tab 2.4 Patientenprofile der Gruppe I

ID	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Material	Proben- alter [d]	WBC [x 10 ³ /μl]	Karyotyp der G-Bandenanalyse
1	79/w	V.a. B-CLL	H-KM	2	18,2	46,XX
2	78/m	B-Zell- Lymphom	H-KM	2	10,4	46,XYqh+
3	68/m	B-NHL	H-KM	4	5,1	46,XY
4	43/w	Plasmozytom	H-KM	1	4,7	46,XX
5a	70/w	B-CLL	EDTA-Blut	1	5,1	Mosaik: 46,XX/ 47,XX,+12 Mosaik: 46,XX/ 47,XX,+12
5b			H-Blut	1	14,7	
6	71/w	B-CLL	H-KM	1	12,7	47,XX,+12
7	64/m	Hochmalig- nes NHL	H-KM	1	3,2	46,XY
8	71/m	V.a. B-CLL	H-KM	1	74,7	46,XY
9	62/w	V.a. B-CLL	H-KM	1	33,6	46,XX

ID	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Material	Proben- alter [d]	WBC [x 10 ³ /μl]	Karyotyp der G-Bandenanalyse
10	77/m	V.a. Plasmo- zytom	H-KM	2	4,4	46,XY
11	72/m	V.a. Plasmo- zytom	H-KM	1	3,8 Buffy coat	46,XY
12	78/m	V.a. B-CLL	H-KM	1	25,7	46,XY
13	62/w	NHL	H-KM	1	13,5 Buffy coat	<u>Mosaik:</u> 49,XX,+12,+18, +19/46,XX/48,X, -X,+12,+18,+19
14	49/w	NHL	H-KM	1	19,7 Buffy coat	46,XX
15	61/m	V.a. B-CLL	H-KM	1	20,8	46,XY
16	51/m	V.a. B-CLL	H-KM	1	41,7	<u>Mosaik:</u> 46,XY,t(11;14), add(15)(q?)/46,XY
17	67/m	B-CLL	H-Blut	3	21,0	<u>Mosaik:</u> 46,XY/ 47,XY,+12
18	41/w	B-CLL	H-KM	3	25,2 Buffy coat	46,XX
19	77/w	NHL	H-KM	1	4,2	46,XX

WBC = white blood cell count (Leukozyten-Zellzahl); H-KM = Heparin-Knochenmark; H-Blut = Heparin-Blut

Tab 2.5 Patientenprofile der Gruppe II

ID	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Material	Proben- alter [d]	WBC [x 10 ³ /μl]	Karyotyp der G-Bandenanalyse
A	67/m	V.a. Plasmozy- tom	H-KM	3	16,5 Buffy coat	46,XY
B	43/w	B-CLL	H-KM	3	12,5 Buffy coat	46,XX
C	55/w	V.a. Plasmozy- tom	H-KM	2	8,5	46,XX
D	57/m	B-CLL Progres- sion	H-KM	5	27,7	46,XY,del(11)(q?)
E	61/m	V.a. B-CLL	H-KM	6	40,3 Buffy coat	46,XY
F	69/w	Hochmalignes B-NHL	H-KM	7	20,6	46,XX
G	72/m	V.a. Plasmozy- tom	H-KM	1	18,9	<u>Mosaik:</u> 46,XY,del (20)(q?)/46,XY
H	26/m	B-Zell NHL	H-KM	1	26,7	46,XY
I	73/w	B-CLL	H-KM	1	111,9	Keine Proliferation

ID	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Material	Proben- alter [d]	WBC [x 10 ³ /μl]	Karyotyp der G-Bandenanalyse
J	60/m	B-CLL	H-KM	0	8,7	46,XY
K	48/m	Mantelzell-NHL	H-KM	0	5,0	<u>Mosaik</u> : 46,XY/ strukturell aber- rant, kein einheit- licher Karyotyp
L	81/w	Hochmalignes NHL	H-KM	0	6,2	46,XX
M	68/m	B-CLL	H-KM	0	30,7	46,XY
N	67/m	B-CLL	H-Blut	0	27,7	Keine Daten

WBC = white blood cell count (Leukozyten-Zellzahl); H-KM = Heparin-Knochenmark; H-Blut = Heparin-Blut

2.3.2 Kultivierungsschemen

Kultivierungsschema I

Vor dem Ansatz der Kulturen wurde aus den Proben eine Lebend-Tot-Bestimmung mittels Acridin-Orange/Ethidiumbromid-Färbelsg. durchgeführt. Im Anschluss daran fand die Zellkultivierung in fünf Kulturansätzen (A-E) für 72h statt. Danach wurde erneut eine Lebend-Tot-Bestimmung durchgeführt. Nach der Kulturabertung und Herstellung von Metaphasenpräparaten erfolgte die Auswertung mittels Bestimmung des Mitoseindex (Anzahl der Metaphasen auf 1000 Zellkerne). Die fünf Kulturansätze (A-E) des Kultivierungsschemas I sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tab 2.6 Kultivierungsschema I

Kultur	Stimulation	Medium
A	--	RPMI (+ 15% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin)
B	TPA	RPMI (+ 15% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin)
C	TPA	Iscove (+ 400 μg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 12 μg/ml humanes Transferin und 50μM 2-β-Mercaptoethanol) konditioniert mit MP-6 Zellen, Dichte 1 x 10⁶ Zellen/ml
D	TPA	Iscove (+ 400 μg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 12 μg/ml humanes Transferin und 50 μM 2-β-Mercaptoethanol) konditioniert mit MP-6 Zellen, Dichte 0,2 x 10⁶ Zellen/ml
E	--	Iscove (+ 400 μg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 12 μg/ml humanes Transferin und 50 μM 2-β-Mercaptoethanol) konditioniert mit MP-6 Zellen, Dichte 0,2 x 10⁶ Zellen/ml

Kultivierungsschema II

Bei der Kultivierung der Gruppe II wurden keine Lebend-Tot-Bestimmungen durchgeführt. Es erfolgte die Zellkultivierung in drei Kulturansätzen (a-c). Der weitere Ablauf verlief analog dem Kultivierungsschema I.

Das Kultivierungsschema II ist in Tabelle 2.7 dargestellt.

Tab 2.7 Kultivierungsschema II

Kultur	Stimulation	Medium
a	--	Iscove (+ 400 µg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 12 µg/ml humanes Transferin und 50 µM 2-β-Mercaptoethanol)
b	TPA	Iscove (+ 400 µg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 12 µg/ml humanes Transferin und 50 µM 2-β-Mercaptoethanol)
c	TPA	Iscove (+ 400 µg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 12 µg/ml humanes Transferin und 50 µM 2-β-Mercaptoethanol) konditioniert mit MP-6 Zellen, Dichte 0,2 x 10⁶ Zellen/ml

2.3.3 Verwendete Materialien und Geräte

a. Materialien

- Kulturflaschen
- Zählkammer (Neubauer)
- Objektträger
- Deckgläser
- Silikonisierte Glaspasteurpipetten

b. Geräte

- Umkehrmikroskop
- Brutschrank (Forma Scientific)
- Zentrifuge (Heraeus)
- Gefrierschrank (-20°C)
- Fluoreszenzmikroskop (Zeiss)
- Wasserbad (ITS)
- Heizplatte
- Lichtmikroskop (Zeiss)

2.3.4 Verwendete Reagenzien

- RPMI-Medium-1640 (Sigma)
- Iscove-Medium basal (Biochrom)
- Fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom)
- Albumin bovine (BSA-Albumin) (Serva)
- Humanes Transferin 4 mg/ml (Gibco)
- Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml) (Gibco)
- Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (TPA) 1mg/ml in DMSO (Sigma)
- Colcemid 10 µg/ml in PBS (Biochrom)
- 2-β-Mercaptoethanol
- Acridin-Orange/Ethidiumbromid-Färbelsg:
Stammlsg. (SL): 50 mg Ethidiumbromid
15 mg Acridin-Orange
49 ml 1 x PBS
1 ml Ethanol (99,8%)

Die Reagenzien im Dunkeln lösen und anschließend filtrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

Gebrauchslsg. (GL): 25 µl SL + 12,5 µl schwarze Tusche (Pelikan) und auf 1 ml mit 1 x PBS auffüllen

- 0,55% KCl
- Fixans: Methanol/Eisessig (3:1)
- A.dest
- Sörensen-Puffer:
Stammlsg. (SL) A: 9,08 g KH_2PO_4 auf 1000 ml mit A. dest lösen
Stammlsg. (SL) B: 11,88 g Na_2HPO_4 auf 1000 ml A. dest lösen
Gebrauchslösung (GL): 50 ml SL A + 50 ml SL B
pH auf 6,8 einstellen
- Giemsa-Färbelösung: 5 ml Giemsa + 95 ml GL Sörensen-Puffer

2.3.5 Durchführung der Kultivierungsversuche

Die zu untersuchenden Heparin-Knochenmarkproben wurden zum Abnahmezeitpunkt in Transportmedium (RPMI mit 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen. Im zytogenetischen Labor des Instituts für Immunologie und Genetik wurden sie dann wie folgt gewaschen:

- 15 min bei 2000 Upm abzentrifugieren

- Überstand verwerfen, Pellet in 10 ml RPMI-Medium (mit 20% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin) aufnehmen

Im Anschluss daran (bei den Blutproben direkt nach Eintreffen der Probe) erfolgte eine Zellzahlbestimmung und der Routineansatz für die zytogenetische Analyse. Danach standen die Proben für die Kultivierungsversuche dieser Arbeit zur Verfügung.

2.3.5.1 Herstellung von konditioniertem ISCOVE-Medium mit MP-6-Zellen

Die MP-6-Zelllinie (Suspensionszelllinie) wurde freundlicherweise von Prof. Anders Rosén (Department of Biomedicine and Surgery; University of Linköping; Schweden) für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Es wurde ein konditioniertes ISCOVE-Medium aus einer MP-6 Zelldichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml und 1×10^6 Zellen/ml wie folgt hergestellt:

- Kultivierung der MP-6-Zellen:
RPMI-Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin; Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit
- Konditionierung:
Die Konditionierung kann bei gutem Zellwachstum und reichlich Zellen durchgeführt werden.
 - Zellzahl mit der Zählkammer am Umkehrmikroskop bestimmen
 - MP-6 Zellen in einer Dichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml und 1×10^6 Zellen/ml in Iscove-Medium mit 400 µg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 12 µg/ml humanes Transferin und 50µM 2-β-Mercaptoethanol aufnehmen
 - Für 24 h im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultivieren
 - Nach 24 h Zellsuspension 15 min bei 1200 Upm abzentrifugieren
 - Überstand (konditioniertes Iscove-Medium) vorsichtig abziehen und in Einfrierröhrchen (50 ml) portionieren (Zellpellet verwerfen)
 - Konditioniertes Medium bei -20°C einfrieren
 - Je nach Bedarf entsprechende Volumina auftauen

2.3.5.2 Lebend-Tot-Bestimmung mit Ethidiumbromid/Acridinorange

Eine Lebend-Tot-Bestimmung wurde bei der Untersuchungsgruppe I vor dem Ansatz der Kulturen und nach Beendigung der Kultivierung (nach 72 h) wie folgt durchgeführt:

- 1 Tropfen Färbelösung (GL) auf einen OT geben und mit einem Tropfen der Kulturprobe mischen

- OT eindecken und direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem Doppelbandpass-Filter für die gleichzeitige Anregung von roter und grüner Fluoreszenz auswerten
- Zur Auswertung etwa 200 Kerne auszählen (rote Kerne sind tot, grüne lebend) und das Lebend-Tot-Verhältnis bestimmen

2.3.5.3 Kulturansätze

Es wurden 10 ml Kulturen mit 1×10^6 Zellen/ml in Kulturtöpfchen wie folgt angesetzt:

- 1×10^6 Zellen aus dem Probenmaterial entnehmen und in das Kulturtöpfchen überführen
- Entsprechende Menge Medium (je nach Ansatz RPMI-, ISCOVE- oder konditioniertes ISCOVE-Medium) dazu geben, so dass die Gesamtmenge 10 ml entspricht
- Bei den TPA stimulierten Ansätze 20 μ l TPA zugeben
- Kulturen für 72h im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultivieren

Bei nicht ausreichender Zellzahl wurde nur die Hälfte (Gesamtvolumen 5 ml) angesetzt.

2.3.5.4 Zellaberntung und Herstellung von Metaphasenpräparaten

Zum Pipettieren wurden stets silikonisierte Glaspasteurpipetten verwendet.

a. Metaphasenarretierung

- 30 min vor dem Kultivierungsende 0,1 ml Colcemid (10 μ g/ml) zur 10 ml Kultur geben und weiterkultivieren
- nach 30 min Zellkultur in ein Zentrifugenröhrchen überführen und 10 min bei 1200 Upm abzentrifugieren

b. Hypotoniebehandlung

- Überstand abziehen und verwerfen
- Zum Zellpellet etwa 10 ml warme (37°C) 0,55% KCl zugeben, resuspendieren
- 15 min bei 37°C inkubieren
- 10 min bei 1200 Upm abzentrifugieren

c. Fixierung

Fixans (Methanol/Eisessig 3:1) stets frisch angesetzt und eiskalt (-20°C) verwenden.

- Überstand abziehen und verwerfen
- Vorsichtig 1 ml Fixans (Methanol/Eisessig 3:1) tropfenweise unter ständigem resuspendieren zum Zellpellet zugeben
- Mit Fixans auf 12 ml auffüllen und resuspendieren

- 30 min bei 4°C fixieren
- 10 min bei 1200 Upm abzentrifugieren

d. Waschen

- Überstand abziehen
- Etwa 10 ml Fixans zum Zellpellet zugeben, resuspendieren
- Erneut 10 min bei 1200 Upm abzentrifugieren
- Vorgang zwei mal wiederholen (bis Zellpellet hell ist)

e. Präparate tropfen

- Überstand abziehen
- Zellpellet in etwa 0,5 ml Fixans aufnehmen und resuspendieren
- Zellsuspension auf einen sauberen, in A.dest geschwenkten Objektträger (OT) auftropfen (Tropfhöhe etwa 25 cm, Tropfmenge etwa 3-5 Tropfen)
- OT kurz auf der Heizplatte (60°C) trocknen

f. Färbung

- OT 10 min in Giemsa-Färbelösung färben
- OT gut in A.dest schwenken und lufttrocknen
- Mit Eukitt eindecken (Dauerpräparat)

h. Auswertung

Die Präparate wurden an einem Lichtmikroskop (Zeiss) unter Verwendung von Immersionsöl ausgewertet. Von jedem Kulturansatz wurde von drei verschiedenen Objektträgern die Metaphasenanzahl auf 1000 Kerne ermittelt. Die durchschnittliche Metaphasenanzahl auf 1000 Kernen ergibt dann den Mitoseindex.

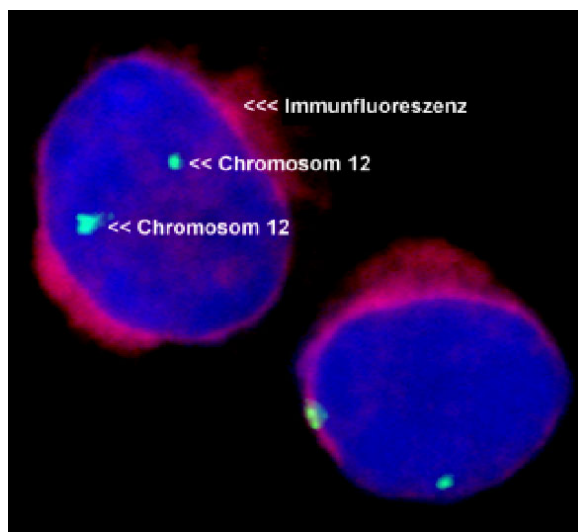
3 ERGEBNISSE

Schwerpunkt: FICTION

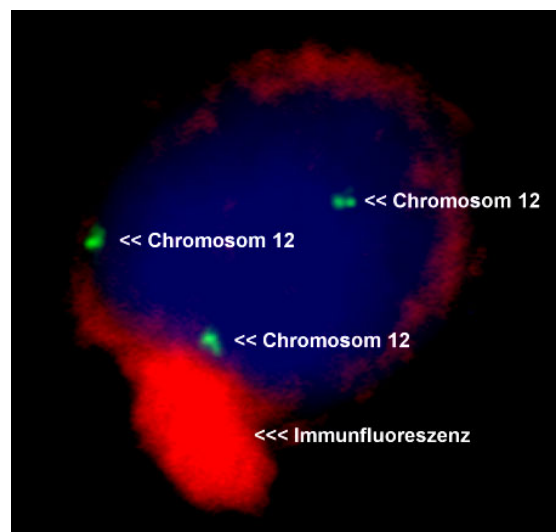
3.1 FICTION-Analyse

Die FICTION-Analyse wurde zur numerischen Chromosomenanalyse des Chromosoms 12 in CD20 positiven B-Zellen herangezogen. In der Abbildung 3.1 sind zwei FICTION-Bilder, die mit dem ISIS-Programm (Metasystems) aufgenommen wurden, dargestellt. Die Immunfärbung markiert mittels CD20 die B-Zellen durch eine Rotfluoreszenz der Zelloberfläche, die α -Satelliten Sonde für die Chromosomen 12 (D12Z3) markiert die Zentromere der Chromosomen 12 durch eine Grünfluoreszenz. Links ist ein Fall mit CD20 positiven Zellen und einer Disomie 12, rechts ein Fall mit einer CD20 positiven Zelle und einer Trisomie 12 dargestellt.

Abb 3.1 FICTION-Bilder (A und B); Die Zellen sind mittels DAPI blau angefärbt, die Immunfluoreszenz der CD20 positiven Zellen zeigt sich rot und die Zentromerregion der Chromosomen 12 ist grün



A: CD20 positive Zellen (rote Markierung) mit Disomie 12 (grüne Markierung)



B: CD20 positive Zelle (rote Markierung) mit Trisomie 12 (grüne Markierung)

3.1.1 Ermittlung des cut off levels hinsichtlich der Anzahl der Chromosomen 12 in CD20 positiven B-Zellen

Zur Validierung der Ergebnisse muss zunächst ein *cut off level* bestimmt werden, bevor Aussagen über das Vorliegen einer Monosomie oder Trisomie 12 getroffen werden können.

Der *cut off level* gibt einen Grenzwert für abweichende Werte von den Normalwerten an. Abweichende Werte unterhalb des *cut off levels* werden als methodenbedingt falsch positiv ein-

gestuft. Liegt die Anzahl abweichender Werte oberhalb dieses Grenzwertes, so wird dies als echte Abweichung von der Norm bewertet. Den *cut off level* erhält man aus dem Mittelwert der Kontrollmessungen plus drei mal der entsprechenden Standardabweichung.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Kontrollpersonen (jeweils drei Frauen und Männer, vgl. Tab 2.1) zur Ermittlung des *cut off levels* für eine Monosomie 12 bzw. Trisomie 12 herangezogen. Das Durchschnittsalter der Kontrollpersonen lag bei 32,3 Jahre (range 24-56). Pro Kontrollprobe wurde die Signalanzahl für die Chromosomen 12 in mindestens 200 CD20 positiven Zellen ausgewertet (siehe Tabelle 3.1).

Tab 3.1 Ergebnisse der Signalanzahl für die Chromosomen 12 in CD20 positiven Zellen der Kontrollproben

ID	Monosomie 12 (1 Signal) [%]	Disomie 12 (2 Signale) [%]	Trisomie 12 (3 Signale) [%]	Anzahl ausgewerteter CD20 positiver Zellen
Ko 1	6,5	91	2,5	200
Ko 2	4,1	91,8	4,1	218
Ko 3	7,3	90,9	1,8	220
Ko 4	6,9	91,7	1,4	218
Ko 5	7,0	91,3	1,7	230
Ko 6	4,6	91,7	3,7	218

Für eine **Monosomie 12** ergibt sich folgender *cut off level*:

- Der Mittelwert für eine Monosomie 12 liegt bei 6,1% (range 4,1-7,3%)
- Die Standardabweichung beträgt 1,4%.
- Demnach beträgt der *cut off level* 10,2%.

Das heißt, das Vorliegen einer echten Monosomie 12 wird erst angenommen, wenn mehr als 10,2% der untersuchten CD20 positiven Zellen nur ein Signal aufweisen.

Für eine **Trisomie 12** wird folgender *cut off level* festgelegt:

- Der Mittelwert für eine Trisomie 12 liegt bei 2,5% (range 1,7-4,1%)
- Die Standardabweichung beträgt 1,1%
- Demnach beträgt der *cut off level* 5,9%

Eine Patientenprobe wird als Trisomie 12 positiv bewertet, wenn mehr als 5,9% der untersuchten CD20 positiven Zellen drei Signale aufweisen.

3.1.2 Ergebnisse der Signalanzahl für die Chromosomen 12 in CD20 positiven Zellen der Patientenproben

Insgesamt wurden 53 Patienten (25 Frauen und 28 Männer) mit der Verdachtsdiagnose bzw. Diagnose einer B-CLL mittels der FICTION-Methode untersucht. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs lag bei 67,6 Jahre (range 39-90).

Immunphänotypisch wurden CD20 positive Zellen (B-Zellen) markiert und genotypisch die Zentromere der Chromosomen 12. Pro Patient wurde die Signalanzahl für die Chromosomen 12 in mindestens 200 (bei einem Fall (ID 2) mangels Material nur in 169) CD20 positiven Zellen ausgewertet (siehe Tabelle 3.2).

Tab 3.2 Ergebnisse der Signalanzahl für die Chromosomen 12 in CD20 positiven Zellen der Patientenproben (Trisomie 12 positive Fälle sind fett gedruckt und der Trisomie 12 Klon rot markiert)

ID	Monosomie 12 (1 Signal) [%]	Disomie 12 (2 Signale) [%]	Trisomie 12 (3 Signale) [%]	Anzahl ausgewerteter CD20 positiver Zellen
1	5,5	92	2,5	200
2	1,8	18,9	79,3	169
3	3	94,5	2,5	200
4	2	95	3	200
5	2,5	49,7	47,8	201
6	4	95	1	200
7	5	95	0	200
8	2,2	48,7	49,1	230
9	5	93	2	200
10	6,9	92,4	0,7	303
11	5,5	94,2	0,3	308
12	1	17,6	81,4	307
13	4,6	94,7	0,7	306
14	2,8	95,2	2	252
15	3,3	95,3	1,4	210
16	4,4	94,1	1,5	205
17	3	94,9	2,1	237
18	3,5	95,5	1,0	314
19	3,9	93,2	2,9	311
20	2,5	97,2	0,3	319
21	5,4	93,6	1	203
22	2,7	95,8	1,5	334
23	3,7	93,7	2,6	272
24	4,6	93,3	2,1	241

ID	Monosomie 12 (1 Signal) [%]	Disomie 12 (2 Signale) [%]	Trisomie 12 (3 Signale) [%]	Anzahl ausgewerteter CD20 positiver Zellen
25	3,7	93,9	2,4	213
26	2,3	96,3	1,4	216
27	2,5	96,3	1,2	242
28	3,4	95,8	0,8	261
29	4,5	94,3	1,2	245
30	5,1	94,6	0,3	317
31	4,4	93,7	1,9	320
32	6,4	91,2	2,4	296
33	4,2	93,0	2,8	215
34	3,2	96,5	0,3	311
35	4,8	95,2	0	231
36	4,2	95,8	0	313
37	3,2	94,3	2,5	318
38	3,2	94,9	1,9	253
39	1,4	40,1	58,5	299
40	4,4	94,3	1,3	318
41	2,7	95,9	1,4	294
42	4,1	94,9	1,0	316
43	2,5	96,5	1	311
44	3,0	94,7	3	264
45	1,9	19,2	78,9	308
46	1,9	97,7	0,4	266
47	1,8	98,2	0	220
48	3,3	96,2	0,5	210
49	3,3	95,3	1,4	214
50	2,0	97,0	1,0	299
51	4,2	94,2	1,6	240
52	4,1	95,3	0,6	320
53	2,4	96,8	0,8	253

Eine Trisomie 12 fand sich unter den 53 untersuchten Patienten sechs mal (11,3%). Darunter waren drei Patienten mit einer fraglichen Diagnosestellung hinsichtlich einer B-CLL. Der Anteil des Trisomie 12 tragenden Klons an der Gesamtzellzahl ausgewerteter CD20 positiver Zellen lag zwischen 48 und 81% (siehe Tabelle 3.3).

Tab 3.3 Übersicht der Trisomie 12 positiven Patienten hinsichtlich ihre Diagnose und des Zellanteils des Trisomie 12 tragenden Zellklons an der Gesamtzellzahl ausgewerteter CD20 positiver Zellen

ID	Alter/ Geschlecht	Enddiagnose	Zellanteil des Trisomie 12 Klons an der Gesamtzellzahl ausgewer- teter CD20 positiver B-Zellen [%]
2	84/w	Atypische B-CLL/ Prolympho- zyten-Leukämie	79
5	69/w	B-CLL	48
8	71/w	B-CLL mit atypischen B-Zellen	49
12	90/w	B-NHL, immunologisch nicht sicher einzuordnen; Mantelzell- Lymphom?	81
39	72/m	B-CLL	59
45	60/m	B-CLL	79

3.1.3 Beobachtung der Entwicklung eines Trisomie 12 Klons über ein Jahr

Bei der Patientin ID 5 war es möglich, den Trisomie 12 tragenden Klon über den Zeitraum eines Jahres zu beobachten. In diesem Zeitraum konnten fünf Blutproben einer FICTION-Analyse unterzogen werden, wobei der Zellanteil des Trisomie 12 Klons geringfügig anstieg, aber keine deutliche Tendenz beobachtet werden konnte (siehe Tabelle 3.4).

Tab 3.4 Ergebnisse der FICTION-Analysen der Patientin ID 5 über den Zeitraum eines Jahres

Abnahmedaten	Zellanteil des Trisomie 12 Klons an der Gesamtzellzahl ausgewer- teter CD20 positiver B-Zellen [%]	Anzahl ausgewerteter CD20 positiver B-Zellen
Mai 2000	48	201
November 2000	47	136
März 2001	49	228
Mai 2001	73	204
Juni 2001	61	212

Schwerpunkt: SKY

3.2 SKY-Analyse

In der vorliegenden Arbeit konnten 20 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen nach der konventionellen zytogenetischen Bandenanalyse mittels SKY untersucht werden. Die für die SKY-Analysen notwendigen Hybridisierungen wurde stets mit dem Sondenkit der Firma ASI durchgeführt, wobei sich die Durchführung an den Herstellerangaben richtete. Mit diesem kommerziell erwerbbaaren Hybridisierungskit wurden stets gute Hybridisierungssignale in relativ kurzer Zeit erzielt.

3.2.1 Etablierung der SKY-Technik

Die Auswertung erfolgte an einem modifizierten technischen Mikroskop, das für die SKY-Anwendung stets umgebaut wurde. Da das technische Zeiss-Mikroskop „Axiotech“ weniger für die SKY-Anwendung geeignet ist als ein Zeiss-Mikroskop „Axiskop“, gab es häufig Probleme mit der Rotfluoreszenz. Dies zeigte sich in Diskrepanzen bei der Chromosomenklassifikation des Falschfarben- zum Echtfarbenbilds, was vermutlich auf einen Intensitätsverlust im Infrarotbereich durch das Mikroskop zurückzuführen ist. Deshalb wurde zur Validierung der Ergebnisse stets das Echtfarbenbild zur Auswertung mit herangezogen.

3.2.2 Ergebnisse der SKY-Analysen

Die mittels der SKY-Analyse karyotypisierten Metaphasen werden nachfolgend vorgestellt und mit dem konventionellen zytogenetischen Befund verglichen. Jedem Fall liegen ein GTG-Banden-Karyogramm und ein SKY-Karyogramm bei. Bei Fällen mit mehreren Karyotypen bzw. Subklonen sind die übereinstimmenden Aberrationen farblich gekennzeichnet.

Fall ID 1: Diagnose: AML/ M1

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Mit der konventionellen Zytogenetik wurde ein komplex aberranter männlicher Karyotyp gefunden, der ein derivatives Chromosom 5, bestehend aus einer Translokation 5/7, ein verlängertes Chromosom 8p und mehrere numerische Veränderungen mit verschiedene Markerchromosomen zeigte (siehe Abbildung 3.2a).

Karyotyp:

42,XY,der(5)t(5;7)(p?p?),-7,add(8)(p?)-12,-17,-18,-20,-21,-22,+3mar

Die 24-Farben-FISH wurde zur weiteren Klärung der komplexen Veränderungen herangezogen.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Karyotyp:

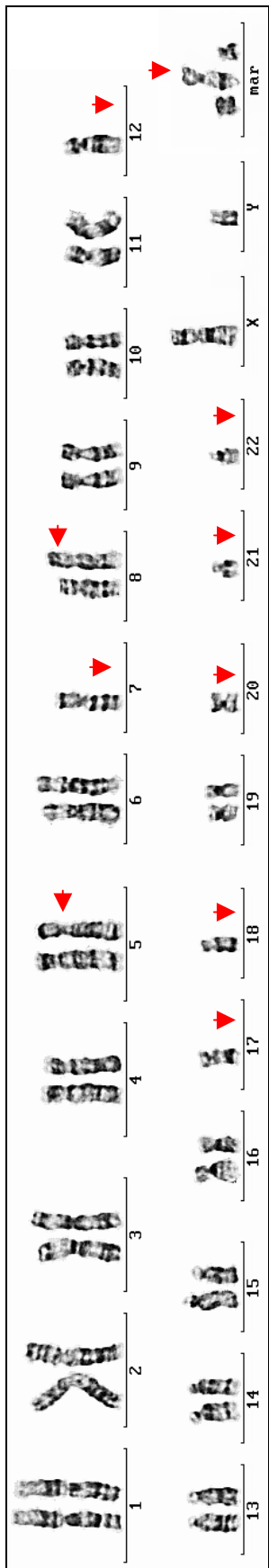
42,XY,-5,der(5)t(5;17)(q23;q21?),der(7)t(5;7)(q11;q11),der(12)t(12;22)(q21;q21)?t(12;?)(p13?;?),-17,-18,-20,-21,-22,+2mar [4]

42,XY,-5,der(5)t(5;17)(q23;q21?),der(7)t(5;7)(q11;q11),-12,-14,-17,-18,-20,-22,+3mar [1]

Der konventionelle zytogenetische Befund konnte erweitert werden, allerdings gelang es nicht alle Markerchromosomen zu identifizieren. Vier gefundene Metaphasen scheinen den gleichen Hauptklon zu präsentieren. Dabei handelt es sich um einen männlichen Chromosomensatz mit 42 Chromosomen, mit einem Verlust eines Chromosoms 5 und einem derivativen Chromosom 5, das im langen Arm Material von 17q und einem derivativen Chromosom 7, das im langen Arm Material von 5q enthält. Des Weiteren liegt ein derivatives Chromosom 12 vor, dessen Segmente nicht vollständig aufzuklären waren. Im langen Arm von diesem Chromosom 12 befindet sich Material von Chromosom 22. Eine terminale Bande am kurzen Arm scheint weiteres Material von einem anderen Chromosom darzustellen, das nicht näher identifiziert werden konnte. Es liegen auch Verluste eines Chromosoms 17, 18, 20, 21, 22 und zusätzlich 2 Markerchromosomen vor (siehe Abbildung 3.2b). Es gibt keine Hinweise auf die Materialzusammensetzung der Markerchromosomen. Die leichte Verlängerung im kurzen Arm eines Chromosoms 8 ist wohl auf einen intrachromosomalen Umbau oder einer Amplifikation zurückzuführen. Material aus einem anderen Chromosom konnte nicht gefunden werden. Die eine Metaphase, die etwas von dem beschriebenen Klon abweicht stellt vermutlich einen weiteren kleinen Subklon dar.

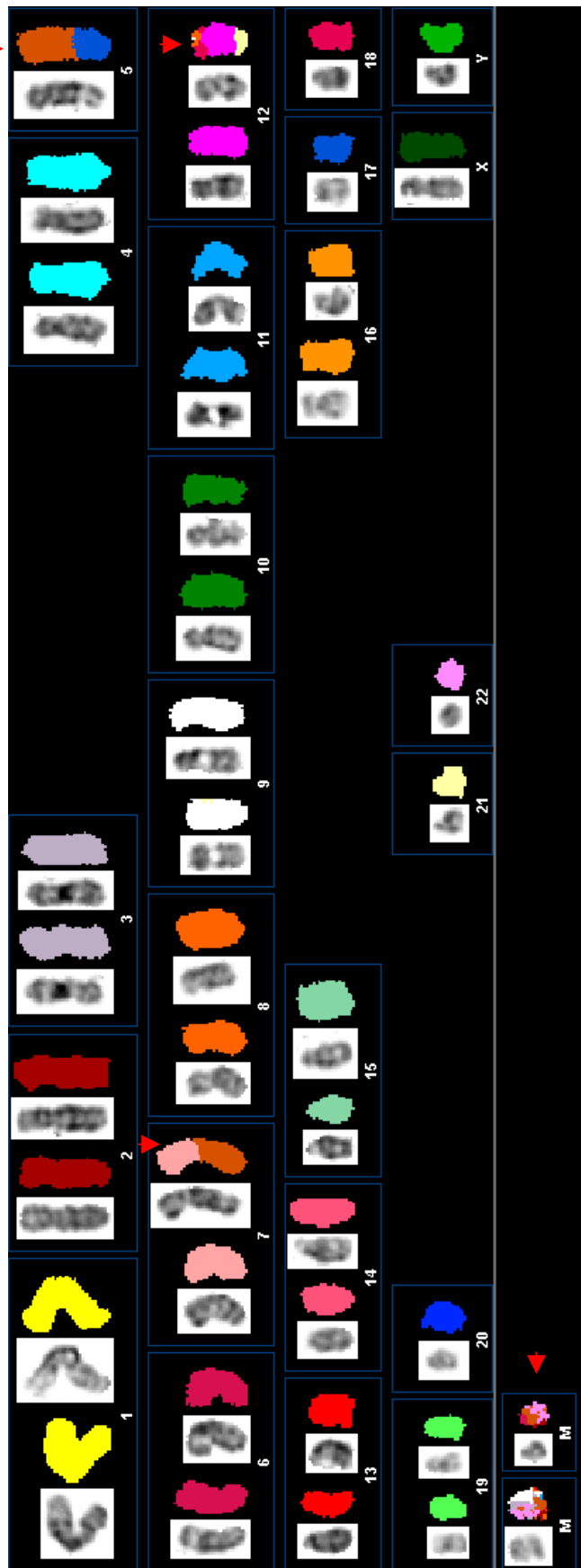
Abb 3.2: Fall ID 1

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 42,XY,der(5)t(5;7)(p?:p?)-7,add(8)(p?)-12,-17,-18,-20,-21,-22,+3mar

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 42,XY,-5,der(5)t(5;17)(q23;q21?),der(7)t(5;7)(q11;q11),der(12)t(12;22)(q21;q21)?t(12;?) (p13?;?),-17,-18,-20,-21,-22,+2mar

Fall ID 2: Diagnose AML/ M6

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 10

Die konventionelle Zytogenetik zeigte einen hypodiploiden weiblichen Chromosomensatz mit dem Verlust von vermutlich einem Chromosom 7. Es war nicht sicher feststellbar, ob stets ein Chromosom 7 fehlte (siehe Abbildung 3.3a).

Karyotyp:

45,XX,?-7

Die 24-Farben-FISH sollte den vermuteten Verlust eines Chromosoms 7 bestätigen.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Karyotyp:

45,XX,t(3;21)(q26;q22),-7 [3]

44,XX,t(3;21)(q26;q22),-7,-20 [1]

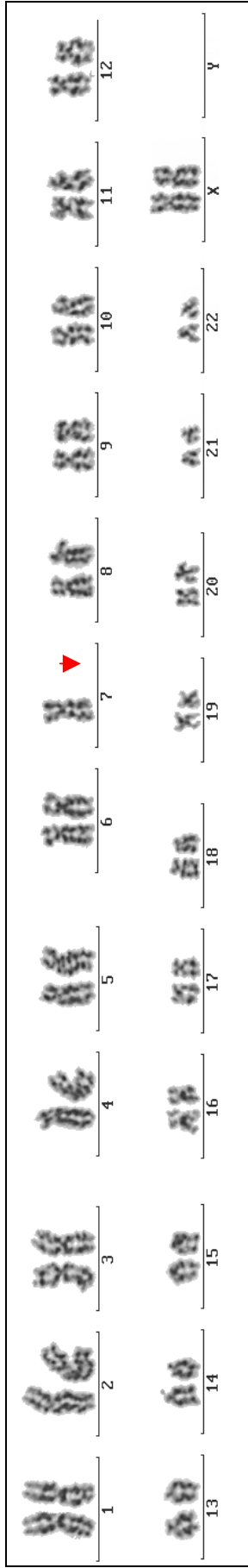
44,XX,t(3;21)(q26;q22),-7,-7 [1]

Die nach der G-Bandenanalyse vermutete Monosomie 7 konnte bestätigt werden. Zusätzlich fand sich noch eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 3 und 21 (t(3;21)(q26;q22)) (siehe Abbildung 3.3b). Die jeweils eine Metaphase mit zusätzlichem Verlust eines Chromosoms 20 bzw. 7 wird als präparationsbedingt eingestuft.

Da die t(3;21)(q26;q22) nicht typisch für eine AML/ M6 ist, wurde zum Ausschluss einer konstitutionellen Chromosomenaberration Heparinblut der Patientin angefordert. Dieses wurde nach Standardmethoden für eine Chromosomenanalyse einerseits zur Stimulation normaler T-Lymphozyten mit Phythämagglutinin und andererseits zur Stimulation der malignen myeloischen Zellreihe mit GM-CSF (Makrophagen, Granulozyten *colony stimulation factor*) kultiviert. Nach der Aberntung und Präparateherstellung erfolgte eine FISH mit humanen Painting-Sonden auf die Chromosomen 3 und 21. Die Durchführung erfolgte nach standardisiertem Protokoll des Labors. Die FISH-Analyse konnte eindeutig nachweisen, dass die t(3;21)(q26;q22) der malignen Erkrankung zugeordnet werden kann, da sie in den Phythämagglutinin stimulierten Blutlymphozyten nicht nachweisbar war (siehe Abbildung 3.4).

