

**Hochauflösende Array-CGH-Analysen zum Nachweis  
submikroskopischer Aberrationen bei  
Myelodysplastischen Syndromen (MDS)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Anne Pölitz**  
aus Leverkusen

Düsseldorf, Mai 2010

aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf  
(Institutsdirektorin: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Royer-Pokora)

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora

Koreferent: Prof. Dr. Martin Beye

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2010

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | <b>Myelodysplastische Syndrome (MDS)</b>                        | <b>1</b>  |
| 1.1.1    | Geschichtliches   | 1         |
| 1.1.2    | Epidemiologie, klinisches Bild und Diagnostik                   | 2         |
| 1.1.3    | Klassifikationssysteme und Prognosegruppen                      | 4         |
| 1.2      | <b>Zytogenetik bei MDS</b>                                      | <b>7</b>  |
| 1.3      | <b>Prognostische Bedeutung von zytogenetischen Aberrationen</b> | <b>8</b>  |
| 1.4      | <b>Molekularzytogenetik</b>                                     | <b>9</b>  |
| 1.5      | <b>Weiterentwicklung der Techniken zur Aberrationsdetektion</b> | <b>10</b> |
| 1.5.1    | Komparative genomische Hybridisierung (CGH)                     | 11        |
| 1.5.2    | Spektrale Karyotypisierung (SKY)                                | 11        |
| 1.5.3    | Klon- und SNP-Array-CGH   | 12        |
| 1.6      | <b>60-mer-Oligonukleotid-basierte aCGH</b>                      | <b>14</b> |
| 1.7      | <b>Genomische Kopienzahlvarianten (CNVs)</b>                    | <b>15</b> |
| 1.8      | <b>Ziel der Arbeit</b>  | <b>16</b> |
| <b>2</b> | <b>Material</b>   | <b>18</b> |
| 2.1      | <b>Puffer und Lösungen</b>                                      | <b>18</b> |
| 2.2      | <b>Enzyme, Kits und Fluoreszenzfarbstoffe</b>                   | <b>18</b> |
| 2.3      | <b>Sonstiges Material und kommerzielle Reagenzien</b>           | <b>21</b> |
| 2.4      | <b>Größen- und Konzentrationsmarker</b>                         | <b>22</b> |
| 2.5      | <b>BACs und PACs für FISH-Sonden</b>                            | <b>22</b> |
| 2.6      | <b>Kommerzielle FISH-Sonden</b>                                 | <b>24</b> |
| 2.7      | <b>Verwendete Mikroarrays</b>                                   | <b>24</b> |
| 2.8      | <b>DHPLC</b>  | <b>25</b> |
| 2.9      | <b>Software und Internettools</b>                               | <b>25</b> |
| 2.10     | <b>Geräte</b>   | <b>26</b> |
| 2.11     | <b>Primer</b>   | <b>27</b> |
| <b>3</b> | <b>Patienten</b>  | <b>30</b> |
| 3.1      | <b>105-Patienten-Kollektiv</b>                                  | <b>30</b> |
| 3.2      | <b>Patientenproben</b>  | <b>30</b> |
| <b>4</b> | <b>Methoden</b>   | <b>35</b> |
| 4.1      | <b>Oligonukleotidmikroarray-basierte CGH-Analysen</b>           | <b>35</b> |
| 4.1.1    | DNA-Isolation   | 36        |
| 4.1.1.1  | DNA-Isolation aus fixierten Leukozyten                          | 36        |
| 4.1.1.2  | DNA-Isolation aus kryokonservierten Knochenmarkzellen           | 37        |
| 4.1.2    | Aufkonzentrierung der DNA mittels Natriumacetat-Ethanol-Fällung | 37        |
| 4.1.3    | Restriktion der genomischen DNA                                 | 38        |

---

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 4.1.4       | Fluoreszenzmarkierung der DNA mittels 'random-priming'               | 38        |
| 4.1.5       | Aufreinigung der markierten DNA                                      | 39        |
| 4.1.6       | Bestimmung der Spezifischen Aktivität und der Ausbeute (NanoDrop)    | 40        |
| 4.1.7       | Vorbereitung der Proben und Hybridisierung auf dem Array             | 40        |
| 4.1.8       | Waschen der Mikroarrays  | 41        |
| 4.1.9       | Scannen und Feature Extraction                                       | 41        |
| 4.1.10      | Array-Auswertung   | 42        |
| <b>4.2</b>  | <b>FISH</b>  | <b>43</b> |
| 4.2.1       | Objektträgervorbehandlung und Präparatherstellung                    | 43        |
| 4.2.2       | FISH mit kommerziellen Fluoreszenzsonden                             | 44        |
| 4.2.3       | FISH mit BAC-Sonden  | 44        |
| 4.2.3.1     | Bakterienkultur und Glycerinstock                                    | 45        |
| 4.2.3.2     | Plasmidpräparation   | 45        |
| 4.2.3.3     | Indirekte Markierung von BAC-DNA                                     | 46        |
| 4.2.3.4     | Fällung und Hybridisierung der indirekt markierten Sonde             | 47        |
| 4.2.3.5     | Sondendetektion und Präparatwaschung                                 | 48        |
| <b>4.3</b>  | <b>PCR-Varianten</b>   | <b>49</b> |
| 4.3.1       | Singleplex- und multiplex-PCR  | 49        |
| 4.3.2       | 'Long range'- bzw. Deletions-spezifische PCR                         | 50        |
| 4.3.3       | Touchdown-PCRs   | 50        |
| <b>4.4</b>  | <b>Quantitative real-time PCR (qPCR)</b>                             | <b>51</b> |
| 4.4.1       | Primerdesign   | 51        |
| 4.4.2       | Primeretablierung mittels Temperaturgradienten-PCR                   | 52        |
| 4.4.2.1     | Primeroptimierung mittels qPCR                                       | 52        |
| 4.4.3       | qPCR-Durchführung und -Auswertung                                    | 53        |
| 4.4.4       | Umrechnung von Array- $\log_2$ Ratio, qPCR-Ratio und FISH-Zellanteil | 54        |
| <b>4.5</b>  | <b>Mutationsanalyse (DHPLC)</b>                                      | <b>54</b> |
| 4.5.1       | Theoretische Bestimmung der Schmelztemperaturen                      | 55        |
| 4.5.2       | Probenvorbereitung und Beurteilung der Kontroll-DNAs                 | 55        |
| <b>4.6</b>  | <b>'Custom'-Array-Design</b>   | <b>56</b> |
| 4.6.1       | 'Custom'-Array1-Design   | 56        |
| 4.6.2       | 'Custom'-Array2-Design   | 57        |
| <b>4.7</b>  | <b>T-Zell-Separation mittels MACS</b>                                | <b>58</b> |
| 4.7.1       | T-Zell-Positivselektion (MACS)                                       | 58        |
| 4.7.2       | Durchflusszytometrie mittels FACS                                    | 59        |
| <b>4.8</b>  | <b>Weitere molekularbiologische Methoden</b>                         | <b>60</b> |
| 4.8.1       | Gelelektrophoresen   | 60        |
| 4.8.2       | Gelextraktionen  | 60        |
| 4.8.3       | PCR-Produktaufreinigungen  | 61        |
| 4.8.4       | DNA-Konzentrationsmessung mittels NanoDrop                           | 61        |
| 4.8.5       | Sequenzierreaktion und Gelauftrag                                    | 61        |
| <b>4.9</b>  | <b>Sequenzanalysen</b>   | <b>62</b> |
| <b>4.10</b> | <b>MLPA</b>  | <b>62</b> |
| <b>5</b>    | <b>Ergebnisse</b>  | <b>64</b> |
| 5.1         | Array-CGH-Analysen bei MDS – Qualität und Technik                    | 65        |
| 5.2         | Auswahl rekurrent auftretender Aberrationen                          | 68        |
| 5.2.1       | 7q22-Deletionen bei drei Patientenproben (P15, P70, P100)            | 68        |