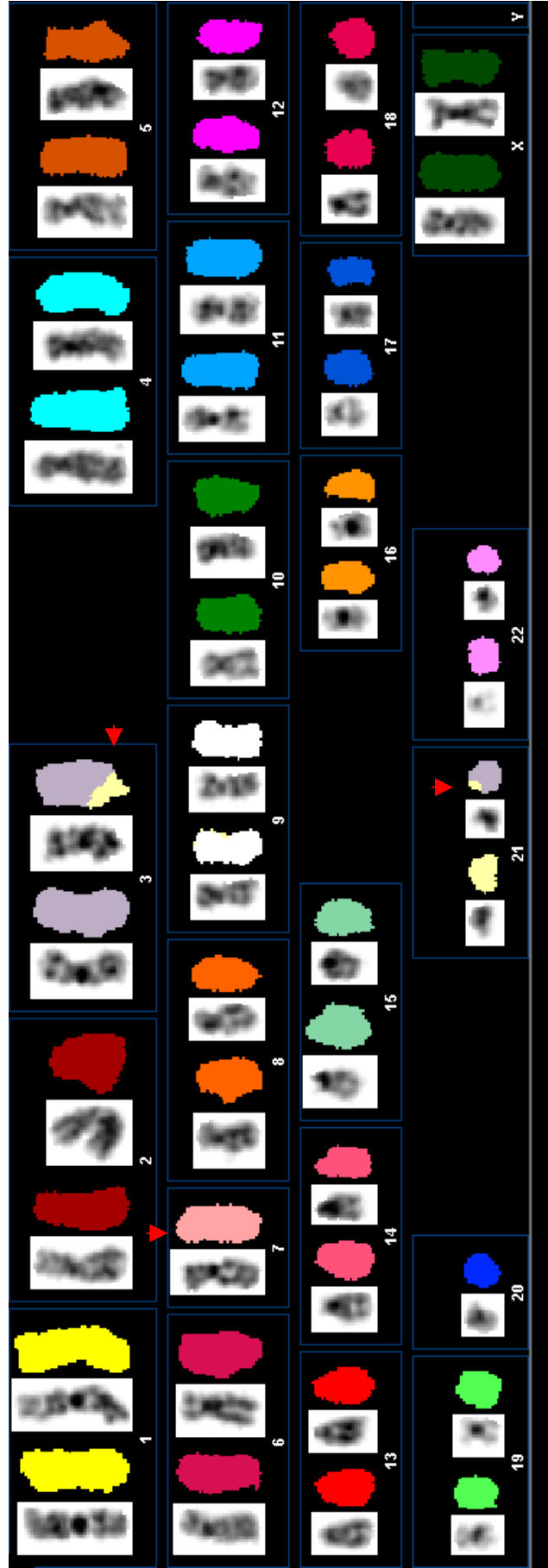
Abb 3.3: Fall ID 2

a) GTG-Bänderung



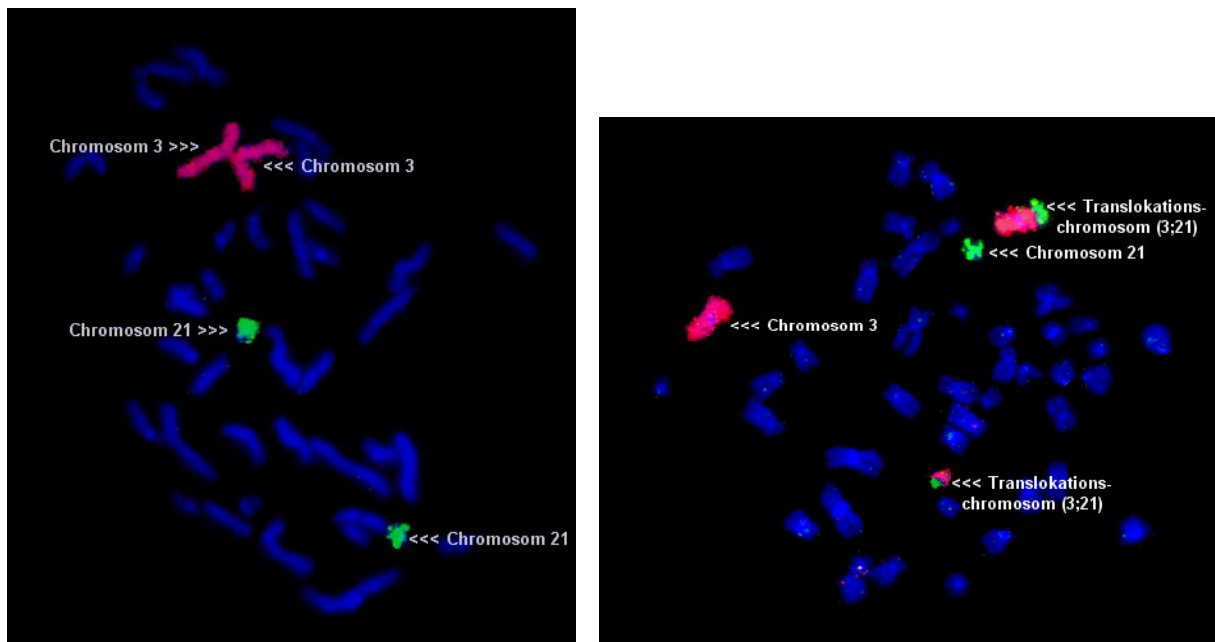
Karyotyp: 45,XX,-7

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 45,XX,t(3;21)(q26;q22),-7

Abb 3.4 FISH–Metaphasenbilder (A und B) aus Phythämagglutinin und GM-CSF stimulierten Blutkulturen des Falls ID 2. Die Chromosomen sind mittels DAPI-Färbung blau dargestellt, die Chromosomen 3 erscheinen durch die Rhodaminfärbung rot und die Chromosomen 21 durch FITC grün



A: Metaphase aus der Phythämagglutinin stimulierten Kultur mit jeweils zwei normalen Chromosomen 3 und 21

B: Metaphase aus der GM-CSF stimulierten Kultur mit zwei Translokationschromosomen t(3;21) und jeweils einem normalen Chromosom 3 und 21

Fall ID 3: Diagnose: AML rezidiv

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Mit der G-Bandenanalyse wurde ein Verlust eines Chromosoms 5, ein Zugewinn an 6p und ein Markerchromosom festgestellt (siehe Abbildung 3.5a).

Karyotyp:

46,XX,-5,add(6)(p23?),+mar

Mit Hilfe der Vielfarben-FISH sollte der Zugewinn am Chromosom 6 und das Markerchromosom identifiziert werden.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Karyotyp:

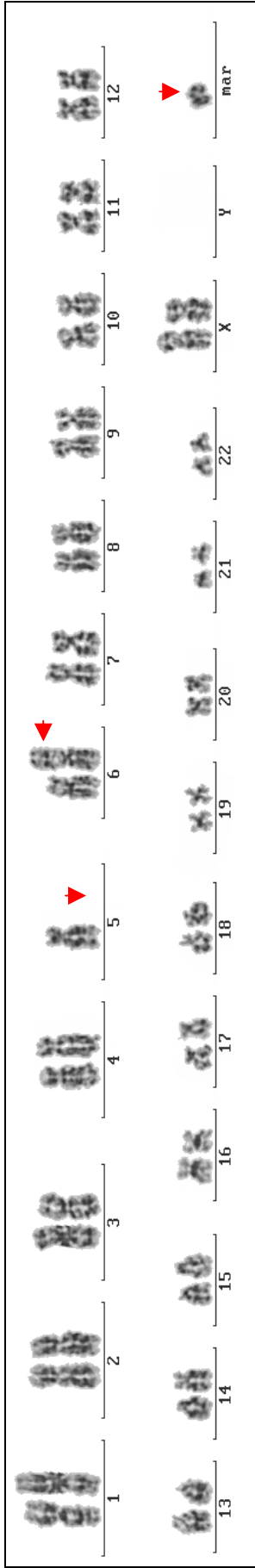
46,XX,del(5)(pter→p?)(qter→q?),der(6)t(1;6)(?:p23?) [4]

44,XX,del(5)(pter→p?)(qter→q?),der(6)t(1;6)(?:p23?)-11,-16 [1]

Die SKY-Analyse zeigte, dass es sich bei dem Zugewinn am kurzen Arm eines Chromosoms 6 um Material von Chromosom 1 handelte. Wobei nicht aufzuklären war, ob das zusätzliche Material von 1q oder 1p stammte. Das Markerchromosom konnte als ein in beiden Armen stark deletiertes Chromosom 5 identifiziert werden (siehe Abbildung 3.5b). Daher handelte es sich nicht, wie nach der G-Bandenanalyse vermutet, um einen Verlust eines ganzen Chromosoms 5, sondern um eine partielle Monosomie 5.

Abb 3.5: Fall ID 3

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XX,-5,add(6)(p23?),+mar

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XX,del(5)(pter→p?)(qter→q?),der(6)t(1;6)(?:p23?)

Fall ID 4: Diagnose: B-CLL

Konventionelle Zytogenetik: Juli 2000

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 9

Die Knochenmarkszellen zeigten überwiegend einen normalen männlichen Karyotyp. Es wurden aber auch einige verschieden stark aberrante Metaphasen mit Markerchromosomen gefunden (siehe Abbildung 3.6a), die mit der 24-Farben-FISH näher karyotypisiert werden sollten.

Karyotyp:

46,XY

44-46,XY numerisch und strukturell stark aberrante Chromosomensätze mit Markerchromosomen

SKY-Analyse: Juli 2000

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Karyotyp:

46,XY [3]

46,XY,der(4)t(4;17)(p12;?q),-17,t(14;15)(q2;q1),+22 [1]

45,XY,-10 [1]

Wie bereits in der G-Bandenanalyse zeigte sich überwiegend der normale Karyotyp 46,XY. Lediglich eine aberrante Metaphase, mit derivativem Chromosom 4, das im p-Arm Material von Chromosom 17 enthält und einer vermutlich reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 14 und 15, konnte gefunden werden (siehe Abbildung 3.6b). Daher lässt sich kein aberranter Hauptklon ermitteln. Die hypodiploide Metaphase mit Verlust eines Chromosoms 10 ist vermutlich präparativ bedingt.

Konventionelle Zytogenetik: Januar 2001

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 14

Die G-Bandenanalyse ergab sehr variable Karyotypen mit vielen verschiedenen numerischen und strukturellen Aberrationen. Darunter trat häufig eine Monosomie bzw. Deletion von Chromosom 5 und 7, eine Trisomie 8 und 22 sowie eine Disomie des Y-Chromosoms auf (siehe Abbildung 3.7a). Unauffällige diploide Metaphasen kamen nur noch vereinzelt vor.

Karyotyp:

43-46,XYY mit zahlreichen numerischen und strukturellen Aberrationen/ 46,XY

Mit Hilfe der 24 Farben-FISH sollten die Aberrationen weiter aufgeklärt werden.

SKY-Analyse: Januar 2001

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 9

Karyotyp:

- 45,XY_Y,der(5)t(5;22)(q10;?),-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),+20,del(20)(p?),del(20)(p?) [2]**
- 45,XY_Y,der(5)t(5;22)(q10;?),-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),del(20)(p?),+der(20)t(13;20)(?q?,?) [1]**
- 45,XY_Y,der(3)t(3;13)(q2;q?),-5,-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),+20,del(20)(p?),del(20)(p?),+2mar [1]**
- 44,XY_Y,-4,-5,-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),+20,del(20)(p?),del(20)(p?)-22,+3mar [1]**
- 44,XY_Y,der(5)t(5;22)(q10;?),-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-15,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),+20,del(20)(p?),del(20)(p?) [1]**
- 44,XY_Y,der(5)t(5;22)(q10;?),-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),+20,del(20)(p?),del(20)(p?)-22 [1]**
- 43,XY_Y,der(3)t(3;13)(q2;q?),-5,-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),+20,del(20)(p?),del(20)(p?)-22 [1]**
- 39,XY_Y,-1,der(3)t(3;13)(q2;q?),-5,-6,-7,t(10;11)(q22;q13),-12,-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),+20,del(20)(p?),del(20)(p?)-21 [1]**

Die **rot** gekennzeichneten Aberrationen konnten in allen Metaphasen (soweit kein präparativ bedingter Chromosomenverlust vorlag) gefunden werden und stellten vermutlich frühe Ereignisse in der Karyotypevolution dar. Hierzu zählte der Zugewinn des Y-Chromosoms, eine Monosomie 7, 13, 16 und 18, eine Trisomie 8 und eine partielle Trisomie 20 (zwei Chromosomen 20 erscheinen deletiert), eine Translokation zwischen den Chromosomen 10 und 11, ein Derivatchromosom 16 mit Material von Chromosom 20 und ein Derivatchromosom 19 mit Material von Chromosom 7q.

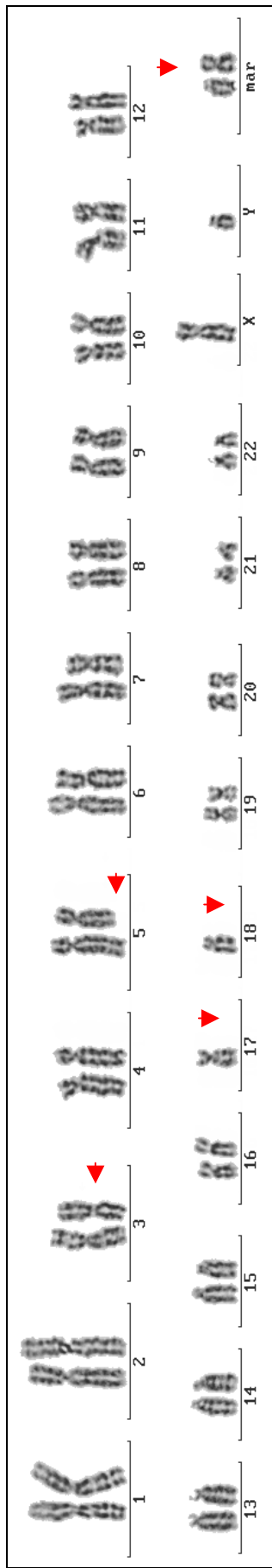
Die **grün** markierte Aberration kennzeichnet einen Subklon, der fünfmal gefunden wurde. Er enthält zu den rot gekennzeichneten Aberrationen noch ein Derivatchromosom 5, das sich aus dem kurzen Arm vom Chromosom 5 und einem Segment von Chromosom 22 zusammensetzt.

Die **blau** markierte Aberration gehört zu einem Subklon, der dreimal gefunden wurde. Neben den rot gekennzeichneten Aberrationen lag noch ein Derivatchromosom 3 mit Material von Chromosom 13 vor.

Alle weiteren, schwarz gekennzeichneten Aberrationen, traten nur vereinzelt auf und könnten auch präparativ bedingt sein. Eine ähnlich aberrante Metaphase, wie sie im Juli 2000 gefunden wurde, lag nicht vor (siehe Abbildung 3.7b).

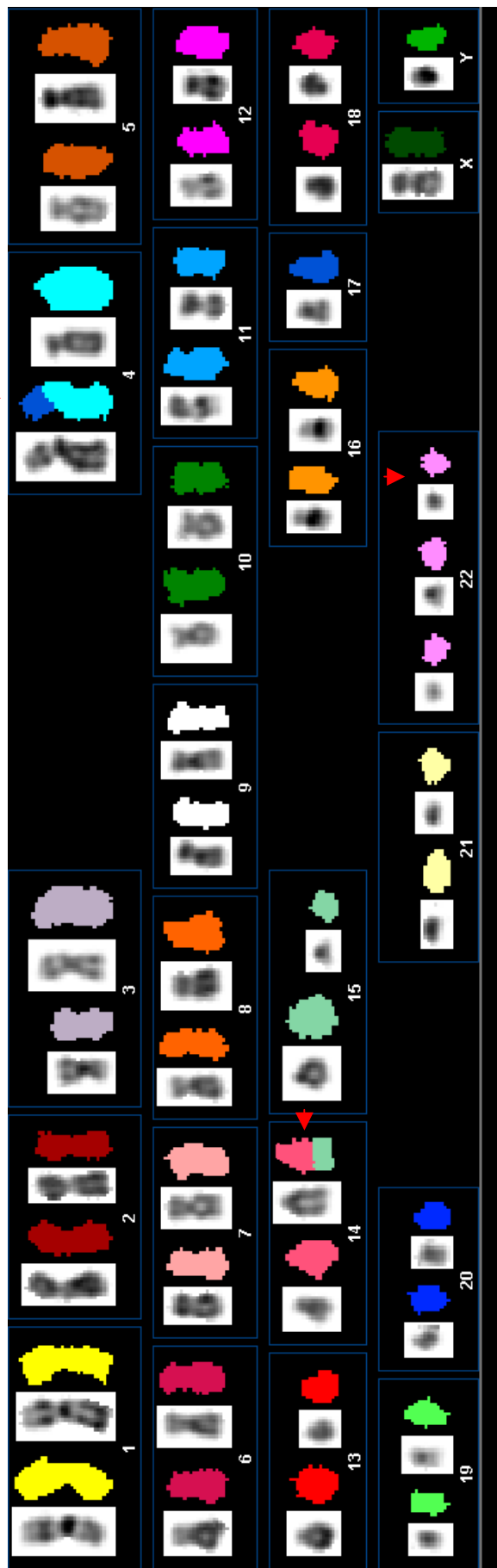
Abb 3.6: Fall ID 4 /Juli 2000

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XY,?3,del(5)(q31?),-17,-18,+2mar

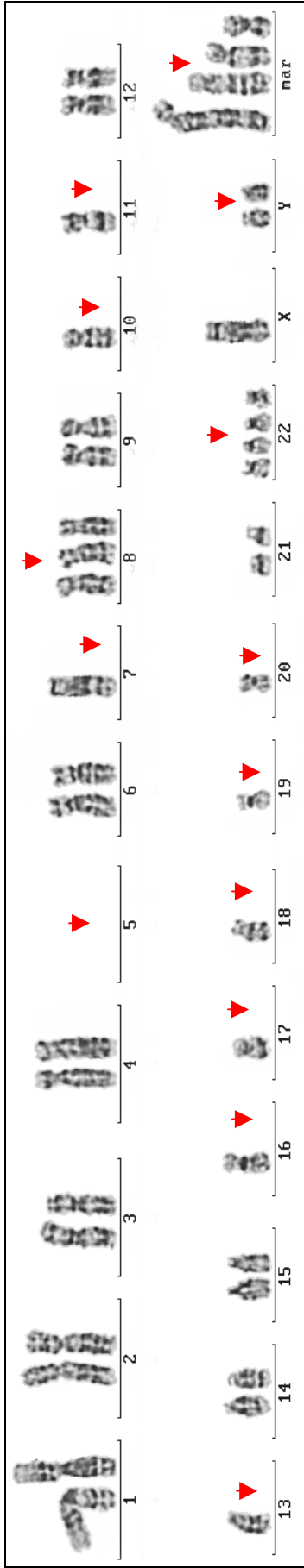
b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XY,der(4)t(4;17)(p12;?q),-17,t(14;15)(q2;q1),+22

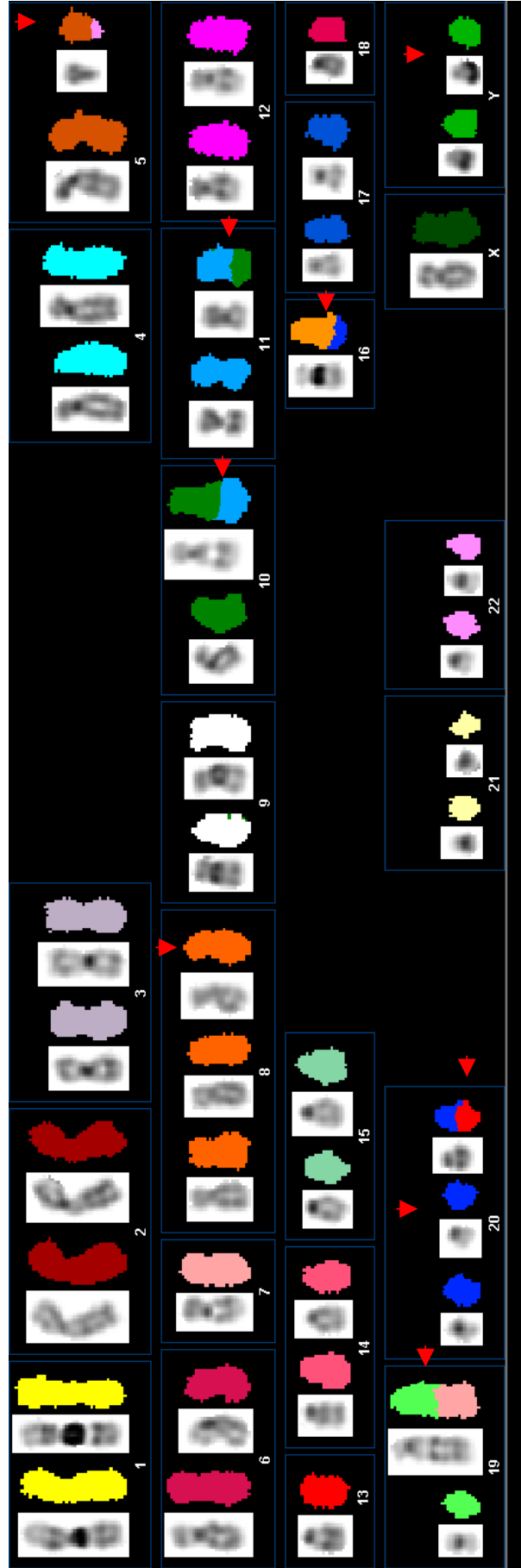
Abb 3.7: Fall ID 4/Januar 2001

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 43,XY,-5,-5,-7,+8,-10,-11,-13,-13,-16,-17,-18,-19,-20,+22,+4mar

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 45,XY,der(5)t(5;22)(q10;?),-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;?;q13),del(20)(p?),+der(20)t(13;20)(?q;?)

Fall ID 5: Diagnose: V.a. schweres MDS

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Die G-Bandenanalyse zeigte einen hypodiploiden weiblichen Chromosomensatz mit numerischen und zahlreichen strukturellen Aberrationen mit 4 Markerchromosomen, die nicht näher identifizierbar waren (siehe Abbildung 3.8a).

Vorläufiger Karyotyp:

45,XX,-5,-7,-12,-13,-17,+4mar

Zur weiteren Abklärung des aberranten Zellklons wurde eine 24-Farben-FISH herangezogen.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 3

Karyotyp:

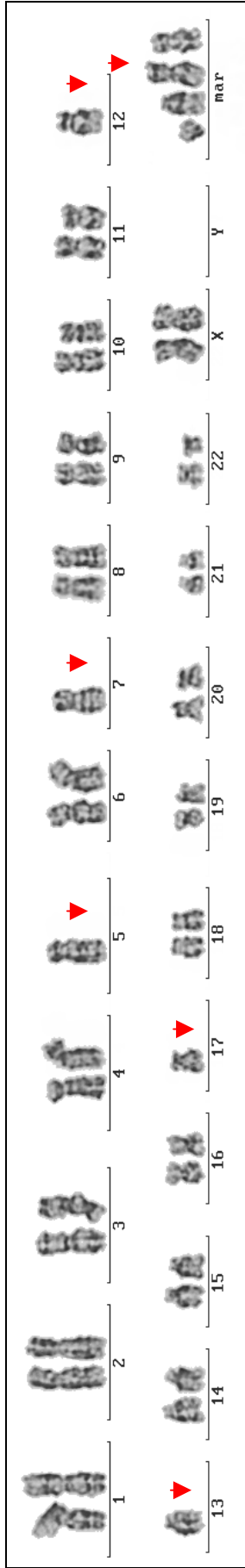
45,XX,t(3;21)(q26;q22),del(5)(q23),-7,t(12;13;17)(12qter→12p12::13q22→13qter;13pter→13q22::17q11→17qter;17pter→17q11::12p13→12pter [2]

42,XX,t(3;21)(q26;q22),del(5)(q23),-7,-8,-10,t(12;13;17)(12qter→12p12::13q22→13qter;13pter→13q22::17q11→17qter;17pter→17q11::12p13→12pter,-22 [1]

Der aberrante Zellklon konnte näher charakterisiert werden. Neben einer Monosomie 7 wurde ein Markerchromosom als das für MDS typische 5q- Syndrom identifiziert. Drei weitere Markerchromosomen stellen vermutlich reziprok ein 3-Bruch-Rearrangement mit einer Translokation zwischen den Chromosomen 12, 13 und 17 dar. Zusätzlich wurde die in Myelodysplasien eher selten beschriebene reziproke Translokation t(3;21) gefunden (siehe Abbildung 3.8b). Die Verluste eines Chromosoms 8, 10 und 22 in einer Metaphase könnten präparativ bedingt sein.

Abb 3.8: Fall ID 5

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 45,XX,-5,-7,-12,-13,-17,+4mar

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 45,XX,t(3;21)(q26;q22),del(5)(q23),-7,t(12;13;17)(12qter→12p12::13q22→13qter;13pter→13q22::17q11→17qter;17pter→17q11::12p13→12pter

Fall ID 6: Diagnose B-CLL

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 12

Der in der G-Bandenanalyse ermittelte Hauptklon zeigte einen männlichen Karyotyp mit verkürztem Chromosom 3 und verlängertem Chromosom 17 (siehe Abbildung 3.9a). Da noch weitere Metaphasen mit verschiedenen numerischen und strukturellen Aberrationen gefunden wurden, sollte der Befund mit der 24-Farben-FISH überprüft werden. Daneben lag auch der normale männliche Karyotyp vor.

Karyotyp:

46,XY,del(3)(p23?),add(17)(q24?)/ 46,XY

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 10

Karyotyp:

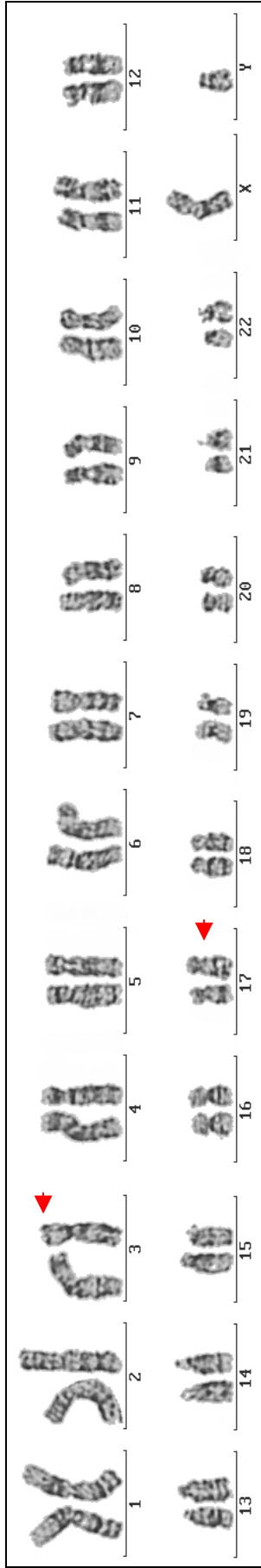
46,XY,t(3;17)(p23;q24) [5]

46,XY [4]

44,Y,-X,-8 [1]

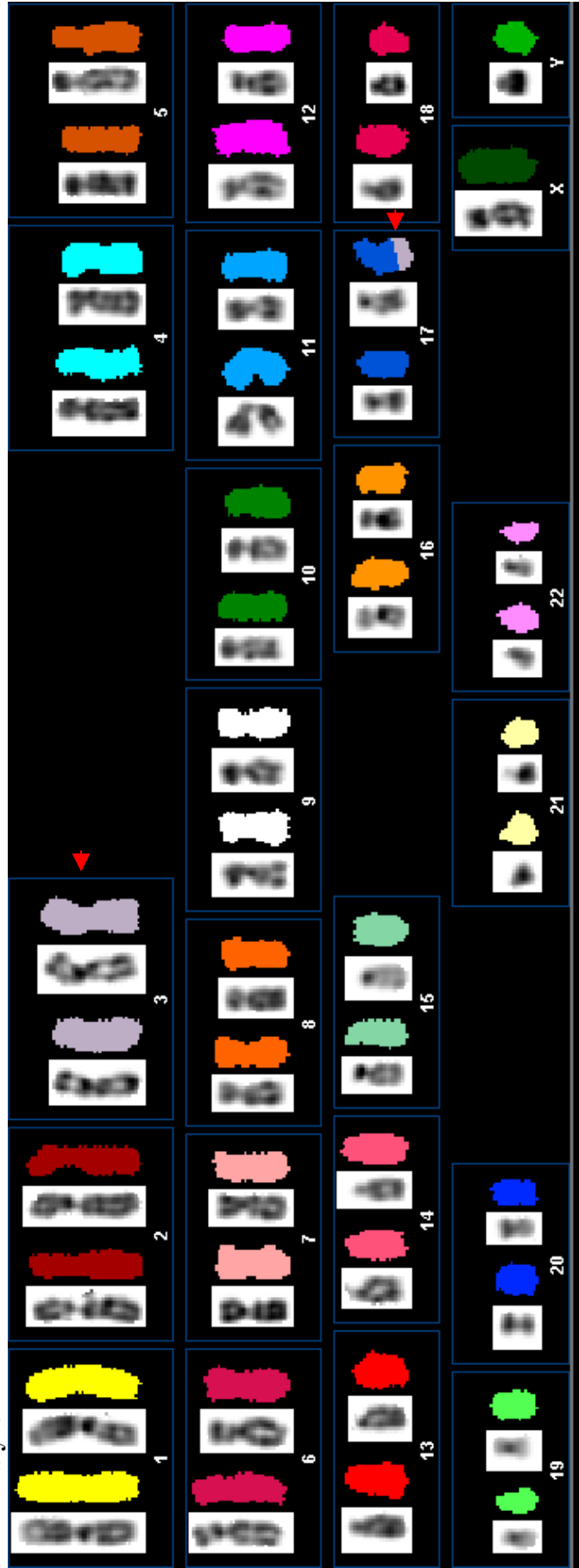
Die Verkürzung an einem Chromosom 3 und die Verlängerung an einem Chromosom 17 konnten unter Zuhilfenahme der G-Bandenanalyse als subtile reziproke Translokation identifiziert werden (die SKY-Analyse zeigte keinen Farbwechsel am betroffenen Chromosom 3) (siehe Abbildung 3.9b). Es lagen keine weiteren Metaphasen mit Aberrationen vor. Die hypodiploide Metaphase ist vermutlich auf einen präparativ bedingten Chromosomenverlust zurückzuführen.

Abb 3.9: Fall ID 6
a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XY,del(3)(p23?),add(17)(q24?)

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XY,t(3;17)(p23;q24)

Fall ID 7: Diagnose: V.a. NHL rezidiv

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 9

Mittels G-Banden wurde kein einheitlicher Karyotyp gefunden. Der gefundene Chromosomensatz wechselte zwischen 41 und 44 Chromosomen und zeigte zahlreiche numerische und strukturelle Aberrationen. Wobei alle Metaphasen ein großes Markerchromosom zeigten, das vermutlich auf ein stark verlängertes Chromosom 1 zurückzuführen ist (siehe Abbildung 3.10a).

Karyotyp:

41-44,XX numerisch und strukturell stark aberranter Chromosomensatz mit meist einem stark verlängerten Chromosom 1

Zur näheren Abklärung der Aberrationen wurde die SKY-Technik herangezogen.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Karyotyp:

43,XX,dic(1;6)(p36?:p23?),der(5)t(5;21)(q11;q10),der(8)t(5;8)(?:p22?),der(16)t(16;22)(q2;q?),-17,-18,del(21)(q?),der(22)t(21;22)(q?:p11?),der(22)t(6;22)(?:q13) [2]

43,XX,dic(1;6)(p36?:p23?),der(5)t(5;21)(q11;q10),der(8)t(5;8)(?:p22?),-17,-18,del(21)(q?),der(22)t(21;22)(q?:p11?),der(22)t(6;22)(?:q13) [1]

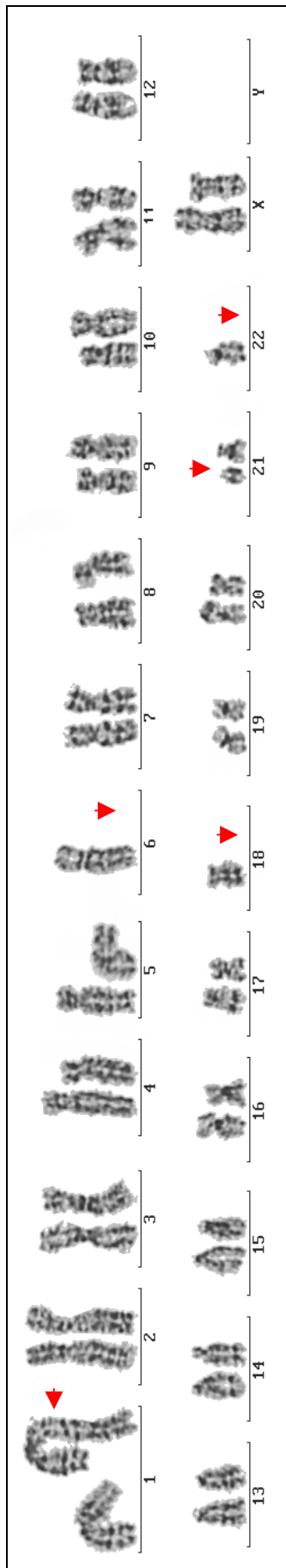
42,XX,dic(1;6)(p36?:p23?),der(5)t(5;21)(q11;q10),der(8)t(5;8)(?:p22?),der(16)t(16;22)(q2;q?),-17,-18,-21,der(22)t(21;22)(q?:p11?),der(22)t(6;22)(?:q13) [1]

41,XX,der(5)t(5;21)(q11;q10),der(8)t(5;8)(?:p22?),-9,-14,der(16)t(16;22)(q2;q?),-17,-18,-21,der(22)t(21;22)(q?:p11?) [1]

Die komplexen Aberrationen konnten weitgehend aufgeklärt werden. Die **rot** gekennzeichneten Aberrationen konnten in allen Metaphasen gefunden werden und stellten vermutlich die Aberrationen eines frühen Klons dar. Dieser enthielt das stark verlängerte Chromosom 1, das sich als ein dizentrisches Chromosom 1/6, bestehend aus einem fast vollständigem Chromosom 1 und 6, herausstellte. Weitere Derivatchromosomen wurden gefunden, dazu gehören ein im q-Arm stark verkürztes der(5) mit Material im q-Arm von Chromosom 21, ein der(8) mit einem kleinen Segment von Chromosom 5 im p-Arm, ein der(16) mit einem kleinen Segment von Chromosom 22 in q-Arm, das nicht in allen Metaphasen vorlag (**blaue** Markierung), ein der (22) mit Material von Chromosom 21 im p-Arm und ein weiteres der(22) mit einem klei-

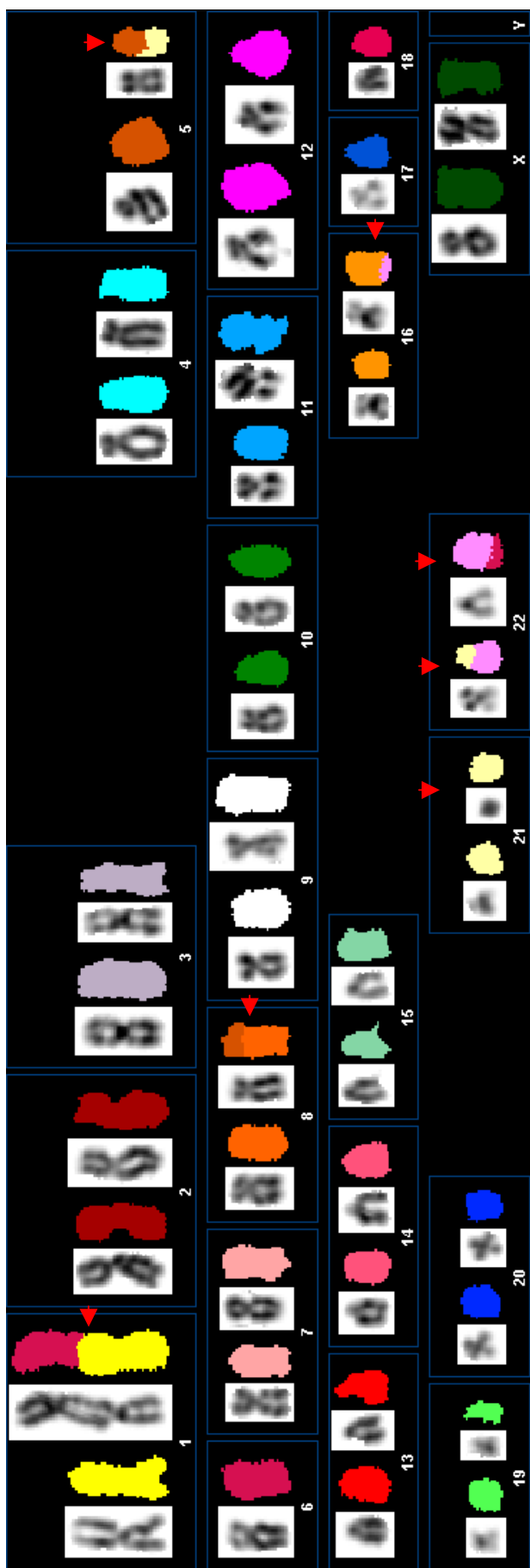
nen Segment von Chromosom 6 im q-Arm. Daneben lagen eine Monosomie 17 und 18 sowie in manchen Metaphasen ein deletiertes, in einigen Metaphasen vollständig fehlendes Chromosom 21 vor (grüne Markierung) (siehe Abbildung 3.10b). Nicht in allen Metaphasen konnten diese Aberrationen gefunden werden (siehe grüne und blaue Markierung), so dass verschiedene Subklone vorlagen.

Abb 3.10: Fall ID 7
a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 43,XX,add(1)(p36?),-6,-18,?21,-22

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 43,XX,dic(1;6)(p36?;p23?),der(5)t(5;21)(q11;q10),der(8)t(5;8)(?;p22?),der(16)t(16;22)(q2;q?),-17,-18,del(21)(q?),der(22)t(21;22)(q?;p11?),der(22)t(6;22)(?;q13)

Fall ID 8: Diagnose: B-CLL

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Die konventionelle Bandenanalyse zeigte einen Mosaikbefund, bestehend aus einem unauffälligen weiblichen Karyotyp und einem hyperdiploiden Karyotyp mit Trisomie 12 (siehe Abbildung 3.11a).

Karyotyp:

46,XX/ 47,XX+12

Dieser Befund wurde im Hinblick auf weitere Aberrationen mit der SKY-Technik überprüft.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Karyotyp:

46,XX [3]

45,X,-X,-4,+12 [1]

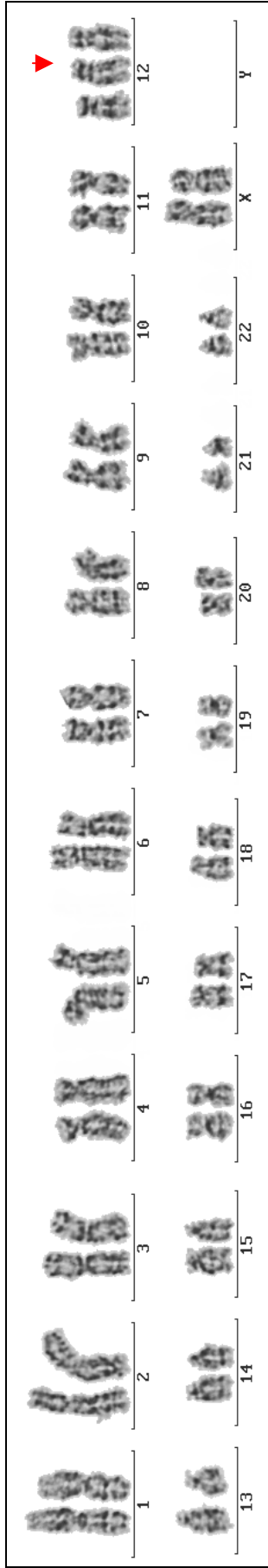
47,XXX [1]

Überwiegend wurden unauffällige diploide Metaphasen gefunden (siehe Abbildung 3.11b).

Der G-Bandenbefund konnte sich nur an Hand einer Metaphase bestätigen. Wobei diese neben der Trisomie 12 zusätzlich Verluste der Chromosomen X und 4 zeigte, die als präparativ bedingt eingestuft werden. Eine Metaphase mit Trisomie X ist vermutlich ein Kulturartefakt.

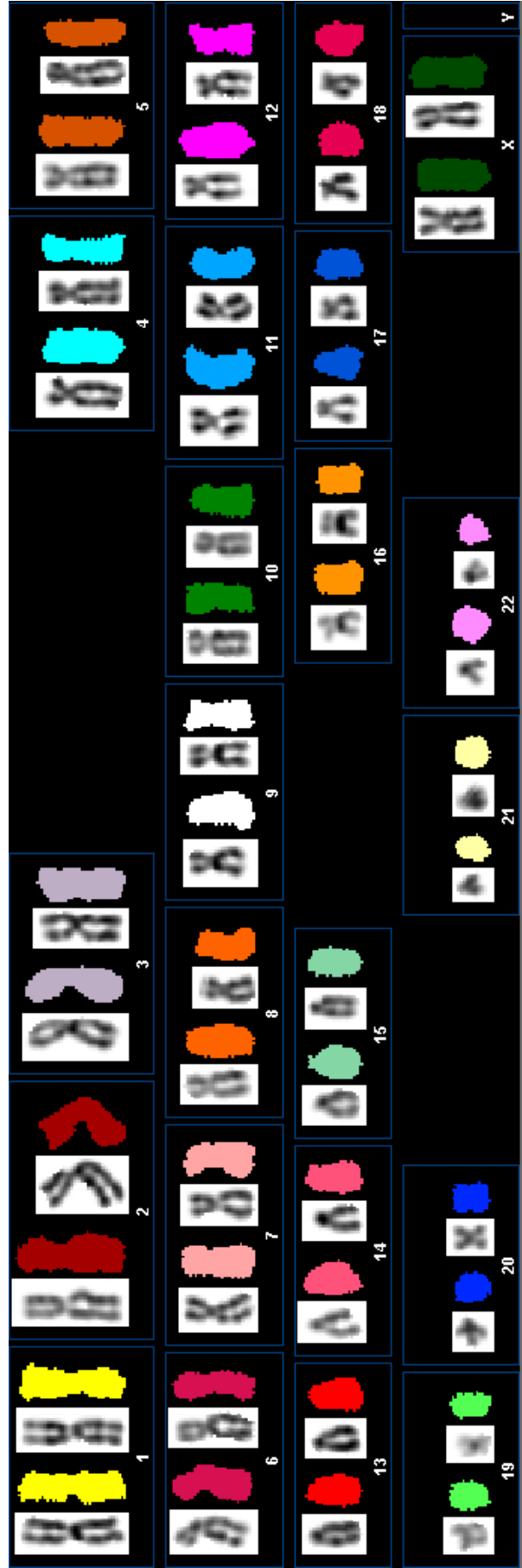
Abb 3.11: Fall ID 8

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 47,XX+12

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XX

Fall ID 9: Diagnose: B-CLL

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 7

In der G-Bandenanalyse wurde ein Mosaikbefund, bestehend aus einem pseudodiploiden Klon mit Trisomie 12 und Monosomie 18 (siehe Abbildung 3.12a) und einem unauffälligen diploiden Klon, gefunden.