---

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 5.2.1.1    | Identifizierung der Deletionen – detailliertes Vorgehen bei der aCGH..... | 69         |
| 5.2.1.2    | Theoretische Charakterisierung der Deletionen – Datenbankrecherche ..     | 73         |
| 5.2.1.3    | Verifizierung der Deletionen – FISH .....                                 | 74         |
| 5.2.1.4    | Verifizierung der Deletionen – qPCR.....                                  | 76         |
| 5.2.1.5    | Molekulare Charakterisierung – 'custom'-Array1 und 2 .....                | 80         |
| 5.2.1.6    | Molekulare Charakterisierung – 'long range'-PCR.....                      | 81         |
| 5.2.1.7    | Zusatzaberrationen bei Patienten mit 7q22-Deletion.....                   | 82         |
| 5.2.2      | 5q31-Deletionen bei zwei Patientenproben (P52, P100) .....                | 83         |
| 5.2.2.1    | Identifizierung der Deletionen – aCGH .....                               | 83         |
| 5.2.2.2    | Verifizierung der Deletionen – FISH .....                                 | 84         |
| 5.2.2.3    | Verifizierung der Deletionen – qPCR.....                                  | 85         |
| 5.2.2.4    | Molekulare Charakterisierung – 'custom'-Array2 und 'long range'-PCR ...   | 85         |
| 5.2.2.5    | Zusatzaberrationen bei Patienten mit 5q-Deletion.....                     | 86         |
| 5.2.3      | 21q22-Deletionen bei zwei Patientenproben (P24, P39) .....                | 86         |
| 5.2.3.1    | Identifizierung der Deletionen – aCGH .....                               | 86         |
| 5.2.3.2    | Verifizierung der Deletionen – FISH .....                                 | 87         |
| 5.2.3.3    | Molekulare Charakterisierung – 'custom'-Array1 und 'long range'-PCR ...   | 88         |
| 5.2.3.4    | Bruchpunktbestimmung .....  | 89         |
| 5.2.3.5    | Zusatzaberrationen bei Patienten mit 21q22-Deletion.....                  | 90         |
| 5.2.4      | 4q24-Deletionen bei zwei Patientenproben (P40, P41) .....                 | 90         |
| 5.2.4.1    | Identifizierung der Deletionen – aCGH.....                                | 91         |
| 5.2.4.2    | Verifizierung der Deletionen – FISH .....                                 | 91         |
| 5.2.4.3    | <i>TET2</i> -Genstruktur.....   | 92         |
| 5.2.4.4    | Verifizierung der Deletionen – qPCR.....                                  | 92         |
| 5.2.4.5    | Molekulare Charakterisierung – 'custom'-Array2 und 'long range'-PCR ...   | 93         |
| 5.2.4.6    | Bruchpunktbestimmung.....   | 93         |
| 5.2.4.7    | <i>TET2</i> -Mutationsanalyse von insgesamt 9 Patienten – DHPLC.....      | 94         |
| 5.2.4.8    | Zusatzaberrationen bei Patienten mit 4q24-Deletion.....                   | 96         |
| <b>5.3</b> | <b>Optimierung des Datenmanagements.....</b>                              | <b>96</b>  |
| <b>5.4</b> | <b>Weitere mit aCGH verifizierte Aberrationen.....</b>                    | <b>99</b>  |
| 5.4.1      | Komplex aberranter Fall (P79).....  | 99         |
| 5.4.2      | Kleine Aberrationen (P72, P38, P11).....                                  | 101        |
| <b>5.5</b> | <b>Bruchpunktidentifizierungen, Gene und Sequenzanalysen .....</b>        | <b>102</b> |
| <b>5.6</b> | <b>Vergleichsanalysen.....</b>  | <b>107</b> |
| 5.6.1      | aCGH-Vergleich mit DNA aus unkultivierten Zellen.....                     | 107        |
| 5.6.1.1    | DNA aus kryokonservierten Zellen vor Kultivierung (5 Patienten) .....     | 107        |
| 5.6.1.2    | DNA aus frischem Knochenmark vor Kultivierung (P25, P49).....             | 111        |
| 5.6.2      | Vergleich der beiden verwendeten Algorithmen ADM-2 und GLAD.....          | 112        |
| <b>5.7</b> | <b>Etablierung der Separation CD3-positiver Zellen .....</b>              | <b>117</b> |
| <b>5.8</b> | <b>Falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse .....</b>               | <b>118</b> |
| 5.8.1      | Mit FISH und qPCR nicht zu verifizierende Aberrationen .....              | 118        |
| 5.8.2      | Mit MLPA nicht zu verifizierende Aberrationen .....                       | 119        |
| <b>5.9</b> | <b>Zusammenfassung der verifizierten Imbalancen .....</b>                 | <b>120</b> |
| <b>6</b>   | <b>Diskussion.....</b>  | <b>125</b> |
| <b>6.1</b> | <b>Array-CGH-Analysen bei MDS .....</b>                                   | <b>125</b> |
| <b>6.2</b> | <b>Rekurrent auftretende Aberrationen.....</b>                            | <b>127</b> |
| 6.2.1      | 7q22-Deletionen bei drei Patienten (P15, P70, P100) .....                 | 127        |
| 6.2.2      | 5q31-Deletionen bei zwei Patienten (P52, P100) .....                      | 134        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 6.2.3      | 21q22-Deletionen bei zwei Patienten (P24, P39) .....                         | 137        |
| 6.2.4      | 4q24-Deletionen bei zwei Patienten (P40, P41) .....                          | 140        |
| <b>6.3</b> | <b>Weitere aufgedeckte Aberrationen und ihre Interpretation .....</b>        | <b>144</b> |
| <b>6.4</b> | <b>CNVs, genomische Architektur und trunkierte Gene.....</b>                 | <b>145</b> |
| 6.4.1      | Homologien, Sequenzmotive und Chromosomeninstabilität.....                   | 147        |
| 6.4.2      | Trunkierte Gene.....   | 149        |
| <b>6.5</b> | <b>Qualitätssicherung der Daten, u. a. durch Vergleichsanalysen.....</b>     | <b>150</b> |
| 6.5.1      | Vergleich der verwendeten Auswertealgorithmen.....                           | 150        |
| 6.5.2      | Vergleichsexperimente mit DNA aus kultivierten und unkultivierten Zellen ... | 152        |
| 6.5.3      | Nicht verifizierbare Arrayresultate.....                                     | 153        |
| <b>6.6</b> | <b>Ausblick zu Diagnostik und Pathogenese bei MDS .....</b>                  | <b>153</b> |
| <b>7</b>   | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>156</b> |
| <b>8</b>   | <b>Abstract .....</b>  | <b>157</b> |
| <b>9</b>   | <b>Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>158</b> |

**Danksagung**

**Eidesstattliche Erklärung**

**Lebenslauf**

**Anhang**

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |               |  |
|-------------------|---|---------------|--|
| A, C, G, T        | Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin                         | <i>EcoRI</i>  | Restriktionsendonuklease                                 |
| %CV               | coefficient of variation                                | EDTA          | Ethylendiamintetraessigsäure                             |
| µl / ml / dl / l  | Mikro- / Milli- / Dezi- / Liter                         | EtBr          | Ethidiumbromid   |
| A <sub>260</sub>  | Absorption bei 260 nm                                   | EtOH          | Ethanol  |
| Abb.              | Abbildung   | FA            | Formamid (deionisiertes)                                 |
| aCGH              | array-based comparative genomic hybridisation           | FAB           | french american british system                           |
| ADM-2             | aberration detection method-2                           | FACS          | fluorescence activated cell sorting                      |
| ALU               | SINE (von <i>AluI</i> )                                 | FAM           | 6-carboxyfluorescein                                     |
| AML               | Akute Myeloische Leukämie                               | FE            | feature extraction software                              |
| <i>aqua dest.</i> | destilliertes Wasser                                    | FISH          | Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung                |
| AU                | anson units   | FITC          | Fluorescein  |
| BAC               | bacterial artificial chromosome                         | FKS           | fetales Kälberserum                                      |
| bp / kb / Mb      | Basenpaare / Kilo- / Mega-                              | FoSTeS        | fork stalling and template switching                     |
| BSA               | bovine serum albumine                                   | gen / genom   | genomisch  |
| CC                | classical cytogenetic                                   | ges.          | gesamt   |
| CD                | cluster of differentiation                              | GLAD          | gain and loss analysis of DNA                            |
| cDNA              | complementary DNA                                       | GTG           | G-bands by trypsin using giemsa                          |
| CDR               | common deleted region                                   | GW            | genomic workbench software                               |
| Chr.              | Chromosom   | HD            | high definition  |
| CML               | Chronische Myeloische Leukämie                          | HDACi         | Deacetylase-Inhibitoren                                  |
| CMML              | Chronische Myelomonozytäre Leukämie                     | int           | intermediär  |
| CMPE              | Chronische Myeloproliferative Erkrankung                | Inter / Meta  | Inter- / Metaphasen                                      |
| CNV               | copy number variant (hier: im Sinne von Polymorphismus) | inv / iso     | Inversion / Isochromosom                                 |
| CpG               | Cytosin-phosphatidyl-Guanin                             | IPSS          | international prognostic scoring system                  |
| Cy3 / 5           | Cyanin3 / 5   | ISCN          | international system for human cytogenetic nomenclature  |
| DAPI              | 4,6-diamidin-2-phenylindol                              | <i>JAK2</i>   | <i>janus kinase 2</i> (Tyrosinkinase)                    |
| del(5q)           | 5q-Deletion   | KM            | Knochenmark  |
| DGV               | database of genomic variants                            | KMT           | Knochenmarkstransplantation                              |
| DIG               | Digoxigenin   | Konz. / konz. | Konzentration / konzentriert                             |
| DLRS              | derivative of log <sub>2</sub> ratio spread             | LB            | Luria Bertani Medium                                     |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                                  | LCR           | low complexity repeat                                    |
| <i>DNaseI</i>     | Desoxyribonuklease                                      | LINES         | long interspersed nuclear elements                       |
| DNMT              | DNA-Methyltransferase                                   | LOH           | loss of heterozygosity                                   |
| dNTP              | Desoxyribonukleotid-Triphosphat                         | Lsg.          | Lösung   |
| ds / ssDNA        | doppel- / einzelsträngige DNA                           | LTR           | long terminal repeat                                     |
| DTT               | Dithiothreitol  | mar           | Markerchromosom  |
| dUTP              | Deoxyuridin-Triphosphat                                 | m / sqPCR     | multiplex/semiquantitat. PCR                             |
| E / I             | Exon / Intron   | M             | molar (mol/l); 1 mol = 6,022 x 10 <sup>23</sup> Teilchen |
| <i>E. coli</i>    | <i>Escherischia coli</i>                                | MACS          | magnetic cell sorting                                    |

|              |   |                 |   |
|--------------|---|-----------------|---|
| MDS          | Myelodysplastische Syndrome   | RNA             | Ribonukleinsäure  |
| MDS/MPD      | Myelodysplastische/ -proliferative Erkrankungen                             | RNase           | Ribonuklease  |
| MG / MW      | Molekulargewicht  | ROX             | 6-carboxy-X-rhodamine                                     |
| MMBIR        | microhomology-mediated break-induced replication                            | RP11            | Biobliotheksbezeichnung genomische DNA-Bank (BAC)         |
| MMEJ         | microhomology-mediated end joining  | rpm / upm       | Umdrehungen pro Minute                                    |
| mRNA         | messenger RNA (Boten-RNA)   | RPMI 1640       | Zellkulturmedium  |
| NaAc         | Natriumacetat (3 M, pH 5,2)   | RS              | Ringsideroblasten   |
| NaCl / KCl   | Natrium-/ Kaliumchlorid   | RT              | Raumtemperatur  |
| NAHR         | non-allelic homologous recombination  | sAML            | sekundäre AML (nach MDS)                                  |
| NaOH         | Natriumhydroxid (Natronlauge)   | SDS             | Sodium-Dodecylsulfat                                      |
| NHEJ         | non-homologous end joining  | SDS2.2          | sequence detection system 2.2                             |
| NP-40        | Nonidet P40 Detergenz   | SINES           | short interspersed nuclear elements                       |
| NS / AS      | Nuklein- / Aminosäure   | SNP             | single nucleotide polymorphism                            |
| oB           | ohne Befund   | SSC             | saline sodium citrate                                     |
| Oligos       | Oligonukleotide   | Statistik R     | Programmiersprache  |
| OMIM         | online mendelian inheritance in man   | t               | Translokation   |
| OT           | Objektträger (evtl. Präparat)   | TAE             | Tris-Acetic-EDTA-Puffer                                   |
| PX           | Patient (-enprobe)  | Taq             | <i>Thermus aquaticus</i>                                  |
| PAC          | P1 artificial chromosome  | TBE             | Tris-Borat-EDTA-Puffer                                    |
| p-Arm        | kurzer Chromosomenarm   | TD              | touchdown (PCR)   |
| PB           | peripheres Blut   | TE              | Tris-EDTA-Puffer  |
| PBSZT        | periphere Blutstammzell-Transplantation                                     | T <sub>m</sub>  | Schmelztemperatur   |
| PCR          | Polymerase-Kettenreaktion   | Tris            | Trishydroxymethyl-aminomethan                             |
| pg / ng / µg | Nano- / Pico- / Microgramm  | txt / tif-Datei | Text- / Bilddatei   |
| pH           | <i>potentia hydrogenii</i>  | U               | unit (Enzymmengen-Einheit)                                |
| ppb          | parts per billion (Ozoneinheit)   | ÜN              | über-Nacht  |
| q / rtPCR    | quantitative / real time PCR  | UPD             | uniparentale Disomie                                      |
| q-Arm        | langer Chromosomenarm   | UV              | ultraviolett (Licht)                                      |
| QC           | quality control (software)  | VP              | Verlaufspröbe   |
| RA           | Refraktäre Anämie   | Vol.            | Volumen   |
| RAEB-1       | Refraktäre Anämie mit Blastenexzess Typ 1                                   | WHO             | world health organization (2. MDS-Klassifizierungssystem) |
| RAEB-2       | Refraktäre Anämie mit Blastenexzess Typ 2                                   | X und Y         | Geschlechtschromosomen                                    |
| RAEBt        | RAEB in AML-Transformation  | Zz              | Zellzahl  |
| RARS         | Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten                                     |                 |   |
| RCMD         | Refraktäre Zytopenie mit Multilineärer Dysplasie                            |                 |   |
| RCUD         | Refraktäre Zytopenie mit Unilineären Dysplasien                             |                 |   |
| RMLength     | repeat-masked length = Intervalllänge nach Entfernung repetitiver Sequenzen |                 |   |

# 1 Einleitung

## 1.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS)

Die Myelodysplastischen Syndrome (MDS) zählen zu einer heterogenen Gruppe häufiger, erworbener Erkrankungen des Knochenmarks und werden überwiegend bei über 60-Jährigen diagnostiziert. Defekte der hämatopoetischen Stammzelle führen in Knochenmark und Blut zu einer klonalen Zellentwicklungs- und -funktionsstörung, welche in 25% der Fälle in eine Akute Myeloische Leukämie (AML) mündet. Auf Grund der Zellklonalität und des unkontrollierten Wachstums wurden die MDS früher auch als Präleukämien bezeichnet. Neben der klinischen Diagnostik durch eine Auswertung des Blutbildes und Untersuchung von Knochenmarkausstrichen wird mittlerweile meist eine tumorzytogenetische Analyse der Knochenmarkzellen durchgeführt. In 50% der MDS-Patienten werden chromosomale Aberrationen gefunden, die eine wichtige prognostische und therapeutische Bedeutung haben. Neben aggressiven und häufig schnell tödlich verlaufenden MDS-Subtypen kommen auch mildere Formen vor, weshalb zwischen mehreren Entitäten und Prognoseklassen unterschieden und der Begriff MDS eher in der Mehrzahl verwendet wird. Die Erstdiagnose erfolgt meist auf Grund unspezifischer Symptome, wie Müdigkeit oder Anämieanzeichen, und wird nicht selten zufällig gestellt. Die Behandlungsmöglichkeiten erstrecken sich von unterstützenden Transfusionen über aggressive Chemotherapien bis hin zu Knochenmark- oder peripheren Blutstammzelltransplantationen. Nur die Transplantationen versprechen Heilung, tragen allerdings ein hohes Risiko in sich und kommen nicht für alle Patienten in Frage. Das hohe Alter verbunden mit einem schlechten Allgemeinzustand und sekundäre Infektionen verhindern in vielen Fällen die belastende Therapie.

### 1.1.1 Geschichtliches

Die Bezeichnung MDS wurde 1976 von der 'French American British co-operative Group' (FAB) festgelegt und MDS als eine mit AML verwechselbare Erkrankung beschrieben (Bennett *et al.*, 1976). Die erste Klassifikation wurde 1982, wiederum von der FAB-Gruppe, aufgestellt und beruhte auf zytomorphologischen Gesichtspunkten durch die Analyse von Knochenmarkausstrichen. Die prognostische Signifikanz von zu findenden

Chromosomenanomalien war noch unbekannt (Bennett *et al.*, 1982). Gleichzeitig wurde in Düsseldorf das MDS-Register zur einheitlichen Datenerfassung und -beurteilung gegründet. Seit 1997 findet das 'international prognostic scoring system' (IPSS) bei MDS in der Klinik Anwendung. Dieses vereint die zytogenetischen, morphologischen und klinischen Gegebenheiten in sich und lässt die Einordnung in prognostische Untergruppen zu. Die Hauptneuerung bestand in der Definition zytogenetischer Risikogruppen, d. h. spezifischen, rekurrenten genomischen Aberrationen wurden bestimmte Prognosen zugeordnet (Greenberg *et al.*, 1997). Im Jahre 2001 folgte eine von der WHO aktualisierte und verfeinerte MDS-Klassifikation. Unter anderem wurde die Abgrenzung zur AML verschärft und die bisher einzige zytogenetische Entität, charakterisiert durch eine isolierte 5q-Deletion, geschaffen (Bennett, 2000). Neben Fusionsgenen wurden gehäuft Mutationen in und Hypermethylierungen von spezifischen Genen in MDS beschrieben (Imai *et al.*, 2000; Fenaux, 2001). 2005 zeigte sich, dass Lenalidomid eine hämatologische Antwort in Niedrigrisiko-Patienten verzeichnet und dass es vor allem zu Remissionen in Patienten mit 5q31-Deletion führt (List *et al.*, 2005; List *et al.*, 2006). Die Frage, ob 'molecular profiling' von zytogenetischen Subgruppen zur Therapieindividualisierung führen kann, kam auf (Galili *et al.*, 2006).

Durch die WHO werden weiterhin Verbesserungen der Klassifikation vorgenommen, wie die Hervorhebung der Bedeutung zytogenetischer Anomalien und molekularer Mutationen, sowie die Schaffung neuer Entitäten, wie z. B. Kinder-MDS (Vardiman *et al.*, 2009).

### **1.1.2 Epidemiologie, klinisches Bild und Diagnostik**

Die MDS zählen zu den häufigsten Neoplasien des älteren Menschen, wobei sich eine deutliche Korrelation zwischen dem Alter und der Inzidenz zeigt. Anhand des Düsseldorfer Registers mit 308 Patienten, die zwischen 1991 und 2001 untersucht wurden und im Düsseldorfer Raum lebten, wurde die Inzidenz auf 4-5 Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr bestimmt, mit einem etwas höheren Anteil an männlichen Patienten. Bei den 70-80-Jährigen wurde eine stark erhöhte Erkrankungsrate von 24,5 pro 100.000 Personen gefunden, wobei der Anstieg vor allem unter den Männern beobachtet wurde (Germing *et al.*, 2004). Das mediane Erkrankungsalter lag bei einem großen deutsch-österreichischen Kollektiv bei 65,7 Jahren mit einem Mann-Frau-Verhältnis von 1,29 (Haase *et al.*, 2007).

Die jährliche Fallzahl für MDS in der BRD wurde auf 3.644 geschätzt (Hellenbrecht *et al.*, 2003).

Vor der Erstdiagnose leiden die Patienten an Symptomen, wie Anämie (72%), Infektionen (31%), Blutungen (21%), Spleno- und Hepatomegalie (20-25%). Von den diagnostizierten Patienten zeigen 94% eine Anämie, 45% eine Leukozytopenie, 60% eine Thrombozytopenie, 28% eine Panzytopenie, 2,3% ein normales Blutbild und 42% einen erhöhten Laktatdehydrogenasewert (Zellzerfall-Maß) (Germing, 2006). Charakteristisch bei MDS ist eine dysplastische, ineffektive Hämatopoese mit peripherer Zytopenie bei normo- bis hyperzellulärem Knochenmark. Die wichtigsten Dysplasiekriterien sind Pseudo-Pelger-Zellen (hantel- oder brillenförmige Mikromyelozyten), hypogranulierte Myelozyten und Promyelozyten, Mikromegakaryozyten und mononukleäre Megakaryozyten (Bennett *et al.*, 1982; Aul *et al.*, 1998).