Karyotyp:

46,XY,+12,-18/ 46,XY

Dieses Ergebnis sollte mit der 24-Farben-FISH überprüft werden.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

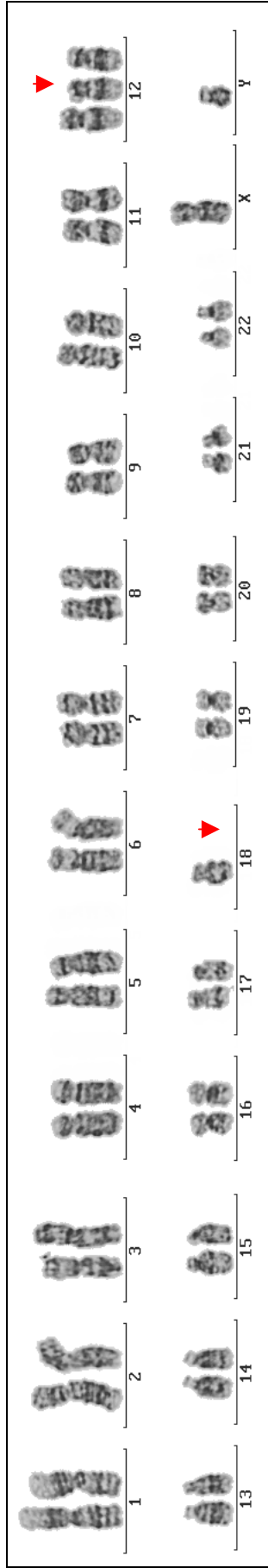
Karyotyp:

46,XY,der(10)t(10;18)(q26;q22),+12,-17,der(18)t(17;18)(q11;q11) [4]

45,XY,-5,der(10)t(10;18)(q26;q22),+12,-17,der(18)t(17;18)(q11;q11) [1]

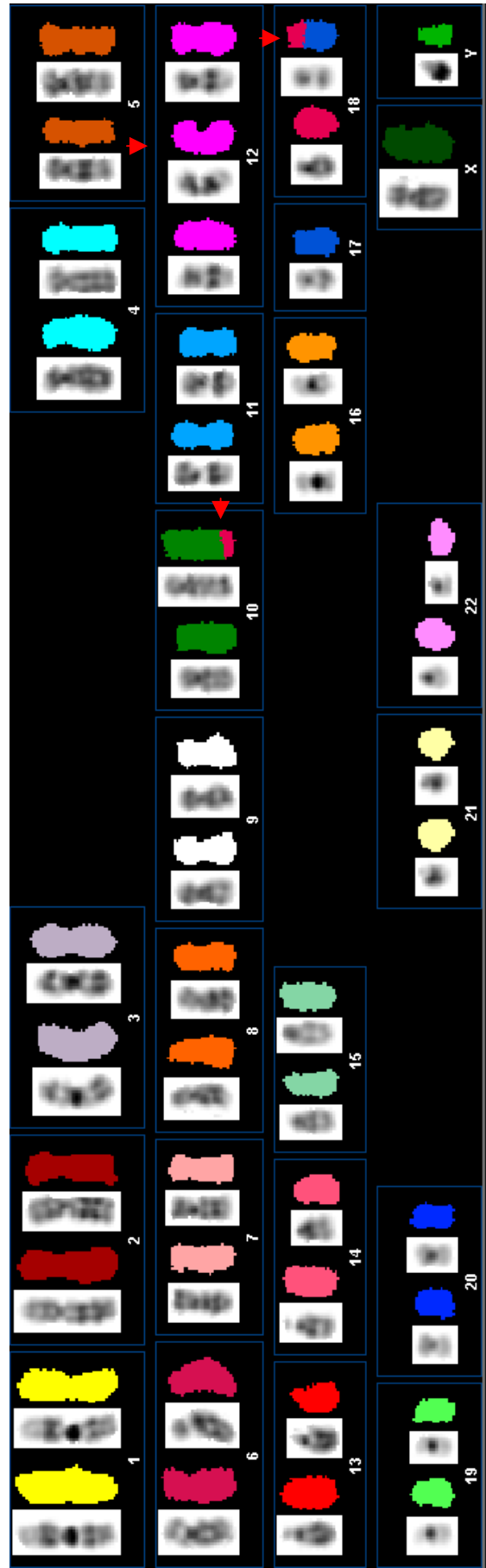
Neben der auch schon mit der G-Bänderung erfassten Trisomie 12, konnte die SKY-Analyse anstatt einer Monosomie 18 ein Derivatchromosom 18 bei gleichzeitigem Verlust eines Chromosoms 17 identifizieren. Das Derivatchromosom 18 enthält im q-Arm Material von 17q. Zusätzlich lag noch ein Derivatchromosom 10, mit einem kleinen Segment von 18q im q-Arm, vor (siehe Abbildung 3.12b). Der Verlust eines Chromosoms 5 in einer Metaphase ist vermutlich präparativ bedingt. Der unauffällige diploide Zellklon wurde in der SKY-Analyse nicht gefunden.

Abb 3.12: Fall ID 9
a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XY,+12,-18

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XY,der(10)t(10;18)(q26;q22),+12,-17,der(18)t(17;18)(q11;q11)

Fall ID 10: Diagnose: nicht bekannt

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Neben einem normalen männlichen Karyotyp zeigt die G-Bandenanalyse in etwa der Hälfte der ausgewerteten Metaphasen eine fragliche zusätzliche dunkle Bande am kurzen Arm eines Chromosoms 1 (siehe Abbildung 3.13a). Diese sollte mittels 24-Farben-FISH näher abgeklärt werden.

Karyotyp:

46,XY/ 46,XY,?add(1)(p36)

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

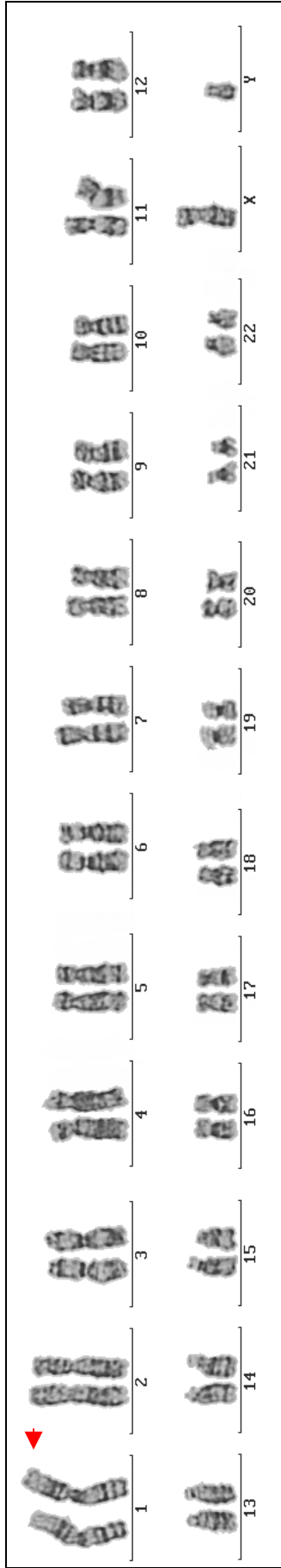
Karyotyp:

46,XY [5]

45,XY,-22 [1]

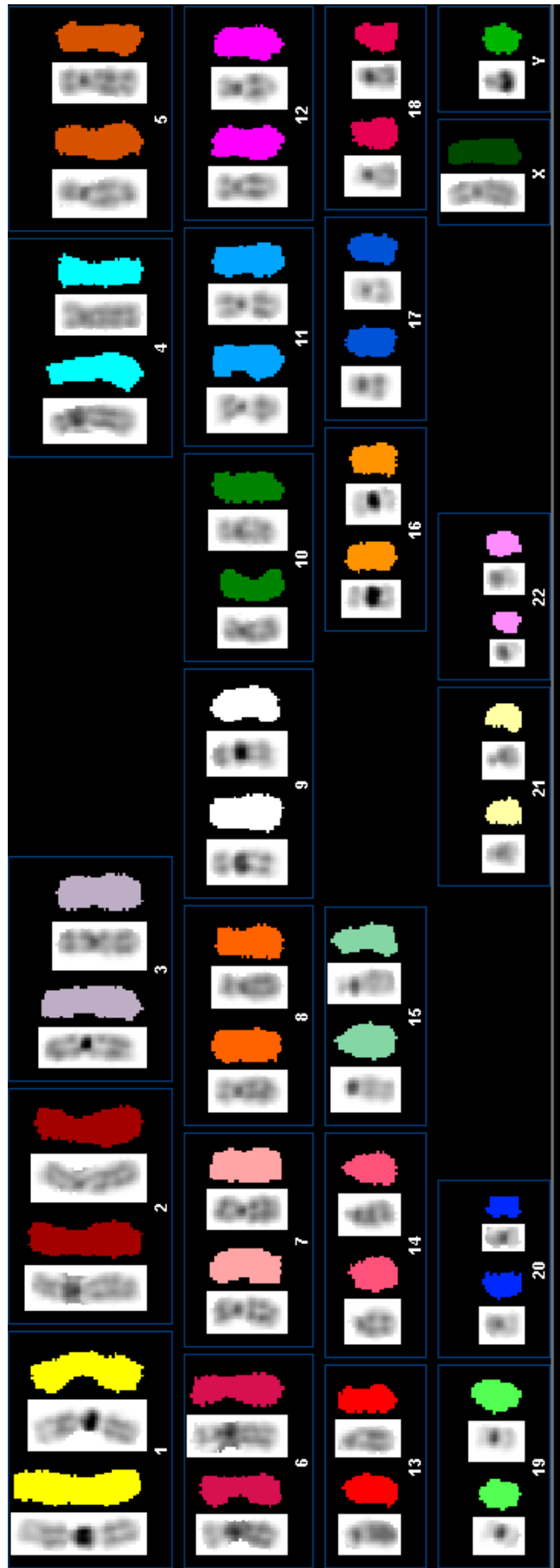
Die SKY-Analyse erbrachte keinen Hinweis auf eine Veränderung am Chromosom 1 unter Beteiligung eines weiteren Chromosoms. Es besteht durchgehend aus Material von Chromosom 1 (siehe Abbildung 3.13b). Die fragliche dunkle Bande ist möglicherweise auf eine subtile intrachromosomale Veränderung zurückzuführen, die auch als konstitutionelle Aberration vorliegen könnte. Der Verlust eines Chromosoms 22 in einer Metaphase wird als präparativ bedingter Chromosomenverlust eingestuft.

Abb 3.13: Fall ID 10
a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XY,?add(1)(p36)

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XY

Fall ID 11: Diagnose: CML, Verlauf

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 10

Die G-Bandenanalyse zeigte einen weiblichen Karyotyp mit komplexen Aberrationen. Dazu gehörten ein deletiertes Chromosom 2 und 5, sowie ein derivatives Chromosom 2, 9 und 22 (siehe Abbildung 3.14a).

Karyotyp:

46,XX,del(2)(q11),del(5)(q12),der(9)t(9;?)(q34;?),ins(9;2)(q34;q11q37),der(22)t(9;22)(q34;q11)

Der Befund sollte mit der SKY-Analyse weiter aufgeklärt werden.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Karyotyp:

46,XX,del(2)(q11),der(5)t(5;22)(q10;q11),der(9)t(9;5)(q34;q?),ins(9;2)(q34;q11q37),der(22)t(9;22)(q34;q11) [2]

46,XX,csb1,del(2)(q11),der(5)t(5;22)(q10;q11),der(9)t(9;5)(q34;q?),ins(9;2)(q34;q11q37),der(22)t(9;22)(q34;q11) [1]

45,XX,del(2)(q11),der(5)t(5;22)(q10;q11),der(9)t(9;5)(q34;q?),ins(9;2)(q34;q11q37),-15,der(22)t(9;22)(q34;q11) [1]

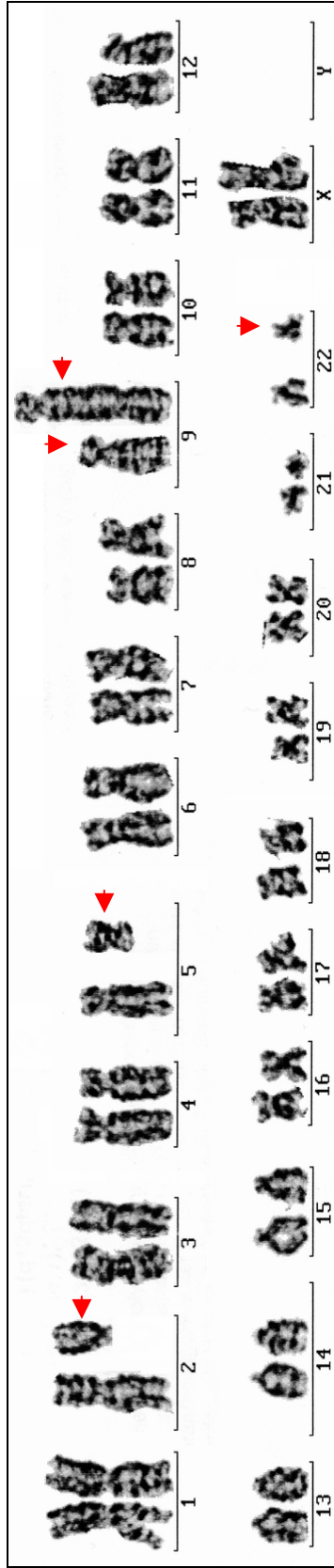
44,XX,-1,del(2)(q11),der(5)t(5;22)(q10;q11),der(9)t(9;5)(q34;q?),ins(9;2)(q34;q11q37),-22 [1]

44,XX,del(2)(q11),der(5)t(5;22)(q10;q11),der(9)t(9;5)(q34;q?),ins(9;2)(q34;q11q37),-20,-21,der(22)t(9;22)(q34;q11) [1]

Die komplexen Aberrationen wurden weiter aufgeklärt. Das deletierte Chromosom 5 ist ein Derivatchromosom, das sich aus dem kurzen Arm mit Zentromer von Chromosom 5 und im langen Arm aus Material von Chromosom 22 zusammensetzt.

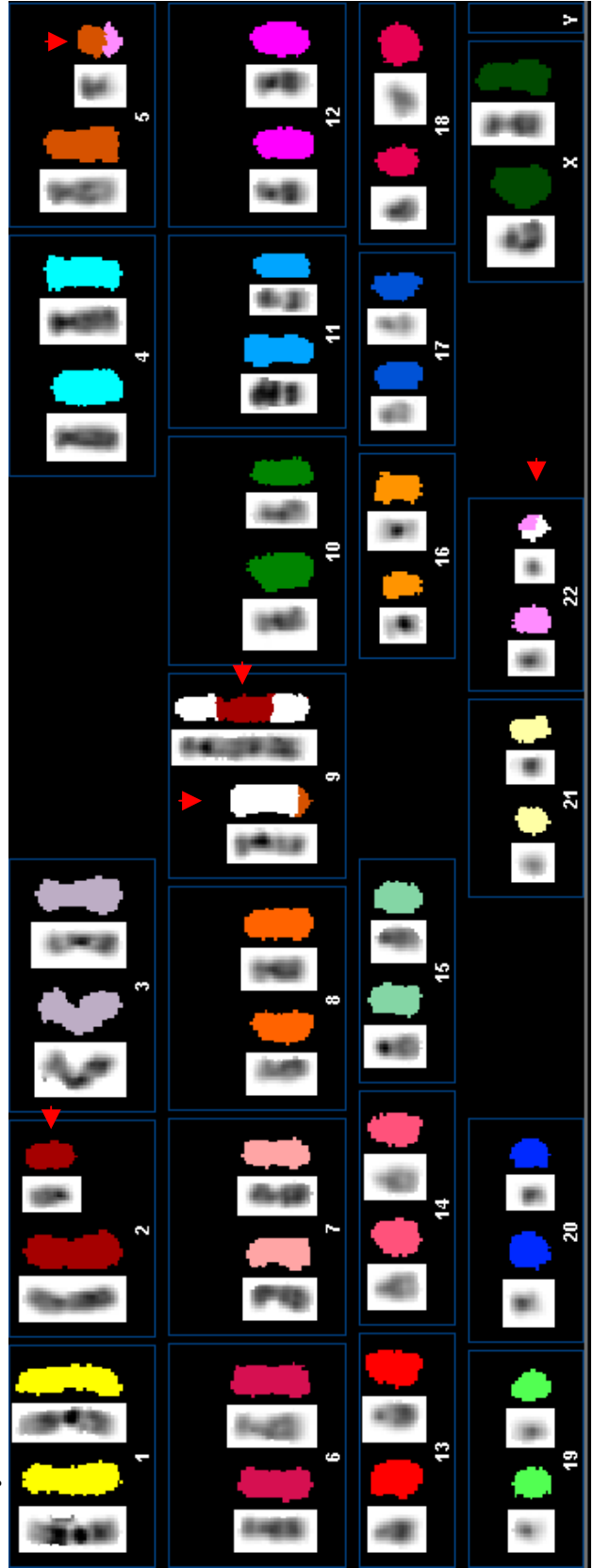
Das derivative Chromosom 9 besitzt im langen Arm Material von Chromosom 5. Das deletierte Chromosom 2 sowie die Insertion von Material des Chromosoms 2 in den langen Arm eines Chromosoms 9 haben sich bestätigt. Das derivative Chromosom 22 stellt ein Philadelphia-Chromosom dar, wobei die Translokation nicht reziprok ist, da das Material von Chromosom 22 zum derivativem Chromosom 5 gehört (siehe Abbildung 3.14b). Die Chromosomenverluste der hypodiploiden Metaphasen sowie der Chromosomenbruch sind vermutlich präparativ bedingt.

Abb 3.14: Fall ID 11
a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XX,del(2)(q11),del(5)(q12),der(9)t(9;?)(q34;?),ins(9;?2)(q34;q11q37),der(22)t(9;22)(q34;q11)

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XX,del(2)(q11),der(5)t(5;22)(q10;q11),der(9)t(9;5)(q34;q?),ins(9;2)(q34;q11q37),der(22)t(9;22)(q34;q11)

Fall ID 12: Diagnose: V.a. B-CLL

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Der konventionelle zytogenetische Befund diagnostizierte einen männlichen Karyotyp mit einer Trisomie 12 und einer Monosomie 17 (siehe Abbildung 3.15a).

Karyotyp:

46,XY,+12,-17

Der Befund wurde mittels SKY-Analyse überprüft.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 4

Karyotyp:

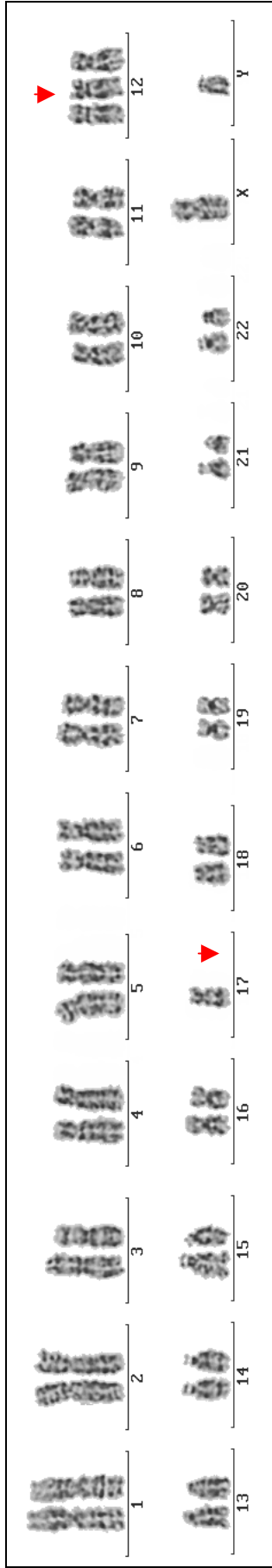
46,XY,der(3)t(3;17)(p13;q21?)+12,-17 [3]

46,XY,del(3)(q10),der(3)t(3;17)(p13;q21?)+12,-17 [1]

Neben dem Zugewinn eines Chromosoms 12 und dem Verlust eines Chromosom 17 konnte die SKY-Analyse ein derivatives Chromosom 3 identifizieren. Dieses enthält im kurzen Arm Material von 17q. Es handelt sich also um einen unbalancierten Karyotyp, der neben der Trisomie 12 einen Verlust des Segments 3p13-pter und 17q21?-pter aufweist (siehe Abbildung 3.15b). Ob die Metaphase mit noch zusätzlich einem deletierten Chromosom 3 einen weiteren malignen Zellklon darstellt, konnte auf Grund der geringen Anzahl von Metaphasen nicht geklärt werden.

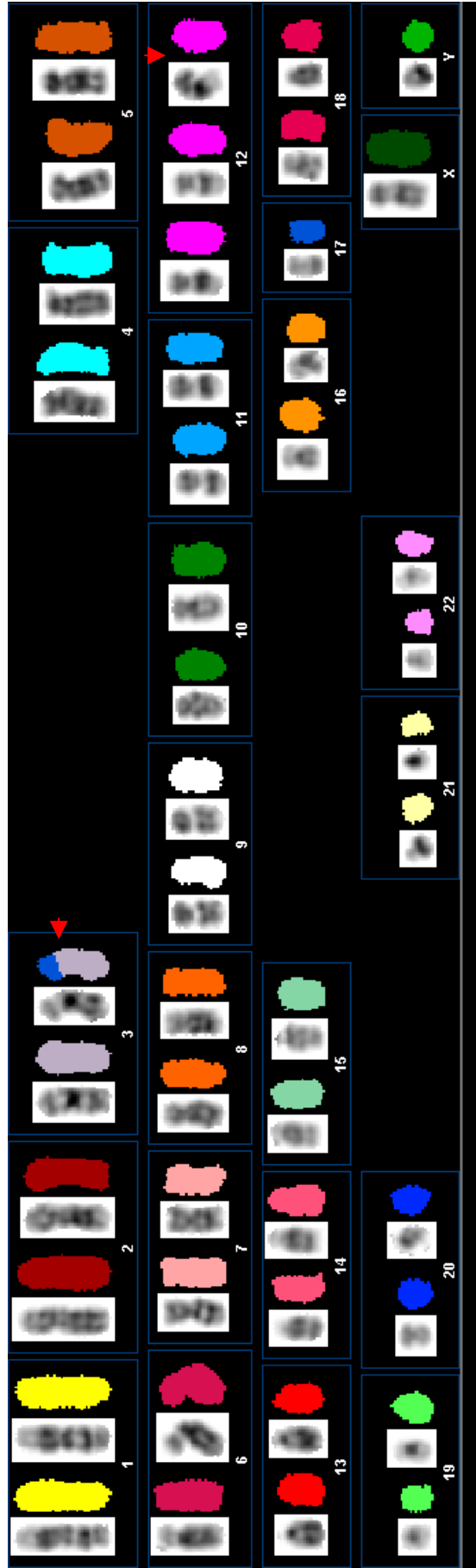
Abb 3.15: Fall ID 12

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XY,+12,-17

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XY,der(3)t(3;17)(p13;q21?)+12,-17

Fall ID 13: Diagnose: B-CLL

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Die konventionelle G-Bandenanalyse zeigte einen Mosaik-Befund. Überwiegend konnte ein unauffälliger männlicher Karyotyp gefunden werden. Es lag aber auch ein maligner Zellklon mit einer Monosomie 18 und einem Markerchromosom vor (siehe Abbildung 3.16a).

Karyotyp:

46,XY/ 46,XY,-18,+mar

Der Marker des aberranten Zellklons sollte mit Hilfe der 24-Farben-FISH näher identifiziert werden.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 11

Karyotyp:

46,XY,+der(2)t(2;18)(q11;q11),-18 [5]

46,XY [3]

45,XY,-19 [1]

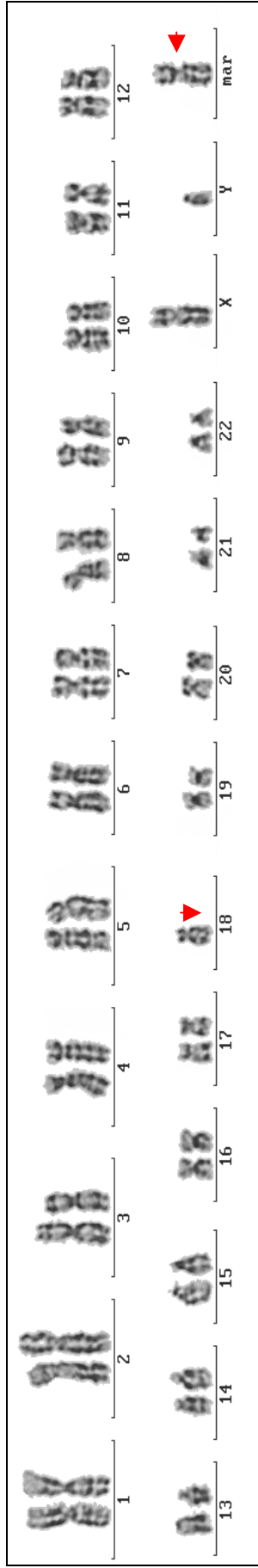
45,XY,-9 [1]

44,XY,del(3)(?q),-6,-8 [1]

Die SKY-Analyse konnte das Markerchromosom als Derivatvchromosom 2, bestehend aus dem p-Arm mit Zentromer von Chromosom 2 und dem q-Arm von Chromosom 18, identifizieren (siehe Abbildung 3.16b). Es handelt sich also um einen unbalancierten Karyotyp mit dem Zugewinn von 2p und dem Verlust des Segments 18q11-pter. Die hypodiploide Metaphase mit einer Deletion am Chromosom 3 und dem Verlust von jeweils einem Chromosom 6 und 8 könnte präparationsbedingt sein. Auch die hypodiploiden Metaphasen mit dem Verlust von jeweils einem Chromosom 9 bzw. 19 werden als Präparationsartefakte eingestuft.

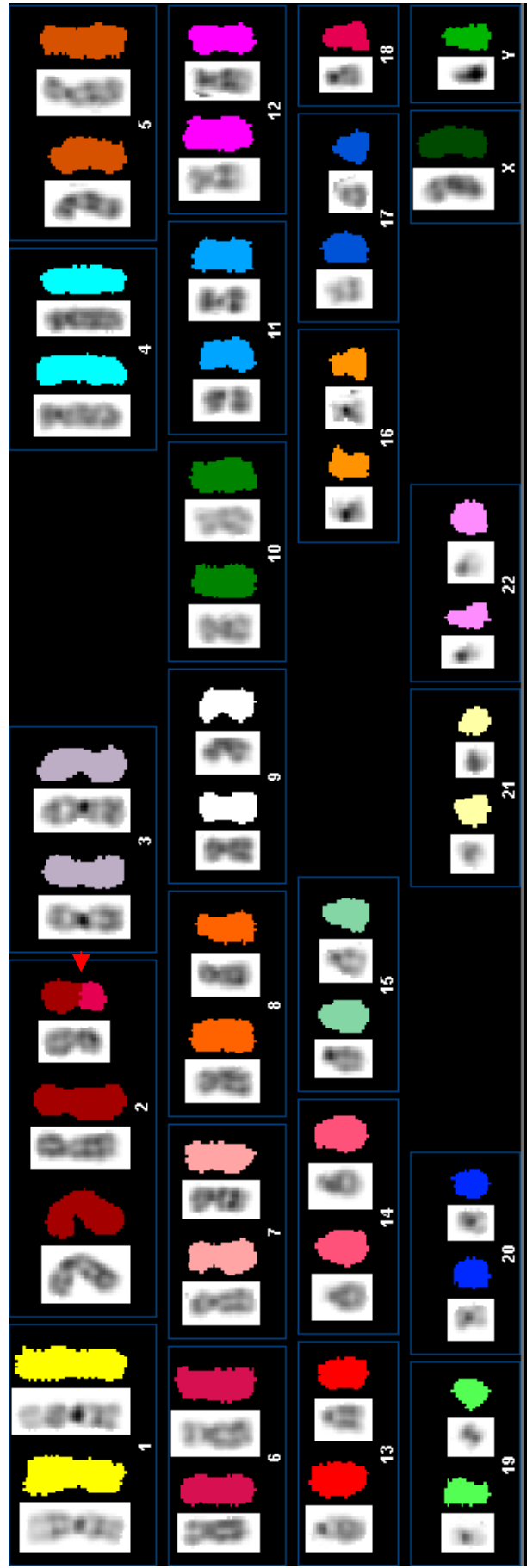
Abb 3.16: Fall ID 13

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XY,-18,+mar

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XY,+der(2)t(2;18)(q11;q11),-18

Fall ID 14: Diagnose: V.a. B-CLL

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Mittels G-Bänderung wurde ein weiblicher komplex aberranter Karyotyp identifiziert. Dieser wies ein deletiertes Chromosom 1, ein derivatives und stark verlängertes Chromosom 4, den Verlust von Chromosom 13 und ein nicht näher identifizierbares Markerchromosom auf (siehe Abbildung 3.17a).

Karyotyp:

46,XX,del(1)(q12),der(4)t(4;?),-13,+mar

Mit der SKY-Analyse soll dieser Karyotyp genauer entschlüsselt werden.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 4

Karyotyp:

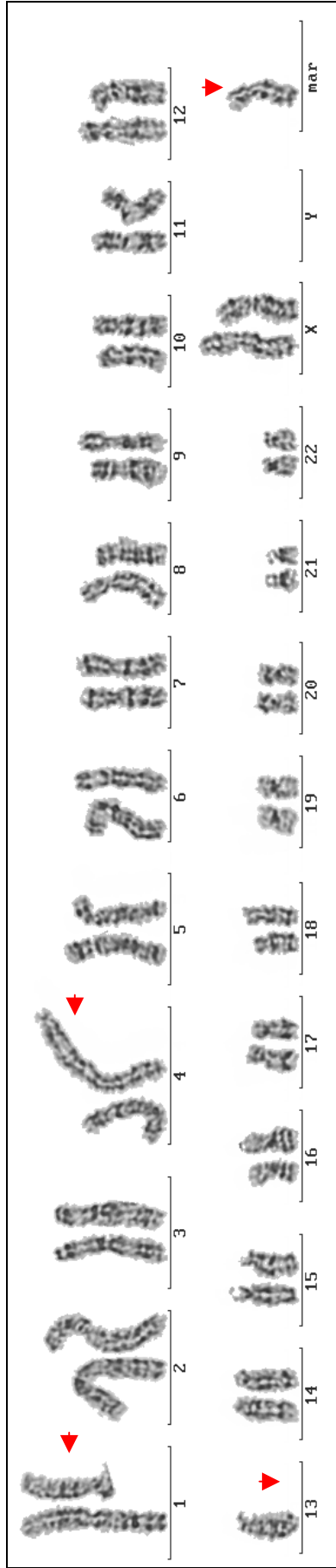
46,XX,del(1)(q12),-4,+8,der(13)t(4;13)(?;q21?→pter),der(14)t(4;13;14)(q12?-q?; q21?→qter;q24?→pter) [2]

44,XX,del(1)(q12),-3,-4,+8,der(13)t(4;13)(?;q21?→pter),der(14)t(4;13;14)(q12?-q?; q21?→qter;q24?→pter),-17 [1]

43,XX,-1,-1,-4,-5,+8,der(13)t(4;13)(?;q21?→pter),der(14)t(4;13;14)(q12?-q?;q21?→qter;q24?→pter) [1]

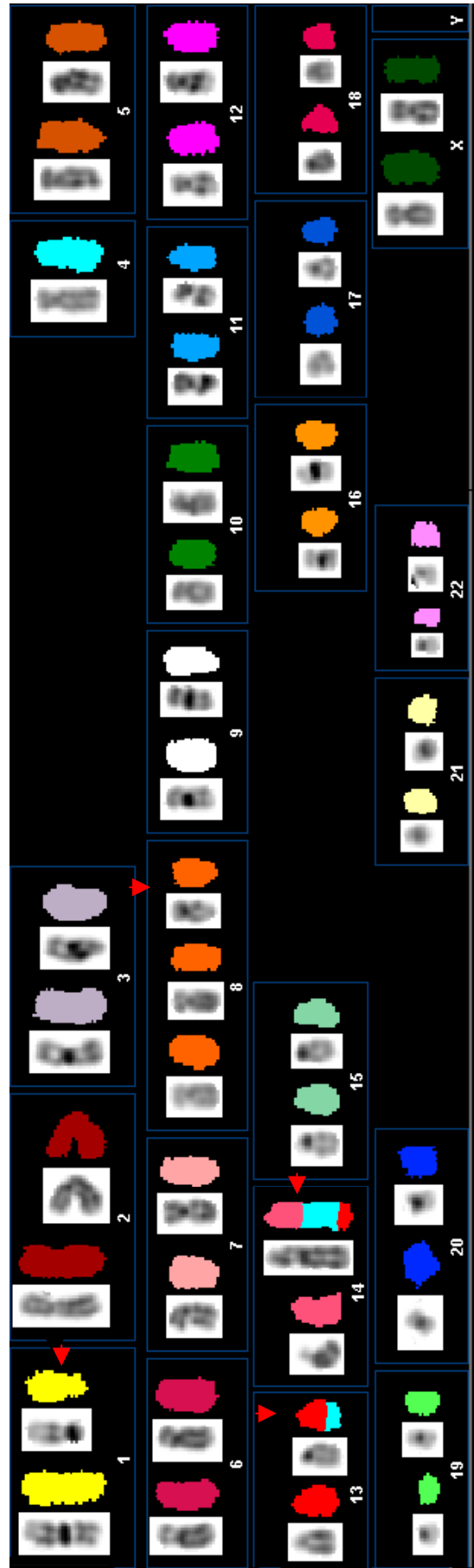
Mit der SKY-Analyse konnte das deletierte Chromosom 1 bestätigt werden. Das verlängerte Chromosom 4 ist ein Derivatchromosom 14, da es das Zentromer von Chromosom 14 enthält. Im einzelnen besteht das der(14) aus dem fast vollständigem Chromosom 14, einem größeren Segment aus dem q-Arm von Chromosom 4 und einem kleinen Segment von 13q. Anstatt eines Verlustes von Chromosom 13 fand sich ein derivatives Chromosom 13, bestehend aus dem Zentromer und einem Segment von Chromosom 13 (13q21?→pter) und einem kleinen Segment von Chromosom 4. Das Markerchromosom wurde als Chromosom 8 identifiziert, so dass eine Trisomie 8 vorliegt (siehe Abbildung 3.17b). Auf Grund der veränderten G-Bandenabfolge in diesem Chromosom werden intrachromosomale Veränderungen vermutet. Die Chromosomenverluste 3 und 7 bzw. 1, 1 und 5 der hypodiploiden Metaphasen werden als Präparationsartefakte eingestuft.

Abb 3.17: Fall ID 14
a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XX,del(1)(q12),der(4)t(4;?),-13,+mar

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XX,del(1)(q12),-4,+8,der(13)t(4;13)(?;q21?→pter),der(14)t(4;13;14)(q12?-q?; q21?→qter;q24?→pter)

Fall ID 15: Diagnose: V.a. Thrombozytose

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Die konventionelle Zytogenetik zeigte einen weiblichen Karyotyp mit dem Verlust eines Chromosoms 8 und dem Zugewinn eines Markerchromosoms (siehe Abbildung 3.18a).

Karyotyp:

46,XX,-8,+mar

Die SKY-Analyse wurde zur Identifizierung des Markerchromosoms herangezogen.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 4

Karyotyp:

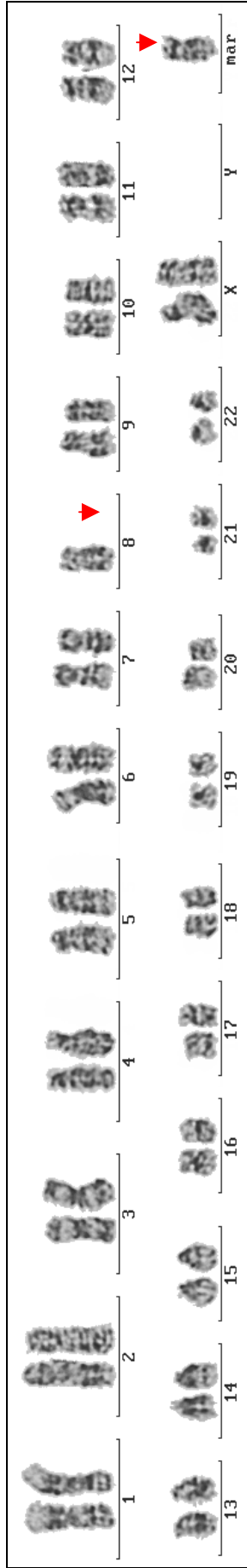
46,XX [3]

45,XX,-17 [1]

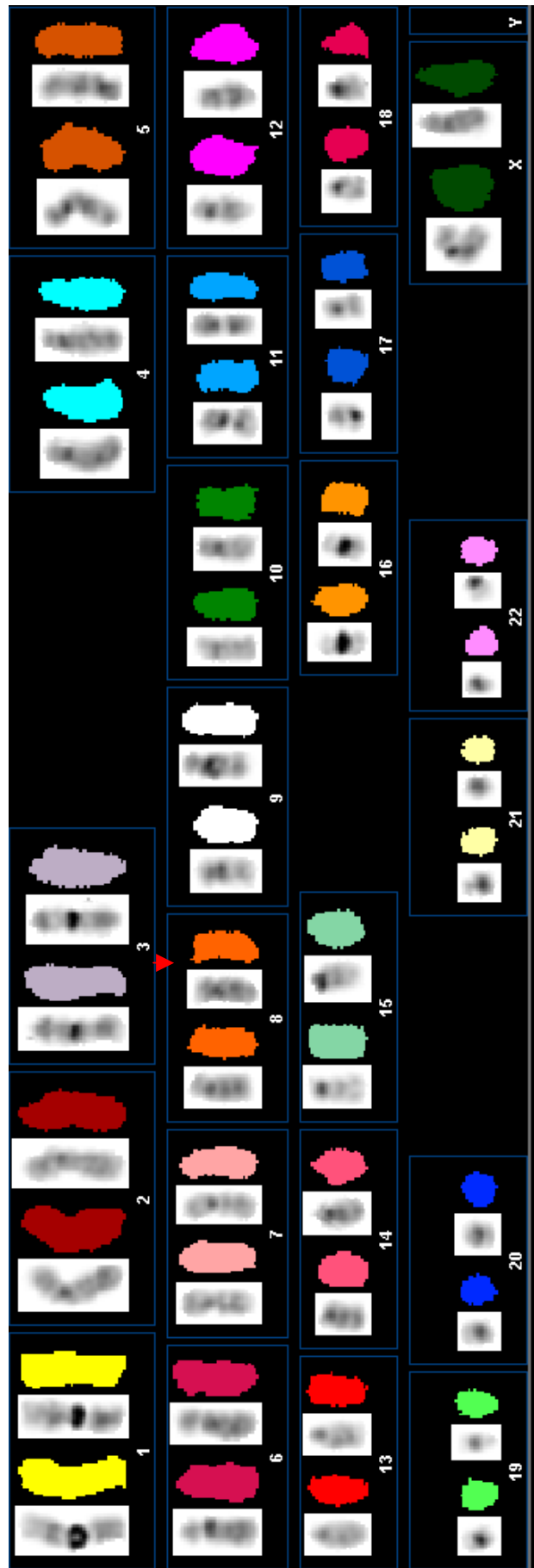
Das Markerchromosom wurde als Chromosom 8 identifiziert (siehe Abbildung 3.18b). Das stark veränderte G-Bandenmuster resultiert vermutlich aus einer intrastrukturellen Veränderung in diesem Chromosom. Diese Veränderung könnte durchaus auch eine konstitutionelle Chromosomenanomalie darstellen. Der Verlust eines Chromosoms 17 in einer Metaphase ist vermutlich präparativ bedingt.