Um die Verdachtsdiagnose abzuklären werden mit Hilfe eines Blutbildes und Differentialblutbildes die Zellzahlen im peripheren Blut bestimmt, die zumeist vorliegenden Dysplasiezeichen aller drei Zellreihen aufgedeckt und bei 25% der Patienten Blasten (unreife Zellen) im Blut nachgewiesen. Durch zytochemische Färbungen von Knochenmarkausstrichen können mikroskopisch zytologisch charakteristische Auffälligkeiten der Zellzahl, -art und -form beobachtet werden. Dabei ist die MDS-Diagnose nicht immer eindeutig zu stellen, denn es gibt andere hämatologische als auch nicht-hämatologische Erkrankungen, die das histomorphologische Bild der MDS, wie Dysplasien und Anämien, imitieren können (Germing und Haas, 2009).

Alle Therapiemaßnahmen außer der kurativen Transplantation basieren auf der Minderung der Symptome. Zu den supportiven Therapien zählt hauptsächlich die Substitution von Erythrozyten und Thrombozyten bei Anämiesymptomatik und Blutungsneigung. Der Gefahr der Eisenüberladung durch die Erythrozytentransfusion wird durch Eisenchelatherapien vorgebeugt. Eine Behandlung mit Zytokinen kann zur Reduktion der Apoptoserate und zur Unterstützung des Reifungsprozesses der roten Zellreihe führen. Lymphotoxische Immunsuppressiva werden eingesetzt, um die Apoptose hämatopoetischer Vorläuferzellen durch proapoptotische Zytokine zu unterdrücken. Die systematische Weiterentwicklung von Thalidomid zu einer immunmodulatorischen Substanz (IMiD) führte zu dem Medikament Lenalidomid (in Studie), das der vermehrten angiogenetischen Aktivität bei MDS entgegensteuert und zur hämatologischen als auch zytogenetischen Remission besonders in Patienten mit 5q-Deletion führen kann. Epigenetische Therapieansätze bei MDS umfassen den Einsatz von Histon-Deacetylase-Inhibitoren

(HDACi) oder DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTi), die die gestörte Genexpression auf Grund epigenetischer Deregulation verhindern. HDACis helfen den Histon-acetylierten Zustand von Core-Histonproteinen, der die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an die DNA erlaubt, zu bewahren. DNMTis hemmen die Methylierung von CpG-Inseln, die sich überwiegend in Promotor- und in 5'-kodierenden Regionen befinden, und führen zu einem ähnlichen Effekt wie die HDACis. Die kurativen Stammzelltransplantationen zeigen in Studien nur ein krankheitsfreies Überleben in 29-40%, wobei das Hauptproblem die hohe therapiebedingte Mortalität darstellt. Blastenzahl, Alter und zytogenetischer Status zum Zeitpunkt der Transplantation spielen eine wichtige Rolle. Die früher hochdosierte aggressive Chemotherapie wird mittlerweile eher durch eine dosisreduzierte Chemotherapie ersetzt, bei der sich nach der Blutstammzelltransplantation (PBSZT) vorübergehend ein gemischter Spender-Empfänger-Chimärismus einstellt. Hierdurch tritt der therapeutisch erwünschte 'graft-versus-leukemia' (GvL) Effekt auf und die unerwünschte graft-versus-host (GvH) Erkrankung stellt sich erst verzögert ein (Germing und Haas, 2009). Die jeweiligen Therapiemaßnahmen und Lebenserwartungen der Patienten richten sich nach dem vorliegenden MDS-Subtyp, der anhand festgelegter Klassifizierungs- und Prognosesysteme bestimmt wird.

### **1.1.3 Klassifikationssysteme und Prognosegruppen**

Die überholte FAB-Klassifikation und die moderne WHO-Klassifikation werden in folgender, gekürzter Tabelle inklusive ihrer wichtigsten Charakteristika gegenüber gestellt (Bennett *et al.*, 1982; Jaffe *et al.*, 2001; Vardiman *et al.*, 2009; Germing und Haas, 2009).

**Tabelle 1.1-1:** Übersicht der FAB- und WHO-Klassifikation von MDS. Aufgeführt sind die jeweiligen Subtypen und ihre spezifischen Diagnosekriterien. Verwandte Erkrankungen, die teilweise bei der Diagnose eine Rolle spielen (wie primäre und sekundäre AML/MDS oder die Gruppe der myeloproliferativen / -dysplastischen Erkrankungen) wurden mit aufgelistet (nicht fett). PB = peripheres Blut, KM = Knochenmark, RS = Ringsideroblasten

| FAB-Subtypen   | WHO-Subtypen   |
|--|--|
| <p><b>1. RA</b> = Refraktäre Anämie<br/> <b>in PB:</b> &lt; 1% Blasten<br/> <b>in KM:</b> &lt; 5% Blasten, &lt; 15% RS</p>   | <p><b>1. RCUD</b> = Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie - refraktäre Granulozytopenie, refraktäre Thrombozytopenie, refraktäre Anämie<br/> <b>in PB:</b> &lt; 1% Blasten<br/> <b>in KM:</b> &lt; 5% Blasten, &lt; 15% RS</p>  |
|  | <p><b>2. MDS mit del(5q)</b> = MDS assoziiert mit einer isolierten Deletion 5q (früher 5q- Syndrom)<br/> <b>in PB:</b> &lt; 1% Blasten, Anämie<br/> <b>in KM:</b> &lt; 5% Blasten, isolierte del(5q)</p>   |
|  | <p><b>3. RCMD</b> = Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie mit oder ohne Ringsideroblasten<br/> <b>in PB:</b> &lt; 1 Blasten, Zytopenie(n)<br/> <b>in KM:</b> &lt; 5% Blasten, &gt; / &lt; 15% RS</p>  |
| <p><b>2. RARS</b> = Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten<br/> <b>in PB:</b> &lt; 1% Blasten<br/> <b>in KM:</b> &lt; 5% Blasten, ≥ 15% RS</p>  | <p><b>4. RARS</b> = Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten<br/> <b>in PB:</b> &lt; 1% Blasten, Anämie<br/> <b>in KM:</b> &lt; 5% Blasten, ≥ 15% RS</p>  |
| <p><b>3. RAEB</b> = Refraktäre Anämie mit Blastenexzess<br/> <b>in PB:</b> &gt; 5% Blasten<br/> <b>in KM:</b> 5-20% Blasten, evtl. RS</p>  | <p><b>5. RAEB</b> = Refraktäre Anämie mit Blastenexzess<br/> <b>RAEB-1:</b><br/> <b>in PB:</b> &lt; 5% Blasten, Zytopenie(n)<br/> <b>in KM:</b> 5-9% Blasten unilineäre oder multilineäre Dysplasie(n)<br/> <b>RAEB-2:</b><br/> <b>in PB:</b> 5-19% Blasten, Zytopenie(n), evtl. Auerstäbchen<br/> <b>in KM:</b> 10-19% Blasten, unilineäre oder multilineäre Dysplasie(n), evtl. Auerstäbchen</p> |
|  | <p><b>6. MDS-U</b> = Unklassifizierbare MDS<br/> <b>in PB:</b> &lt; 1% Blasten, Zytopenie(n)<br/> <b>in KM:</b> &lt; 5% Blasten<br/> 3 spezifische Ausschlusskriterien</p>   |
| <p><b>4. CMML</b> = Chronische Myelomonozytäre Leukämie<br/> <b>in PB:</b> &lt; 5% Blasten, &gt; 10<sup>9</sup>/l Monozyten<br/> <b>in KM:</b> meist &lt; 5% Blasten, selten 5-20%</p> | <p><b>7. Vorläufige Entität RCC</b> = Refraktäre Zytopenie bei Kindern</p>   |
|  | <p>MDS/MPD-Klassifizierungssystem<br/> CMML I und II zählen nun zu dem Myelodysplastischen/Myeloproliferativen Erkrankungen</p>  |
| <p><b>5. RAEBt</b> = Refraktäre Anämie in Transformation<br/> <b>in PB:</b> ≥ 5% Blasten, evtl. Auerstäbchen<br/> <b>in KM:</b> 20-30% Blasten, evtl. Auerstäbchen</p>                 | <p>AML-Klassifizierungssystem<br/> RAEBt gibt es so nicht mehr</p>   |
| <p>Sekundäre MDS/AML<br/> tMDS = Therapie-assoziierte MDS</p>  | <p>Therapie-assoziierte MDS und AML-Klassifikation<br/> tMDS = Therapie-assoziierte MDS</p>  |
| <p>AML-Klassifizierungssystem<br/> AML = Akute Myeloische Leukämie<br/> <b>in PB:</b> &gt; 30% Blasten<br/> <b>in KM:</b> &gt; 30% Blasten</p>   | <p>AML-Klassifizierungssystem<br/> AML ab ≥ 20% Blasten in PB oder KM</p>  |

Das von der WHO revidierte FAB-System hat den Vorteil, dass es die Homogenität der Subgruppen verbessert, indem einzelne Subgruppen zugefügt oder weggelassen und die Charakteristika strenger definiert wurden. Die für diese Arbeit bedeutendste Neuerung war die Definition einer neuen Subgruppe auf Grund der Diagnose einer chromosomalen Aberration durch die Tumorzytogenetik. Das nach FAB als refraktäre Anämie klassifizierte 5q-minus-Syndrom (5q-) mit einer isolierten Deletion des langen Arms von Chromosom 5 wird bei der WHO-Klassifikation als separate Erkrankung eingestuft (Jaffe *et al.*, 2001). Die Merkmale dieser Patienten sind einheitlich und unterscheidbar dadurch, dass sie die typische Aberration aufweisen, eine eher gute Prognose haben, häufiger Frauen betreffen und andere, ähnliche klinische Aspekte vereinen.

Die durchschnittliche Lebenserwartung und das Risiko einer AML-Entwicklung aller Subtypen wurden mit folgenden Zahlen bestimmt (vgl. Tabelle 1.1-2).