Abb 3.18: Fall ID 15

a) GTG-Bänderung



b) SKY-Analyse



Fall ID 16: Diagnose: V.a. MPS

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 8

In der G-Bandenanalyse zeigte sich ein Mosaikbefund. Hierbei handelte es sich um einen auffälligen diploiden Zellklon mit männlichem Karyotyp und einem strukturell veränderten Chromosom 7q. Daneben lag noch ein hyperdiploider Zellklon mit 47 Chromosomen, einem strukturell veränderten Chromosom 7q und einer fraglichen Trisomie 21 vor (siehe Abbildung 3.19a).

Karyotyp:

46,XY,7q?/ 47,XY,7q?,+?21

Die 24-Farben-FISH soll den Befund überprüfen und die fragliche Trisomie 21 abklären.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Karyotyp:

47,XY,+21 [4]

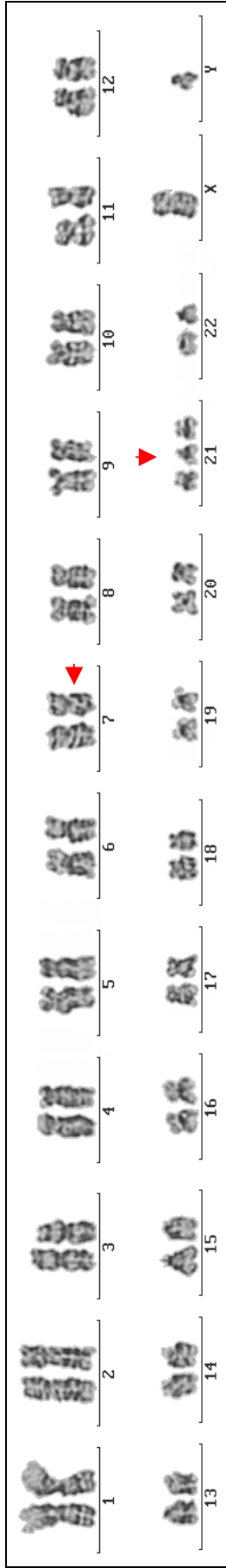
46,XY [1]

46,XY,csb3 [1]

Der Mosaikbefund der G-Bandenanalyse konnte bestätigt werden. Im hyperdiploiden Zellklon liegt eine Trisomie 21 vor (siehe Abbildung 3.19b). Die vermutlich konstitutionelle intrastrukturelle Veränderung an einem Chromosom 7q, die in beiden Zellklonen vorliegt, konnte nicht näher aufgeklärt werden. Die SKY-Analyse zeigte aber, dass kein weiteres Chromosom mit einbezogen ist. Der Chromosomenbruch eines Chromosoms 3, der in einer Metaphase vorliegt, wird als Präparationsartefakt eingestuft.

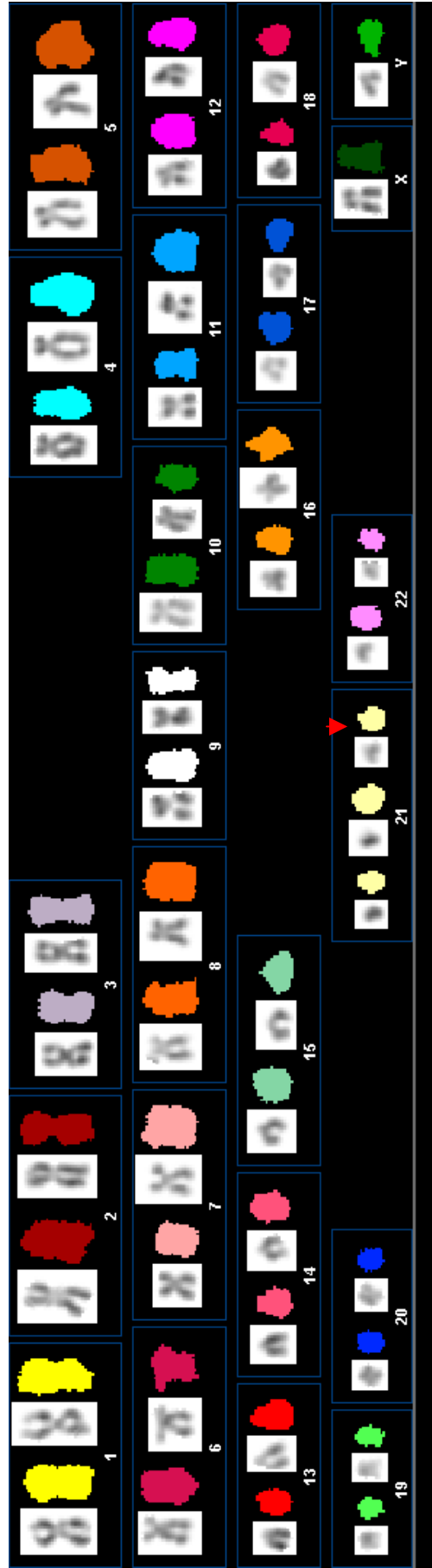
Abb 3.19: Fall ID 16

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 47,XY,7q?,+?21

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 47,XY,+21

Fall ID 17: Diagnose: V.a. lymphatische Systemerkrankung

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 8

Die G-Bandenanalyse zeigte verschiedene komplex aberrante weiblich Karyotypen, wobei ein Hauptkaryotyp vorzuherrschen schien. Dieser enthielt Verluste von jeweils einem Chromosomen 10, 13 und 17 sowie 3 Markerchromosomen (siehe Abbildung 3.20a).

Karyotyp (Hauptkaryotyp):

46,XX,-10,-13,-17,+3mar

Die SKY-Analyse sollte die Markerchromosomen näher identifizieren.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 7

Karyotyp:

46,X,t(X;6)(p11;q22?),der(10)t(10;13)(q24;q12),der(13)t(13;17)(q12;q21),der(17)t(10;17)(q24;q21) [2]

45,X,t(X;6)(p11;q22?)-5,der(10)t(10;13)(q24;q12),der(13)t(13;17)(q12;q21),der(17)t(10;17)(q24;q21) [1]

44,X,t(X;6)(p11;q22?)-7,-8,der(10)t(10;13)(q24;q12),der(13)t(13;17)(q12;q21),der(17)t(10;17)(q24;q21) [1]

44,X,t(X;6)(p11;q22?)-6,der(10)t(10;13)(q24;q12),-11,der(13)t(13;17)(q12;q21),der(17)t(10;17)(q24;q21) [1]

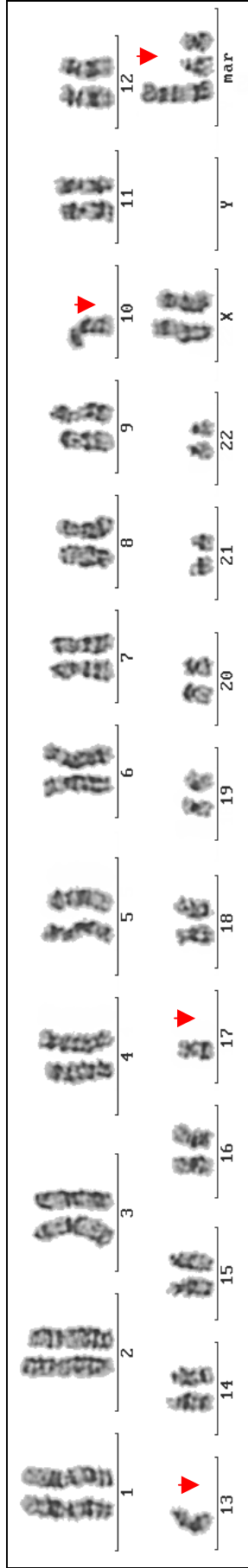
46,X,del(X)(q?),der(9)t(X;9)(q?:q3) [1]

46,XX [1]

Der Hauptkaryotyp konnte an Hand von 5 Metaphasen weitgehend aufgeklärt werden. Er beinhaltet eine vermutlich reziproke Translokation zwischen dem p-Arm von Chromosom X und einem Segment aus dem q-Arm von Chromosom 6. Des weiteren liegen ein derivatives Chromosom 10, das im langen Arm Material von 13q enthält, ein kleines Derivatchromosom 13 mit Material von 17q sowie ein kleines derivatives Chromosom 17, das aus dem p-Arm und dem Zentromer von Chromosom 17 und einem Segment von 10q besteht, vor (siehe Abbildung 3.20b). Bei 3 Metaphasen wurden noch zusätzlich verschiedene Chromosomenverluste gefunden, die als präparativbedingt eingestuft werden. Eine aberrante Metaphase mit einem deletierten Chromosom X und einem derivaten Chromosom 9, das im q-Arm Material von Chromosom Xq enthält, stellt vermutlich einen weiteren kleinen malignen Zellklon dar. Zusätzlich wurde noch eine unauffällige Metaphase gefunden.

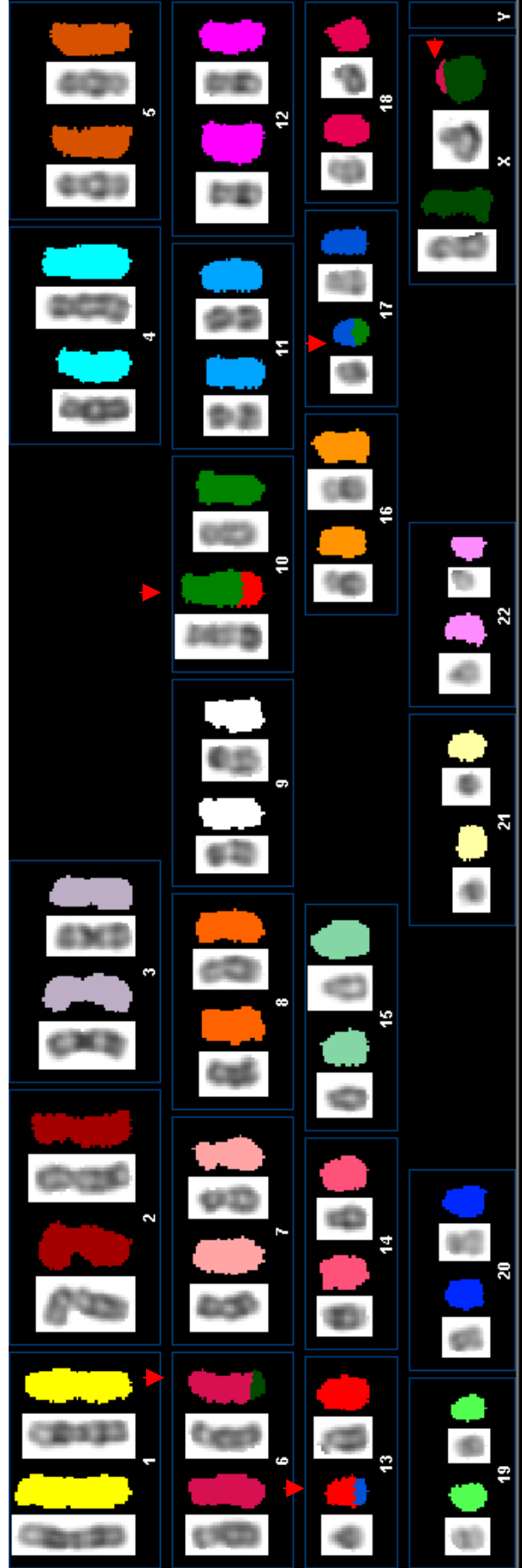
Abb 3.20: Fall ID 17

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XX,-10,-13,-17,+3mar

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,X,t(X;6)(p11;q22?),der(10)t(10;13)(q24;q12),der(13)t(13;17)(q12;q21),der(17)t(10;17)(q24;q21)

Fall ID 18: Diagnose: NHL

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Mittels G-Bandenanalyse wurde ein Mosaikbefund bestehend aus einem unauffälligem männlichen Karyotyp und einem hyperdiploiden Zellklon gefunden. Der hyperdiploide Klon wies eine Trisomie 12, 18 und 19 auf (siehe Abbildung 3.21a).

Karyotyp:

46,XY/ 49,XY,+12,+18,+19

Die SKY-Analyse wurde zur Überprüfung des Befundes herangezogen.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 4

Karyotyp:

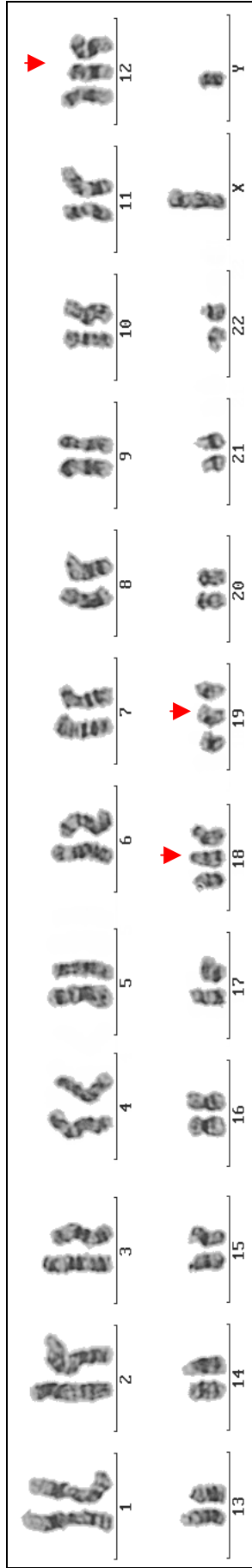
49,XY,+12,+18,+19 [2]

48,XY,-1,+12,+18,+19 [1]

46,XY [1]

Der mittels G-Bänderung erstellte Mosaikbefund wurde bestätigt. Auch die SKY-Analyse zeigte neben einem unauffälligem Karyotyp einen Zellklon mit zusätzlich einem Chromosom 12, 18 und 19 (siehe Abbildung 3.21b). Der Verlust eines Chromosoms 1 in einer hyperdiploiden Metaphase ist präparativ bedingt.

Abb 3.21: Fall ID 18
a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 49,XY,+12,+18,+19

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 49,XY,+12,+18,+19

Fall ID 19: Diagnose: CML, Blastenkrise

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 15

Die konventionelle zytogenetische Analyse ergab einen Mosaikbefund. Neben einem weiblichen Karyotyp mit einem verlängerten Chromosom 2 und einer typischen Philadelphia-Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 zeigte ein zweiter Klon zu den bereits genannten Aberrationen noch ein Isochromosom 17 (siehe Abbildung 3.22a).

Karyotyp:

46,XX,add(2)(q?),t(9;22)(q34;q11)/

46,XX,add(2)(q?),t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)

Der Befund sollte im Hinblick auf das Material des verlängerten Chromosoms 2 mit der 24-Farben-FISH überprüft werden.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Karyotyp:

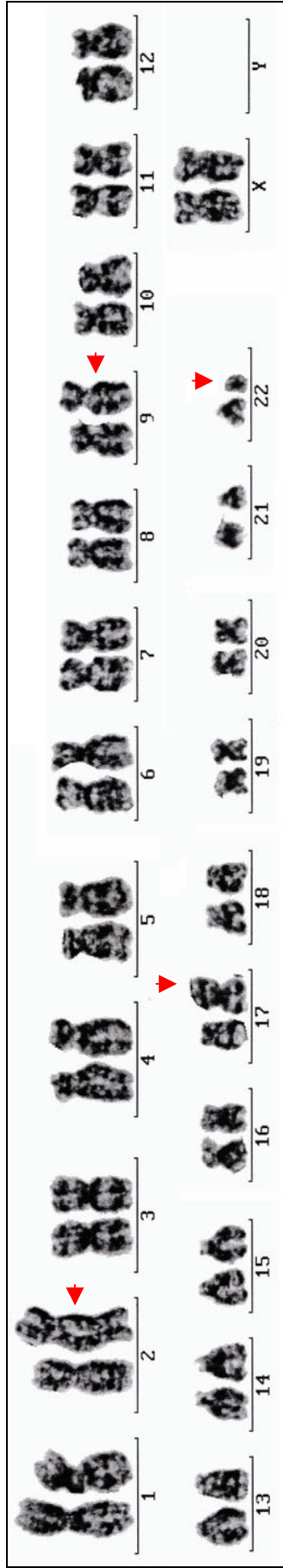
46,XX,dup(2)(q?),t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10) [4]

46,XX,dup(2)(q?),t(9;22)(q34;q11) [1]

Der konventionelle zytogenetische Mosaikbefund bestätigte sich (siehe Abbildung 3.22b). Das verlängerte Chromosom 2, welches in beiden aberranten Zellklonen vorliegt, konnte nicht vollständig aufgeklärt werden. Offensichtlich ist kein Material eines weiteren Chromosoms bei der Veränderung beteiligt, so dass es sich vermutlich um eine intrachromosomale Duplikation handelt. Welches Segment dupliziert ist und ob ein Segment eventuell dabei verloren ging, konnte nicht geklärt werden.

Abb 3.22: Fall ID 19

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XX,add(2)(q?),t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XX,dup(2)(q?),t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)

Fall ID 20: Diagnose: Leukopenie, Anämie

Konventionelle Zytogenetik

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 5

Die G-Bandenanalyse zeigte einen weiblichen Karyotyp mit einer 8/21-Translokation, wie sie für die AML/ M2 typisch ist. Zusätzlich wurde noch ein verkürztes Chromosom 9 gefunden (siehe Abbildung 3.23a).

Karyotyp:

46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)

Zur Überprüfung der Befundes wurde eine 24-Farben-FISH herangezogen.

SKY-Analyse

Anzahl karyotypisierter Metaphasen: 6

Karyotyp:

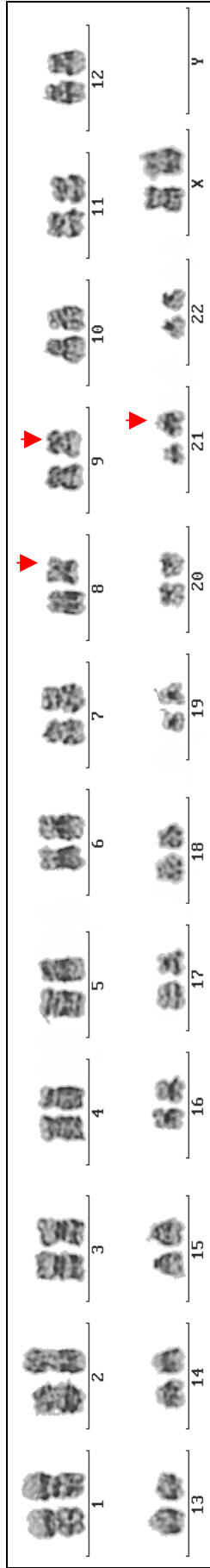
46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [5]

46,XY,t(8;21)(q22;q22),-9 [1]

Der G-Bandenbefund bestätigt sich, weitere Aberrationen konnten nicht gefunden werden (siehe Abbildung 3.23b). Der Verlust des deletierten Chromosoms 9 in einer Metaphase ist vermutlich präparativ bedingt.

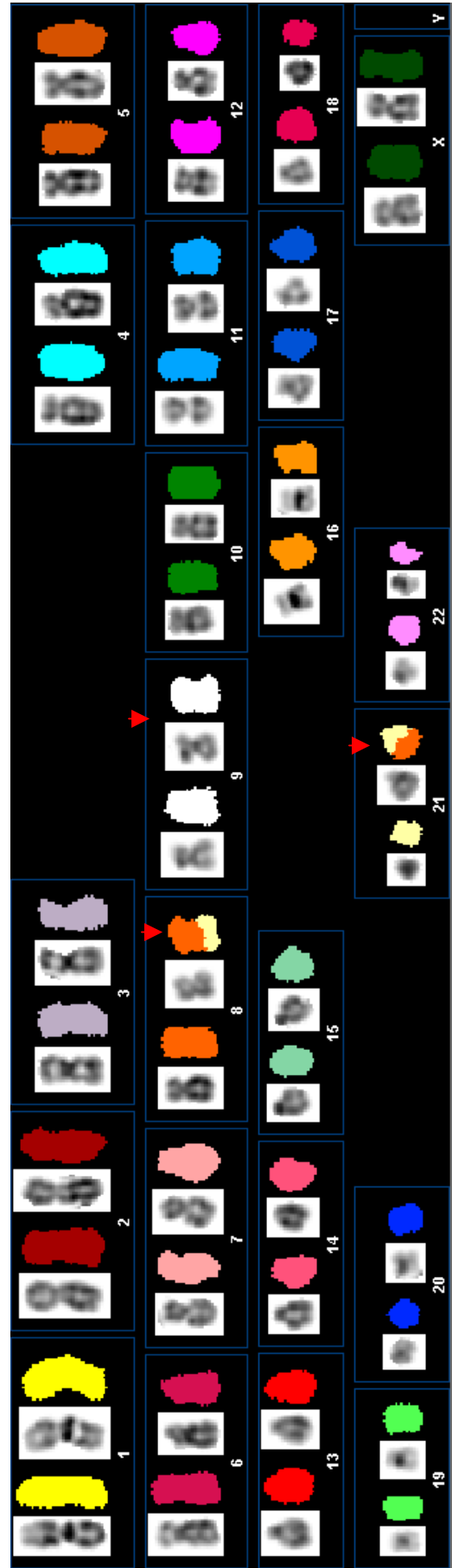
Abb 3.23: Fall ID 20

a) GTG-Bänderung



Karyotyp: 46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)

b) SKY-Analyse



Karyotyp: 46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)

3.2.3 Die Ergebnisse der SKY-Analysen im Überblick

Insgesamt wurden 20 Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Neoplasien mit der SKY-Technik untersucht, um die mit der konventionellen Zytogenetik festgestellten Karyotypen zu überprüfen und gegebenenfalls zu ergänzen. Vorwiegende Ziele waren die Charakterisierung von Markerchromosomen, die Aufklärung komplexer struktureller Aberrationen und die Identifikation von Aberrationen, die durch die Bänderungsanalyse nicht erfasst wurden. Auf diese Weise sollte der Einsatzbereich und die Limitation der SKY-Technik überprüft werden.

Ein kurzer Gesamtüberblick der mittels SKY-Analysen gewonnenen Ergebnisse ist in nachfolgender Tabelle 3.5 im Vergleich zu den G-Bandenbefunden dargestellt.

Tab 3.5 Kurzer Überblick der Ergebnisse der SKY-Analysen im Vergleich zu den G-Bandenbefunden

ID	G-Bandenbefund	SKY-Befund
1/ 3/ 4/ 7/ 11/ 14	Komplex aberrante Karyotypen mit strukturellen und z.T. numerischen Aberrationen sowie z.T. mit Markerchromosomen, die nicht näher in der G-Bänderung identifiziert werden konnten	Numerische und strukturelle Aberrationen weiter aufgeklärt und konventioneller zytogenetischer Befund ergänzt
5/ 13/ 15/ 17	Unklare Markerchromosom(en)	Markerchromosomen vollständig identifiziert
10/ 16	Fragliche Aberration(en)	Weitere zytogenetische Information erhalten, aber Fragestellung nicht eindeutig abgeklärt
2/ 9/ 12	Numerisch aberrante Karyotypen	Zusätzlich strukturelle Aberrationen gefunden
6/ 8/ 18/ 19/ 20	Numerisch oder strukturell aberrante Karyotypen	Zytogenetischer Befund bestätigt, keine weiteren Aberrationen gefunden

Schwerpunkt: KULTIVIERUNG

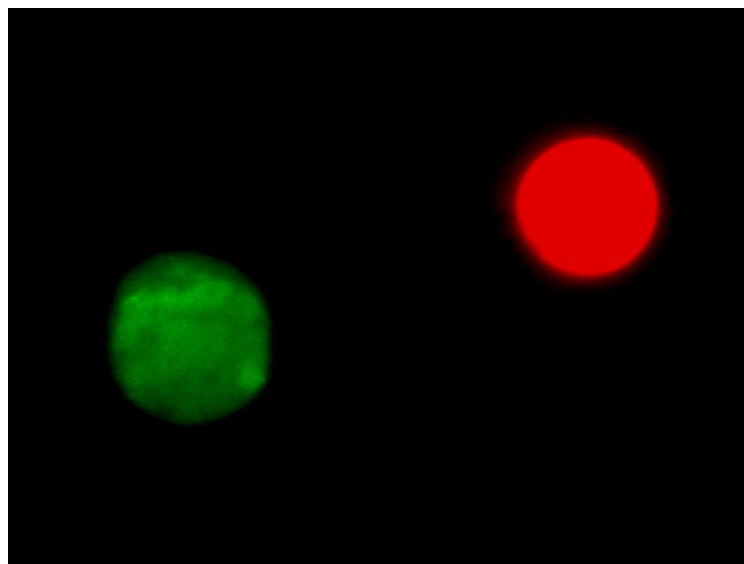
3.3 Kultivierungsversuche

Die Kultivierungsversuche beruhen auf dem Einsatz von konditioniertem Medium. Dieses wurde in so großen Mengen hergestellt, portioniert und eingefroren, dass pro Kultivierungsschema (I und II) alle Kultivierungen mit konditioniertem Medium der gleichen Charge durchgeführt werden konnte.

3.3.1 Ergebnisse der Lebend-Tot-Bestimmungen - Gruppe I

Von den Patientenproben (Gruppe I) wurde vor dem Ansetzen der Kulturen und nach 72 stündiger Kultivierung von allen Kultivierungsansätzen eine Lebend-Tot-Bestimmung mittels Acridin-Orange/Ethidiumbromid-Färbung durchgeführt. Diese Färbung stellt lebende Zellen auf Grund ihren intakten Membranpumpen, die das Ethidiumbromid aus der Zelle herauspumpen, grün dar. Bei toten Zellen wirkt dieser Mechanismus nicht mehr, weshalb sie rot gefärbt sind (siehe Abbildung 3.24). Pro Patientenprobe (direkt) bzw. Kulturansatz wurden zwischen 150 und 350 Zellen ausgewertet und der Prozentsatz lebender Zellen bestimmt (siehe Tabelle 3.6).

Abb 3.24 Lebend-Tot-Färbung von Lymphozyten mit Acridin-Orange/Ethidiumbromid



Die grüne Zelle stellt eine lebende, die rote eine tote Zelle dar.

Tab 3.6 Prozentualer Anteil lebender Zellen in den jeweiligen Patientenproben direkt bzw. Kulturansätzen der Gruppe I nach 72 stündiger Kultivierung

ID	direkt		Kulturansätze nach 72 h Kultivierung									
	[%]	GZ	A [%]	GZ	B [%]	GZ	C [%]	GZ	D [%]	GZ	E [%]	GZ
1	82,3	271	58,4	286	65,7	309	63,5	263	59,9	344	47,9	313
2	95,4	174	94	200	82,6	201	66,2	210	69,1	285	48,8	215
3	93,9	215	94,6	204	100	200	100	200	97	200	95,5	202
4	100	200	90,5	201	35	203	66,3	208	51,7	201	89,8	216
5 a	94	249	93,5	201	80,2	222	96,2	218	83,2	205	92,4	250
5 b	99	203	80,5	200	83,4	205	91,7	216	84,1	226	81,7	240
6	98,2	217	87,3	221	75,7	222	73,9	249	69,8	242	90,3	217
7	94,7	225	93,3	238	81,2	266	73,0	341	75,1	221	86,4	206
8	100	202	91,9	221	94,6	241	87,7	235	94,5	235	97,1	206
9	98,2	220	97,3	224	96,8	221	61,3	217	57,1	212	87,4	223
10	95,3	215	97,1	242	97,1	209	91,2	260	96,5	230	98,6	208
11	97,3	218	95,2	248	93,6	248	88	266	91	311	100	246
12	91,9	245	96,2	211	95,4	219	81,6	245	78,1	256	91,8	233
13	98,7	223	94,3	229	92,8	223	74,5	204	71,9	253	89,9	218
14	96,7	209	96,9	228	86,8	242	19,2	239	17,1	234	90,9	254
15	97,6	208	97,2	212	97,2	212	61,2	227	79,4	214	81,5	232
16	99,1	219	90	210	96,7	271	36,7	278	58,6	237	98,1	208
17	95,1	205	93,2	207	95,4	216	95,2	227	96,8	220	82,9	234
18	86	215	14,1	212	28	203	9	209	2,7	224	19,6	204
19	98,5	205	33	233	55	207	48,3	234	57,4	216	56,6	219
Durchschnittliche Lebendzellzahl												
	96		84		82		69		70		81	

GZ = Gesamtanzahl ausgewerteter Zellen

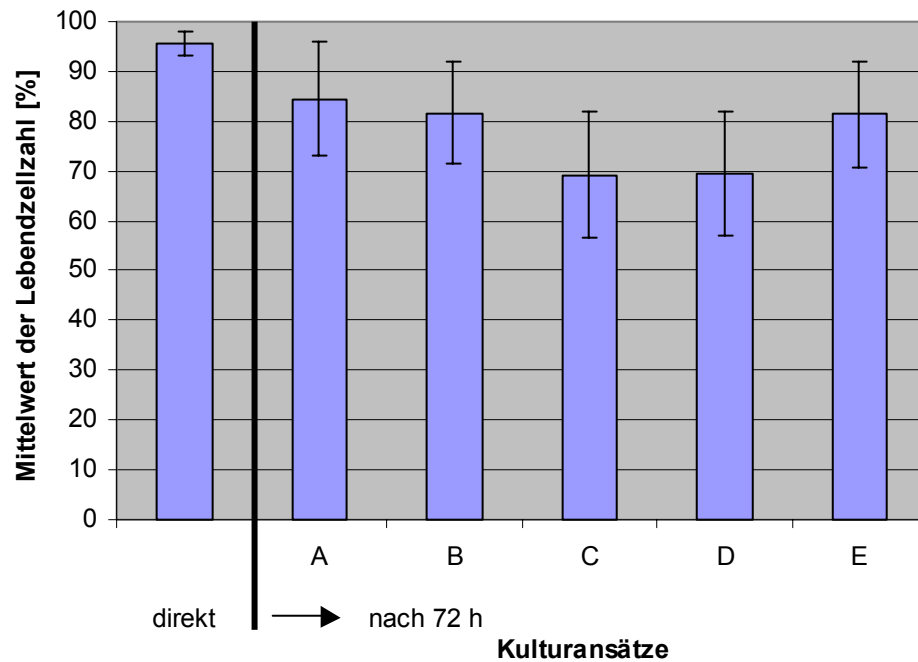
[%] = prozentualer Anteil lebender Zellen

A-E = Kulturansätze nach dem Kultivierungsschema I (vgl. Tab 2.6; Seite 52)

(A = RPMI-Medium; B = TPA/RPMI-Medium; C = TPA/konditioniertes (aus 1×10^6 Zellen/ml) ISCOVE-Medium; D = TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium; E = konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium)

Vor der Kultivierung (direkt) lag die durchschnittliche Lebendzellzahl aller Patientenproben bei 96%, nach 72 stündiger Kultivierung schwankte sie in den einzelnen Kultivierungsansätzen (A-E) zwischen 69 und 84% (siehe Abbildung 3.25). Die Ansätze A, B und E zeigten nach 72 h Kultivierung eine durchschnittliche Lebendzellzahl von etwas mehr als 80%. Ansatz C und D zeigten eine deutlich geringere durchschnittliche Lebendzellzahl (ca. 70%).

Abb 3.25 Diagramm der durchschnittlichen Lebendzellzahlen [%] der Gruppe I in den Patientenproben direkt bzw. in den Kulturansätzen (A-E) nach 72 stündiger Kultivierung



A-E = Kulturansätze nach dem Kultivierungsschema I (vgl. Tab 2.6; Seite 52)

(A = RPMI-Medium; B = TPA/RPMI-Medium; C = TPA/konditioniertes (aus 1×10^6 Zellen/ml) ISCOVE-Medium; D = TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium; E = konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium)

3.3.2 Ergebnisse des Mitoseindices in den einzelnen Kulturen - Gruppe I

Aus jedem Kulturansatz ist an Hand der Metaphasenpräparate der Mitoseindex (MI) ermittelt worden. Hierfür wurde jeweils dreimal von drei verschiedenen Metaphasenpräparaten eines Kulturansatzes die Anzahl der Metaphasen auf 1000 Kerne bestimmt. Der Mittelwert der drei Auszählungen pro Kulturansatz entspricht dem Mitoseindex (siehe Tabelle 3.7).

Als Referenzansatz werden der Ansatz A und E gewertet, die eine Kultivierung in RPMI- bzw. ISCOVE-Medium ohne weitere Zusätze beinhaltet.

Tab 3.7 Mitoseindex der einzelnen Kulturansätze - Gruppe I
(Pro Fall ist der höchste Mitoseindex **rot** hervorgehoben)

ID	Mitoseindex der Kulturansätze				
	A	B	C	D	E
1	1,7	1,3	1	1,7	1,3
2	9,7	19,7	16,3	9	0,3
3	1	2	0,7	3	0
4	0	3,3	22,3	39,3	0
5 a	0	1,3	5,0	7,0	0
5 b	0	11,7	18,7	26	0,7
6	1,3	6,3	9,7	9	1
7	1	13,3	19,3	28	0
8	0	0	0	0	0
9	0	1,3	1,3	0,3	0
10	1,3	7,7	9,7	7,7	0
11	1,3	0,7	2	2	0
12	0,3	0	0	0,7	0
13	1,3	0,3	3,3	6,3	0
14	0	0	0	0	0
15	0,3	2	0,3	6,6	0
16	0	15,3	0	2	0,3
17	0	2,3	5,3	7,7	0
18	0,3	3,3	4,3	1	0,7
19	0	3	17,7	5,7	0,3

A-E = Kulturansätze nach dem Kultivierungsschema I (vgl. Tab 2.6; Seite 52)

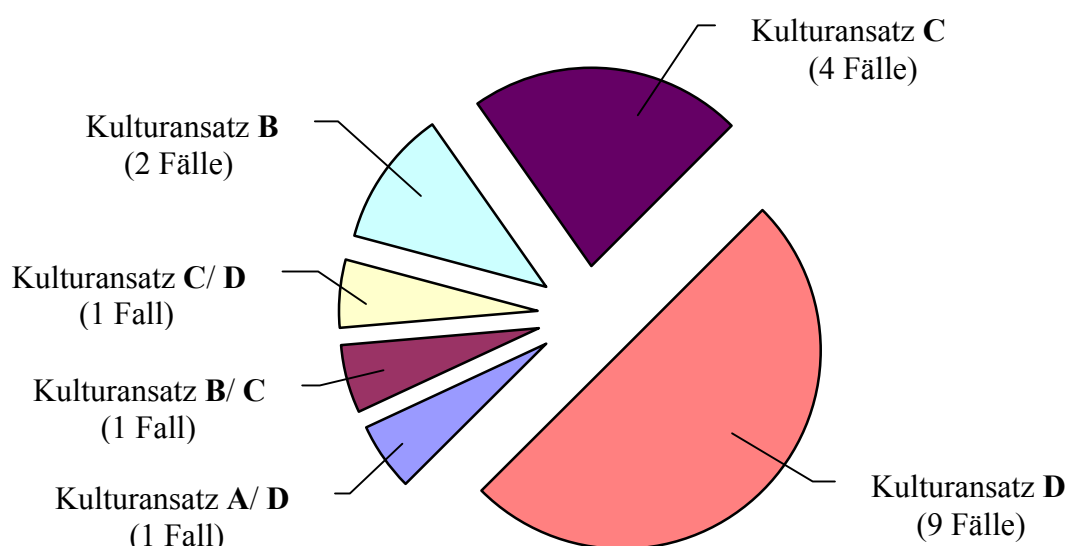
(A = RPMI-Medium; B = TPA/RPMI-Medium; C = TPA/konditioniertes (aus 1×10^6 Zellen/ml) ISCOVE-Medium; D = TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium; E = konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium)

Von den 20 nach dem Kultivierungsschema I kultivierten Proben zeigten 18 eine nachweisbare Proliferation (außer ID 8 und 14). Darunter befanden sich vier Patientenproben (ID 1/ 9/ 11/ 12), deren höchster Mitoseindex unter drei lag. Dies bedeutet, dass sie wegen geringer Metaphasenzahl nur schwer und zeitaufwendig karyotypisierbar wären.

Von den 18 proliferierten Fällen zeigte die Hälfte im Kulturansatz D (TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium) den höchsten Mitoseindex (range 1,7-39,3) und damit die stärkste Proliferationsaktivität. Bei vier Patientenproben lag der Mitoseindex (range 4,3-17,7) im Kulturansatz C (TPA/konditioniertes (aus 1×10^6 MP-6 Zellen/ml) ISCOVE-Medium) am höchsten. Demnach war die Kultivierung mit konditioniertem Medium und

TPA-Zugabe bei fast $\frac{3}{4}$ aller untersuchten Fälle hinsichtlich des Mitoseindex am erfolgreichsten. Nur zwei der 18 proliferierten Patientenproben zeigten beim Standardkulturansatzes (TPA/RPMI-Medium) den höchsten Mitoseindex (15,3 und 19,7). Jeweils eine Patientenprobe hatte gleichviel Metaphasen und damit den selben Mitoseindex in den Kulturansätzen C und D (2), bzw. B und C (1,3) sowie A und D (1,7) (siehe Abbildung 3.26). Die Referenzansätze A und E zeigten wie erwartet nur eine geringe Mitoseaktivität (MI zwischen 0 und 1,7 (Ausreißer 9,7) bzw. 0 und 1,3).

Abb 3.26 Verteilung der Kulturansätze (A-D) nach den höchsten Mitoseindexen von den 18 proliferierten Proben der Gruppe I



A-D = Kulturansätze nach dem Kultivierungsschema I (vgl. Tab 2.6; Seite 52)

(A = RPMI-Medium; B = TPA/RPMI-Medium; C = TPA/konditioniertes (aus 1×10^6 Zellen/ml) ISCOVE-Medium; D = TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium)

3.3.3 Vergleich der Anzahl numerisch unauffälliger und aberranter Metaphasen in den Kulturansätzen B und D bei zytogenetischen Mosaikbefunden

Von vier Patienten (ID 5a/ 5b/ 6/ 13/ 17) wurde auf Grund ihres zytogenetisch numerischen Mosaikbefundes die Chromosomenanzahl in den vorhandenen Metaphasen der Kulturansätze B (TPA/RPMI-Medium) und D (TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ MP-6 Zellen/ml) ISCOVE-Medium) bestimmt. Um festzustellen, welche Kultur welchen Klon verstärkt zur Proliferation stimuliert, wurden soweit möglich 50 Metaphasen ausgezählt (siehe Tabelle 3.8).

Tab 3.8 Verteilung von numerisch unauffälligen und aberranten Metaphasen auf die Gesamtzahl von (soweit möglich) 50 ausgezählten Metaphasen aus den Kulturansätzen B und D der Patientenproben **ID 5a/ 5b/ 6/ 13** und **17**

Kulturansatz	Anzahl der Metaphasen mit			
	46 Chromosomen	47 Chromosomen	48 Chromosomen	49 Chromosomen
ID 5a Karyotyp 46,XX/ 47,XX,+12				
B	5	5	--	--
D	30	20	--	--
ID 5b Karyotyp 46,XX/ 47,XX,+12				
B	43	7	--	--
D	47	3	--	--
ID 6 Karyotyp 46,XX/ 47,XX,+12				
B	33	17	--	--
D	29	21	--	--
ID 13 Karyotyp 49,XX,+12,+18,+19/ 46,XX/ 48,X,-X,+12,+18,+19				
B	2		6	3
D	16		3	31
ID 17 Karyotyp 46,XY/ 47,XY,+12				
B	20	30	--	--
D	22	28	--	--

B und D = Kulturansätze nach dem Kultivierungsschema I (vgl. Tab 2.6; Seite 52)

(B = TPA/RPMI-Medium; D = TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium)

Die Verteilung numerisch unauffälliger und aberranter Metaphasen war in den Kulturansätzen B und D annähernd identisch. Kritisch ist zu bemerken, dass nicht bei allen Fällen (ID 5a und 13) 50 Metaphasen aus dem Kulturansatzes B ausgezählt werden konnten. Dennoch zeigte sich kein deutlicher Proliferationsvorteil eines Klonen gegenüber einer bestimmten Kultur. Es scheinen beide Kultivierungsmethoden (Ansatz B und D) im gleichen Maße die malignen B-Zellen zur Proliferation zu stimulieren.

3.3.4 Ergebnisse des Mitoseindices in den einzelnen Kulturen - Gruppe II

Um sicher zu gehen, dass die deutlich bessere Proliferationsrate der Kulturansätze C und D nicht auf die Verwendung des ISCOVE-Mediums mit TPA-Stimulation, sondern auf die Konditionierung des ISCOVE-Mediums und der TPA-Zugabe zurückzuführen ist, wurden weitere Kultivierungen nach dem Kultivierungsschema II (mit ausschließlich ISCOVE-Medium) durchgeführt. Hierbei ist nur der Mitoseindex (MI) in den einzelnen Kulturen (a-c) bestimmt worden. Als Referenz wurde der Ansatz a gewertet, der eine Kultivierung in ISCOVE-Medium ohne weitere Zusätze beinhaltet. Die Auswertung erfolgte analog zur ersten Kultivierung. Die ermittelten Mitoseindices sind in nachfolgender Tabelle 3.9 dargestellt.

Tab 3.9 Mitoseindex der einzelnen Kulturansätze der Gruppe II
(Pro Fall ist der höchste Mitoseindex **rot** hervorgehoben)

ID	Mitoseindex der Kulturansätze		
	a	b	c
A	1,3	0	0,3
B	0	0,3	4,3
C	1,3	0,7	4
D	0	0	0
E	0,3	0,7	2,3
F	0,3	0	0,3
G	2,3	5	9,3
H	3	5,7	9,3
I	0	0	0
J	1,3	9,7	15,7
K	0,7	7	22,7
L	0	5	28,3
M	0,3	2,7	2,3
N	0	20	16,3

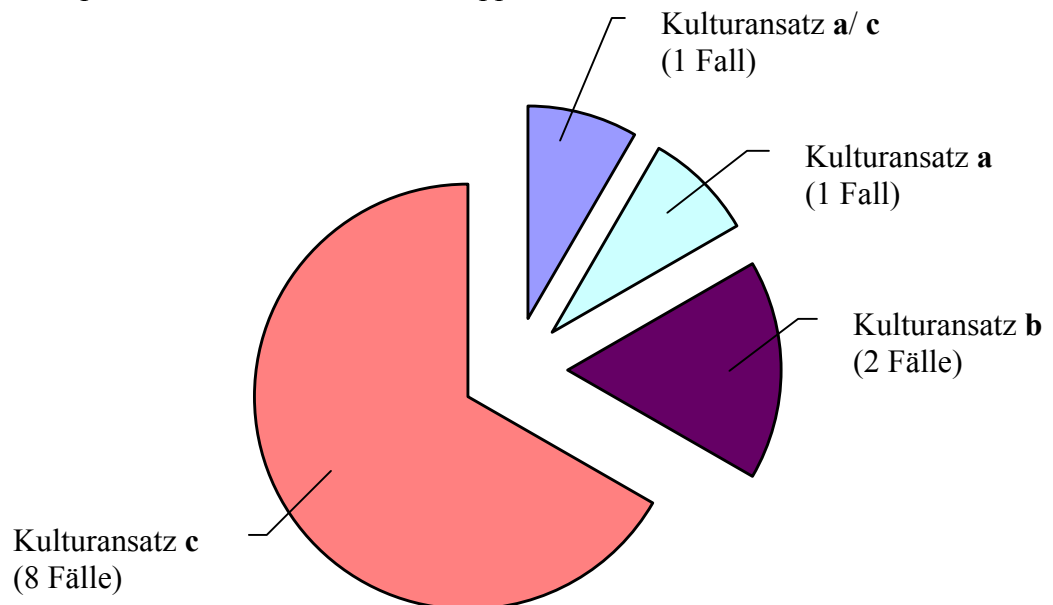
a-c = Kulturansätze nach dem Kultivierungsschema II (vgl. Tab 2.7; Seite 53)

(a = ISCOVE-Medium; b = TPA/ISCOVE-Medium; c = TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium)

Unter den 14 kultivierten Fällen zeigten zwei (ID D und I) keine Proliferation. Von den 12 proliferierten Patientenproben lag bei fünf (ID A/ E/ F/ M und N) der Mitoseindex unter drei, was auf Grund der geringen Metaphasenzahl eine zytogenetische Auswertung stark erschweren würde.

Der Referenzansatz a (ISCOVE-Medium) zeigte erwartungsgemäß eine geringe Mitoseaktivität (Mitoseindex zwischen 0 und 1,3). Der Mitoseindex lag im Vergleich zu Ansatz b (TPA/ISCOVE-Medium) im Ansatz c (TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium) bei acht von 12 proliferierten Proben deutlich höher (zwischen dem 1,6- und 14-fachem; Mitoseindex: range 2,3-28,3). Diese Ergebnisse bestätigten die Tendenz der Ergebnisse aus dem Kultivierungsschemas I, dass sich die Verwendung von konditioniertem Medium mit TPA synergistisch auf die Steigerung der Proliferationsaktivität von B-Zellen auswirkt. Nur zwei Fälle (ID M und N) zeigten im Kulturansatz b den höchsten Mitoseindex (2,7 und 20) und eine Patientenprobe (ID A) im Kulturansatz a (1,3). Ein Fall (ID F) zeigte den gleichen Mitoseindex (0,3) in den Kulturansätze a und c (siehe Abbildung 3.27)

Abb 3.27 Verteilung der Kulturansätze (a-c) nach den höchsten Mitoseindexen von den 12 proliferierten Proben der – Gruppe I



a-c = Kulturansätze nach dem Kultivierungsschema II (vgl. Tab 2.7; Seite 53)

(a = ISCOVE-Medium; b = TPA/ISCOVE-Medium; c = TPA/konditioniertes (aus $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ISCOVE-Medium)

4 DISKUSSION

Schwerpunkt: FICTION

4.1 Die FICTION-Technik und ihr Einsatzgebiet

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass der Einsatz der Interphase-FISH (I-FISH) in der Routinediagnostik bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und insbesondere bei Patienten mit Lymphomen einen großen diagnostischen Vorteil bringt (Martín-Subero et al., 2003; Siebert et al., 1998a; Siebert et al., 1998b). In Tabelle 4.1 sind die Vorteile der I-FISH im Vergleich zu anderen Methoden dargestellt.

Besonders vorteilhaft ist bei dieser Methode, dass weder die Zellstruktur noch die Gewebemorphologie zerstört wird. Dies bietet die Möglichkeit, die I-FISH mit einer Fluoreszenz-Immunfärbung zu kombinieren, welche dann als FICTION (*Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasms*) bezeichnet wird. Im Vergleich zu anderen Techniken ist die FICTION-Methode die einzigste, die simultan, hoch sensitiv und quantitativ diagnostische und prognostische Aussagen auf DNA- und Proteinebene ermöglicht (Martín-Subero et al., 2003).

Tab 4.1 Vorteile der I-FISH zur Detektion tumorassoziierter Chromosomenrearrangements in hämatologischen Neoplasien im Vergleich zu anderen Methoden (aus Martín-Subero et al., 2003)

Vergleich I-FISH ↔ konventionelle Zytogenetik, SKY und M-FISH

- I-FISH benötigt keine Tumormetaphasen, kein frisches Material und somit keine lebenden Zellen für eine Kultivierung
- I-FISH ist für die Routinediagnostik geeignet, da die meisten Untersuchungsmaterialien verwendet werden können (Ausstriche, Cytospinpräparate, Cryostat- oder Paraffin-Material)
- I-FISH erlaubt eine reale Quantifizierung des aberranten Klons, da keine Wachstumsvor- bzw. nachteile vergleichbar der in vitro Kultivierung vorliegen
- Auch kleinere leukämische Infiltrationen von Blut oder Knochenmark können mittels I-FISH detektiert werden
- I-FISH kann binnen eines Tages Ergebnisse liefern
- I-FISH ist zeitsparend, weniger laborintensiv und weniger kostenaufwendig

- I-FISH lässt sich leichter automatisieren

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Technik der simultanen Fluoreszenz-Immunphänotypisierung und I-FISH zur Detektion numerischer Aberrationen des Chromosoms 12 in CD20 positiven B-Zellen war gut durchführbar und ermöglichte eine spezifische Auswertung. Die Immunfärbung tolerierte das Hybridisierungsverfahren ohne Reduktion der Fluoreszenzintensität der CD20-Markierung. Diese Technik findet vor allem in Studien hämatologischer Neoplasien wie Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren ihren Einsatz, da einzelne Tumorzellen hinsichtlich des Immunphänotyps und Genotyps betrachtet und ausgewertet werden können (Weber-Matthiesen et al., 1995; Weber-Matthiesen et al., 1996; Zhang et al., 1996; Zhang et al., 2000). Neben numerischen Veränderungen lassen sich mit der FICTION-Methode auch strukturelle Aberrationen nachweisen (Nylund et al., 1993).

Die von Weber-Matthiesen et al. (1992) eingeführte FICTION-Methode wurde auf isolierte Leukozyten aus Lymphknoten von Patienten mit follikulärem Lymphom angewendet. Zur Untersuchung mononukleärer Zellen aus Blut und Knochenmark wird eine Ficoll-Trennung und Cytospin-Präparate empfohlen (Knuutila et al., 1989; Nylund et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden die Präparate durch Blutausstriche von B-CLL-Patienten gewonnen. Da der Erkrankung eine Akkumulation reifer B-Zellen zugrunde liegt, waren in allen Präparaten genügend B-Lymphozyten vorhanden. Die Anfertigung von Cytospin-Präparaten scheint daher nur bei geringer Leukozytenzahl ($>10.000/\mu\text{l}$) ratsam. Durch die Acetonbehandlung platzen die Erythrozyten, so dass sie bei der weiteren Durchführung keine Störungen hervorrufen konnten. Die Tabelle 4.2 zeigt die Vorteile der FICTION-Methode im Vergleich zur I-FISH-Methode.

Tab 4.2 Vorteile der FICTION-Methode gegenüber der I-FISH-Methode

Vergleich FICTION ↔ I-FISH

- FICTION ermöglicht durch die Immunfärbung einen Überblick des Größenverhältnisses der Tumormasse gegenüber dem Normalgewebe
- FICTION sichert durch die Immunfärbung, dass ausschließlich zur klonalen Evolution gehörende Zellen in die Auswertung gelangen
- FICTION kann auch zytogenetische Aberrationen erfassen, die nur in einem Teil der malignen Zellen vorliegen

- FICTION erkennt durch die Immunfärbung auch sehr kleine maligne Zellklone, die dann nach zytogenetischen Veränderungen untersucht werden können
- FICTION eignet sich besonders zur Remissionskontrolle, da sie auch die sichere Erfassung von wenigen malignen Zellen anhand des immunologischen Markers erlaubt

Eine Erweiterung der FICTION-Methode hat die Arbeitsgruppe Martín-Subero et al. (2002) mit einem Protokoll zur *multicolor*-FICTION (M-FICTION) entwickelt. Es gelang ihr in B-NHL die B-Zellen mit CD20 zu markieren und simultan nach den häufigen primären Veränderungen wie den Translokationen t(8;14), t(11;14), t(14;18) und t(3;14) zu suchen. Realisiert werden konnte diese Vorgehensweise durch neu entwickelte Fluoreszenzfarbstoffe, einem entsprechenden Filtersystem und einer digitalen Bildverarbeitung. Diese Technik erlaubt neben der Erfassung der Morphologie und der Fluoreszenz-Immunphänotypisierung die simultane Untersuchung von verschiedenen Chromosomenaberrationen in den einzelnen Zellen. Die Anwendung der FICTION-Methode zur Abklärung einer Trisomie 12 in den B-Zellen von B-CLL-Patienten eignet sich auch für den Einsatz in der Routinediagnostik. Sie ist leicht und rasch durchführbar (Immunfärbung, Hybridisierung und Auswertung sind nach 2 Tagen abgeschlossen). Die Immunfärbung mit CD20 gibt Aufschluss darüber, ob eine zytogenetische Aberration wie z.B. die Trisomie 12 in allen CD20 positiven (vermutlich malignen) Zellen) vorliegt, oder nur in einem kleinen malignen Klon. Die B-CLL ist eine Erkrankung mit Akkumulation reifer B-Lymphozyten, die meist CD19, CD20, CD22 und CD23 positiv sind. Die Immunfärbung mit CD34 markiert die Vorläufer-B-Zellen, mittels FICTION-Methode kann auch in diesen Zellen nach Veränderungen gesucht werden, die typischerweise in reifen B-CLL-Zellen gefunden werden. Gahn et al. (1999) suchten nach der Trisomie 12 in den Vorläufer-B-Zellen von Trisomie 12 positiven B-CLL-Patienten. Es konnte bei keinem der Patienten in den CD34 positiven Vorläuferzellen eine Trisomie 12 detektiert werden.

Durch die Detektion genetischer Aberrationen in immunologisch charakterisierten Zellpopulationen lassen sich auch Zellen untersuchen, die nur eine Minderheit im analysierten Gewebe darstellen (Weber-Matthiesen et al., 1992; Siebert und Schlegelberger, 1997). Es wäre denkbar, dass die I-FISH bei einer Gewebeanalyse von z.B. einem Hodgkin Lymphom, bei dem häufig der Anteil der Tumorzellen zwischen 1 und 0,1% liegt, ein falsch negatives Resultat ergibt, da die Sondensignale unter dem *cut off level* liegen. Würde man die gleiche Analyse unter Verwendung der FICTION-Methode durchführen, wären die Hodgkin und Reed-

Sternberg Zellen als klonale Aberrationen erkennbar und die Untersuchung einer möglichen zytogenetischen Aberration würde nur in diesen Zellen erfolgen.

4.1.1 Ermittlung des *cut off levels* für die FICTION-Methode zur Detektion einer Trisomie oder Monosomie 12

Die Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie weist darauf hin, dass jedes Labor für die Auswertung von FISH-Analysen seinen eigenen *cut off level* für die jeweils verwendeten Sonden und Materialien (Ausstriche, peripheres Blut, Knochenmark, Tumorgewebe etc.) erstellen muss. Die Rate falsch positiver/negativer Signale hängt zum einen von der verwendeten Sonde, aber zum anderen auch von der Herstellung der Präparate ab. Üblicherweise sollte man mindestens 5 bis 10 Normalkontrollen (z.B. normales peripheres Blut oder Knochenmark) durchführen und dann den Mittelwert der falsch positiven bzw. negativen Signale plus drei Standardabweichungen als sogenannten *cut off level* berechnen (Engel, 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete zentromerspezifische Sonde (Chromosom 12 α -Satelliten (D12Z3)- Sonde) zeigt laut Herstellerangaben bei diploiden Zellen in 70-90% zwei Fluoreszenzsignale für beide Chromosomen 12. Diese Angabe ist für die Erkennung einer Trisomie 12 bzw. Monosomie 12 sehr unbefriedigend. Um falsch negative bzw. falsch positive Fälle zu vermeiden wurden die *cut off level* bestimmt. Für eine Trisomie 12 lag er bei 5,9% und für eine Monosomie 12 bei 10,2%. Innerhalb verschiedener Studien ist der *cut off level* in Abhängigkeit der individuellen Laborbedingungen starken Schwankungen unterworfen. In einer FISH-Analyse zur Untersuchung der Trisomie 12 wurde er auf 2% (Garcia-Marco et al., 1997) und auf 3-6% (Martín-Subero et al., 2003) festgelegt. Ein *cut off level* für die Monosomie 12 wurde in der Literatur nicht gefunden, da nach bisheriger Literaturrecherche noch keine Untersuchung über eine Monosomie 12 vorliegt. Der relativ hohe *cut off level* kann in verschiedenen Faktoren begründet sein. Zum Verlust eines Signals können Überlagerungen des FISH-Signals durch die Immunfärbung, Überlagerungen der beiden Chromosomen 12 aber auch die Dreidimensionalität der Zellen führen. Da die Auswertung ausschließlich nach optischen Kriterien und ohne digitale Bildanalyse mittels CCD-Kamera stattfand, ist es auch möglich, dass sehr schwache Signale vom menschlichen Auge nicht erfasst wurden.

4.1.1.1 Ausschluss einer Monosomie 12 bei B-CLL Patienten mittels FICTION

Die Ergebnisse der FICTION-Analyse der vorliegenden Arbeit zeigten keinen Hinweis auf die Existenz einer Monosomie 12 bei B-CLL-Patienten. Alle ausgewerteten Proben lagen unter dem *cut off level* von 10,2% (range 1-6,9%).

In Voruntersuchungen von Doris Herrmann fanden sich unter 81 untersuchten B-CLL-

Patienten 19 mit der Tendenz zu einer Monosomie 12. Die Streubreite der als Monosomie 12 positiv gewerteten Kerne lag zwischen 3 und 21%. Wobei lediglich in drei Fällen der Anteil der Monosomie 12 tragenden Zellen 10,2% überschritt (persönliche Mitteilung von D. Herrmann). Bei diesen Untersuchungen wurde kein *cut off level* ermittelt und die FICTION-Technik nicht verfahrensoptimal eingesetzt, weshalb die detektierten Monosomie 12 positiven Fälle wahrscheinlich auf Färbeartefakte und technische Schwierigkeiten zurückgeführt werden können. Auch die Aufbereitung der Proben in Form von Cytospinpräparate, die eine hohe Zelldichte aufwiesen, erschwerten eine präzise Auswertung der Hybridisierungssignale.

Nach Literaturrecherche sind keine weiteren B-CLL-Fälle mit einer Monosomie 12 aufgetreten, so dass derzeit von keiner Assoziation einer B-CLL Erkrankung mit dieser numerischen Aberration ausgegangen werden kann.

4.1.1.2 Untersuchung der Trisomie 12 bei B-CLL Patienten mittels FICTION

Unter den 53 untersuchten Fällen fanden sich sechs (11,3%) mit einer Trisomie 12 (ID 2/ 5/ 8/ 12/ 39/ 45). Der Zellanteil der Trisomie 12 tragenden Klone an der Gesamtzahl der CD20 positiven Zellen lag zwischen 47,8 und 81,4%. Demnach liegt nur in einem Teil der vermutlich malignen B-Zellen eine Trisomie 12 vor. Dies wurde bereits von Raghoebier et al. (1992), Cuneo et al. (1994), Auer et al. (1999) und Liso et al. (1999) beschrieben. Liso et al. (1999) konnten zusätzlich zeigen, dass der Anteil Trisomie 12 tragender Zellen in Lymphknoten deutlich höher ist als im peripheren Blut oder im Knochenmark von B-CLL-Patienten. Diese Beobachtung wurde als Folge unterschiedlicher Zellverteilung in den verschiedenen Geweben und/oder eines Lymphknoten spezifischen Tropismus und/oder eines Proliferationsvorteils selektiver Gewebe erklärt.

Die Daten über die Häufigkeit eines Zellklons mit Trisomie 12 bei B-CLL-Patienten schwankt zwischen 11 und 54% (Juliusson et al., 1990; Anastasi et al., 1992; Baker et al., 1993; Bienz et al., 1993; Woessner et al., 1996; Liso et al., 1999; Lazaridou et al., 2000). Diese große Spanne ist vermutlich auf die Heterogenität der untersuchten Patientenkollektive sowie auf die unterschiedliche Sensitivität und Spezifität der angewandten Nachweismethoden zurückzuführen (Reining et al., 1994; Liso et al., 1999). Neuere Studien beschreiben die Inzidenz der Trisomie 12 niedriger (8-15%) als frühere Studien (20-54%). Woessner et al. (1996) ermittelten mit der konventionellen Zytogenetik und der FISH-Technik für die Trisomie 12 eine Häufigkeit von 11,5%. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Stilgenbauer et al. (1998) in einer molekulargenetischen Untersuchung von 245 B-CLL-Fällen fanden sie 36 mit Trisomie 12-Zellklonen (15%). In einer FISH-Untersuchung von Döhner et al. (2000) mit einer Sonde für 12q13 hatten 16% der B-CLL-Patienten eine 12q Trisomie.

Der Einfluss des ausgewählten Patientenkollektivs auf die Häufigkeit der Trisomie 12 zeigte sich an Untersuchungen von B-CLL-Patienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium. Bei ihnen konnte die Trisomie 12 verstärkt gefunden werden (Juliusson et al., 1990; Woessner et al., 1994). Dies könnte die niedrige Inzidenz der Trisomie 12 in der vorliegenden Arbeit erklären. Unter den 53 untersuchten Patienten waren 14 mit einer B-CLL-Verdachtsdiagnose, die sich bei 13 weitgehend bestätigte. Vermutlich befanden sich diese Patienten noch in einem Anfangsstadium der Erkrankung. Bei 3 Patienten lautete die Diagnose B-NHL, so dass nicht gesichert ist, ob es sich um B-CLL-Fälle handelt. Angaben über die Krankheitsstadien der Patienten lagen nicht vor.

4.1.2 Die Trisomie 12 in atypischen B-CLL-Fällen

Die atypische B-CLL (aCLL) stellt eine zytologisch abweichende Variante der B-CLL mit 10-55% großen Lymphozyten, Prolymphozyten und/oder Zentrozyten dar und wurde erstmals von der FAB Organisation 1989 beschrieben (Bennett et al., 1989). Die häufigste nachgewiesene zytogenetische Aberration der aCLL ist die Trisomie 12. Unter den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen sechs Fällen mit Trisomie 12 sind drei (ID 2/ 8 und 12), die hinsichtlich ihrer Diagnosestellung nicht eindeutig klärbar waren. Der Fall ID 2 wurde als atypische B-CLL bzw. fragliche chronische Prolymphozytenleukämie (CPL) eingestuft, Fall ID 8 stellt eine B-CLL mit atypischen B-Zellen dar und der Fall ID 12 konnte nicht sicher von einem Mantelzell-Lymphom abgegrenzt werden. Dieses Resultat bestätigt das gehäufte Vorkommen der Trisomie 12 in atypischen B-CLL-Fällen. Que et al. (1993) zeigten einen Zusammenhang zwischen der B-CLL mit atypischer Morphologie und dem Auftreten einer Trisomie 12. Woessner et al. (1996) fanden in 48 typischen, nach morphologischen Kriterien klassifizierten B-CLL Fällen keine Trisomie 12 und in 13 atypischen B-CLL Fällen sieben mit Trisomie 12. Diese Beobachtung wird auch von anderen Untersuchungen, welche die Trisomie 12 in CLL/CPL und CPL fanden, gestützt (Cuneo et al., 1992; Matutes et al., 1993; Que et al., 1993; Criel et al., 1994 und 1997). Demnach scheint die Trisomie 12 einen Subtyp der B-CLL mit atypischer Morphologie und Immunphänotyp (CD5-, FMC7+, starke Immunglobulinexpression) zu charakterisieren (Matutes et al., 1996; Criel et al., 1997; Kalil und Cheson, 1999). Diese atypische B-CLL mit Trisomie 12 wird mit einer verstärkten Krankheitsprogression assoziiert (Kalil und Cheson, 1999). Allerdings scheint die atypische Lymphozytenmorphologie im Vergleich zur Trisomie 12 ein wichtigerer und ungünstigerer Prognosefaktor zu sein (Oscier et al., 1997). Trotz der Assoziation zwischen einer atypischen B-CLL und der Trisomie 12 konnten Hjalmar et al. (1998 und 2000) in Untersuchungen an einzelnen Zellen mit May-Grünwald Giemsa (MGG)/ FISH zeigen, dass die Trisomie 12 nicht auf maligne

Lymphozyten mit atypischer Morphologie beschränkt ist, sondern auch in typischen B-CLL-Zellen vorliegt. Vermutlich haben beide Zelltypen (typische und atypische B-CLL-Zellen) den gleichen klonalen Ursprung, wobei die Unterschiede in der Zellmorphologie nicht mit dem Erwerb eines zusätzlichen Chromosoms 12 erklärt werden können (Hjalmar et al., 2000). Die Vermutung von Garcia-Marco et al. (1996), dass die Trisomie 12 mit einer verstärkten Zellproliferation und das Zunehmen des Trisomie 12 tragenden Klons mit der Krankheitsprogression assoziiert ist, konnte bislang nicht bestätigt werden (Auer et al., 1999). Eine neue Studie von Schlette et al. (2003) lässt vermuten, dass etwa 20% der B-CLL-Fälle CD79b (ein recht neu charakterisierter B-Zell Marker) positiv sind und dass diese Expression mit der Trisomie 12 und atypischen immunphänotypischen Merkmalen (wie die Positivität für CD22 und FMC7) korreliert.

Was die prognostische Aussagekraft betrifft, geht man inzwischen von einer tendenziell schlechteren Prognose bei Patienten mit Trisomie 12 oder komplexen Karyotypen als bei Patienten mit normalem Karyotyp oder mit anderen zytogenetischen Anomalien aus (Cuneo et al., 1992; Döhner et al., 1999). Gewöhnlich haben Patienten mit typischer B-CLL eine bessere Prognose als Patienten mit atypischer B-CLL (Woessner et al., 1996).

4.1.3 Beobachtung der Entwicklung der Trisomie 12 über die Zeit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte von einer B-CLL-Patientin mit Trisomie 12 wiederholt Blutproben untersucht werden. Der Trisomie 12 Klon wurde von Mai 2000 bis Juni 2001 mit insgesamt fünf FICTION-Untersuchungen beobachtet. Der prozentuale Anteil des Trisomie 12 Klons an den gesamten CD20 positiven Zellen schwankte zwischen 48 und 73%. Eine deutliche Tendenz konnte in diesem kurzen Zeitraum nicht festgestellt werden, hierzu müsste der Klon unter weiterer Beobachtung stehen. Auer et al. (1999) untersuchten in ihrer Studie mittels FISH den Verlauf des Trisomie 12 tragenden Klons bei 41 B-CLL-Patienten über vier Jahre. In diesem Zeitraum konnten sie keine signifikanten Veränderungen feststellen. Die Trisomie 12 tragenden Klone blieben sogar bei Patienten mit Krankheitsprogression konstant. Raghoebar et al. (1992) zeigten in ihrer FISH-Untersuchung, dass die Trisomie 12 nicht im Verlauf der Erkrankung von B-CLL-Patienten entwickelt wird und dass der Prozentanteil der Trisomie 12 tragenden Zellen weitgehend stabil bleibt. Eine Expansion des Trisomie 12 Klons wurde in einer kleineren Interphase-FISH Studie bei Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf und Therapie festgestellt (Garcia-Marco et al., 1997). Eine Zunahme des Trisomie 12 tragenden Klons in Verbindung mit einem progressivem Krankheitsverlauf bei therapiebedürftigen Patienten konnten auch Hjalmar et al. (2001) in einer Studie mit 77 B-CLL-Patienten, darunter 17 mit Trisomie 12 seit der ersten Untersuchung und zwei, die die

Trisomie 12 erst im Verlauf der Studie erworben haben, feststellen. Die kontroversen Ergebnisse können nach Hjalmar et al. (2001) in zu klein ausgewählten und therapielosen Patientenkollektive erklärt werden (Raghoebier et al. (1992) untersuchten nur vier Fälle). Bei Auer et al. (1999) wurden im Laufe der vier Jahre die 41 Patienten nur zweimal hinsichtlich ihrer Trisomie 12 untersucht. Die Hälfte der Patienten hatten einen sehr kleinen Trisomie 12 tragenden Klon ($\leq 5\%$). Bei Studien mit solch kleinen Klonen, besonders in Fällen mit niedriger Leukozytenzahl und geringer Anzahl maligner Zellen, muss daran gedacht werden, dass durch eine Kontamination mit T-Zellen die Tumorzellen überschwemmt werden könnten. Eine Folge davon wäre eine fälschlicherweise zu geringe Zellzahl von Trisomie 12 tragenden Zellen (Hjalmar et al., 2001). Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten FICTION-Technik, die mittels der Immunfärbung die CD20 positiven B-Zellen markiert, kann die Ergebnisverfälschung durch eine Kontamination mit T-Zellen ausgeschlossen werden.

Das Vorkommen der Trisomie 12 als Resultat einer klonalen Evolution ist bisher nur in wenigen Fälle beschrieben. Dies ist möglicherweise auf die Resistenz des Trisomie 12 tragenden Klons gegenüber Mitogenen und dem Versagen des Klons bei der Zellteilung oder auf andere Faktoren zurückzuführen. In 350 mit konventioneller Zytogenetik und FISH untersuchten Fällen fanden sich zytogenetisch sieben Fälle mit aberrantem Karyotyp ohne Trisomie 12. Diese zeigten in der FISH-Analyse die Existenz eines Trisomie 12 tragenden Klons. In 20 Fällen mit zytogenetisch unauffälligem Karyotyp zeigte die FISH-Analyse bei über 20% der untersuchten Zellkerne eine Trisomie 12. Es scheint, dass die konventionelle Zytogenetik zur Detektion der Trisomie 12 nicht ausreichend ist und vermutlich deshalb einige klonale Veränderungen unerkannt bleiben (Garcia-Marco et al., 1997).

Ein Erwerb der Trisomie 12 im Verlauf einer B-CLL Erkrankung wurde bislang nur in Verbindung mit der Transformation zum Richter Syndrom (Übergang einer niedrig malignen CLL in eine Verlaufsform mit höherer Malignität) gefunden (Cuneo et al., 1994; Brynes et al., 1995; Garcia-Marco et al., 1997). Bei Hjalmar et al. (2001) entwickelten im Verlauf ihrer B-CLL Erkrankung zwei Patienten, anscheinend ohne Anzeichen einer Transformation, einen Trisomie 12 tragenden Klon. Auch Esparza et al. (2002) konnten bei einem Patienten im Verlauf der Erkrankung und erst nach einer allogenen Knochenmarktransplantation einen Trisomie 12 tragenden Klon nachweisen. Möglicherweise trat diese neue Aberration durch den fortschreitendem Krankheitsverlauf in Erscheinung oder wurde erst nach der Knochenmarktransplantation durch die Expansion eines sehr kleinen Klons detektierbar.

Liso et al. (1999) zeigten, dass das Vorkommen des Trisomie 12 tragenden Klons im Knochenmark, Blut und Lymphknoten eines Patienten in stark unterschiedlicher Ausprägung vor-

liegen kann, wobei sich Zellen mit Trisomie 12 in Lymphknoten deutlich vermehrt fanden. Wie in der vorliegenden Arbeit werden in den meisten Studien ausschließlich Blutproben untersucht. Es ist denkbar, dass eine Expansion des Trisomie 12 tragenden Klons insbesondere während der Krankheitsprogression bei einer Blutuntersuchung unbemerkt bleibt, da sie meist isoliert in Lymphknoten durch Lymphombildung stattfindet.

Der Erwerb einer Trisomie 12 und die Expansion der Trisomie 12 im Zusammenhang mit der Krankheitsprogression muss in Zukunft durch weiterführende Studien näher charakterisiert werden. Insbesondere sollten verstärkt FISH- bzw. FICTION-Analysen an Knochenmark- und Lymphknotenmaterial vorgenommen werden.

4.1.4 Trisomie 12, eine primäre oder sekundäre Aberration?

Seit Jahren ist bekannt, dass sekundäre Chromosomenaberrationen nach der primären Transformation im Verlauf der Tumorprogression erworben werden (Vogelstein und Kinzler, 1993) und ein wichtiger Prognosefaktor sind. Während die primären Alterationen zumeist Translokationen darstellen, spielen numerische Chromosomenanomalien sowie Deletionen eine besondere Rolle als sekundäre Aberrationen (Harder et al., 1998). Bei der B-CLL sind die sekundären Veränderungen einer Deletion 17p und 11q mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Martín-Subero et al., 2003). Derzeit ist der Mechanismus, der zu einer Trisomie 12 führt, noch unklar. Eine Möglichkeit wurde bereits 1981 von Mitelman und 1990 von Juliusson und Gahrton vorgestellt. Sie vermuteten, dass die Trisomien durch einen Gen-Dosis-Effekt zum neoplastischen Phänotyp beitragen. Bei der B-CLL wird postuliert, dass die Trisomie 12 durch eine Duplikation von einem Chromosom 12 entsteht (Crossen und Horn, 1987; Mecuci et al., 1988). Dennoch konnte bisher keines der lokalisierten Gene auf dem Chromosom 12 (RAS, ETV6, KIP1, MDM2) in Verbindung mit einer B-CLL gebracht werden. Obwohl die Trisomie 12 auch bei Patienten mit Krankheitsstadium A gefunden wurde, ist ihr Auftreten meist mit einer Krankheitsprogression assoziiert. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass es sich eher um ein sekundäres Ereignis im Verlauf der B-CLL Erkrankung handelt. Auch die Tatsache, dass die Trisomie 12 meist als Mosaik in der klonalen B-Zellpopulation vorliegt (in der vorliegenden Arbeit wurde sie ausschließlich als Mosaik gefunden) lässt vermuten, dass sie während einer leukämischen Transformation der B-CLL entsteht und eine eigene neoplastische B-Zell Population bildet (Garcio-Marco, 1997).

4.1.5 Weitere Aberrationen im Zusammenhang mit dem Chromosom 12

Zytogenetisch komplexe Veränderungen kommen auch bei der B-CLL vor. Patienten mit einem Trisomie 12 Klon können z.B. simultan noch eine 13q14 Deletion aufweisen (Döhner et

al., 1995; Stilgenbauer et al., 1998). Mit der konventionellen Zytogenetik ist die Coexistenz einer 13q Abnormalität und einer Trisomie 12 nur selten beobachtet worden (Louseau et al., 1996; Mould et al., 1996). In einer FISH-Untersuchung von Navarro et al. (1998) konnte bei fast der Hälfte der Patienten mit Trisomie 12 eine allelische Imbalance von 13q14 nachgewiesen werden. Die Analyse der klonalen Verteilung der Trisomie 12 und der 13q14 Deletion zeigte die Präsenz von Zellen, in denen eine Trisomie 12 und 13q14 Imbalance vorlag sowie Zellen die nur eine Trisomie 12 aufwiesen.

Translokationen die die Region 12p11-12 betreffen finden sich weniger häufig als Translokationen bzw. Duplikationen in denen das Segment 12q12-14 involviert ist. Die genetischen Analysen der strukturellen Aberrationen der Chromosomen 12 sind für die Entschlüsselung der genetischen Defekte, die zur Entwicklung einer B-CLL beitragen wichtig (Oscier, 1999). Aberrationen, die zu einer partiellen Trisomie 12 führen, finden sich eher selten bei B-CLL-Patienten. Derzeit ist nur wenig über das pathogen-relevante kritische Segment und die dazugehörigen Genen auf dem Chromosom 12 bekannt. Chromosomenbanden-Studien zeigten die Bande 12q13-q21 als häufigste minimal duplizierte Region bei B-CLL-Fällen mit partieller Trisomie 12 (Stilgenbauer et al., 1998). Dierlamm et al. (1997) fanden in ihrer Untersuchung von 1.836 B-NHL-Patienten vier B-CLL-Patienten mit partieller Trisomie 12 der Bande 12q13-q22.

4.1.6 Die Trisomie 12 und ihre Assoziation zur UM (nicht mutierte)-CLL

Karhu et al. (2003) untersuchten die genetischen Alterationen in hypermutierten und nicht mutierten V_H -Genen (M-CLL und UM-CLL) bei typischen CD19+, CD5+ und CD23+ B-CLL-Patienten. 34 Patienten wurden untersucht, wovon 12 als M-CLL und 22 als UM-CLL klassifiziert wurden. In 4 Fällen (11,8 %) konnte eine Trisomie 12 gefunden werden. Alle vier gehörten zum UM-CLL Typ. Eine ähnliche Assoziation zeigten auch Oscier et al. (2002), wohingegen sich dies in einer Studie von Stilgenbauer et al. (2002) nicht bestätigte.

Karhu et al. (2003) fanden in den UM-CLL deutlich verstärkt größere genomische Veränderungen (ermittelt durch CGH) sowie komplexe Aberrationen (ermittelt durch M-FISH). Auch die Deletionen 17p und 11q traten nahezu ausschließlich bei B-CLL-Klonen mit unmutierten Genen der schweren Kette der Immunglobuline (IgH) auf (Hallek et al., 2002). Diese Beobachtungen führen zu der Hypothese, dass die nicht mutierten sowie die mutierten B-CLL Formen unterschiedliche biologische Hintergründe besitzen.

Schwerpunkt: SKY

4.2 Die SKY-Technik in der Tumorzytogenetik

Die SKY-Analyse stellt eine wertvolle Untersuchungsmethode chromosomaler Aberrationen insbesondere von Tumormaterial dar. Die am häufigsten mit SKY untersuchten Neoplasien sind die hämatologischen Neoplasien (Veldman et al., 1997; Hilgenfeld et al., 1999; Rowley et al., 1999; Markovic et al., 2000; Mohr et al., 2000). Obwohl bereits eine Vielzahl spezifischer Chromosomenaberrationen in hämatologischen Neoplasien identifiziert sind, verspricht die SKY-Analyse die Identifikation von neuen Aberrationen. Diese charakterisieren möglicherweise einen spezifischen Phänotyp oder geben Aufschluss auf das Ansprechen bestimmter Behandlungsweisen oder auf den Krankheitsverlauf (Veldman et al., 1997).

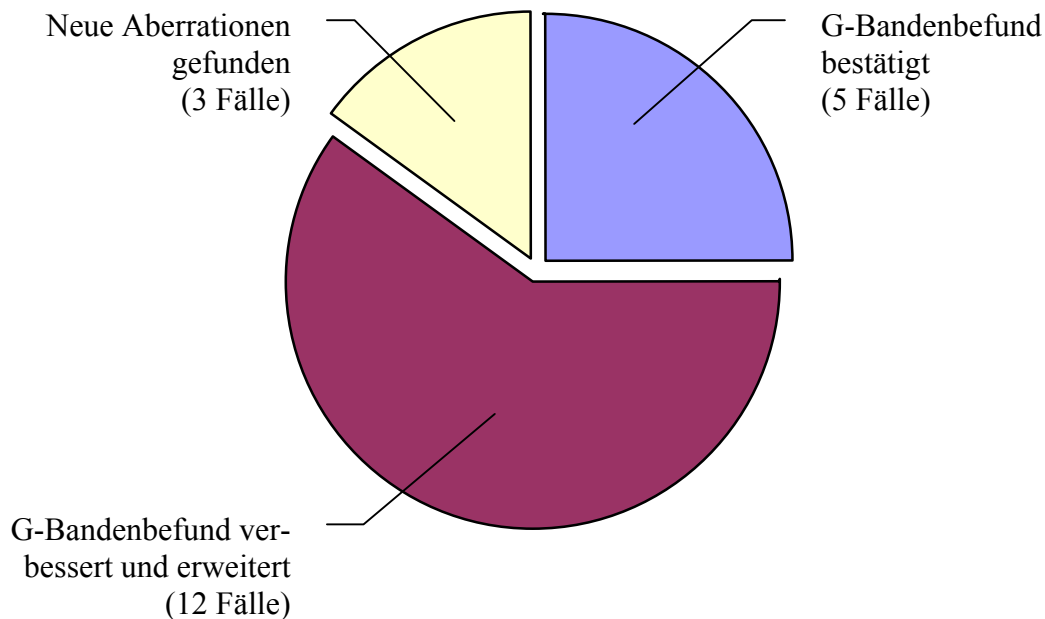
Durch die molekularzytogenetischen Methoden wie FISH, CGH und SKY sind die Untersuchungsmöglichkeiten von Chromosomenaberrationen enorm verbessert worden. Die Kombination dieser Methoden trägt zu einem besseren Verständnis der zu normalen oder abnormen zellulären Prozessen führenden Signalwege und den darin beteiligten Genen bei (Bayani et al., 2001).