**Tabelle 1.1-2:** Prognose und kumulatives Risiko der AML-Entwicklung der verschiedenen WHO-Typen (entnommen aus Germing und Haas, 2009).

| WHO-Typ           | n (%)      | Medianes Überleben<br>(Monate) | AML-Entwicklung nach |          |
|-------------------|------------|--------------------------------|----------------------|----------|
|                   |            |                                | 2 Jahren             | 5 Jahren |
| <b>RCUD</b>       | 218 (9,1)  | 58                             | 6                    | 14       |
| <b>RARS</b>       | 174 (7,3)  | 66                             | 3                    | 3        |
| <b>RCMD</b>       |            |                                |                      |          |
| <b>≥ 15% RS</b>   | 336 (14)   | 32                             | 13                   | 20       |
| <b>&lt; 15 RS</b> | 774 (32,3) | 36                             | 13                   | 20       |
| <b>5q-</b>        | 89 (3,7)   | 77                             | 8                    | 20       |
| <b>RAEB-1</b>     | 359 (15)   | 19                             | 26                   | 44       |
| <b>RAEB-2</b>     | 443 (18,5) | 12                             | 55                   | 65       |

Anhand rekurrent gefundener chromosomaler Aberrationen bei MDS-Patienten wurden zytogenetische Risikogruppen gebildet. Dabei weisen sog. Niedrigrisiko-Patienten einen normalen Karyotyp, eine 5q- oder 20q-Deletion oder einen Chromosom Y-Verlust auf. Ein komplexer Karyotyp oder eine Chromosom 7-Anomalie kennzeichnet Hochrisiko-Patienten. Allen anderen Patienten, d. h. mit jeglicher weiterer Aberration, wird ein intermediäres Risiko prognostiziert. Diese zytogenetischen Risikogruppen fließen ebenso wie der medulläre Blastenanteil und die Anzahl der Zytopenien mit in das für MDS gültige Internationale Prognosesystem (IPSS) ein. Mit Hilfe dessen wird aus den verschiedenen Kriterien ein Wert ('score') berechnet, der zur Einstufung des Patienten in eine MDS-Risikogruppe führt. Dieses 'scoring' wiederum ist eine Hilfe bei der Therapieentscheidung.

**Tabelle 1.1-3:** Definition des IPSS (entnommen aus Germing und Haas, 2009).

| Kriterium   Score               | 0       | 0,5         | 1    | 1,5   | 2     |
|---------------------------------|---------|-------------|------|-------|-------|
| Medullärer Blastenanteil (%)    | 0-4     | 5-10        | -    | 11-20 | 21-29 |
| Anzahl Zytopenien <sup>1)</sup> | 0-1     | 2-3         | -    | -     | -     |
| Zytogenetische Risikogruppe     | niedrig | intermediär | hoch | -     | -     |
| MDS-Risikogruppe                | Score   |             |      |       |       |
| Niedrigrisiko                   | 0       |             |      |       |       |
| Intermediäres Risiko I          | 0,5-1   |             |      |       |       |
| Intermediäres Risiko II         | 1,5-2   |             |      |       |       |
| Hochrisiko                      | ≥ 2,5   |             |      |       |       |

<sup>1)</sup> Thrombozyten < 100.000/μl, Hämoglobin < 10g/dl, Neutrophile < 1.800/μl

<sup>2)</sup> niedrig = normaler Karyotyp, 5q-, 20q-, -Y / hoch = komplexer Karyotyp (≥ 3 klonale Aberrationen), Chromosom 7-Anomalien / intermediär = alle anderen Aberrationen

## 1.2 Zytogenetik bei MDS

Die tumorzytogenetische Analyse wird mittlerweile bei fast allen MDS-Patienten routinemäßig durchgeführt, da bei ca. 50% aller primären MDS-Fälle klonale chromosomale Veränderungen gefunden werden und sie ein prognostisch und therapeutisch angesehener wichtiger Faktor sind. Für eine zytogenetische Untersuchung bei MDS (in der Düsseldorfer tumorzytogenetischen Arbeitsgruppe) werden von dem frischen Knochenmark des Patienten unstimulierte und Antibiotika-freie Kurzzeitkulturen angelegt. Unter Zugabe von L-Glutamin und fötalem Kälberserum wird in meist drei Ansätzen bei verschiedenen Bedingungen eine Zellkultivierung durchgeführt. Hierbei werden die Kultivierungszeit (24, 48 und 72 Stunden), das Kultivierungsmedium (RPMI 1640 oder Marrow Max) und die Colcemid-Einwirkzeit (6 oder 24 Stunden) vor dem Ernten variiert. Letzteres dient der Synchronisierung, was bedeutet, dass proliferierende Zellen durch das Spindelgift in der Metaphase ihres Zellzyklus arretiert werden. Je kürzer die Einwirkzeit, desto gestreckter liegen die Chromosomen vor, desto weniger Zellzyklen konnten aber synchronisiert und somit Metaphasen erhalten werden. Nach anschließender Zentrifugation kann das Plasma über den Erythro- und Leukozyten abgesaugt und verworfen werden. Durch eine hypotone Behandlung mit 0,56%iger Kaliumchloridlösung kommt es zur Quellung der Zellen. Nach einer weiteren Zentrifugation und erneuter Abnahme des Überstandes wird zur vollständigen Hämolyse bzw. Zerstörung der Zellmembranen Ibraimov-Lösung (5%ige Essigsäure) zugesetzt. In Folge werden die Lymphozytenkerne schließlich durch drei Behandlungen mit Methanol-Eisessig (3:1) fixiert. Diese

Zellkernsuspension wird für die geplante Chromosomenbandenanalyse auf Objektträger aufgetropft und nach einer Alterungszeit eine G-Chromosomenbandenfärbung der Metaphasechromosomen mit Trypsin (hydrolysiert Peptidbindungen) und Giemsa (GTG) durchgeführt. AT-reiche Chromosomenbanden lassen sich so als dunkel gefärbte G-Banden darstellen. Je nach Güte und Bedingungen ergibt sich eine spezifische chromosomale Bandenauflösung (um 300 Banden pro haploidem Genom), die bei tumorzytogenetischen Analysen eine Aberrationsdetektionsgrenze ab 5-10 Mb bietet. Eine mikroskopische und computergestützte Auswertung von 20-25 Metaphasen wird zur Erstellung des zytogenetischen Befundes, genauer des Karyotyps entsprechend der ISCN-Kriterien, genutzt (Trost *et al.*, 2006). Mit Hilfe einer Karyotypformel, die das Geschlecht und die Anzahl der normalen und klonal aberranten Metaphasen anzeigt, wird der Chromosomenstatus festgehalten. Klonal bedeutet dabei, dass derselbe numerische Chromosomenverlust in mindestens drei Metaphasen, und ein numerischer Chromosomengewinn oder eine strukturelle Veränderung in mindestens zwei Metaphasen gefunden wurde. Einzelaberrationen können als Zusatz festgehalten werden. Man spricht von einem komplexen Karyotyp, wenn drei oder mehr klonale Aberrationen registriert wurden (Shaffer und Tommerup, 2005; Shaffer, 2009).

### **1.3 Prognostische Bedeutung von zytogenetischen Aberrationen**

Ein Paradebeispiel des Zusammenhangs von Erkrankung, Aberration, Prognose und Therapie wird bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) vorgefunden. In über 90% der CML-Fälle wird das sogenannte Philadelphiachromosom, eine Translokation (t) zwischen den Chromosomen 9 und 22 vorgefunden (Rowley, 1973). Aus dieser resultiert das Fusionsgen bzw. -protein BCR-ABL, eine konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase, die zur unkontrollierten Zellproliferation führt (Hagemeijer, 1987). Imatinib bzw. Gleevec (Novartis) ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der zu den neuen, individuell auf die vorliegende Störung zugeschnittenen Medikamenten ('tailored-medicines') zählt. Der Wirkstoff blockiert kompetitiv und selektiv die ATP-Bindungsstelle spezifischer Tyrosinkinasen, zu denen nicht nur BCR-ABL sondern auch BCR-PDGFR $\alpha$  oder ETV6-JAK2 anderer myeloproliferativer Erkrankungen (CMPE) gehören (Cross und Reiter, 2002; Neumann *et al.*, 2007).

Bei MDS ist das Bild dagegen sehr viel heterogener und man hat noch keine rekurrente, spezifische MDS-Aberration oder Mutation oder andere Störung in einem so hohen Prozentsatz identifizieren können. Viele chromosomale, genetische und epigenetische Veränderungen können gefunden werden, ihre Bedeutungen sind jedoch noch nicht hinreichend untersucht. Die bisher einzigen in den Klinikalltag Eingang gefundenen Veränderungen sind zytogenetisch sichtbare Aberrationen.

Die aktuellste, größte Studie zur prognostischen Bedeutung des Karyotyps in MDS und Korrelation mit den Subtypen stammt von Haase *et al.* Die Daten von 2.124 MDS-Patienten aus Deutschland und Österreich wurden ausgewertet. In 50,2% der primären MDS-Patienten konnten trotz informativer Zytogenetik keine klonalen Aberrationen aufgedeckt werden. Die andere Hälfte wies insgesamt 684 verschiedene zytogenetische Kategorien auf, wobei häufige von seltenen Anomalien unterschieden wurden. 14% der Patienten mit klonalen Aberrationen machten jene mit isolierter 5q-Deletion aus, die als einzige eine eigene Entität bilden. Ca. 29% der Patienten zeigten nur eine Aberration, 9% zwei und 14% wiesen komplexe Veränderungen auf. Der Einfluss des Karyotyps auf den Krankheitsverlauf wurde anhand der 1.286 Patienten, die nur supportiv behandelt wurden, evaluiert. Patienten mit einem unauffälligen Karyotyp überlebten durchschnittlich 53 Monate, Patienten mit einer Aberration 24 Monate und Patienten mit einem komplexen Karyotyp hatten nur eine Lebenserwartung von 9 Monaten. Das mediane Überleben betrug 54 Monate für die gute, 31 Monate für die intermediäre und 11 Monate für die schlechte zytogenetische IPSS-Risikogruppe. Patienten mit Chromosom 7-Aberrationen fielen mit sehr kurzen Überlebenszeiten auf. Das mittlere Überleben aller Patienten mit seltenen Aberrationen betrug nur 7,2 Monate. Insgesamt ergab sich, dass die intermediäre zytogenetische Risikogruppe die geringste signifikante prognostische Bedeutung aufwies. Dies ergibt sich aus der IPSS-Definition, in der sie eine Ausschlussgruppe darstellt, in die auch prognostisch unbekannt, gute und schlechte, zytogenetische Gruppen eingeordnet werden. Ein normaler Karyotyp kam in allen WHO-Subgruppen (außer del(5q)) zwischen 44,2% bei RAEB-1 und 88,5% bei RCMD vor (Haase *et al.*, 2007).

## 1.4 Molekularzytogenetik

Mit Hilfe der molekularzytogenetischen Technik, der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), wird häufig routinemäßig das zytogenetische Ergebnis ergänzt, gestützt oder präzisiert. Durch spezifische fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden kann eine größere Anzahl

von Zellen auf ein bis mehrere bekannte Loci untersucht werden, wobei häufig auch Interphasen aussagekräftig sind. Durch die geeignete Kombination von zwei oder mehr Sonden können kleinere Aberrationen aufgedeckt und kryptische Anomalien, Translokationen oder Markerchromosomen (mar) entschlüsselt werden. Eine zytogenetische Remission oder ein Erkrankungsprogress, ebenso wie der Erfolg einer gegengeschlechtlichen Transplantation kann anhand der Auswertung von Verlaufsproben ermittelt werden (Haferlach *et al.*, 2007). Die Auflösung bei gezieltem Sondeneinsatz beträgt wenige kb. Für häufig in Aberrationen involvierte chromosomale Regionen oder Gene werden Sonden kommerziell angeboten. Auch Sonden für ganze Chromosomen oder -arme sind erhältlich. Für besondere Untersuchungen können mit Hilfe von BACs ('bacterial artificial chromosomes') Sonden selber hergestellt werden. Da diese Methode Lokus-spezifisch funktioniert und die Spektrenunterschiede der Sondenfluorochrome begrenzt sind, ist das Screenen eines Genoms nach unbekanntem Aberrationen mühselig.

Die Suche nach kryptischen Aberrationen bei unauffälligem Karyotyp wurde jedoch erfolgreich in einem Kollektiv von 57 zytogenetisch unauffälligen MDS-Patienten mit 6 Sonden für die häufigsten MDS-Aberrationen durchgeführt. In 15% konnte der normale Karyotyp korrigiert und zudem eine signifikante Korrelation bestimmter Faktoren mit den mittels FISH aufgedeckten Aberrationen bestätigt werden. Hierzu zählten die Blastenzahl, die IPSS-Bewertung und der Erkrankungsprogress (Bernasconi *et al.*, 2003).

## **1.5 Weiterentwicklung der Techniken zur Aberrationsdetektion**

Zur genomweiten Detektion von kleineren Zusatzaberrationen oder verborgenen Veränderungen sind verschiedene Weiterentwicklungen der Methoden zu verzeichnen, die eher nicht mehr oder noch nicht in der Routinediagnostik eingesetzt werden. Auf die CGH-Methode, die auf der vergleichenden Normalmetaphase-Hybridisierung von Test- und Referenz-DNA beruht (Kallioniemi *et al.*, 1992), folgte die SKY, bei der ganze Chromosomen spezifisch angefärbt werden (Schröck *et al.*, 1996). Danach kamen BAC-Klon- oder cDNA-Mikroarrays zum Einsatz, bei denen die Normalmetaphase-Plattform durch BAC- oder cDNA-Sequenzen ersetzt wurde. Diese Formate wurden mittlerweile von den hochauflösenden modernen Oligonukleotid-basierten SNP-Array- und Array-CGH-Technologien abgelöst (Albertson und Pinkel, 2003).

### **1.5.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)**

Die klassische CGH ('comparative genomic hybridisation') erlaubt als erste Technik die genomweite Detektion allelischer Imbalancen durch die simultane *in situ* Hybridisierung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Tumor- und Normal-DNAs mit normalen Metaphasechromosomen. Regionen mit veränderter Kopienzahl im Tumor können somit anhand von Fluoreszenzsignalen, die sich aus den Hybridisierungsverhältnissen der beiden DNAs am jeweiligen Lokus ergeben, auf der Normalmetaphase lokalisiert werden (Thompson und Gray, 1993; Du Manoir *et al.*, 1993).

Der Vorteil, DNA einsetzen zu können, wurde auch für die MDS-Diagnostik erkannt, wo es häufiger zu einer nicht ausreichend informativen Zytogenetik auf Grund fehlender Metaphasen nach Zellkultivierung oder schlechter Chromosomenqualität kommt. In Studien konnte gezeigt werden, dass die CGH ebenso gut wie die klassische Zytogenetik Aberrationen aufdeckt, ihre Ergebnisse teilweise noch verfeinert. Ähnlich wie bei der Lokus-spezifischen FISH werden die Markierungen der hochmolekularen DNA mit Hilfe der Nick-Translation vorgenommen und unter supprimierenden Bedingungen hybridisiert. Durch die Aufnahme mit einer sensiblen Kamera und die Software-gestützte Bestimmung der Fluoreszenzratios (0,5 für Monosomien, 1 für Disomien, 1,5 für Trisomien) können genomische Imbalancen registriert werden. Die minimale nachweisbare Aberrationsgröße wird mit 2-4 Mb für Verluste und Gewinne von ein oder zwei Kopien und mit 100 kb für hochamplifizierte Regionen angegeben (Wilkens *et al.*, 1998). Erfahrungswerte anderer liegen mit einer Auflösung von 20 Mb deutlich höher (Pollack *et al.*, 1999).

Da balancierte Translokationen mit dieser Methode nicht detektiert werden können und um die genomische Auflösung weiter zu erhöhen, wurden Optimierungen vorgenommen, die z. B. zur SKY- oder m(ulticolor)FISH-Technik führten.

### **1.5.2 Spektrale Karyotypisierung (SKY)**

Die SKY ('spectral karyotyping') ist eine Technik, die zwischen der Zytogenetik, FISH- und CGH-Methode steht. Mit ihr können Metaphasechromosomen auf Aberrationen sowohl numerisch als auch strukturell untersucht werden, indem (kommerzielle) Ganzchromosomen-Sonden verwendet werden. Für diese Sonden werden mittels FACS ('fluorescence-activated cell sorting') sortierte Chromosomen benötigt. Die jeweilige Chromosomen-DNA wird dann nicht mit 24 unterschiedlichen Farben markiert, sondern

wenige Fluorochrome (5), die in ihrem Spektrum überlappen, werden miteinander kombiniert und in eine PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP) zur Sondenherstellung eingesetzt. Nach Hybridisierung werden durch ein spezielles Filter-, Kamera- und Softwaresystem die exakten Chromosomen-spezifischen Spektren ermittelt und den entsprechend homologen Chromosomen Falschfarben zugeordnet. Somit wird genomweit in einem Ansatz die Unterscheidung aller Chromosomen möglich und sowohl Imbalancen als auch balancierte Translokationen werden sichtbar. Die Auflösung ist abhängig von der Chromosomenqualität und -größe und liegt zwischen 1-2 Mb oder mehr (Schröck *et al.*, 1996; Macville *et al.*, 1997).

Bei MDS lohnt sich diese Zusatzauswertung bei Vorliegen komplexer Karyotypen, in denen zytogenetisch nicht aufzuklärende Markerchromosomen einer Identifikation der translozierten oder additiven Fragmente bedürfen (Kakazu *et al.*, 1999; Trost *et al.*, 2006).

### **1.5.3 Klon- und SNP-Array-CGH**

Die Array-CGH (aCGH) ist eine Weiterentwicklung der klassischen CGH dahingehend, dass die Normal-Metaphasechromosomen durch DNA-Elemente auf einem Array ersetzt wurden. Diese Elemente können entweder BACs, PACs ('P1-derived artificial chromosomes'), YACs ('yeast artificial chromosomes'), Fosmide, Cosmide, cDNA-Klone spezifischer Gene oder Oligonukleotide unterschiedlicher Länge sein, die das Genom in unterschiedlich hoher Dichte repräsentieren. Wie bei der CGH ergeben sich aus der Cohybridisierung der unterschiedlich markierten Tumor- und Referenz-DNAs mit der DNA auf dem Array entsprechende Fluoreszenzintensitäts-Quotienten. Nach dem Einscannen der Arraysignale wird eine computergestützte Analyse genomischer Imbalancen möglich. Je nach BAC-Array-Typ z. B. werden entsprechend der Anzahl und Größe der DNA-Elemente mittlere Auflösungen zwischen 100 kb und 3 Mb erreicht.