4.2.1 Die SKY-Technik verspricht zusätzliche zytogenetische Informationen

In vielen malignen hämatologischen Erkrankungen können zytogenetisch nicht identifizierbare Chromosomenanomalien mittels *spectral karyotyping* (SKY) identifiziert werden (Schröck et al., 1996; Veldmann et al., 1997). In mehr als 90% der untersuchten Fälle verspricht die SKY-Analyse zusätzliche zytogenetische Informationen, wie die Identifizierung von derivaten Chromosomen, zusätzlichem Chromosomenmaterial und Markerchromosomen (Nanjangud et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sind insgesamt 20 Fälle im Anschluss an die G-Bandenanalyse mit der SKY-Analyse untersucht worden. Zusätzliche zytogenetische Informationen wurden bei 15 Fällen gewonnen. Bei fünf Fällen konnte das zytogenetische Ergebnis bestätigt, aber keine weiteren chromosomalen Veränderungen gefunden werden (siehe Abbildung 4.1). Die SKY-Analyse erbrachte weitere zytogenetische Informationen über komplexe Rearrangement und Markerchromosomen, aber auch bei der Überprüfung des G-Bandenbefunds konnte zusätzliche strukturelle Aberrationen beobachtet werden.

Abb 4.1 Zusätzliche zytogenetische Informationen nach der SKY-Analyse von 20 Fällen



4.2.1.1 Anwendung der SKY-Analyse bei komplex aberranten Karyotypen

Kakazu et al. (1999) sehen die Vorteile der SKY-Technik insbesondere bei zytogenetischen Fällen mit komplexen Chromosomenanomalien, die mittels der G-Bandenanalyse nur schwierig analysierbar sind. In der vorliegenden Arbeit konnte die SKY-Analyse in sechs Fällen mit komplexen Aberrationen (ID 1/ 3/ 4/ 7/ 11 und 14) die mittels G-Bandenanalyse nicht weiter identifizierbaren strukturellen Aberrationen und Markerchromosomen näher charakterisieren. Die numerischen und strukturellen Aberrationen konnten weitgehend aufgeklärt werden und die Bruchpunkte von Translokationen sowie die entsprechenden Translokationspartner ließen sich größtenteils bestimmen. Auch die Markerchromosomen und die einzelnen Chromosomensegmente von Derivatchromosomen wurden annähernd vollständig identifiziert. Nach den vorliegenden Ergebnissen empfiehlt sich bei allen komplex aberranten Karyotypen, die mittels der G-Bandenanalyse meist nicht oder nur schwer identifiziert werden können, eine SKY-Analyse durchzuführen. In diesen Fällen bietet die SKY-Analyse eine hervorragende Erweiterung des durch G-Bänderung ermittelten Befunds. Die Identifikation der komplexen Chromosomenanomalien und multiplen Markern ist besonders für die Diagnose, Prognose und Therapie der Patienten wichtig. Solche Fälle lassen sich nur bedingt mit der G-Bänderung abklären. SKY enthüllt die zunächst nicht identifizierbaren Chromosomenanomalien als Deletionen, Translokationen, Insertionen und Additionen eines vollständigen oder partiellen Chromosoms (Zhao et al., 2001). Vorteilhaft der SKY-Technik ist, neben der effizienten Identifikation

komplexer Markerchromosomen, das simultane Screening des gesamten Genoms nach chromosomalen Aberrationen (Heng et al., 2003).

SKY ermöglicht durch die weitere Aufklärung komplex aberranter Karyotypen neue Zusammenhänge zwischen komplexen Aberrationen und ihre Assoziation zu spezifischen Erkrankungen zu analysieren. Tiefer Einblicke in die Tumorentstehung und -evolution sind möglich und es können somit weitere Assoziationen zwischen zytogenetischen Markern, der Diagnose, der Prognose sowie der Therapie erkannt werden.

4.2.1.2 Korrektur des G-Bandenbefundes nach der SKY-Analyse

Neben der Identifikation komplexer Chromosomenanomalien ergibt sich aus dem SKY-Resultat auch häufig eine Korrektur der zytogenetischen durch G-Bänderung erfassten Aberrationen (siehe Tabelle 4.1).

Tab 4.1 Ermittelte Karyotypen aus der G-Bandenanalyse und SKY-Analyse der untersuchten 20 Fälle

ID	G-Bandenbefund	SKY-Befund
1	42,XY,der(5)t(5;7)(p?;p?,-7,add(8)(p?),-12,-17,-18,-20,-21,-22,+3mar	42,XY,-5,der(5)t(5;17)(q23;q21?),der(7)t(5;7)(q11;q11),der(12)t(12;22)(q21;q21)?t(12;?)(p13?;?,-17,-18,-20,-21,-22,+2mar
2	45,XX,?-7	45,XX,t(3;21)(q26;q22),-7
3	46,XX,-5,add(6)(p23?),+mar	46,XX,del(5)(pter→p?)(qter→q?),der(6)t(1;6)(?;p23?)
4	<p>Juli 2000: <u>Mosaik:</u> 46,XY/44-46,XY numerisch und strukturell stark aberrante Chromosomensätze mit Marker-Chromosomen</p> <p>Januar 2001: 43-46,XYY mit zahlreichen numerischen und strukturellen Aberrationen</p>	<p>Juli 2000: <u>Mosaik:</u> 46,XY/46,XY,der(4)t(4;17)(p12;q),-17,t(14;15)(q2;q1),+22 [1]</p> <p>Januar 2001: <u>Subklone:</u> 45,XYY,der(5)t(5;22)(q10;?),-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),+20,del(20)(p?),del(20)(p?)/45,XYY,der(3)t(3;13)(q2;q?),-5,-7,+8,t(10;11)(q22;q13),-13,-16,der(16)t(16;20)(q2;?),-18,der(19)t(7;19)(q11;q13),+20,del(20)(p?),del(20)(p?),+2mar</p>
5	45,XX,-5,-7,-12,-13,-17,+4mar	45,XX,t(3;21)(q26;q22),del(5)(q23),-7,t(12;13;17)(12qter→12p12::13q22→13qter;13pter→13q22::17q11→17qter;17pter→17q11::12p13→12pter

ID	G-Bandenbefund	SKY-Befund
6	<u>Mosaik:</u> 46,XY,del(3)(p23?),add(17)(q24)/46,XY	<u>Mosaik</u> : 46,XY,t(3;17)(p23;q24)/46,XY
7	41-44,XX numerisch und strukturell stark aberranter Chromosomensatz mit meist einem stark verlängerten Chromosom 1	43,XX,dic(1;6)(p36?p23?),der(5)t(5;21)(q11;q10),der(8)t(5;8)(?;p22?),der(16)t(16;22)(q2;q?),-17,-18,del(21)(q?),der(22)t(21;22)(q?p11),der(22)t(6;22)(?;q13)
8	<u>Mosaik:</u> 46,XX/47,XX+12	<u>Mosaik:</u> 46,XX/ 47,XX+12
9	<u>Mosaik:</u> 46,XY,+12,-18/46,XY	46,XY,der(10)t(10;18)(q26;q22),+12,-17,der(18)t(17;18)(q11;q11)
10	<u>Mosaik:</u> 46,XY/46,XY,?add(1)(p36)	46,XY
11	46,XX,del(2)(q11),del(5)(q12),der(9)t(9;?)(q34;?),ins(9;?2)(q34;q11q37),der(22)t(9;22)(q34;q11)	46,XX,del(2)(q11),der(5)t(5;22)(q10;q11),der(9)t(9;5)(q34;q?),ins(9;2)(q34;q11q37),der(22)t(9;22)(q34;q11)
12	46,XY,+12,-17	46,XY,der(3)t(3;17)(p13;q21?),+12,-17
13	<u>Mosaik:</u> 46,XY/ 46,XY,-18,+mar	<u>Mosaik:</u> 46,XY/46,XY,+der(2)t(2;18)(q11;q11),-18
14	46,XX,del(1)(q12),der(4)t(4;?),-13,+mar	46,XX,del(1)(q12),-4,+8,der(13)t(4;13)(?;q21?→pter),der(14)t(4;13;14)(q12?q?,q21?→qter;q24?→pter)
15	46,XX,-8,+mar	46,XX
16	<u>Mosaik:</u> 46,XY,7q?/ 47,XY,7q ?,+?21	<u>Mosaik:</u> 47,XY,+21/46,XY
17	46,XX,-10,-13,-17,+3mar	46,X,t(X;6)(p11;q22?),der(10)t(10;13)(q24;q12),der(13)t(13;17)(q12;q21),der(17)t(10;17)(q24;q21)
18	<u>Mosaik:</u> 46,XY/49,XY,+12,+18,+19	<u>Mosaik:</u> 49,XY,+12,+18,+19/46,XY
19	<u>Mosaik:</u> 46,XX,add(2)(q?),t(9;22)(q34;q11)/46,XX,add(2)(q?),t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)	<u>Mosaik:</u> 46,XX,dup(2)(q?),t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)/46,XX,dup(2)(q?),t(9;22)(q34;q11)
20	46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)

In der G-Bandenanalyse von MDS-Patienten zeigt sich häufig der Verlust eines Chromosoms 5 oder 5q sowie der Verlust eines Chromosoms 7 oder 7q. SKY-Analysen bei diesen Tumoren zeigten, dass diese Verluste häufig Chromosomensegmente darstellen, die in Translokationen involviert sind (Bayani und Squire, 2002). Kakazu et al. (1999) stellte bei 20 MDS-Fällen die G-Bandenanalyse der SKY-Analyse gegenüber. Die nach der G-Bänderung relativ häufig gefundenen Verluste eines Chromosoms 5/5q bzw. 7/7q stellten sich in der SKY-Analyse in einigen Fällen nicht als einfache Verluste sondern als verlagerte Segmente bei kryptischen, unbalancierten Translokationen und Additionen dar. In der vorliegenden Arbeit konnte der Verlust eines Chromosoms 5 als ein deletiertes Chromosom 5 (ID 3 und 5) und der Verlust von 5q als derivatives Chromosom 5 mit Material von Chromosom 22 (ID 1)

identifiziert werden. Insgesamt zeigten unter den 20 untersuchten SKY-Fällen sechs (ID 1/ 3/ 4/ 5/ 7 und 11) eine Aberration eines Chromosoms 5 in Form einer Deletion (ID 3 und 5) oder eines derivativen Chromosoms 5 (ID 1/ 4/ 7 und 11). Unter den Fällen befanden sich zwei AML (ID 1 und 2), ein MDS (ID 5), eine CML (ID 11), ein NHL (ID 7) und eine B-CLL (ID 4). Die Deletion 5q scheint mit dem Verlust eines Tumorsuppressorgens einher zu gehen und steht vermutlich im Zusammenhang mit der Entwicklung eines MDS oder einer ANLL. Während das Auftreten einer isolierten Deletion 5q bei einem MDS eine gute Prognose darstellt, zeigt sich bei einer ANLL ein eher schlechterer Verlauf. Bei zusätzlichen Karyotypanomalien ist die Prognose, sowohl bei den MDS als auch bei den ANLL, als schlecht anzusehen (Charin, 1998). Der Verlust eines ganzen Chromosoms 5 oder eine Deletion 5q sind häufig Aberrationen in myeloiden Neoplasien (Le Beau, 1992).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass das Chromosom 5 relativ oft in strukturelle Anomalien, sowohl in myeloischen als auch bei lymphatischen Neoplasien, verwickelt ist. Beim Fall ID 4 (B-CLL) wurde neben mehreren strukturellen Veränderungen auch ein derivatives Chromosom 5 mit Verlust eines eigenen Segments und dem Zugewinn eines Segments von Chromosom 22 gefunden. Der Fall ID 7 (NHL) zeigte neben einer Reihe weiterer Aberrationen ein derivatives Chromosom 5, das sich aus Material von Chromosom 5 und 21 zusammensetzte. Strukturelle Anomalien von Chromosom 5 bei lymphatischen Erkrankungen sind bisher noch nicht beschrieben. Beide derivativen Chromosome 5 waren Teil eines komplex aberranten Karyotyps.

4.2.1.3 Identifizierung von Markerchromosomen mittels SKY

Insbesondere bei der Untersuchung hämatologischer Neoplasien, die nicht selten eine nur mäßige G-Bandenauflösung besitzen, werden recht häufig Markerchromosomen gefunden, deren Zusammensetzung wegen des begrenzten Auflösungsvermögens der G-Bänderung nicht aufgeklärt werden kann. Für den Einsatz der Fluoreszenz in situ Hybridisierungen mit spezifischen DNA-Sonden sind Kenntnisse über die involvierten Loci oder Gene notwendig, weshalb die FISH-Technik nur begrenzt zur Identifikation von Markerchromosomen beiträgt. Mittels Chromosomenpainting wäre zwar oft eine Identifikation möglich, doch können immer nur wenige chromosomenspezifische Sonden gemeinsam eingesetzt werden. Deshalb stehen wirtschaftliche Gründe wie hohe Kosten, großer Zeitbedarf, hohe Anzahl von Reagenzien und Patientenmaterial dem Einsatz entgegen. Alternativ bietet sich die CGH (*comparative genomic hybridization*) an, die allerdings technisch anspruchsvoll und für die Detektion kleiner unbalancierter Aberrationen nicht sensitiv genug ist. Auch balancierte Chromosomenrearrangements bleiben unentdeckt (Bayani et al., 2001). Mit der neuen molekularzytogenetischen

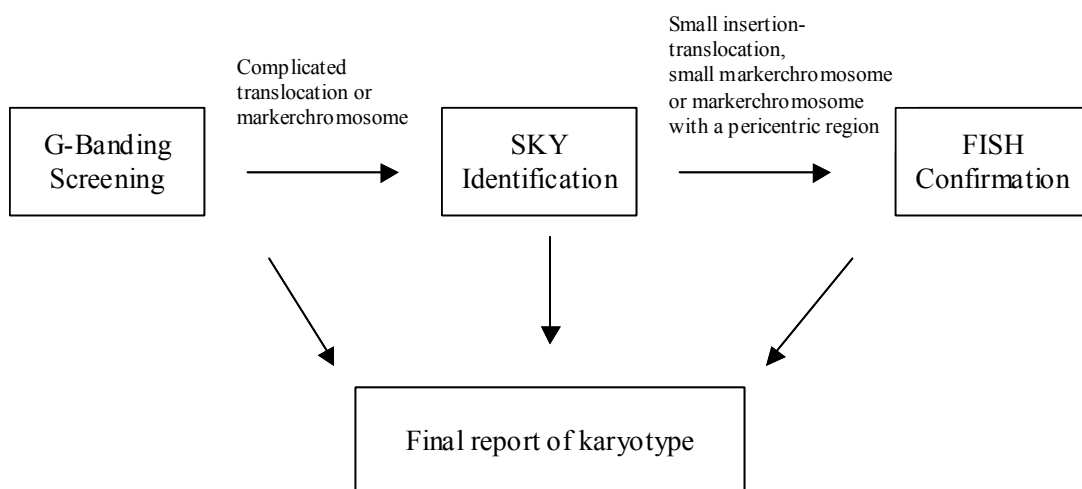
SKY-Technologie, bei der das gesamte Genom mit nur einem FISH-Experiment untersucht wird, lassen sich Markerchromosomen meistens vollständig aufklären.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Fälle (ID 5/ 13/ 15 und 17) mit der SKY-Analyse untersucht, nachdem sie in der G-Bandenanalyse den Verlust eines Chromosoms oder mehrerer Chromosomen und den Zugewinn eines Markerchromosoms oder mehrerer Markerchromosomen zeigten. In allen Fällen konnten die Markerchromosomen identifiziert werden, wobei die Markerchromosomen der Fälle ID 5 und 17 komplex zusammengesetzte Derivatchromosomen darstellen. Neben der Identifikation der Markerchromosomen wurden in beiden Fällen noch zusätzliche strukturelle Aberrationen gefunden, die in der G-Bandenanalyse nicht erkennbar waren. Das Markerchromosom im Fall ID 15 konnte als Chromosom 8 identifiziert werden, doch die daraus resultierende intrachromosomale Veränderung war nicht abklärbar. Grund hierfür ist, das bei der SKY-Analyse jedes Chromosom nur eine Farbe bekommt und deshalb keine Chromosomenabschnitte unterschieden werden können.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist eine SKY-Analyse zur Identifikation von Markerchromosomen nach erfolgter G-Bandenanalyse ratsam.

Heng et al. (2003) nutzen für die pre- und postnatalen Karyotypisierungen ein Schema (siehe Abbildung 4.2), das zunächst bei jeder zytogenetischen Untersuchung eine konventionelle G-Bandenanalyse vorschreibt. Finden sich bei dieser Untersuchung komplexe Karyotypen oder Markerchromosome, so wird eine SKY-Analyse zur weiteren Abklärung empfohlen. Anschließend kann noch eine FISH-Analyse zur Bestätigung der Zusammensetzung abnormaler Chromosomen herangezogen werden.

Abb 4.2 Schema für prä- und postnatale Karyotypisierung (Heng et al., 2003)



4.2.1.4 SKY deckt bei aberranten Karyotypen weitere zytogenetische Aberrationen auf

Die SKY-Technik ermöglicht die Abklärung latenter struktureller Aberrationen, die mittels klassischer Zytogenetik oder FISH unentdeckt bleiben.

Mittels der konventionellen Bänderungs-Zytogenetik wurde unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten 20 Fällen, bei drei (ID 2/ 9 und 12) ausschließlich numerische Aberrationen gefunden. Die Überprüfung der numerisch aberranten Karyotypen mittels SKY-Analyse erbrachte bei allen neben den numerischen auch noch zusätzliche strukturelle Aberrationen. Im Fall ID 2 wurde neben der Monosomie 7 eine Translokation t(3;21) gefunden, im Fall ID 9 außer der Trisomie 12 und der Monosomie 18 ein derivatives Chromosom 10 und 18 identifiziert und im Fall ID 12 neben der Trisomie 12 und Monosomie 17 ein derivatives Chromosom 3 gefunden.

Diese drei Fälle zeigen deutlich die begrenzte Aussagekraft der zytogenetischen G-Bandenanalyse. Die insbesondere bei der Untersuchung von Tumorgewebe häufig erzielte geringe Bandenzahl von nur 150-300 Banden machen die Erkennung von kleineren strukturellen Veränderungen fast unmöglich. Zusätzlich wird die Auswertung durch die begrenzte Anzahl von Metaphasen erschwert. Daher empfiehlt sich alle tumorzytogenetischen Fälle mit unbefriedigender Qualität, d.h. Bandenzahl kleiner 400 Banden und daraus resultierendem unsicheren zytogenetischen Befund einer SKY-Analyse zu unterziehen. Ebenso empfiehlt sich bei zytogenetischen Fällen mit ausschließlich numerischen Aberrationen eine SKY-Analyse zur Kontrolle durchzuführen.

Auch mittels Bandenanalyse normal aussehende Chromosomen können mit der 24-Farben FISH-Technik als aberrant identifiziert werden, da ein Rearrangement zwischen zwei oder mehreren Chromosomen ein Fusionsprodukt zur Folge haben kann, das bei der G-Bänderung wie ein normales Chromosom aussieht (Ried et al., 1998).

4.2.2 SKY-Analyse bei B-Zell Neoplasien

NHL weisen oft einen sehr komplexen Karyotyp mit vielen sekundären Chromosomenanomalien auf. Die durch die Identifikation dieser Veränderungen gewonnenen Informationen können zum Verständnis des biologischen Verhaltens der Tumore beitragen. Mittels G-Bandenanalyse lassen sich diese Tumore häufig nur schwierig oder gar nicht untersuchen (Fan und Rizkalla, 2003). In einer SKY-Untersuchung von Hilgenfeld et al. (1999) wurden sechs B-ALL Fälle und sechs NHL Fälle nach vorangegangener G-Bänderung analysiert. Sie fanden insgesamt 41 neue Aberrationen, 24 Aberrationen wurden hinsichtlich des G-Bandenbefunds verbessert und 12 Aberrationen bestätigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden sieben B-CLL Fälle und zwei NHL Fälle untersucht. Darunter befanden sich drei Fälle (ID 4/ 7 und 14) mit komplex aberrantem Karyotyp. Bei allen drei Fällen erbrachte die SKY-Analyse eine weitere Aufklärung und Erweiterung des zytogenetischen Befunds. Bei vier Fällen (ID 6/ 9/ 12 und 13) konnten die in der G-Bandenanalyse gefundenen Aberrationen näher identifiziert und der zytogenetische G-Bandenbefund verbessert werden. In zwei Fällen (ID 8 und 18) wurde der G-Bandenbefund bestätigt. Nach diesen Ergebnissen scheint der Einsatz der SKY zur Analyse von NHL sinnvoll. Doch die größere Schwierigkeit bei der Untersuchung dieser Tumore, ist ihr schlechtes Ansprechen auf wachstumsstimulierende Agenzien während der Kultivierung. Denn auch eine SKY-Analyse setzt die Gewinnung von Metaphasen voraus.

4.2.3 Limitation der SKY-Technik

Die Anwendung der SKY-Technik ist für die Charakterisierung komplexer Chromosomenanomalien und Markerchromosomen sehr sinnvoll. Dennoch lassen sich einige Chromosomenanomalien mit dieser Technik nicht vollständig identifizieren, was durch die Verwendung chromosomenspezifischer Paintingsonden bedingt ist. Die Herkunft abnormaler Chromosomensegmente lässt sich nur dann bestimmen, wenn sie von einem anderen Chromosom stammen. Die SKY-Technik kann keine arm- oder bandenspezifischen Identifikationen vornehmen. Auch das zu jedem SKY-Bild erstellte DAPI-Bild, das durch Invertierung der G-Bänderung sehr nahe kommt, ist in seiner Auflösung zu gering um solche Veränderungen darstellen zu können. Dies macht den Einsatz armspezifischer Sonden mittels einer FISH-Analyse notwendig (Bayani et al., 2000; Markovic et al., 2000; Tonon et al., 2000).

4.2.3.1 SKY-Analyse bei intrachromosomalen Veränderungen

Die am häufigsten beobachtete Limitation der SKY-Technik ist ihre Auflösungsgrenze gegenüber der Detektion kleinerer Deletionen oder intrachromosomaler Veränderungen wie Inversionen (peri- und parazentrisch) (Bayani und Squire, 2002), da diese keinen Farbwechsel ergeben (Kakazu et al., 2003). Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurde inzwischen eine neue *multicolor banding*- Technik, das *spectral color banding* (SCAN), entwickelt. Sie ermöglicht die simultane Identifikation der meisten Chromosomenbanden eines Chromosoms in spezifischen Farben (Kakazu et al., 2001) und beruht, wie die SKY-Technik, auf dem *spectral imaging*. Neben dublierten Segmenten können auch kleine intrachromosomale Insertionen aufgeklärt werden (Kakazu et al., 2003). Die hohe Auflösung wird durch die Verwendung unterschiedlich markierter chromosomenbandenspezifischer genomischer DNA-Sonden, welche durch Mikrodisektion spezifischer Chromosomenbanden gewonnen wurden,

erzielt (Guan et al., 1994). Die Bandenauflösung wird konstant mit einem Level von 400 Banden angegeben. Insbesondere zur Identifikation intrachromosomaler Umbauten wie Inversionen und kleineren Deletionen scheint die SCAN-Technik sehr geeignet zu sein. Die Tumorzytogenetik erfährt dadurch eine zusätzliche Möglichkeit, die häufig nur sehr schwer zu analysierenden intrachromosomalen Umbauten weiter zu entschlüsseln.

In der vorliegenden Arbeit konnten vier Aberrationen mit Hilfe der SKY-Analyse nicht eindeutig abgeklärt werden. Im Fall ID 10 fand sich bei der G-Bandenanalyse im p-Arm eines Chromosoms 1 terminal eine subtile dunkle Bande, die nicht näher identifizierbar war. Die SKY-Analyse zeigte, dass vermutlich kein Material eines anderen Chromosoms vorlag und daher die Aberration intrachromosomal bedingt ist. Ob es sich dabei um eine Amplifikation oder Inversion handelt konnte nicht geklärt werden. In diesem Fall wäre die Durchführung der neuen SCAN-Technik ratsam, um die dunkle Bande genau lokalisieren zu können. Weitere Limitationen der SKY-Technik zeigten die Fälle ID 14/ 15 und 16. Beim Fall ID 14 wurde mittels G-Bandenanalyse ein stark aberranter Karyotyp mit einem Markerchromosom festgestellt. Die SKY-Technik identifizierte das Markerchromosom als Chromosom 8, so dass eine Trisomie 8 vorlag. Da dieses Chromosom in der G-Bänderung kein typisches Bandenmuster für ein Chromosom 8 zeigte, liegt nahe, dass starke intrachromosomale Umbauten stattgefunden haben, die mit SKY nicht detektierbar sind. Im Fall ID 15 wurde in der G-Bandenanalyse der Verlust eines Chromosoms 8 sowie ein Markerchromosom detektiert. Die SKY-Analyse identifizierte das Markerchromosom als Chromosom 8, so dass auch hier vermutlich ein intrachromosomaler Umbau vorlag. Die G-Bandenanalyse von Fall ID 16 zeigte ein im q-Arm strukturell verändertes Chromosom 7. Bei diesem Chromosom konnte die SKY-Analyse ausschließlich Material von Chromosom 7 nachweisen, so dass die Aberration nicht weiter charakterisierbar war. Wie im Fall ID 10 könnten die intrachromosomalen Umbauten der Chromosomen 8 und 7 der Fälle ID 14/ 15 und 16 mit einer SCAN-Analyse weiter aufgeklärt werden.

Fraglich bleibt bei den Fällen ID 15 und 16, ob die strukturellen Auffälligkeiten am Chromosom 8 bzw. 7 tumorspezifische oder konstitutionelle Veränderungen darstellen. Um dies zu klären, müsste von den Patienten eine konventionelle zytogenetische Blutuntersuchung durchgeführt werden. Da die Aberration im Fall ID 10 ein Mosaikbefund aus dem strukturell auffälligem Karyotyp und einem normalen Karyotyp darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine tumorspezifische Aberration handelt. Ein Färbefehler ist durch die gute Qualität der G-Bandenanalyse mit etwa 450 Banden weitgehend auszuschließen.

Die Zuordnung von p- oder q-Arm ist mit der SKY-Analyse trotz des invertierten DAPI-Bildes problematisch. Bei dem derivativen Chromosom 6 im Fall ID 3 konnte zwar das zusätzliche Material als Segment von Chromosom 1 identifiziert werden, doch ist eine nähere Bestimmung der Herkunft mittels SKY nicht möglich. Genauso verhält es sich bei dem derivativen Chromosom 2 im Fall ID 13, das Material von Chromosom 18 enthält. Die betroffenen Chromosomensegmente konnten nur unter Zuhilfenahme der G-Bänderung bestimmt werden. Auch das duplizierte Chromosomensegment 2 beim Fall ID 19 konnte bezüglich seiner Herkunft nicht näher charakterisiert werden. Eine FISH-Untersuchung mit p- bzw. q-Arm spezifischen Sonden könnte in den Fällen ID 3 und 19 weitere Aufklärung bringen.

Die vorliegenden Ergebnisse bekräftigen die Literaturdaten (Bayani und Squire, 2001; Zhao et al., 2001; Bayani und Squire, 2002; Kakazu et al., 2003), dass die SKY-Analyse zur Aufklärung intrachromosomaler Veränderungen nicht geeignet ist.

4.2.3.2 SKY-Analyse bei Translokationen mit subtilen Chromosomensegmenten

Fan et al. (2000) beschreiben die unterste Grenze der SKY-Technik für die Detektion eines Chromosomensegmentes mit einer Größe von 1-2 Mb. Eine detektierbare Chromosomenanomalie wie z.B. eine Translokation wird durch die Anzahl der „*single copy*“ (Sequenzen die nur einmal pro haploiden Chromosomensatz vorkommen) DNA determiniert. Eine Translokation mit einer *single copy* DNA ist für eine Visualisierung zu klein. Da die SKY-Sonden auf Grund der vielen repetitiven DNA-Sequenzen weder das Zentromer noch die Telomerregion markieren, können Veränderungen in diesen Regionen nicht identifiziert werden. Demnach bleiben kleine *single copy* DNA Translokationen und interchromosomale Insertionen mit der SKY-Technik unerkannt (Zhao et al., 2001).

Die Sensitivität von SKY variiert zwischen den individuellen Chromosomen in Abhängigkeit der einzelnen Sonden im Hybridisierungscocktail (Garini et al., 1996; Schröck et al., 1996). Fan et al. (2000) testeten die Sensitivität von SKY in 10 Fällen mit kleinen interchromosomalen Rearrangements. In 10 reziproken Translokationen waren 13 kleine telomerische Segmente verwickelt. SKY konnte davon neun Segmente an den derivaten Chromosomen identifizieren, aber nur bei acht Segmenten ihre Herkunft eindeutig bestimmen. Die identifizierten Segmente hatten eine Größe von 2-9 Mb. Fan et al. (2000) legten die Auflösungsgrenze für chromosomale Alterationen zwischen 1-2 Mb fest. In der G-Bandenanalyse zeigten diese Fälle eine Auflösung von 550-850 Banden. Fan et al. (2000) gehen davon aus, dass auch die Qualität der Chromosomenpräparation einen Einfluss auf die Hybridisierung und Sensitivität von SKY hat. Besonders für die Telomerregion scheinen FISH-Untersuchungen mit chromoso-

mensspezifischen subtelomerischen Sonden für die Detektion von Deletionen oder Translokationen sensitiver zu sein.

Auch in der vorliegenden Arbeit gab es Schwierigkeiten bei der Identifikation kleiner Translokationssegmente und bei der Identifikation von Markerchromosomen. Im Fall ID 1 lag ein Markerchromosom mit Zentromerbereich eines Chromosoms 12 vor. Im terminalen Bereich des langen Armes konnte Material eines Chromosoms 21 erkannt werden, im terminalen Bereich des kurzen Armes liegt weiteres Material von einem anderen Chromosom vor, dessen Herkunft allerdings nicht geklärt werden konnte. Durch die komplexen Veränderungen kam es an dem Markerchromosom vermutlich zur Überlagerung der Fluoreszenzsignale, was die Identifikation der Segmentzugehörigkeit erschwerte. Neuere Veröffentlichungen beschreiben eine Limitation des *multicolor karyotyping* durch „Fluoreszenzflackern“, welches zu Missklassifikationen von kleinen Insertionen und Translokationen führt (Lee et al., 2001). Dieses Fluoreszenzflackern entsteht in der Bruchpunktregion translocierter Chromosomensegmente unterschiedlicher Herkunft und beruht auf der Überlagerung der sondenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe. Die Missklassifikationen durch Fluoreszenzflackern sind von der Größe der betroffenen Chromosomensegmente aber auch von dem jeweilig betroffenem Sondengemisch abhängig. Dies erklärt, wieso das etwa gleich große Stück im langen Arm des Chromosoms 12 als Material von Chromosom 21 identifiziert wurde, das Segment im kurzen Arm hingegen nicht. Im gleichen Fall ID 1 konnten zwei Markerchromosome überhaupt nicht identifiziert werden. Neben ihrer geringen Größe, erschwert möglicherweise ihre komplexe Zusammensetzung eine Analyse, so dass eine Identifikation mittels SKY nicht möglich war.

Der Fall ID 6 konnte nur mit Hilfe des G-Bandenbefundes charakterisiert werden. Bei der vermutlich reziproken Translokation $t(3;17)$ wurde an einem Chromosom 17 im terminalen Bereich des langen Armes mittels SKY-Analyse eindeutig Material von Chromosom 3 identifiziert. Das fehlende kleine Segment von Chromosom 17 wird an einem Chromosom 3 vermutet, da ein Chromosom 3 in der G-Bandenanalyse stets verkürzt und mit einer etwas veränderten Abschlussbande im terminalen Bereich des p-Armes erscheint. Auch die SKY-Analyse des Echtfarbenbildes erbrachte keine eindeutige Identifikation von Material des Chromosoms 17 an einem Chromosom 3, wobei auf Grund der Echtfarbenähnlichkeit der beiden Chromosomen, Unterschiede mit dem menschlichen Auge nur schwer zu visualisieren sind. Die Identifikation war vermutlich einerseits durch das sehr kleine betroffene Segment der Telomerregion des Chromosoms 17 und andererseits durch das betroffene Sondengemisch und dem daraus resultierendem Fluoreszenzflackern nicht möglich. Fan et al. (2000) gelang in ihren Untersuchungen keine vollständige Identifikation aller kleinen translozierten telomerischen

Segmente mittels der SKY-Analyse. Möglicherweise könnte eine FISH mit den entsprechenden spezifischen Telomersonden die vermutete reziproke Translokation $t(3;17)$ bestätigen. Aus den Resultaten geht hervor, dass die SKY-Analyse neben den Schwächen bei der Identifikation von intrachromosomalen Veränderungen auch limitierende Faktoren bei der Charakterisierung von Translokationen und Markerchromosomen aufweist (siehe Übersicht 4.1).

Übersicht 4.1: Zusammenfassung der Schwächen bei der Detektion von Chromosomenanomalien mittels SKY (aus Literaturdaten und eigenen Ergebnissen zusammengestellt)

Limitierende Faktoren für die Detektion von Chromosomenanomalien mittels SKY

- Betroffenes Sondengemisch
- Chromosomensegmente $\leq 1,5$ Mb
- Fluoreszenzflackern durch Signalüberlagerung
- Chromosomenqualität in Hinblick auf die Länge und Spreitung

Unter der Auflösungsgrenze von SKY

- Intrachromosomale Anomalien wie perizentrische und parazentrische Inversionen
- Kleine Deletionen
- Subtile Translokationen besonders im Telomerbereich
- Bestimmung der Chromosomensegmente nach p- bzw. q-Arm Material und Bandenbestimmung nur bedingt möglich

4.2.4 Identifizierung neuer Chromosomenaberrationen mittels SKY

Neben der Aufklärung komplex aberranter Karyotypen und der Identifikation von Markerchromosomen verspricht die SKY-Analyse eine Identifizierung von neuen und krankheitsspezifischen Chromosomenaberrationen (Veldman et al., 1997). Auch die Häufigkeit von bisher mittels G-Bänderung nur selten beobachteten Chromosomenanomalien könnte sich durch die bessere Darstellungsmöglichkeit ändern. In der vorliegenden Arbeit konnte bei zwei Fällen (ID 2 und 5) eine Translokation $t(3;21)(q26;q22)$ beobachtet werden. In beiden Fällen blieb die Translokation bei der Analyse der G-Banden verborgen. Bei zwei B-CLL-Fällen (ID 6 und ID 12) konnte die SKY-Analyse eine Translokation $t(3;17)$ identifizieren. Beim Fall ID 6 war die reziprok vorliegende Translokation nur unter Berücksichtigung des G-Bandenbefundes bestimmbar. Die unbalancierte Translokation im Fall ID 12 blieb bei der G-Bandenanalyse unentdeckt. Insbesondere für die Identifizierung der $t(3;21)$ scheint die SKY-Analyse besonders geeignet, da sich das Bandenmuster der betroffenen Chromosomen

bei der G-Bänderung nur gering ändert. Da die Metaphasenqualität von Tumormaterial oft nur bedingt zufriedenstellend ist, bleiben kleine G-Bandenmusteränderungen meist verborgen.

4.2.4.1 Die Translokation $t(3;21)(q26;q22)$ in myeloischen Neoplasien

Die bisher eher selten gefundene reziproke Translokation $t(3;21)(q26;q22)$ wurde erstmals von Rubin et al. (1987) bei drei Patienten mit CML während der Blastenkrise beobachtet. Weitere Untersuchungen konnten dieses Resultat bestätigen und die Translokation auch bei Patienten in der chronischen Phase der CML nachweisen. Daneben wurde diese relativ seltene Aberration auch in einer kleinen Anzahl von Patienten mit einer t-AML (therapie-resistent AML) (Rubin et al., 1990) sowie bei Patienten mit MDS im Übergang zu einer AML gefunden. Nur wenige Translokationsfälle sind bei einer de novo AML oder eines MDS aufgetreten (Mitelman, 1994). Insgesamt wird die Prognose bei Patienten mit einer Translokation $t(3;21)(q26;q22)$ eher als ungünstig eingestuft (Rubin et al., 1990). Im Fall ID 5 der vorliegenden Arbeit lag die Verdachtsdiagnose eines schweren MDS vor, so dass die Translokation $t(3;21)$ in das vorliegende Krankheitsbild passt. Vermutlich handelte es sich hierbei um den Übergang eines MDS in eine AML. Die Translokation $t(3;21)$ wurde neben einer Reihe weiterer Aberrationen, darunter auch eine Monosomie 7, gefunden. Die Prognose des Patienten kann auf Grund des Karyotyps als insgesamt eher schlecht bewertet werden. Im Fall ID 2 war das Auftreten der Translokation $t(3;21)$ ungewöhnlich. Bei dem Patienten handelte es sich um eine de novo AML mit dem Subtyp M6. Literaturdaten bestätigen, dass die Aberration auch vereinzelt in de novo AML auftauchen kann. Auch bei diesem Patienten lag wie im Fall ID 5 neben der Translokation $t(3;21)$ eine Monosomie 7 vor, so dass auch hier von einer ungünstigen Prognose ausgegangen werden kann. Vergleiche mit der „Mitelman database“ zeigten, dass auch dort Fälle registriert sind, die eine Monosomie 7 neben einer Translokation $t(3;21)$ aufweisen. Unter den 64 registrierten Fällen mit $t(3;21)$ befinden sich 15 AML-Fälle, darunter einer der zusätzlich eine Monosomie 7 zeigt und 15 MDS-Fälle, wobei einer zusätzlich eine Monosomie 7 und einer eine Deletion 7q aufweist. Auch ein CML-Fall zeigt zusätzlich eine Monosomie 7. Nur bei wenigen der registrierten Fälle liegt die Translokation $t(3;21)$ isoliert vor. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Daten und der Vergleich mit der „Mitelman database“ weisen auf eine mögliche Assoziation der beiden Aberrationen Translokation $t(3;21)$ und Monosomie 7 hin.

Die Translokation $t(3;21)$ wurde in der vorliegenden Arbeit mittels SKY-Analyse in zwei von acht myeloischen Erkrankungen gefunden. Dies lässt darauf schließen, dass die Translokation häufiger als bisher in der Literatur beschrieben auftritt. SKY-Analysen an einer größeren Patientengruppe mit myeloischen Neoplasien könnten hierzu Klarheit schaffen.

4.2.4.2 Die Translokation t(3;17) bei der B-CLL

Unter den 12 mittels SKY untersuchten lymphatischen Erkrankungen fanden sich zwei Fälle (ID 6 und ID 12) mit einer B-CLL, die eine Veränderung der Chromosomen 3 und 17 zeigten. Im Fall ID 6 handelte es sich um eine isolierte reziproke Translokation t(3;17)(p22;q23). Im Fall ID 12 lag neben einer Trisomie 12 eine unbalancierte Aberration mit Verlust eines Chromosoms 17 und einem derivativen Chromosom 3, das aus einer Translokation t(3;17)(p13;q21?) entstanden ist, vor. Spezifische chromosomale Aberrationen, die die Chromosomensegmente 3p und 17q betreffen, sind bei B-CLL-Erkrankungen bisher nicht bekannt. Die Translokationen 3/17 zeigten in beiden Fällen unterschiedliche Bruchpunkte. Es ist fraglich, ob es sich in diesen Fällen um eine neue tumorspezifische Veränderung handelt. Um eine möglicherweise neue Aberration im Zusammenhang mit einer B-CLL-Erkrankung abzuklären, müsste in Zukunft verstärkt Augenmerk auf diese beiden Chromosome gelegt werden.