Eine der ersten aCGH-Studien bei MDS wurde von Paulsson *et al.* Anfang 2006 veröffentlicht (Paulsson *et al.*, 2006). Sie verwendeten BAC-Arrays mit einer genomischen Auflösung von bis zu 100 kb und in 9 von 10 AML/MDS-Fällen konnten neben der isolierten zytogenetisch sichtbaren Trisomie 8 auch Zusatzimbalancen aufgedeckt werden. Nach Abzug der Imbalancen, die zuvor als bekannte Kopienzahlvarianten (vgl. Kapitel 1.7) beschrieben wurden, zeigten immerhin noch 4 Patienten kryptische Aberrationen. O'Keefe *et al.* haben mit Hilfe von BAC-Arrays und einer durchschnittlichen genomischen

Auflösung von 1 Mb 38 MDS-Patienten analysiert. 19 zeigten zuvor zytogenetische Aberrationen, 17 waren zytogenetisch normal und zwei waren nicht informativ auf Grund fehlender Metaphasen nach Zellkultivierung. Bei 14 (82,4%) der zytogenetisch unauffälligen Patienten konnten 219 Aberrationen identifiziert werden. Zusätzlich konnten in 17 (89,5%) der zytogenetisch auffälligen Patienten weitere Veränderungen gefunden werden (O'Keefe *et al.*, 2007).

Arrays mit cDNA-Elementen wurden eigentlich für Genexpressionsanalysen entwickelt, dann aber auch teilweise für aCGH-Experimente mit Krebsgenomen genutzt. Mit Hilfe von PCRs wurden cDNAs mit einer Größe zwischen 0,5 und 2 kb amplifiziert und auf einen speziellen Glasträger aufgebracht. Die anschließende kompetitive Hybridisierung von Tumor- und Referenz-DNAs bot eine höhere genomische Auflösung und größere Kopienzahlratios als die klassische CGH. Dennoch fielen niedrige Signal/Rausch-Verhältnisse und variable Signalintensitäten der kleinen und in ihrer Länge variierenden cDNA-Ziele im Vergleich zu den BAC-Analysen auf. Ein Vorteil war aber der mögliche direkte Vergleich von Imbalancen und Expression auf Basis desselben Arraydesigns (Pollack *et al.*, 1999).

Jedoch fanden auf Grund der besseren Signalintensitäten eher die BAC-optimierten genomischen Mikroarrays Eingang in die Krebsforschung (Davies *et al.*, 2005).

Die neueren auf Oligonukleotiden basierenden Arrays stellen momentan die Plattform der Wahl dar, wobei zwei Hauptformate unterschieden werden. Das erste, der sogenannte SNP-Array, ist durch kurze Oligonukleotide (~25-mer), die bekannte SNPs ('single nucleotide polymorphisms') enthalten, gekennzeichnet. Die neuere Generation umfasst 500.000 und mehr SNP-Oligonukleotide mit einem mittleren Abstand ab 2,5 kb. Der Vorteil dieser Methode ist, dass mit ihr nicht nur genomische Imbalancen bestimmt werden können, sondern auch Verluste parentaler Chromosomenabschnitte ohne Kopienzahländerung bzw. Regionen mit uniparentalen Disomien (UPDs). Allerdings konnte mathematisch gezeigt werden, dass es unmöglich ist mit kurzen 25 bp-Oligonukleotiden eine spezifische Hybridisierung bei gleichzeitig hoher Auflösung genomweit gewähren zu können (de Witte *et al.*, 2006). Deshalb ist ein bedeutender Nachteil dieser Methode, dass eine Restriktion und Amplifikation der DNA nötig ist, die eine Reduktion der Genomkomplexität bedeutet (Carter, 2007). Diese wird durch eine Linker-vermittelte PCR restringierter DNA-Proben erreicht, mit der Folge, dass nur kleine Restriktionsfragmente amplifiziert werden. SNP-Array-Daten zeigen eine hohe Variabilität, welche wahrscheinlich auf die DNA-Amplifikation zurückzuführen ist (Davies *et al.*, 2005). Ein weiterer Nachteil dieses Arrayformats liegt in der nicht direkten Vergleichsmöglichkeit von Tumor- und

Referenzprobe. Nur eine fluoreszenzmarkierte DNA kann hybridisiert werden, so dass das Ergebnis mit bereits bestehenden Referenzdaten abgeglichen werden muss.

Zu Beginn dieser Arbeit waren kaum Publikationen zu MDS und SNP-Arrays zu finden. Zu den ersten zählten Studien von Gondek *et al.* Seine Gruppe konnte mittels SNP-Array-Analysen in 69% der Patienten mit zuvor unauffälligem Karyotyp und in 80% der nicht-erfolgreichen zytogenetischen Analysen Aberrationen identifizieren (Gondek *et al.*, 2007a). In einer weiteren Studie von 119 Niedrigrisiko-MDS-Patienten (77 davon zytogenetisch unauffällig) konnten in 10% Deletionen und in 8% Amplifikationen detektiert werden. Erste Korrelationen mit dem klinischen Verlauf wiesen darauf hin, dass vor allem Patienten mit Deletionen eine verkürzte Lebenserwartung haben und Deletionen häufiger bei Patienten mit höherem IPSS-'score' zu finden sind. Der Anteil an UPDs war mit 46% auffällig hoch, deren Bedeutung konnte aber nicht signifikant belegt werden (Mohamedali *et al.*, 2007).

Die letzte Plattform, die hier vorgestellt wird, basiert ebenfalls auf Oligonukleotiden und wurde auf Grund ihres stabilen Systems für diese Arbeit zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen in zytogenetisch unauffälligen MDS-Proben gewählt.

## **1.6 60-mer-Oligonukleotid-basierte aCGH**

Das System, das bisher das robusteste Hybridisierungsverhalten zeigt und eine größere Flexibilität verspricht, zeichnet sich durch Arrayformate mit optimierten 60-mer Oligonukleotiden aus. Einzigartige Qualitätskontrollprozesse und eine ausgereifte *in situ* 'SurePrint'-Technologie sichern die akkurate Produktion hochauflösender Arrays von anfänglich etwa 40 kb bis nun 2 kb mittlerem genomischen Oligonukleotidabstand für die kommerziellen Formate (Agilent Technologies). Die hochspezifischen Oligonukleotide repräsentieren das gesamte menschliche Genom mit sowohl kodierenden als auch nicht-kodierenden Sequenzen, wobei bekannte Gene und krebsrelevante Gene durch mehrere Proben abgedeckt sind. Die genomische DNA wird direkt, ohne exponentielle Amplifikation bzw. Komplexitätsverlust, eingesetzt und die gleichzeitige, vergleichende Hybridisierung zweier unterschiedlich markierter DNA-Proben ist möglich. SNPs sowie balancierte Translokationen oder Inversionen jedoch können mit dieser Methode nicht detektiert werden.

MDS-Untersuchungen mit dieser Technik waren zu Beginn dieser Arbeit (05/06) noch nicht beschrieben. Anfang 2007 wurden die Ergebnisse einer 44 k-Array-Studie von 26

zytogenetisch normalen AML-Proben veröffentlicht. In 15% der Patienten konnten Imbalancen mit einer Größe von 0,4-4,1 Mb detektiert werden (Tyybäkinoja *et al.*, 2007). In einer weiteren Arbeit waren ebenfalls nur AML-Patienten, diesmal mit unterschiedlichen Karyotypen, Gegenstand der 44 k-aCGH-Analysen. Hier konnten in 60% der zytogenetisch normalen Proben Imbalancen gefunden werden (Suela *et al.*, 2007). Eigene Vorarbeiten konnten die zuverlässige Detektion von zytogenetisch sichtbaren 5q-Deletionen bei 5q-Syndrompatienten-Proben mit 44 k-Arrays zeigen. Dabei wurde die hochauflösende Eigenschaft zur Eingrenzung der 5q-Bruchpunkte genutzt und es konnten zuvor kryptische submikroskopische Zusatzaberrationen aufgedeckt werden (Evers *et al.*, 2007).

Die aCGH-Technik allgemein hat nicht nur in der Forschung sondern auch in der Diagnostik, wie z. B. zur Detektion von Keimbahnveränderungen bei mentaler Retardierung, Einzug gehalten. Allerdings gibt es einige Faktoren, die zu beachten sind, wie die Vermeidung von falsch-positiven Aberrationen, der sinnvolle Umgang und die richtige Interpretation der großen Datenmengen und der Ausschluss von natürlicher genomischer Variation in Form von Kopienzahlvarianten (CNVs). Im Falle von Tumorproben muss bedacht werden, dass es sich meist um ein heterogenes Zellgemisch aus normalen Zellen und Zellen mit Aberration handelt, wodurch je nach Anteil das Anzeigen der Imbalance nicht eindeutig ausfallen kann. Zudem werden in diesen Analysen ebenso Keimbahnveränderungen als Nebenbefunde detektiert (Albertson und Pinkel, 2003; Bejjani und Shaffer, 2006; Shaffer und Bejjani, 2006; Yu *et al.*, 2009).

## 1.7 Genomische Kopienzahlvarianten (CNVs)

Früher dachte man, dass SNPs den Hauptteil an natürlicher genomischer Variabilität ausmachen, doch seit der Ära der hochauflösenden genomweiten Techniken werden mehr und mehr strukturelle Varianten aufgedeckt. Ihre Interpretation, ob Polymorphismus oder Krankheits-assoziiert, bleibt in den meisten Fällen bisher ungeklärt. Zu Beginn der Arbeit wurde diese Thematik aktuell.