4.2.5 Methodenvergleich: Konventionelle Zytogenetik - Spectral Karyotyping

Während die G-Bandenanalyse die Identifizierung der einzelnen Chromosome mittels eines hell-dunkel-Musters erlaubt, gewährleistet die SKY-Analyse die Identifikation der einzelnen Chromosome durch unterschiedliche Farbgebung. Beiden Methoden geht eine Zellkultivierung und Metaphasenpräparation voraus, die insbesondere in der Tumorzytogenetik einen schwierigen Arbeitsbereich darstellt. Die Qualität der Chromosomenspreitung und Chromosomenlänge stellt für die Auflösung einen limitierenden Faktor dar, wobei gerade die Chromosomenspreitung einen starken Einfluss auf die SKY-Analyse haben kann. Insbesondere durch Signalüberlagerungen kann es zu Missklassifizierungen kommen. Auch die Chromosomenlänge ist qualitätsbeeinflussend, denn in der SKY-Analyse können subtile Veränderungen insbesondere bei kurzen Chromosomen nur bedingt erkannt werden. Neben der relativ kostengünstigen und zeitsparenden konventionellen Zytogenetik mit ihren Bänderungsmethoden zeigt sich die SKY-Analyse als kostenaufwendige, technisch sehr anspruchsvolle und zeitaufwendige Methode. Dies erschwert den Eintritt der SKY-Analyse in die Routinediagnostik.

4.2.5.1 SKY-Analysen zur Erweiterung zytogenetischer Befunde

Die SKY-Analyse bzw. 24-Farben-FISH soll weder als Konkurrenz noch als Ersatz zur konventionellen Zytogenetik angesehen werden, sondern eine Erweiterung der zytogenetischen Untersuchungsmöglichkeiten bieten. Dies kann insbesondere bei speziellem Abklärungsbedarf, wie Markerchromosomen oder komplexen Karyotypen der Fall sein. Die Kombination beider Untersuchungsmethoden stellt somit einen Analysevorteil dar.

Zhao et al. (2001) sehen die Vorteile der SKY-Analyse in der Erweiterung und Komplettierung der konventionellen Karyotypisierung. In vielen diagnostischen Situationen wird die 24-Farben-FISH nicht immer notwendig sein. Bei einer Vielzahl von Fragestellungen sind die bisherigen Verfahren bereits so umfangreich, dass ein Hybridisierungstest für bestimmte, am Krankheitsgeschehen beteiligte Loci, sinnvoller und wesentlich kostengünstiger erscheint (Lichter und Speicher, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde die SKY-Analyse erst nach erfolgter G-Bänderung durchgeführt. In allen analysierten Fällen wurden zur Erstellung des SKY-Befundes die Informationen der G-Bänderung herangezogen. Zur Erleichterung der SKY-Karyotypisierung empfiehlt sich, die Ergebnisse der G-Bandenanalyse stets zur Optimierung der SKY-Analyse heranzuziehen.

4.2.5.2 Einsatz von SKY in der Routine

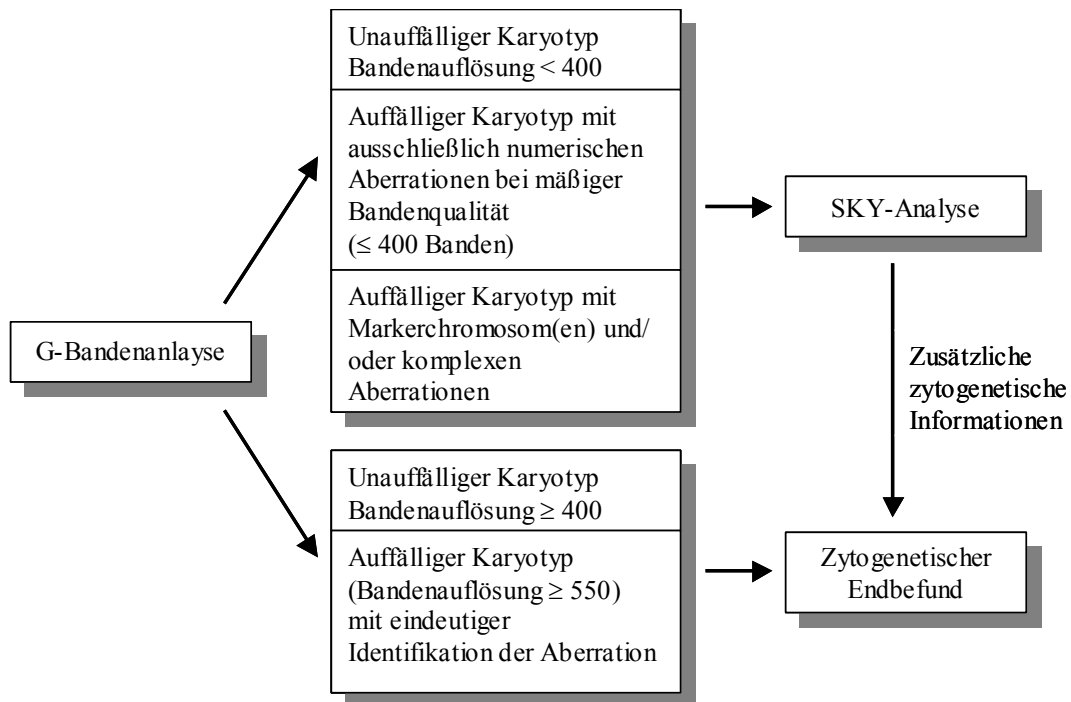
Trotz der vielen Vorteilen der SKY-Technik und ihrer enormen Effizienz bei der Identifikation von komplexen Karyotypen und Markerchromosomen ist derzeit der Einsatz der SKY-Technik in der Routinediagnostik nur bedingt möglich. Neben der beschränkten Verfügbarkeit und der zeitintensiven Bearbeitung sind auch die höheren Kosten kritisch zu betrachten (Heng et al., 2003). Auch die Limitation von SKY durch Fluoreszenzüberlagerungen und der daraus resultierenden Missklassifikation von kleinen Insertionen und Translokationen müssen bedacht werden (Lee et al., 2001).

Für hämatologisch gesicherte Erkrankungen kann nach den Daten der vorliegenden Arbeit bei der in Übersicht 4.2 dargestellten Charakteristik eine SKY-Analyse empfohlen werden.

Am Anfang einer zytogenetischen Analyse sollte wie bisher die G-Bandenanalyse stehen. Sie ermöglicht den raschen Überblick über das gesamte Genom. Liegt bei der G-Bandenanalyse ein unauffälliger Karyotyp vor und wurde eine Bandenqualität von ≥ 400 Banden erreicht, kann davon ausgegangen werden, dass die SKY-Analyse nur bei wenigen Fällen weitere zytogenetische Erkenntnisse erbringen würde. Auch Storck et al. (2001) empfehlen für Chromosomen, die nach konventioneller Karyotypisierung mit guter Auflösung unauffällig sind, routinemäßig keine erweiterten zytogenetischen Analysen durchzuführen. Liegt nach einer Bandenanalyse mit mittelmäßiger Bandenqualität (≤ 400 Banden) ein auffälliger Karyotyp mit ausschließlich numerischen Aberrationen vor, ist eine SKY-Analyse empfehlenswert. In der vorliegenden Arbeit konnten bei drei Fällen (ID 2/ 9 und 12) zusätzlich zu den in der G-Bandenanalyse gefundenen numerischen Aberrationen mittels SKY noch strukturelle Veränderungen gefunden werden. Bei einem auffälligen strukturellen Karyotyp, der mit guter Bandenqualität (≥ 400 Banden) ermittelt wurde, ist eine SKY-Analyse nicht zwingend not-

wendig, solange die Aberrationen eindeutig identifiziert werden konnten. Ist die Bandenqualität deutlich schlechter als 400 Banden, empfiehlt sich trotz unauffälligem Karyotyp zur weiteren Sicherung des Befundes die Durchführung einer SKY-Analyse. Bei allen auffälligen Karyotypen, die mittels G-Bänderung nicht näher charakterisierbare Markerchromosomen aufweisen oder komplex aberrante Veränderungen zeigen, ist die weitere Abklärung durch eine SKY-Analyse ratsam. Der Einsatz der SKY-Analyse nach diesen Kriterien steigert die Sensitivität des zytogenetischen Befundes und hat somit erheblichen Einfluss auf die Diagnose und Prognose von malignen Neoplasien.

Übersicht 4.2 Schema zur Empfehlung der Durchführung einer SKY-Analyse bei hämatologisch gesicherten Erkrankungen



Schwerpunkt: KULTIVIERUNG

4.3 Kultivierung von B-CLL-Zellen

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Daten über Chromosomenaberrationen bei B-CLL-Patienten in Hinblick auf die Identifikation von Subtypen gesammelt (Han et al., 1984; Pittman und Catovsky, 1984; Juliusson et al., 1990). Vor 1980 war es wegen der geringen Anzahl von Metaphasen nicht möglich, Chromosomenanomalien bei B-CLL-Patienten zu studieren. Die Chromosomenanalyse wurde durch zwei limitierende Faktoren stark behindert, dies waren zum einen die geringe spontane Mitosenaktivität der B-Zellen in vitro und zum anderen die schlechte Reaktion dieser B-Zellen auf Mitogene. Bei der Kultivierung von B-CLL-Zellen werden unter der Verwendung von standardisierten B-Zell-Mitogenen wie 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), Lipopolysaccharide (LPS), *pokweed mitogen* (PWM) oder Epstein-Barr Virus (EBV) in ca. 50% der Fälle analysierbare Metaphasen gewonnen (Sadamori et al., 1983; Carlsson et al., 1988). Unter den erfolgreich karyotypisierten Fällen finden sich zu 40-70% Chromosomenanomalien (Han et al., 1984; Juliusson und Gahrton, 1990; Geissler et al., 1997).

Durch die Entwicklung molekularzytogenetischer Techniken wurde es möglich, Chromosomenanomalien auch an sich nicht teilenden Zellen zu beobachten (Stilgenbauer et al., 1998; Bentz et al., 1999). Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ermöglicht die Detektion von Chromosomenaberrationen bei etwa 80% der B-CLL-Patienten. Allerdings können nur Informationen über einzelne speziell untersuchte Chromosomen gewonnen werden (Doehner et al., 1997; 1999). Bis jetzt konnte keine dieser molekularzytogenetischen Techniken die konventionelle Bandentechnik als Screening-Methode für die Detektion von Mutationen auf dem Chromosomenlevel in Tumorzellen ersetzen (Lichter et al., 2000). Deswegen müssen weiterhin die Möglichkeiten zur besseren B-Zell-Proliferation in vitro untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden B-Zellen von Patienten mit den Diagnosen B-CLL, B-NHL und Plasmozytom nach zwei Kultivierungsschemen (I/II) unter Verwendung von konditioniertem Medium kultiviert. An Hand des Mitoseindex konnte gezeigt werden, dass die Kulturen mit MP-6 Zellen konditioniertem ISCOVE-Medium und TPA in fast $\frac{3}{4}$ der untersuchten Proben der Gruppe I die beste Proliferationsstimulierung erbrachten.

4.3.1 Kultivierung mit konditioniertem Medium

Seit 1983 wird Lymphozyten-konditioniertes Medium (LCM) zur qualitativen und quantitativen Verbesserung der Metaphasenausbeute verwendet. Der Einsatz von *giant-cell-tumor-*

konditioniertem Medium (GCT-CM) zur Verbesserung der Qualität von Metaphasenpräparationen aus Knochenmark begann 1988 (Wason und Richkind, 1992). Nach mehreren Studien, die das Ansteigen des Mitoseindex und eine Verbesserung der Metaphasenqualität bei der Verwendung von konditioniertem Medium beschrieben, wurde deren Einsatz forciert (Morgan et al., 1988; Groopam et al., 1989; Keinanen et al., 1989). In dem mittels T-Zell Hybridoma Klon (MP6) konditioniertem Medium wurde ein *B-cell stimulatory factor* (BSF) gefunden (Rosén et al., 1986). Dieser BSF konnte als Thioredoxin identifiziert werden (Rosén et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde ISCOVE-Medium serumfrei mit MP6-Zellen konditioniert. Die Konditionierung erfolgte über 24 h bei einer Zelldichte von 1×10^6 MP-6 Zellen/ml und $0,2 \times 10^6$ MP-6 Zellen/ml. Da sich das konditionierte Medium sehr einfach auch in großen Mengen herstellen lässt und eingefroren über längere Zeit haltbar ist, können eine Vielzahl von Kultivierungen mit dem gleichen konditionierten Medium durchgeführt werden.

Carlsson et al. (1988) beschrieben einen stimulierenden Effekt von MP-6 Zellen konditioniertem serumfreiem Medium auf zwei B-CLL Klone (I73 und I83) mit der Steigerung der DNA-Synthese. Dieser stimulierende Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Das Kultivierungsschema I beinhaltet eine Kultivierung der Patientenproben in MP-6 konditioniertem ISCOVE-Medium (Ansatz E). Von den 20 angesetzten Proben zeigten 13 im Ansatz E keine Proliferation und sieben eine nur sehr schwache (Mitoseindex zwischen 0,3 und 1). Demnach lies sich nach 72-stündiger Kultivierung kein B-Zellen stimulierender Effekt von MP-6 konditioniertem ISCOVE-Medium nachweisen.

4.3.2 Kultivierung von B-Zellen mit MP-6 Zellen konditioniertem ISCOVE-Medium und dem Phorbolster TPA

Der Einsatz von konditioniertem Medium, das aus einer Zelldichte von $0,2 \times 10^6$ MP-6 Zellen/ml (Ansatz D im Kultivierungsschema I) gewonnen wurde schien in der vorliegenden Arbeit für die Kultivierung von B-Zellen günstig zu sein. Da das konditionierte Medium unverdünnt eingesetzt wurde, sind vermutlich bei der Konditionierung des Mediums mit hoher MP-6 Zelldichte (1×10^6 Zellen/ml) (Ansatz C des Kultivierungsschema I) die Nährstoffe des ISCOVS-Mediums so verbraucht worden, dass es für die anschließende Kultivierung der Patientenproben nicht mehr geeignet war. Die Literaturdaten geben zum Konditionieren eine Zelldichte von $0,2 \times 10^6$ MP-6 Zellen/ml und einen Einsatz des Mediums zu 25% vol/vol an, wobei die Kultivierung über vier und bis zu acht Tage verlief und im Anschluss daran die DNA-Synthese gemessen wurde (Carlsson et al., 1993; Rosén et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde das konditionierte Medium unverdünnt eingesetzt, wobei sich die Kultivie-

rungszeit an den gängigen 72 h für eine Langzeitkultivierung zur Metaphasengewinnung aus Tumormaterial richtete.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten bei fast $\frac{3}{4}$ der kultivierten Proben der Gruppe I und bei ca. $\frac{2}{3}$ der Gruppe II den höchsten Mitoseindex in den Kultivierungen mit MP-6 konditioniertem ISCOVE-Medium mit TPA (Ansatz C und D nach Kultivierungsschema I und Ansatz c nach Kultivierungsschema II). Von den 18 proliferierten Fällen der Gruppe I zeigten 11 in den Kulturansätzen C und D einen deutlich höheren Mitoseindex (zwischen dem 1,5- und 21-fachem) gegenüber dem Standardansatz B (RPMI-Medium/TPA). Unter den 12 proliferierten Fällen der Gruppe II waren es acht, die im Ansatz c einen deutlich besseren Mitoseindex (zwischen dem 1,6- und 14-fachem) gegenüber dem Ansatz b (TPA/ISCOVE-Medium) zeigten.

Die Kombination von MP-6 Zellen konditioniertem Medium und TPA wirkt vermutlich synergistisch auf die Proliferationsaktivität von B-Zellen und erzielt somit eine höhere Metaphasenausbeute. Diese Beobachtung deckt sich mit Literaturdaten, bei der nach einer Kultivierung mit MP-6 konditioniertem Medium und TPA eine verstärkte DNA-Synthese beobachtet werden konnte. Bisher wurden keine Kultivierungsmethoden veröffentlicht, die mit den Kultivierungen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind, deren Ziel die Metaphasengewinnung unter dem Einsatz von MP-6 konditioniertem Medium und TPA war.

Durch die Messung der DNA-Synthese konnte bereits beobachtet werden, dass MP-6 konditioniertes serumfreies Medium die mitogenen Eigenschaften von TPA oder SAC (*Staphylococcus aureus Cowan I*) auf B-Lymphozyten steigert (Rosén et al., 1986) und synergistisch mit IL-2 und IL-4 auf die Proliferationssteigerung der B-CLL-Zellen (Carlsson et al., 1988, 1989 I, 1989 II) wirkt. Frühere Studien zeigten, dass TPA bei B-CLL-Zellen Differenzierungsschritte induziert, ohne begleitend proliferierend auf die B-CLL-Zellen zu wirken (Tötterman et al., 1980). Vermutlich hängt die Proliferation der B-CLL-Zellen von autologen T-Zellen ab (Danersund et al., 1985). Mit der Kombination von MP-6 konditioniertem Medium und TPA scheint neben der Differenzierung auch eine signifikante DNA-Synthese ausgelöst zu werden (Carlsson et al., 1988). Der *B-cell stimulatory factor* (BSF), der von den MP-6 Zellen ins Medium sezerniert wird, konnte als Thioredoxin identifiziert werden (Rosén et al., 1995). Die Regulation der Signalwege verläuft häufig über die Änderung des Redoxpotenzials von Thiolelen und Disulfiden. Sie stellen wichtige Wachstumskontrollen in eukaryontischen Zellen und insbesondere in Lymphozyten dar (Ericson et al., 1992; Clark und Ledbetter 1994; Law und Clark, 1994). Neben der ursprünglich beschriebenen Funktion des reduzierten Thioredoxin als Hydrogendonor für die Ribonucleotidreduktase, die essentiell für die DNA-Synthese ist,

konnten auch extracelluläre Funktionen von Thioredoxin, die eine Wirkung auf das Wachstum und die Differenzierung haben, identifiziert werden (Rosén et al., 1995).

Im Gegensatz zu normalen Zellen zeigen B-CLL-Zellen kaum eine Reaktion auf Mitogene und Cytokine. Rosén et al. (1995) vermuteten, dass der Arrest der B-CLL-Zellen in der G₀-Phase des Zellzykluses auf subnormalen T-Helferzell-Funktionen oder auf krankheitsassoziierte mangelnde Reaktion auf Cytokine beruht. Dem scheint Thioredoxin entgegen zu wirken. Dennoch zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Kultivierung von B-Zellen in MP-6 konditioniertem Medium keine Proliferationsaktivität (Ansatz E im Kultivierungsschema I) auslöste. Erst durch die Zugabe von TPA konnte eine gesteigerte Aktivität beobachtet werden. Thioredoxin scheint demnach die B-Zellen in die Lage zu versetzen, auf Stimulatoren wie dem Phorbol ester reagieren zu können. Ohne die Zugabe von Thioredoxin bzw. MP-6 konditioniertem Medium scheint nur eine deutlich geringere Anzahl von Zellen auf die TPA-Stimulation zu reagieren. Offensichtlich werden zur Anregung der Proliferation von B-Zellen zwei Signale benötigt.

Larramendy et al. (1998) postulierten, dass bei der Kultivierung von B-CLL-Zellen durch die Zugabe eines zweiten Mitogens die DNA-Synthese gegenüber nur einem Mitogen deutlich gesteigert wird. Auch sie vermuten, dass B-CLL-Zellen Signale von mehr als einem Mitogen erfordern, um mit einer gesteigerten Proliferation zu reagieren.

4.3.3 Thioredoxin verlängert das Überleben von B-CLL-Zellen

Die Akkumulation von monoklonalen CD5 positiven B-Zellen, die in der G₀/G₁ Phase des Zellzykluses verharren, ist für eine B-CLL kennzeichnend. Die Überexpression des anti-Apoptoseproteins Bcl-2 ist für die sukzessive Expansion des malignen Klons, der eine minimal proliferierende Zellfraktion enthält, verantwortlich (Nilsson et al., 2000). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass der hohe Bcl-2 Gehalt in B-CLL-Zellen auch auf ein über Cytokinrezeptoren vermitteltes externes Signal zurückzuführen ist (McConkey et al., 1991; Osorio et al., 1997). Die Bcl-2 Überexpression wird durch IL-4, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , FGF basic, IL-8, CD6-Ligation und IL-10 herunterreguliert (Dancescu et al., 1992; Buschle et al., 1993; Fluckiger et al., 1994; Jewell et al., 1994; CiCelle et al., 1996; König et al., 1997; Osorio et al., 1997). Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren in vitro wird das externe Signal vermindert, Bcl-2 wird reduziert und die Apoptose induziert (Osorio et al., 1997; Nilsson et al., 2000). Nilsson et al. (2000) beobachteten bei der Kultivierung von B-CLL-Zellen über zwei Monate, dass durch die Zugabe von rekombinantem humanem Thioredoxin Bcl-2 bereits nach 24h verzögert herunterreguliert wird, die Apoptoseanzahl abnimmt und somit die B-CLL-Zellen in vitro ein längeres Überleben zeigen. Es konnte ein dosis-abhängiger Effekt

zwischen der Thioredoxingabe und autokrinem TNF- α , einem Wachstumsfaktor für B-CLL-Zellen, gezeigt werden (Cordingley et al., 1988; Larsson et al., 1993).

Diese Beobachtungen könnten Erklärungsansätze für die in der hier vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse liefern. Die Kultivierung von B-Zellen mit MP-6 konditioniertem Medium und TPA zeigen eine deutlich höhere Mitoserate gegenüber dem Ansatz mit ausschließlich TPA. Die Verzögerung der Apoptose durch das MP-6 konditionierte Medium erlaubt möglicherweise mehr B-Zellen auf die TPA-Stimulation zu reagieren und in die S-Phase des Zellzykluses einzutreten.

4.3.4 Lebend-Tot-Bestimmung vor und nach der Kultivierung von B-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Untersuchungsgruppe I vor der Kultivierung und nach 72 h eine Lebend-Tot-Bestimmung aus den Patientenproben bzw. aus den Kulturansätzen durchgeführt. Hierzu diente eine Acridinorange/Ethidiumbromidfärbung, die den undifferenzierten Zelltod durch eine rote Färbung der Zellen von den vitalen Zellen mit grüner Färbung unterscheidet. Für apoptotische Zellen ist die Färbung nicht spezifisch. Eine früh apoptotische Zelle mit beginnender DNA-Fragmentierung wird wie eine vitale Zelle grün gefärbt, da ihre Membrankanäle noch in Takt sind. Erst im Verlauf der weiteren apoptotischen Vorgänge und mit dem Auflösen zytoplasmatischer Strukturen verlieren diese Kanäle ihre Funktion und die Zelle färbt sich rot an.

Vor der Kultivierung zeigten die Patientenproben eine durchschnittliche Lebendzellzahl von 97%. Nach 72-stündiger Kultivierung war die durchschnittliche Lebendzellzahl in den Kulturansätzen C und D, die in knapp $\frac{3}{4}$ aller untersuchten Proben der Gruppe I den höchsten Mitoseindex zeigten, am geringsten (ca. 70%). Eine höhere durchschnittliche Lebendzellzahl (ca. 80%) zeigten die Ansätze A, B und E, da möglicherweise mehr Zellen in der G₀-Phase des Zellzykluses verweilten. Wenn die Kultivierung mit MP-6 konditioniertem Medium die Reaktionsfreudigkeit der B-Zellen auf TPA erhöht, ist es denkbar, dass mehr Zellen in die G₁- bzw. S-Phase des Zellzykluses eintreten und mehr Zellen auf Grund einer Schädigung, möglicherweise auch durch die toxische Wirkung von TPA, den Weg des apoptotischen Zelltods einschlagen.

Nilsson et al. (2000) beschreiben eine längere Überlebenszeit von B-CLL-Zellen durch die Gabe von rekombinanten humanen Thioredoxin und MP-6 konditioniertem Medium. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Zellen des Ansatzes A, B und E nach der Kultivierung in etwa die gleiche Anzahl lebender Zellen, so dass nach 72 h der beschriebene Effekt der längeren Überlebenszeit durch Thioredoxin nicht nachgewiesen werden konnte.

4.3.5 Stimulation der neoplastischen B-Zellen

Mit Hilfe der MAC-Technik (*Morphology, Antibody, Chromosomes*) (Knuutila, 1996) kann die Immunphänotypisierung und die Karyotypisierung miteinander kombiniert werden. Bei einer Untersuchung von B-CLL-Patienten zeigte sich, dass die meisten Metaphasen normalen Karyotyps von T-Zellen stammen (Larramendy et al., 1990; Knuutila, 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von B-NHL-Zellen mit MP-6 konditioniertem Medium und TPA-Stimulation (Ansatz C und D) bei den meisten Fällen eine höhere Metaphasenausbeute als der Standardansatz B erzielte. Um zu untersuchen, wie sich das Verhältnis zwischen aberranten Zellklonen zu normalen Zellklonen in den beiden Kultivierungsmethoden verhält, wurden die Metaphasen auf den Präparaten der Ansätze B und D von Fällen (ID 5a/ 5b/ 6/ 13 und 17) mit bekanntem numerischen Mosaik ausgezählt. Die aberranten Klone fanden sich bei beiden Ansätzen (B und D) wieder. Das Verhältnis zwischen aberranten und normalen Klonen zeigte bei beiden Ansätzen (B und D) eine ähnliche Verteilung. Es konnte keine deutlich unterschiedliche Tendenz festgestellt werden, wobei sich die Auswertung des Ansatzes B auf Grund der niedrigeren Mitosenanzahl schwierig gestaltete.

Im Fall ID 5b lag eine sehr geringe Anzahl (Ansatz B: sieben, Ansatz D: drei Metaphasen von 50) aberranter Metaphasen (47,XX,+12) vor. Möglicherweise trägt nur ein kleiner Teil der neoplastischen Zellen die klonale Aberration (Autio et al., 1987; Pérez Losada A et al., 1991; García-Marco et al., 1994). In einer Untersuchung von Larramendy et al. (1998) fanden sich in allen Fällen mit Chromosomenaberrationen auch Mitosen mit normalem Karyotyp. Diese lassen sich vermutlich auf eine T-Zell Proliferation zurückführen.

4.3.6 B-Zellen Proliferation nach optimaler Mitogenstimulation

Larramendy et al. (1998) testeten vier Mitogene in 14 verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen an 14 Patienten mit B-CLL und prolymphozytischer Leukämie (PL) hinsichtlich des Thymidineinbaus und des Mitoseindices. Beide Untersuchungsmethoden zeigten ähnliche Ergebnisse. Es konnten verschiedene Mitogenkombinationen ausgewählt werden, die eine gute Proliferation von neoplastischen B-Zellen erzielten. Aus den 14 Mitogenkombinationen konnten sechs verschiedene OMC's (*optimal mitogen combination*) festgelegt werden. Es wird empfohlen, bei jedem neu diagnostiziertem B-CLL-Fall verschiedene Mitogenkombinationen auszutesten, um fallspezifisch das jeweilige Mitogenstimulationsoptimum herauszufinden.

Dies gestaltet sich insbesondere in der Routinediagnostik schwierig, denn viele verschiedene Kultivierungsansätze bedeuten einen hohen Zeit- und Kostenaufwand. Auch die Auswertung

von bis zu 14 Ansätzen lässt sich in der Routine kaum bewerkstelligen. Zumal bei klinischen Untersuchungen eine rasche Erstellung des zytogenetischen Befunds sehr wichtig ist, da er Einfluss auf die Diagnose und Therapie hat.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kultivierung mit MP-6 konditioniertem Medium und TPA könnte den Standardansatz RPMI-Medium/TPA ersetzen. Durch den synergistischen Effekt des Mediums mit dem *B-cell stimulatory factor* (BSF) Thioredoxin und dem Phorbol ester auf die Proliferationsaktivität von B-Zellen, konnte die Mitoserate deutlich gesteigert werden. Das Verhältnis zwischen aberrantem Klon und normalen Metaphasen scheint bei dieser Kultivierung gegenüber der RPMI/TPA-Kultivierung unverändert. Demnach werden die gleichen Zellen wie beim Standardansatz zur Proliferation angeregt. Durch die deutlich höhere Zahl vorhandener Metaphasen wird die zytogenetische Auswertung erleichtert. Da sich das konditionierte Medium in größeren Mengen herstellen und einfrieren lässt, ist der zusätzliche Arbeitsaufwand auch in der Routinediagnostik vertretbar. Die Kultivierungsart zeigte keinen Einfluss auf die Mitosenqualität, jedoch steigt durch die Anzahl verfügbarer Metaphasen die Chance, auch Metaphasen besserer Qualität auswerten zu können.

Eine B- und T-Zelltrennung vor der Aberntung der Kulturen könnte die mehrfach beschriebene zytogenetische Auswertung von T-Zellmetaphasen in B-Zell-Neoplasien (Larramendy et al., 1990; 1998; Knuutila, 1997) ausschließen, da die Chromosomenpräparation aus der B-Zell Fraktion erfolgen würde. Dabei könnte die Technologie des *magnetic cell sortings* Anwendung finden, bei der durch immunomagnetische Separation ohne Zellschädigung die B-Zellen von den T-Zellen getrennt werden können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in die drei Themenschwerpunkte FICTION-Technik (*Fluorescence-Immunophenotyping and Interphase Cytogenetic as a Tool for Investigation of Neoplasms*), SKY-Technik (*Spectral Karyotyping*) und Kultivierungsverfahren.

Mittels der **FICTION**-Technik konnte gezeigt werden, dass die Trisomie 12 bei 53 untersuchten B-CLL-Patienten mit etwa 11% deutlich seltener auftrat, als in der Literatur beschrieben. Es scheint eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer Trisomie 12 und einer atypischen B-CLL vorzuliegen, da drei der sechs Fälle mit Trisomie 12 eine atypische B-CLL Variante darstellten. Bei einem Fall konnte der Trisomie 12 tragende Klon über 13 Monate beobachtet werden und zeigte in diesem Zeitraum keine signifikante Veränderung. Der Klon blieb weitestgehend stabil.

Eine aus Vorversuchen von Doris Herrmann vermutete Existenz einer Monosomie 12 bei B-CLL-Patienten (persönliche Mitteilung) hat sich nicht bestätigt. Bei allen untersuchten Proben lagen die Zellen mit Monosomie 12 unter dem ermittelten *cut off level* von 10,2% für die Hybridisierung.

Als zweiter Schwerpunkt wurde die Einsatzfähigkeit der **SKY**-Technik in der Tumorzytogenetik durch die Analyse von 20 Tumorfällen ausgetestet. Unter den 20 untersuchten tumorzytogenetischen Fällen konnte bei 12 der durch G-Bänderung erhobene Befund verbessert und erweitert werden. Bei drei Fällen wurden neue, in der G-Bandenanalyse nicht gefundene Aberrationen identifiziert und in fünf Fällen bestätigte sich der G-Bandenbefund. Die SKY-Technik erwies sich als wertvolle Methode zur weiteren Charakterisierung von komplex aberranten Karyotypen oder zur Identifikation von Markerchromosomen, wobei nicht alle Aberrationen aufgeklärt werden konnten.

Unter den 20 untersuchten Fällen wurde bei zwei myeloischen Erkrankungen neben einer Monosomie 7 die Translokation $t(3;21)(q26;q22)$ gefunden. Möglicherweise kommt diese häufiger als bisher beschrieben in myeloischen Erkrankungen vor, weil sie durch die G-Bandenanalyse nicht sicher erkannt wird. Vorzugsweise scheint sie neben einer Monosomie 7 aufzutreten.

In dem Schwerpunkt, der sich mit der **Kultivierung** von neoplastischen B-Zellen beschäftigte, konnte ein neues Kultivierungsverfahren für B-Zellen entwickelt werden. Eine Kultivierung mit MP-6 Zellen konditioniertem ISCOVE-Medium und dem Phorbolster TPA zeigte in 15 von 20 Proben einen synergistischen Effekt auf die Proliferationssteigerung (um das

1,5-21 fache) gegenüber dem TPA-Standardansatz in RPMI-Medium. Durch eine Metaphasenanalyse von fünf Fällen mit numerischen Mosaikbefunden konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis zwischen aberranten und normalen Klonen bei beiden Kultivierungsarten etwa gleich blieb.

Eine Lebend-Tot-Bestimmung vor und nach der Kultivierung zeigte, dass nach 72-stündiger Kultivierung in den Kulturen mit dem höchsten Mitoseindex die durchschnittlich Lebendzellzahl am geringsten (ca. 70%) war.

6 AUSBLICK

Nach der Einführung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) gelang es eine Vielzahl neuer Methoden zu entwickeln, die auf dem Prinzip der FISH-Technologie basieren. Diese stehen heute der Zytogenetik und insbesondere der Tumorzytogenetik zur Erweiterung des konventionellen G-Bandenbefunds zur Verfügung. Insbesondere die FISH-Technik ist für die Anwendung in der Tumorzytogenetik besonders ratsam, da sie die selektive Markierung der Tumorzellen ermöglicht. Die in der vorliegenden Arbeit mit dieser Methode untersuchte Trisomie 12 bei B-CLL-Patienten muss in weiteren Studien hinsichtlich der Klassifizierung eines Subtyps mit atypischen Erscheinungsbild und ihrer prognostischen Bedeutung untersucht werden. Der Zusammenhang zwischen einer Krankheitsprogression und dem Erwerb bzw. der Expansion eines Trisomie 12 Klon sollte im Hinblick auf die Verteilung im Knochenmark und Lymphknotenmaterial untersucht werden.

Die SKY-Analyse ermöglicht weitere Einblicke in tumorassoziierte Chromosomenveränderungen und wird in den nächsten Jahren vermutlich noch einige neue krankheitsassoziierte Aberrationen identifizieren. Insbesondere in Kombination mit dem *spectral color banding* (SCAN) stehen neue Wege zu noch detaillierteren zytogenetischen Untersuchungsmöglichkeiten offen. Gerade die Kombination verschiedener Methoden und deren fallspezifischen Einsatz wird die zytogenetische Diagnostik erheblich verfeinern. Auch die Anwendung von DNA-Chips, mit deren Hilfe ein genetisches Profil erstellt werden kann, wird dabei hilfreich sein. Diese Profile ermöglichen eine Verbesserung der Diagnose und Prognose und geben eventuell auch Einblicke in die Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten, so dass Krankheiten gezielter bekämpft werden können.

Trotz der Entwicklung neuer Mitosen unabhängiger Analyseverfahren ist die tumorzytogenetische Analyse nach wie vor weitgehend von der Metaphasengewinnung abhängig. Die dazu notwendigen Kultivierungs- und Stimulierungsmethoden sind derzeit noch unbefriedigend. Besonders die Kultivierung von neoplastischen B-Zellen stellt sich schwierig dar. Ein B-Zellen spezifischer Stimulator, vergleichbar dem Phytohämagglutinin für T-Zellen, ist noch nicht gefunden worden. In Zukunft müssen weitere Kultivierungsverfahren entwickelt und optimiert werden. Die Verwendung von konditioniertem Medium, vergleichbar dem in der vorliegenden Arbeit, kann dabei hilfreich sein. Eine gute zytogenetische Analyse setzt nach wie vor eine gute Chromosomenpräparation voraus. Diese muss bei Tumormaterial auch aus den neoplastischen Zellen hervorgehen. Die Entwicklung und Erweiterung von Kultivie-

rungsmethoden sollten eine gesicherte Chromosomenpräparation aus Tumorzellen zulassen. Dies kann möglicherweise durch eine Zellseparation vor der Chromosomenpräparation realisiert werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberini CM, Bet P, Milstein C, Sitia R: Secretion of immunoglobulin M assembly intermediates in the presence of reducing agents. *Nature* 347:485, 1990
- Anastasi J, Le Beau MM, Wardiman JW, Fernald AA, Larson RA, Rowley JD: Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. *Blood* 79:1796, 1992
- Andreeff M, Darzynkiewicz Z, Sharpless TK, Clarkson BD, Melamed MR: Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA. *Blood* 55:282, 1980
- Auer RL, Bienz N, Neilson J, Cai M, Waters JJ, Milligan DW, Fegan CD: The sequential analysis of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 104:742, 1999
- Autio K, Elonen E, teerenhovi L, Knuutila S: Cytogenetic and immunologic characterization of mitotic cells in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol* 39:289, 1987
- Baake M, Gilles A: Hämatologie. Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe. Gitz-Verlag, 1994
- Baker BW, Heighway J, Browett PJ, Norton JD: A polymerase chain-based method for detection of trisomy 12 in B chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 85:179, 1993
- Bannerji R, Byrd JC: Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion in Oncology* 12:22, 2000
- Bartl: Akute myeloische Leukämien; Klassifikation. Tumorzentrum München: URL: <http://www.krebsinfo.de>, 1997
- Bayani J et al. : Sequential G-banding, SKY and FISH provide a refined identification of translocation breakpoints and complex chromosomal rearrangements. *Elsevier Trends Journal Technical Tips Online* 2000: <http://www.biomednet.com/db/tto>
- Bayani J, Squire JA: Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping. *Clin Genet* 59:65, 2001
- Bayani JM, Squire JA: Applications of SKY in cancer cytogenetics. *Cancer Investigation* 20:373, 2002
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemias. *J Clin Pathol* 42:567, 1989
- Bentz M, Stilgenbauer S, Lichter P, Döhner H: Interphase FISH in chronic lymphoproliferative disorders and comparative genomic hybridisation in the study of lymphomas. *Haematologica* 84:102, 1999

- Bertini R, Howard OM, Dong HF, Oppenheim JJ, Bizzarri C, Sergi R, Caselli G, Pagliei S, Romines B, Wilshire JA, Mengozzi M, Nakamura H, Yodoi J, Pekkari K, Gurunath R, Holmgren A, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Ghezzi P: Thioredoxin, a redox enzyme released in infection inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes and T cells. *J Exp Med* 189:1, 1999
- Bienz N, Cardy DLN, Leyland MJ, Hulten MA: Trisomie 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: an evaluation of 33 patients by direct fluorescence in situ hybridization. *British Journal of Haematology* 85:819, 1993
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198, 1981
- Brittinger G, Hellriegel K-P, Hiddemann W: Chronische lymphatische Leukämie und Haarzellenleukämie. Diagnostik und Therapie. Empfehlungen einer Konsensustagung. *Med Klin* 92:309, 1997
- Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L: Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-colour FISH assay (M-TEL). *Nature Med* 7:496, 2001
- Brynes RK, McCourty A, Sun NC, Koo CH: Trisomy 12 in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukaemia. *Am J Clin Pathol* 104:199, 1995
- Buschle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK: Interferon γ inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *J Exp Med* 177:213, 1993
- Carlsson M, Matsson P, Rosén A, Sundström C, Tötterman TH, Nilsson K: Phorbol ester and B cell-stimulatory factor synergize to induce B-chronic lymphocytic leukaemia cells to simultaneous immunoglobulin secretion and DNA synthesis. *Leukemia* 2:734, 1988
- Carlsson M, Söderberg O, Nilsson K: Interleukin-4 (IL-4) enhances homotypic adhesion of activated B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells via a selective up-regulation of CD54. *Scand. J. Immunol.* 37:515, 1993
- Carlsson M, Sundström C, Bengtsson M, Tötterman TH, Rosén A, Nilsson K. *Eur J Immunol.* 19:913, 1989 I
- Carlsson M, Tötterman TH, Matsson P, Nilsson K: Cell cycle progression of B-chronic lymphocytic leukaemia cells induced to differentiate by TPA. *Blood* 71:415, 1988
- Carlsson M, Tötterman TH, Rosén A, Nilsson K. *Leukemia* 3:593, 1989 II
- Charrin C: del(5q) in myeloid malignancies. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*: URL : <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/del5qID1092.html>, 1998
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR: National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87:4990, 1996

- Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G: High resolution multicolour-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84:156, 1999
- CiCelle PF, Mariana S, Riera L, Staccini A, reato G, Foa R: Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood* 87:4382, 1996
- Clark EA, Ledbetter JA: How B and T cells talk to each other. *Nature* 367:425, 1994
- Collins R, Verschuer L, Harmon B, Prentice R, Pope J, Kerr J: Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 71:343, 1989
- Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AV, Reittie JE, Heslop HE, Vyakarnam A, Turner M, Meager A, Brenner MK: Tumor necrosis factor as an autocrine tumor growth factor of chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1:969, 1988
- Cremer T, Landegent J, Brückner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson PP, van der Ploeg M: Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 74:346, 1986
- Criel A, Verhoef G, Vlietinck R, Mecucci C, Billiet J, Michaux L, Meeus P, Louwagie A, Van Orshoven A, Van Hoof A, Boogaerts M, Van den Berghe H, De Wolf-Peeters C: Further characterization of morphologically defined and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br J Haematol* 97:383, 1997
- Criel A, Wlodarska I, Meeus P, Stul M, Louwagie A, Van Hoof A, Hidajat M, Mecucci C, Van den Berghe H: Trisomy 12 is uncommon in typical chronic lymphocytic leukemias. *Br J Haematol* 87:523, 1994
- Crossen PE, Horn HL: Origin of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Genet Cytogenet* 28:185, 1987
- Cuneo A, Bigoni R, Balboni M, Carli MG, Piva N, Fagioli F, Latorraca A, Wlodarska I, van den Berghe H, Castoldi G: Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia: a cytogenetic and interphase cytogenetic study. *Leuk lymphoma* 15:167, 1994
- Cuneo A, Wlodarska I, Sayed Ali M, Piva N, Carli MG, Fagioli F, Tallarico A, Pazzi I, Ferrari L, Cassiman JJ, Van den Berghe H, Castoldi GL: Nonradioactive in situ hybridisation for the detection and monitoring of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 81:192, 1992
- Dalla-Favera R: Molecular pathogenesis of CLL. *Ann Hematol* 77:A51, 1998
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM: Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7824, 1982

- Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M: Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukaemia cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* 176:1319, 1992
- Danersund A, Tötterman TH, Nilsson K, Egle-Jansson I, Kabelitz D, Sjöberg O: Phorbol ester induced differentiation of chronic B lymphocytic leukaemia cells – regulatory impact of autologous and allogenic accessory cells. *Clin. Exp. Immunol.* 59:644, 1985
- Deckwerth TL, Easton RM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Johnson EM: Placement of the Bcl-2 family member Bax in the death pathway of sympathetic neurons activated by trophic factor deprivation. *Exp. Neurol* 152:150-162, 1998
- De Toter D, di Celle PF, Cagnetti A, Foa R: The IL2-2 rezeptor complex: expression and function on normal and leukemic B cells. *Keukemia* 9:1425, 1995
- Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, Vermeesch JR, Meeus P, Stul M, Criel A, Verhoef G, Thomas J, Delannoy A, Louwagie A, Cassiman JJ, Mecucci C, Hagemeijer A, Van den Berghe H: FISH identifies different types of duplications with 12q13-15 as the commonly involved segment in B-cell lymphoproliferative malignancies characterized by partial trisomy 12. *Genes Chromosomes Cancer* 20:155, 1997
- Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, Volkmann M, Galle PR, Poustka A, Hunstein W, Lichter P: p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 85:1580, 1995
- Döhner H, Pohl S, Bulgay-Mörschel M, Stilgenbauer S, Bentz M, Lichter P: Detection of trisomy 12 in chronic lymphoid leukemias using fluorescence in situ hybridization. *Leukemia* 7:516, 1993
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leucemia. *N Engl J Med* 343:1910, 2000
- Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P: Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 77:266, 1999
- Döhner H, Stilgenbauer S, Fischer K, Bentz M, Lichter P: Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of B cell chronic lymphocytic leukemia. Specific chromosome aberrations identify prognostic subgroups of patients and point to loci of candidate genes. *Leukemia* 11:19, 1997
- Drach J: Interphasenzytogenetik mittels Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) in Huber H, Löffler H, Faber V: Methoden der diagnostischen Hämatologie. Springer Verlag; Seite 119-124, 1994
- Engel H: Empfehlung des Arbeitskreises Laboratorium der DGHO für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie: www.dgho.de/dgho/fish99.htm, 1999

- Esparza C, Romero A, Méndez R, Serrano A, Jurado M, Jiménez P, Ruiz-Capello F: Expansion of cells with trisomy 12 associated with progressive lymphocytosis and a dramatic change in chimera status in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 87:(07)ECR25, 2002
- Ericson M, Hörling J, Wendel-Hansen V, Holmgren A, Rosén A: Secretion of thioredoxin after in vitro activation of human B cells. *Lymphokine Cytokine Res* 11:201, 1992
- Fan YS, Siu VM, Jung JH, Xu J: Sensitivity of multi color spectral karyotyping in detection small interchromosomal rearrangements. *Genet Test* 4:9, 2000
- Fan YS, Rizkalla K: Comprehensive cytogenetic analysis including multicolour spectral karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridisation in lymphoma diagnosis: a summary of 154 cases. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 143:73, 2003
- Flaßhove M, Scheulen ME, Seeber S, Dührsen U, Schaefer UW: Akute myeloische Leukämie (AML) des Erwachsenen. *Innere Klinik – Tumorforschung*, www.uni-essen.de/tumorforschung/leitlinien-wtz/aml-ll.html, 2000
- Fluckiger AC, Durand I, Banchereau J: Interleukin 10 induces cell death of B-chronic lymphocytic leukaemia. *J Exp Med* 179:91, 1994
- Fonatsch C: Somatische Mutationen — Gen- und Chromosomendefekte bei sporadischen Tumoren. *Medgen* 14:98, 2002
- Fonatsch C, Krömer E: Myeloische Leukämien. *Medgen* 14:100, 2002
- Gahn B, Wendenburg B, Troff C, Neef J, Grove D, Haferlach T: Analysis of progenitor cell involvement in B-CLL by simultaneous immunophenotypic and genotypic analysis at the single cell level. *British Journal of Haematology* 105:955, 1999
- Gahrton G, Robèrt KH, Friberg K, Zech L, Bird AG: Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood* 56:640, 1980
- Garcia-Marco J, Matutes E, Morilla R, Ellis J, Oscier D, Fantes J, Catovsky D, Price CM: Trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia assessment of lineare restriction by simultaneous analysis of immunophenotype and genotype in interphase cells by fluorescence in situ hybridisation. *Br J Haematol* 87: 44, 1994
- Garcia-Marco JA, Price CM, Catovsky D: Interphase cytogenetics in chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Genet Cytogenet* 94:52, 1997
- Garcia-Marco JA, Price C, Ellis J, Morey M, Matutes E, Lens D, Colman S, Catovsky D: Correlation of trisomy 12 with proliferating cells by combined immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridisation in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 10:1705, 1996
- Garini Y, Macville M, Manoir S du, Buckwald RA, Lavi M, Katzir N, Wine D, Bar-Am I, Schröck E, Cabib D, Ried T: Spectral karyotyping. *Bioimaging* 4:65, 1996

- Geisler GH, Philip P, Christensen BE, Hou-Jensen K, Pedersen NT, Jensen OM, Thorling K, Andersen E, Birgens HS, Drivsholm A, Ellegaard J, Larsen JK, Plesner T, Brown P, Andersen PK, Hansen MM: In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients. *Leukemia Research* 21:1011, 1997
- Granzow M, Popp S, Keller M, Holtgreve-Grez H, Brough M, Schoell B, Rauterberg-Ruland I, Hager HD, Traiverdian G, Jauch A: Multiplex FISH telomere integrity assay identifies an unbalanced cryptic translocation der(5)t(3;5)(q27;p15.3) in a family with three mentally retarded individuals. *Hum Genet* 107:51, 2000
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36:93, 1984
- Groopman JE, Molina JM, Scaddon DT: Hematopoietic growth factors: Biology and clinical applications. *N Engl J Med* 321:1449, 1989
- Guan X-Y, Meltzer PS, Dalton WS, Trent JM: Identification of cryptic sites of DNA sequence amplification in human breast cancer by chromosome microdissection. *Nat Genet* 8:155, 1994
- Haas OA: Tumorzytogenetik. *Medgen* 11:369, 1999
- Hallek M, Bergmann M, Emmerich B: Chronische lymphatische Leukämie. *Deutsches Ärzteblatt* 99:A1294, 2002
- Hallek M, Kuhn-Hallek I, Emmerich B: Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 11:4, 1997
- Han T, Ozer H, Sadamori N, Emrich L, Gomez G.A., Henderson ES, Bloom ML, Sandberg AA: Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *New England Journal of Medicine* 310:288, 1984
- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed J: bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 82:1820, 1993
- Harder L, Grote W: Bedeutung der genetischen Diagnostik für die Klassifikation und Risikostratifizierung maligner Lymphome. *Medgen* 14:115, 2002
- Harder S, Siebert R, Grote W, Schlegelberger B: Bedeutung genetischer Aberrationen für die histopathologische und klinisch-prognostische Klassifikation maligner Lymphomen. *Medgen* 10:307, 1998
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17:3835, 1999
- Heim S, Mitelman F: *Cancer Cytogenetics* (2nd ed.). Wiley-Liss, New York, 1995

- Henegariu O, Heerema NA, Bray-Ward P, Ward DC: Colour-changing karyotyping: an alternative to M-FISH/SKY. *Nature Genet* 23:263, 1999
- Henegariu O, Artan S, Grealley JM, Chen XN, Korenberg JR, Vance GH, Stubbs L, Bray-Ward P, Ward DC: Cryptic translocation identification in human and mouse using several telomeric multiplex FISH (TM-FISH) strategies. *Lab Invest* 81:483, 2001a
- Henegariu O, Bray-Ward P, Artan S, Vance GH, Qumsyieh M, Ward DC: Small marker chromosome identification in metaphase and interphase using centromeric multiplex FISH (CM-FISH). *Lab Invest* 81:475, 2001b
- Heng HHQ, Ye CJ, Yang F, Ebrahim S, Liu G, Bremer SW, Thomas CM, Ye J, Chen TJ, Tuck-Muller C, Yu JW, Krawetz SA, Johnson A: Analysis of marker or complex chromosomal rearrangements present in pre- and postnatal karyotypes utilizing a combination of G-banding, spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridisation. *Clin Genet* 63:358, 2003
- Hilgenfeld E, Padilla-Nash H, Schröck E, Ried T: Analysis of B-cell neoplasias by spectral karyotyping (SKY). *Current topics in microbiology and immunology* 246:169, 1999
- Hjalmar V, Hast R, Kimby E: Sequential fluorescence in situ hybridisation analyses for trisomy 12 in chronic leukemic B-cell disorders. *Haematologica* 86:174, 2001
- Hjalmar V, Kimby E, Matutes E, Sundstrom C, Jacobsson B, Arvidsson I, Hast R: Trisomy 12 and lymphoplasmacytoid lymphocytes in chronic leukemic B-cell disorders. *Haematologica* 83:602, 1998
- Holmgren A: Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54:753, 1985
- Holmgren A, Björnstedt M: Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Meth Enzymol* 252:199, 1995
- Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD: Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer* 30:375, 2001
- Jahneway C.A., Travers P: Immunobiology. The Immune System in Health Disease. Current Biology Lfd., London/Garland Publishis Inc., New York, 1997
- Jehn: Sonderform der AML; Sekundäre Leukämien. Tumorzentrum München: <http://www.krebsinfo.de>, 1997
- Jewell AP, Worman CP, Lydyard PM, Yong KL, Giles FJ, Goldstone AH: Interferon-alfa up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Hematol* 88:268, 1994
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582, 1969
- Juliusson G, Gahrton G: Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 45:143, 1990

- Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, et al.: Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 323:720, 1990
- Kakazu N, Ashihara E, Hada S, Ueda T, Sasaki H, Terada M, Abe T: Development of spectral colour banding in cytogenetic analysis. *Lancet* 357:529, 2001
- Kakazu N, Bar-Am I, Hada S, Ago H, Abe T: A new chromosome banding technique, spectral color banding (SCAN), for full characterization of chromosomal abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 37:412, 2003
- Kakazu N, Taniaki M, Horiike S, Nishida K, Tatekawa T, Nagai M, Takahashi T, Akaogi T, Inazawa J, Ohki M, Abe T: Combined spectral karyotyping and DAPI banding analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 26:336, 1999
- Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E, Fracchiolla NS, Bonaldo MF, Lawton L, Jelenc P, Ye X, Qu X, Chien M, Hauptschein R, Gaidano G, Vitolo U, Saglio G, Resegotti L, Brodjansky V, Yankovsky N, Zhang P, Soares MB, Russo J, Edelman IS, Efstratiadis A, Dalla-Favera R, Fischer SG: Cloning and gene mapping of the chromosomes 13q14 region detected in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 42:369, 1997
- Kalil N, Cheson BD: Chronic lymphocytic leukemia. *The Oncologist* 4:352, 1999
- Katzenberger T, Lohr A, Ott MM, Kalla J, Rosenwald A, Müller-Hermelink HK, Ott G: Genetic and biological features define two types of follicular non-Hodgkin grade 3 lymphoma. *Verh Dtsch Ges Pathol* 84:153, 2000
- Karhu R, Ahlstedt-Soini M, Bittner M, Metzler P, Trent JM, Isola JJ: Chromosome arm-specific multicolor-FISH. *Genes Chrom Cancer* 30:105, 2001
- Karhu R, Tobin G, Thunberg U, Vilpo L, Sundström C, Knuutila S, Rosenquist R, Vilpo J: More expansive genetic alterations in unmutated than in hypermutated cases of chronic lymphocytic leukaemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 37:417, 2003
- Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek DF, Dewald GW, Byrd JC, Farag S, Lucas M, Lin T: Chronic lymphocytic leukemia. *Am Soc Hematol Educ Programm* 193, 2002
- Keinanen M, Bloomfield CD, Machnick J, Griffin JD, de la Chapelle A: Human bone marrow cytogenetics: Growth factors stimulate metaphase for specific lineages. *Leukemia* 3:405, 1989
- Kipps TJ: Chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion in Hematology* 7:223, 2000a
- Kipps TJ: Genetics of chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Cell Ther* 42:5, 2000b
- Kirchner H, Kruse A, Neustock P, Rink L: Cytokine und Interferone, Botenstoffe des Immunsystems. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin · Oxford, 1994
- Knauf WU, Knuutila S, Zeigmeister B, Thiel E: Trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with advanced diseases, atypical morphology, high level of sCD25 and refractoriness to treatment. *Leuk Lymphoma* 19:289, 1995

- Knuutila S: Morphology antibody chromosomes technique for determining phenotype and genotype of the same cell. In Boyle AL (ed): Current Protocols in Human Genetics /John Wiley & Sons, Madison 1996)
- Knuutila S: Lineage specificity in haematological neoplasms. *Br J Haematol* 96:2, 1997
- Knuutila S, Kovanen PE: Relative proportions of mitotic T and B cells in PHA-stimulated lymphocyte cultures. *Cancer Genet Cytogenet* 29:151, 1987
- Knuutila S, Teerenhovi L: Immunophenotyping of aneuploid cells. *Cancer Genet Cytogenet* 41:1, 1989
- Kobayashi R, Picchio G, Kirven M, Meisenholder G, Baird S, Carson DA, Mosier DE, Kipps TJ: Transfer of human chronic lymphocytic leukemia to mice with severe combined immune deficiency. *Leuk Res* 16:1013, 1992
- Koehler MR, Steinlein C, Schröck E, Yu V, Nanni M, Schmid M, Venkitaraman A, Calabrese G, Palka G, Bar-Am I, Garini Y: Spectral bioimaging in modern cytogenetics and pathology. *E.C.A. Newsletter* 4:3, 1999
- König A, Menzel T, Lynen S, Wrazel L, Rosen A, Al-Katib A, Raveche E, Gabrilove JL: Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia* 11:258, 1997
- Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter p, Döhner H, Stilgenbauer S: VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1410, 2002
- Lai JL, Zandecki M, Mary JY, Bernardi F, Izydorczyk V, Flactif M, Morel P, Jouet JP, Bauters F, Facon T: Improved cytogenetics in multiple myeloma: A study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 85:2490, 1995
- Lampert IA, Wotherspoon A, Van Noorden S, Hasserjian RP: High expression of CD23 in the proliferation centers of chronic lymphocytic leukaemia in lymph nodes and spleen. *Human Pathol* 30:648, 1999
- Langer S, Fauth C, Kraus J, Speicher MR: Vielfarben-Fluoreszenz in situ hybridisierung in der Kinderheilkunde. *Medgen* 13:191, 2001
- Larramendy ML, Siitonen SM, Zhu Y, Hurme M, Vilpo L, Vilpo JA, Knuutila S: Optimized mitogen stimulation induces proliferation of neoplastic B cells in chronic lymphocytic leukemia: significance for cytogenetic analysis. *Cytogenet Cell Genet* 82:215, 1998
- Larramendy ML, Peltomäki P, Salonen E, Knuutila S: Chromosomal abnormality limited to T4 lymphocytes in a patient with T-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol* 45:52, 1990
- Larsson LG, Carlsson M, Schena M, Lantz M, Caligaris-Cappio F, Nilsson K: Interleukin 2 enhances the production of tumor necrosis factor- α in activated B-type chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells. *Leukemia* 7:226, 1993
- Law C, Clark EA: Cell-cell interactions that regulate the development of B-lineage cells. *Curr. Opin. Immunol.* 6:238, 1994

- Lazaridou A, Miraxtsi C, Korantzis J, Eleftheriadis N, Christakis JI: Simultaneous detection of BCL-2 protein, trisomy 12, retinoblastoma and p53 monoallelic gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukaemia by fluorescence in situ hybridisation (FISH): relation to disease status. *Leukemia and Lymphoma* 36(5-6):503, 2000
- Le Beau MM: Deletions of chromosome 5 in malignant disorders. *Cancer Surv.* 15:143, 1992
- Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, Fletcher JO, Morton CC: Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet*: 68:1043, 2001
- Lichter P, Bentz M, Joos S: Detection of chromosomal aberrations by means of molecular cytogenetics: painting of chromosomes and chromosomal subregions and comparative genomic hybridisation. *Methods Enzymol* 254:334, 1995
- Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S: Comparative genomic hybridisation: uses and limitations. *Seminars in Hematology* 37:348, 2000
- Lichter P, Speicher MR: Die molekulare Zytogenetik: Konkurrenz, Ersatz oder Ergänzung der konventionellen Zytogenetik? *Medgen* 11:378, 1999
- Lichter P, Ried T: Molecular analysis of chromosome aberration; In situ hybridisation. *Methods in Molecular Biology; Chromosome Analysis Protocols* 29:449, 1994
- Lichter P, Ward DC: Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? *Nature* 345:93, 1990
- Liso V, Capalbo S, Lapietra A, Pavone V, Guarini A, Specchia G: Evaluation of trisomy 12 by fluorescence in situ hybridization in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 84:212, 1999
- Loiseau HA, Devilder MC, Garand R, Bouyge I, Rapp MJ, Milpied N, Harousseau JL, Moisan JP, Bataille R: 13q14 deletions are not primary events in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a study of 100 patients using fluorescence in situ hybridisation. *Clinical Cancer Research* 2:1673, 1996
- Ludwig W-D, Thiel E: Diagnostik der akuten Leukämien mit morphologischen, immunologischen und zytogenetischen Verfahren. *Internist* 34:498, 1993
- Macville M, Veldman T, Padilla-Nash H, Wangsa D, O'Brien P, Schröck E, Ried T: Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements. *Histochem Cell Biol* 108:299, 1997
- Malik Z, Cabib D, Buckwald RA, Talmi A, Garini Y, Lipson SG: Fourier transform multipixel spectroscopy for quantitative cytology. *J Microsc* 182:133, 1996
- Markovic VD, Bouman D, Bayani J, Al-Maghrabi J, Kamel-Reid S, Squire JA: Lack of BCR/ABL reciprocal fusion in variant philadelphia chromosome translocations: a use of double fusion signal FISH and spectral karyotyping. *Leukemia* 14:1157, 2000
- Martín-Subero JI, Chudoba I, Harder L, Gesk S, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Siebert R: Multicolor-FICTION: Expanding the possibilities of combined Morphologic, Immunophenotypic and genetic single cell analyses. *Am J Path* 161:413, 2002

- Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R: Interphase cytogenetics of hematological Neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Research* 23:1139, 2003
- Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky: Trisomy 12 defines a group of CLL with a atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 92:382, 1996
- Matutes E, Oscier D, Que TH, Marco JG, Ellis J, Brito-Babapulle V, Copplestone A, Glide S, Catovsky D: The spectrumj of B-cell disease with trisomy 12. A report of 80 cases. *Br J Haematol* 84 (Suppl. 1):13, 1993
- McConkey DJ, Aguilar-Santelises M, Hartzell P, Eriksson I, Mellstedt H, Orrenius S, Jondal M: Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukaemia cells. *J Immunol* 146:1072, 1991
- McMillan DN, Kernohan NM, Flett ME, Heys SD, Deehan DJ, Sewell HK, Walker F, Eremin O: Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localization in human solid tumor cells in situ and in vitro: evidence for a direct role in the regulation of tumor cell proliferation. *Int J Cancer* 60:766, 1995
- Mecuci C, Delannoy A, Van den Berghe H: The origin ot trisomy 12 in chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Genet Cytogenet* 36:203, 1988
- Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M: Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signalling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med* 77:282, 1999
- Melo JV: The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 10:751, 1996
- Michaux L: Plasma cell leukaemia (PCL). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 1997. <http://www.infobiogen.fr>
- Mitelman database: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Mitelman F: Tumor etiology and chromosome pattern: Evidence from human and experimental neoplasms. In: *Genes, Chromosomes and Neoplasia*. Stubblefield E, ed. Raven Press, New York, pp.335, 1981
- Mitelman F: *Catalog of chromosome aberrations in cancer* (ed.5). New York, Wiley-Liss, 1994
- Mohr B, Bornhauser M, Thiede C, Schakel U, Schaich M, Illmer T, Pascheberg U, Ehninger G: Comparson of spectral karyotyping and conventional cytogenetics in 39 patients with acute myeloid leukemia end myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 14:1031, 2000
- Morgan GJ, Pratt G: Modern molecular diagnostics and the management of haematological malignancies. *Clin.Lab.Haem.* 20:135, 1998
- Morgan R, Chen Z, Richkind K, Roherty S, Velasco J, Sandberg A: PHA/IL2: an efficient mitogen cocktail for cytogenetic studies of non-hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Genet Cytogenet* 109:134, 1999

- Morgan S, Poland-Johnson NK, Meloni-Balliet A, Morgan R: Methodology and experience in culturing and testing the GCT cell line for bone marrow cytogenetic improvement. *Karyogramm* 14:7, 1988
- Mould S, Gardiner A, Corcoran M, Oscier DG: Trisomy 12 and structural abnormalities of 13q14 occurring in the same clone in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 92:389, 1996
- Müller S, Rocchi M, Ferguson-Smith MA, Wienberg J: Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 100:271, 1997
- Müller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J: Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 33:445, 1998
- Nanjangud G, Rao PH, Hegde A, Teruya-Feldstein J, Donnelly G, Qin J, Jhanwar SC, Zeleznetz AD, Chaganti RSK: Spectral karyotyping identifies new rearrangements, translocations and clinical associations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 99:2554, 2002
- Navarro B, García-Marco J, Jones D, Price CM, Catovsky D: Association and clonal distribution of trisomy 12 and 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 102:1330, 1998
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T: A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolour-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108:199, 2001
- Nilsson J, Söderberg O, Nilsson K, Rosén A: Thioresoxin prolongs survival of B-type chronic lymphocytic leukaemia cells. *Blood* 95:1420, 2000
- Novak U, Oppliger Leibundgut E, Hager J, Mühlematter D, Jotterand M, Besse C, Leupin N, Ratschiller D, Papp J, Kearsy G, Aebi S, Graber H, Jaggi R, Lüthi JM, Meyer-Monard S, Lathrop M, Tobler A, Fey MF: A high-resolution allelotype of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 100:1787, 2002
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J: Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15:351, 1997
- Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132:1497, 1960
- Nylund S, Verbeek W, Larramendy ML, Ruutu T, Heinonen K, Hallman H, Knuutila S: Cell lineage involvement in four patients with myelodysplastic syndrome and t(1;7) or trisomy 8 studied by simultaneous immunophenotyping and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 70:120, 1993
- Oduncu F, Nerl C, Meinhardt G, Danhauser-Riedl S, Langenmayer I, Schneller F, Hallek M, Emmerich B: Lymphozytische Lymphome und Immunozytom. *Manual Maligne Lymphome by Tumorzentrum München* <http://www.krebsinfo.de>:57, 2000
- Oscier DG: Cytogenetics and molecular genetics of chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica* 84:88, 1999

- Oscier DG: Chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 105:1, 1999a
- Oscier DG, Gardiner AG, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ: Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 100:1177, 2002
- Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK: Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood* 89:4153, 1997
- Osorio LM, De Santiago A, Aguilar-Santelises M, Mellstedt H, Jondal M: CD6 ligation modulates the Bcl-2/Bax ratio and protects chronic lymphocytic leukaemia B cells from apoptosis induced by anti-IgM. *Blood* 89:2833, 1997
- Pachmann: Erweiterte Diagnostik; FISH-Technik. Tumorzentrum München: <http://www.krebsinfo.de>, 1997
- Paietta E, Racevskis J, Neuberg D, Rowe JM, Goldstone AH, Wiernik PH: Expression of CD25 (interleukin-2 receptor α chain) in adult acute lymphoblastic leukemia predicts for the presence of BCR/ABL fusion transcripts: results of a preliminary laboratory analysis of ECOG/MRC intergroup study E2993. *Leukemia* 11:1887, 1997
- Pardue ML, Gall JG: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:600, 1969
- Pérez Losada A, Wessman M, Tiainen M, Hopman AHN, Willard HF, Solé F, Caballín R, Woessner S, Knuutila S: Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukaemia: an interphase cytogenetic study. *Blood* 78:775, 1991
- Pittman S, Catovsky D: Prognostic significance of chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 58:649, 1984
- Powis G, Briehl M, Oblong J: Redox signalling and the control of cell growth and death. *Pharmacol Ther* 68:149, 1995
- Que TH, Marco JG, Ellis J, Matutes E, Babapulle VB, Boyle S, Catovsky D: Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization analysis by stage, immunophenotype and morphology. *Blood* 82:571, 1993
- Raghoebier S, Kibbelaar RE, Kleiverda JK, Kluin-Nelemans JC, van Krieken JHJM, Kok F, Kluin PM: Mosaicism of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by non-radioactive in situ hybridization. *Leukemia* 6:1220, 1992
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46:219, 1975
- Ried T, Schröck E, Ning Y, Wienberg J: Chromosome painting: a useful art. *Human Molecular Genetics* 7:1619, 1998
- Rieder H, Bradtke J: Was ist Zytogenetik? Kompetenznetz Leukämien <http://knm1.ibe.med.uni-muenchen.de/tumorzytogenetik/zytogenetik/zytogenetik.html>, 2002

- Reining G, Clodi K, König M, Geissler K, Haas OA, Mannhalter C: Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukaemia: comparison of a polymerase chain reaction based technique with fluorescence in situ hybridisation. *British Journal of haematology* 87:843, 1994
- Rosén A, Lundman P, Carlsson M, Bhavani K, Srinivasa BR, Kjellström G, Nilsson K, Holmgren A: A CD4⁺ T cell line-secreted factor, growth promoting for normal and leukemic B cells identified as thioredoxin. *International Immunology* 7:625, 1995
- Rosén A, Ugglä C, Szigeti R, Kallin B, Lindqvist C, Teuthen J: A T-helper cell x molt4 human hybridoma constitutively producing b-cell stimulatory and inhibitory factors. *Lymphokine research* 5:185, 1986
- Roth A, Glasmach A: chronisch lymphatische Leukämie. [www.lymphome.de/Info Lymphome/Literatur/PatInfos/PatInfo CLL.pdf](http://www.lymphome.de/Info/Lymphome/Literatur/PatInfos/PatInfo CLL.pdf), 2002
- Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290, 1973
- Rowley JD, Reshmi S, Carlson K, Roulston D: Spectral karyotyping analysis of T-cell acute leukaemia. *Blood* 93:2038, 1999
- Rozman C, Montserrat E: Chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 333:1052, 1995
- Rubin CM, Larson RA, Anastasi J, Winter JN, Thangavelu M, Vardiman J, Rowley JD, Le Beau MM: t(3;21)(q26;q22): A recurring chromosomal abnormality in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia. *Blood* 76:2594, 1990
- Rubin CM, Larson RA, Bitter MA, Carrino JJ, Le Beau MM, Diaz MO, Rowley JD: Association of a chromosomal translocation with the blast phase of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 70:1338, 1987
- Sadamori N, Han T, Minowada J, Cohen E, Sandberg AA: Chromosome studies in stimulated lymphocytes of B-cell chronic lymphocytic leukemias. *Hamatological Oncology* 1:243, 1983
- Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-Jenisch R, Metzke S, Joos S, Weber-Matthiesen K, Grote W, Schlegelberger B: Application of interphase fluorescence in situ hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphomas. *Blood* 91:984, 1998a
- Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-Jenisch R, Plendl H, Metzke S, Joos S, Zucca E, Weber-Matthiesen K, Roggero E, Grote W, Schlegelberger B: Application of interphase cytogenetics for the detection of t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol* 9:519, 1998b
- Schlegelberger B, Metzke S, Harder S, Zühlke-Jenisch R, Zhang Y, Siebert R: Classical and molecular cytogenetics of tumor cells. In Wegner R: *Diagnostic Cytogenetics*. Springer Verlag ISBN 3-540-64602-7:151, 1999
- Schlette E, medeiros LJ, Keating M, Lai R: CD79b expression in chronic lymphocytic leukemia. Association with trisomy 12 and atypical immunophenotype. *Arch Pathol Lab Med* 127:561, 2003

- Schoch C, Haferlach T: Zytogenetik. Manual Multiples Myelom by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München. <http://www.krebsinfo.de:74>, 2002
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494, 1996
- Schuffenhauer S: Klinische Zytogenetik – gestern, heute, morgen: Ein Überblick. *Medgen* 11:354, 1999
- Seong C, Delasalle K, Hayes K, Weber D, Dimopoulos M, Swankowski J, Huh Y, Glassman A, Champlin R, Alexanian R: Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *Br J haematol* 101:189, 1998
- Shahidi H, Leslie WT, Wool NL, Gregory SA: Transformation os chronic lymphocytic leukemia to immunoblastic lymphoma (Richter's syndrome). *Med Pediatr Oncol* 29:146, 1997)
- Siebert R, Matthiesen P, Harder L, Zhang Y, Borowski A, Zuhlke-Jenisch R, Metzke S, Joos S, Weber-Matthiesen K, Grote W, Schlegelberger B: Application of interphase fluorescence in situ Hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphomas. *Blood* 91:984, 1998
- Siebert R und Schlegelberger B: Combined immunophenotyping and interphase cytogenetics in malignant lymphomas: results from FICTION studies. *Rev Clin Exp Hematol* 4:41, 1997
- Silberstein DS, Ali MH, Baker SL, David JR: Human eosinophil cytotoxicity-enhancing factor: purification, physical characteristics and partial amino acid sequence of an active polypeptide. *J Immunol* 143:979, 1989
- Solé F, Woessner S, Perez-Losada A, Florensa L, Montero S, Asensio A, Besses C, Sans-Sabrafen J: Cytogenetic studies in seventy-six cases of B-chronic lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 93:160, 1997
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature genet* 12:368, 1996
- Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H: Genetics of chronic lymphocytic leukaemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 16:993, 2002
- Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P, Döhner H: Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Hematol* 76:101, 1998
- Stein H, Hiddemann W: Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome. *Deutsches Ärzteblatt* 96:C-2301, 1999
- Storck S, Henn W, Freiler A, Reichardt S, Zang K, Martin T: Molekularzytogenetische Analyse niedriggradiger Meningeome. 14. Tumorzytogenetische Arbeitstagung: Abstractband: 11, 2001

- Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Wakasugi H, Yodoi J: ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to Trx; possible involvement of thiol reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J* 8:757, 1989
- Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RPM, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk: New strategy for multicolour fluorescence in situ hybridisation: COB-RA: Combined Binary Ratio labelling. *European J Hum Genet* 7:2, 2000
- Tonon G, Roschke A, Stover K, Shou Y, Kuehl WM, Kirsch IR: Spectral karyotyping combined with locusspecific FISH simultaneously defines genes and chromosomes involved in chromosomal translocations. *Genes Chromosomes Cancer* 27:418, 2000
- Tötterman TH, Nilsson K, Sundström C: Phorbol ester induced differentiation of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Nature* 288:176, 1980
- Traut W: „Chromosomen“. Springer-Verlag, 1991
- Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer JR: Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* 86:4250, 1995
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD: The world health organisation (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100:2292, 2002
- Veldman T, Vignon C, Schröck E, Rowley JD, Ried T: Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet* 15:406, 1997
- Vesole DH, Tricot G, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Bracy D, Miller L, Cheson B, Crowley J, Barlogie B: Autotransplant in multiple myeloma: What have we learned? *Blood* 88:838, 1996
- Vincent A, Cawley J, Buthem J: Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 87:4780, 1996
- Vogelstein B und Kinzler KW: The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9: 138, 1993
- Wakasugi N, Tagaya Y, Wakasugi H, Mitsui A, Maeda M, Yodoi J, Trusz T: Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin a and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8282, 1990
- Wason D, Richkind KE: The use of giant cell tumor conditioned media in cytogenetic studies of hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 61:126, 1992
- Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Müller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W: Rapid immunophenotypic characterization of chromosomally aberrant cells by the new FICTION method. *Cytogenet Cell Genet* 63:123, 1993b

- Weber-Matthiesen K, Deeberg J, Poetsch M, Grote W, Schlegelberger B: Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analysed cases of Hodgkin's disease. *Blood* 86:1464, 1995
- Weber-Matthiesen K, Deerberg-Wittram J, Rosenwald A, Poetsch M, Grote W, Schlegelberger B: Translocation t(2;5) is not a primary event in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 149:463, 1996
- Weber-Matthiesen K, Pressl S, Schlegelberger B, Grote W: Combined immunophenotyping and interphase cytogenetics on cryostat section by the new FICTION-method. *Leukemia* 7:646, 1993a
- Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Müller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W: Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem* 40:171, 1992
- Weh HJ, Gutensohn K, Selbach J, Kruse R, Wacker-Backhaus G, Seeger D, Fiedler W, Fett W, Hossfeld DK: Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukaemia. *Eur J Cancer* 29A:1269, 1993
- Wiegant J, Bezrookove V, Rosenberg C, Tanke HJ, Raap AK, Zhang H, Bittner M, Trent JM, Meltzer P: Differentially painting human chromosome arms with combined binary ratio-labeling fluorescence in situ hybridisation. *Genome Res* 10:861, 2000
- Woessner S, Solé F, Pérez-Losada A, Florensa L, Vilá RM: Trisomy 12 is a rare cytogenetic finding in typical chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* 20(5):369, 1996
- Wollman EE, d'Auriol L, Rimsky L, Shaw A, Jacquot JP, Wingfield P, Graber P, Dessarps F, Robin P, Galibert F, Bertoglio J, Fradelizi D: Cloning and expression of a cDNA for human Trx. *J Biol Chem* 263:15506, 1988
- Yodoi J, Trusz T: ADF, a growth-promoting factor derived from adult T cell leukemia and homologous to thioredoxin: involvement in lymphocyte immortalization by HTLV-I and EBV. *Adv Cancer Res* 57:381, 1991
- Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS: Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *British Journal of Haematology* 109:794, 2000
- Zhang Y, Poetsch M, Weber-Matthiesen K, Rohde K, Winkemann M, Haferlach T, Gassmann W, Ludwig WD, Grote W, Löffler H, Schlegelberger B: Secondary acute leukaemias with 11q23 rearrangement: clinical, cytogenetic, FISH and FICTION studies. *Br J Haematol* 92:673, 1996
- Zhang Y, Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Theile M, Scherneck S, Schlegelberger B: Feasibility of simultaneous fluorescence immunophenotyping and fluorescence in situ hybridization study for the detection of estrogen receptor expression and deletions of the estrogen receptor gene in breast carcinoma cell lines. *Virchows Arch* 436:271, 2000
- Zhao L, Hayes K, Zebunnisa K, Glassman A: Spectral karyotyping study of chromosome abnormalities in human leukaemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 127:143, 2001

Zietz C, Fend F, Permanetter W, Wiebecke B: Pathologisch-anatomische Grundlagen maligner Lymphome. Manual Maligne Lymphome by Tumorzentrum München <http://www.krebsinfo.de>:9, 2000

Zwiebel JA, Cheson BD: Chronic lymphocytic leukaemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol* 25:42, 1998

8 WERDEGANG

Katrin Kießner

Geboren: 17.12.1970, Mainz

Wohnhaft in: 67655 Kaiserslautern; Kerststr. 20

Werdegang:

1977 - 1981	Grundschule
1981 - 1987	Realschule in Annweiler am Trifels Abschluss: mittlere Reife
1987 - 1988	Freiwilliges soziales Jahr im Vinzentius-Krankenhaus in Landau/Pfalz
1988 - 1991	Berufsausbildung zur Biologisch-Technischen-Assistentin (BTA) am Naturwissenschaftlichen Technikum Landau/Pfalz Abschluss: BTA
April 1991 - Dez. 1991	Tätig als BTA (ganztags) am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München/Neuherberg Abteilung: zentrales Laserlaboratorium
Jan. 1992 - Dez. 1994	Besuch einer Abendschule zur Vorbereitung auf das Abitur an der Volkshochschule in Neustadt/Weinstraße Abschluss: allgemeine Hochschulreife
Mai 1992 - Juli 1994	Tätig als BTA (ganztags) am Städtischen Klinikum Ludwigshafen/Rhein Abteilung: medizinische Mikrobiologie
März 1995 - Juli 1998	Tätig als BTA (halbtags) an der Technischen Universität Kaiserslautern Abteilung: Humanbiologie und Humangenetik Schwerpunkt: Durchflusszytometrie (03/95 – 07/96) Zytogenetische Diagnostik (08/96 – 06/98)
Okt. 1995 - Dez. 1999	Diplomstudiengang Biologie an der Technischen Universität Kaiserslautern (Hauptfach: Humanbiologie) Thema der Diplomarbeit: Nachweis der Inversion 16 mit Hilfe von Fluoreszenz in situ Hybridisierung und reverser Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion in humanen Leukämiezellen Abschluss: Diplom-Biologin

- Sept. 1998 - März 2000** Tätig als wissenschaftliche Hilfskraft an der Technischen Universität Kaiserslautern
Abteilung: Humanbiologie und Humangenetik
(Schwerpunkt: Lehre)
- Tätig als BTA (Teilzeit) am Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserslautern
Abteilung: Zytogenetische Diagnostik
- Seit Januar 2000** Promotion an der Technischen Universität Kaiserslautern
Abteilung: Humanbiologie und Humangenetik
Thema der Dissertation:
Untersuchungen zur Verbesserung der zytogenetischen Diagnostik bei Lymphomen und Leukämien
- April 2000 - Sept. 2001** Gewährung eines Stipendiums nach dem Landesgraduier-
tenförderungsgesetz in Rheinland-Pfalz
- Okt. 2001 - Okt. 2002** Tätig als Biologin (ganztags) am Institut für Immunologie
und Genetik in Kaiserslautern
Abteilung: Zytogenetische Diagnostik
- Seit Nov. 2002** Teilzeit-Erziehungsurlaub
Tätig als Biologin (Teilzeit) am Institut für Immunologie
und Genetik in Kaiserslautern
Abteilung: Zytogenetische Diagnostik

9 VERÖFFENTLICHUNGEN

Posterbeitrag und Abstract bei der Posterpräsentation des Schwerpunktes MNT (Medizin, Naturwissenschaften und Technik) am 09.12.2000 in Kaiserslautern

Kießner K, Zankl H, Hagmann FG, Link H: Einsatz der FICTION- und SKY-Technik in der Tumorzytogenetik. Abstract im Posterpräsentationsband des MNT 2000, Seite 27

Posterbeitrag auf dem 45. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft vom 08.-10. März 2001

Kießner K, Zankl H, Hagmann FG, Link H: Einsatz und klinische Bedeutung neuer molekulargenetischer und zytogenetischer Techniken in der Tumordiagnostik

Abstract im Abstractband der 15. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung vom 25.-27.04.2002 bei München

Kießner K, Zankl H: Neue Kultivierungsverfahren für B-Non-Hodkin-Lymphome. Abstractband der 15. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung bei München 2002, Seite 35

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit ausschließlich mit den angegebenen Mitteln und von mir selbst erarbeitet sowie verfasst wurde.

Katrin Kießner

Kaiserslautern, im Februar 2004