Redon *et al.* definierten einen CNV als ein DNA-Segment mit einer Größe von 1 kb oder größer und einer variablen Kopienzahl bei Vergleich mit einem Referenzgenom. Ein CNV kann eine einfache Struktur aufweisen, z. B. als Tandemduplikation, als auch in komplexe Zugewinne oder Verluste homologer Sequenzen an mehreren Stellen des Genoms

involviert sein. Mit einer einzigen Methode kann nicht sämtliche genomische Variation entschlüsselt werden (Redon *et al.*, 2006). CNVs werden als genomische Varianten angesehen, die einerseits zur normalen phänotypischen Variation beitragen, andererseits aber auch eine gewisse Suszeptibilität für multifaktorielle Erkrankungen darstellen können (Vissers *et al.*, 2009). CNVs werden in Kollektiven gesunder Probanden gefunden und somit auch als Art Polymorphismen angesehen, die keinen pathogenen Effekt oder eine sonstige phänotypische Ausprägung zur Folge haben. Man geht von einer Vererbung durch die Eltern aus und findet häufige CNVs und seltene, in Abhängigkeit vom jeweiligen ethnischen Hintergrund. Informationen zu diesen CNVs, ermittelt durch Studien in Gesunden, werden in der dynamischen 'Database of Genomic Variants' (DGV) gesammelt (Iafrate *et al.*, 2004). Sie dient der Öffentlichkeit zum Abgleich der eigenen Daten und kann das Ausschließen fehlinterpretierter Ergebnisse unterstützen. Eine Imbalance, die in einem MDS-Kollektiv mittels hochauflösender aCGH detektiert wird, muss keine MDS-spezifische Aberration darstellen, sondern es kann sich um einen bekannten CNV handeln. Mittlerweile können einige CNVs mit spezifischen Erkrankungen oder Eigenarten korreliert werden, wie z. B. mit einem vermehrten Osteoporose- (Yang *et al.*, 2008) oder Psoriasis-Risiko (Hollox *et al.*, 2008). Ein Großteil der CNVs umfasst Gene, welches ebenfalls dafür spricht, dass CNVs nicht als unbedeutende Varianten vernachlässigt werden können. Eine Kombination von bestimmten Varianten oder das vermehrte Auftreten einer Variante könnte eine spezifische Prädisposition darstellen.

Da aCGH-Analysen auf einem vergleichenden Prinzip beruhen, ist auch die Wahl der Referenz-DNA kritisch. Einige Arbeitsgruppen verwenden eine einzige Referenz-DNA, um eine einheitliche Bezugsquelle samt der potentiellen CNVs zu haben, andere einen DNA-Pool, um potentielle Imbalancen durch CNVs auszugleichen.

In dieser Arbeit werden CNVs erstmal als Polymorphismen angesehen, d. h. sie können auch in der gesunden Bevölkerung gefunden werden und stehen nicht im (direkten) Zusammenhang mit MDS.

## **1.8 Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, erstmalig eine größere Anzahl (> 100) zytogenetisch unauffälliger MDS-Proben mit der hochauflösenden Oligonukleotid-aCGH-Technik auf submikroskopische Aberrationen hin zu analysieren. Die Identifikation und Charakterisierung einer rekurrenten Veränderung oder neuer Anomalien könnte in Zukunft

einerseits zur Verbesserung der Klassifikation, Prognose und Therapie der Patienten führen und andererseits helfen, die MDS-Pathogenese zu beleuchten. Ob der Einsatz der neuen Technik als Routinemethode bei MDS sinnvoll und praktikabel ist, sollte überprüft werden. Dazu sollten die Aberrationen mit anderen Methoden bestätigt und verschiedene Auswerteprogramme miteinander verglichen werden.

Mit der bisherigen Routinetechnik, der klassischen Chromosomenbandenanalyse, werden bei nur ca. 50% der MDS-Erkrankten Aberrationen detektiert. Da die Chromosomenaberration mittlerweile als ein wichtiger prognostischer Faktor des multifaktoriell-bedingten MDS-Erkrankungsbildes anerkannt ist, sollte analysiert werden, ob eine effektivere Diagnosetechnik Aberrationen aufdecken kann. Identifizierte Imbalancen sollten mit weiteren Methoden wie FISH und qPCR verifiziert werden, um die Verlässlichkeit der aCGH-Technik zu belegen. Die Genauigkeit der Auswertelgorithmen und die Qualität der Daten sollten durch Vergleichsexperimente ermittelt werden. Zur Charakterisierung neuer Aberrationen sollten die genauen Bruchpunkte, wo möglich, mittels 'custom'-Arrays und 'long range'-PCRs bestimmt und rekurrent involvierte Gene oder chromosomale Regionen im Hinblick auf die Prognose oder den MDS-Phänotyp ausgewertet werden. Zudem sollte erforscht werden, ob die Genomstruktur verantwortlich für eine gewisse Chromosomenbrüchigkeit ist oder es zu einer systematischen Genbeteiligung spezifischer Signalwege bei MDS kommt.

## 2 Material

### 2.1 Puffer und Lösungen

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Agar ( <i>E. coli</i> )        | 1,5% Bacto Agar (w/v) in LB-Medium; autoklavieren                                       |
| Alkoholreihe                   | 70%, 85% und 100% Ethanol (v/v)   |
| Alkohol-Wasser-Gemisch         | 13% Ethanol (v/v)   |
| Ammoniumacetat (Plasmide)      | 4 M CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>  |
| Auftragungspuffer, 5x          | 25% Ficoll 70 / 25 mM EDTA / 0,1% Bromphenolblau  |
| Chloramphenicol-Stock          | 3,4% (w/v) in Ethanol, absolut; Endkonz. 1:1.000  |
| Dextransulfat-SSC              | 20% Dextransulfat (w/v) / 4x SSC (v/v)  |
| DNA-Stabilisierungspuffer, 10x | 0,01 M NaCl / 0,01 M EDTA / 0,05 M Tris   |
| EDTA                           | 0,5 M pH 8  |
| Erythrozyten-Lysepuffer        | 150 mM NH <sub>4</sub> Cl / 10 mM KHCO <sub>3</sub> / 0,1 mM EDTA; pH 7,4               |
| Essigsäure                     | 5% CH <sub>3</sub> COOH (v/v)   |
| Fixativ (Chromosomen)          | 3:1 Methanol / Eisessig (100% Essigsäure) (v/v)   |
| LB-Medium ( <i>E. coli</i> )   | 1% Bacto Tryptone (w/v) / 0,5% Bacto Yeast (w/v) / 1% NaCl (w/v); pH 7,5; autoklavieren |
| Lösung I (Plasmide)            | 50 mM Glucose / 25 mM Tris/Cl pH 8 / 10 mM EDTA pH 8; autoklavieren                     |
| Lösung II (Plasmide)           | 0,2 M NaOH / 1% SDS (v/v)   |
| Lösung III (Plasmide)          | 3 M Kaliumacetat / 11,5 % Eisessig (v/v)  |
| MACs-Puffer                    | 2 mM EDTA / 0,5% BSA (w/v) / in PBS, Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei      |
| Natriumacetat (Fällung)        | 3 M CH <sub>3</sub> COONa pH 5,2; autoklavieren   |
| SSC, 20x                       | 3 M NaCl / 0,3 M Natriumcitrat; pH 7; autoklavieren                                     |
| TAE, 50x                       | 2 M TrisBase / 5,71% Eisessig (v/v) / 50 mM EDTA  |
| TBE, 10x                       | 0,89 M TrisBase / 0,89 M Borsäure / 0,02 M EDTA   |
| TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)   | 10 mM Tris/Cl pH 7,5 / 1 mM EDTA pH 7,5; autoklavieren                                  |
| Tris/Cl                        | 1 M pH 7,4 Trizma/HCl – Trizma/Base; autoklavieren                                      |
| Wasch-I, 75°C (Vysis-FISH)     | 0,4x SSC / 0,3% NP-40 (v/v); pH 7   |
| Wasch-II, RT (Vysis-FISH)      | 2x SSC / 0,1% NP-40 (v/v); pH 7   |
| Waschlösung 1, 37°C (FISH)     | 2x SSC / 0,2% Tween-20  |
| Waschlösung 2, 42°C (FISH)     | 0,05x SSC   |

Die meisten verwendeten Chemikalien wurde von den Firmen Sigma-Aldrich und Merck bezogen. Lösungen wurden immer mit destilliertem oder sterilem Wasser angesetzt und teilweise autoklaviert.

### 2.2 Enzyme, Kits und Fluoreszenzfarbstoffe

|  |        |
|--|--------|
| QIAamp DNA Blood Midi Kit                              | Qiagen |
| QIAamp Midi Spin columns                               |        |
| Protease, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE |        |
| QIAquick PCR Purification Kit                          | Qiagen |

|   |   |            |
|---|---|------------|
| QIAquick spin column                              |   |            |
| Buffer PE, PB                                     |   |            |
| Buffer EB:  | 10 mM Tris-Cl (pH 8.5)  |            |
| QIAprep Miniprep Kit                              |   | Qiagen     |
| QIAprep Miniprep column                           |   |            |
| Buffer PE, PB                                     |   |            |
| Buffer EB:  | 10 mM Tris-Cl (pH 8.5)  |            |
| Plasmid Midi Kit                                  |   | Qiagen     |
| Buffer 1, 2, 3                                    |   |            |
| Buffer QF, QBT                                    |   |            |
| Restriction Endonuclease <i>EcoRI</i> , 10 U/μl   |   | Roche      |
| G▼ <sup>+</sup> A <sup>+</sup> ATT <sup>+</sup> C |   |            |
| +CTT <sup>+</sup> A <sup>+</sup> AT▲G             |   |            |
| 10x SuRE/Cut Buffer H                             |   |            |
| <i>AluI</i> (10 U/μl)                             |   | Promega    |
| AG▼CT   |   |            |
| TC▲GA   |   |            |
| 10x Buffer C, Acetylated BSA (10 μg/μl)           |   |            |
| <i>RsaI</i> (10 U/μL)                             |   | Promega    |
| GT▼AC   |   |            |
| CA▲TG   |   |            |
| 10x Buffer C, Acetylated BSA (10 μg/μl)           |   |            |
| RNase A, 10 mg/ml                                 |   | Sigma      |
| spaltet Phosphodiesterbindungen nach U und C      |   |            |
| <i>Taq</i> Polymerase, recombinant, 5 U/μl        |   | Invitrogen |
| 10X PCR Buffer:                                   | 200 mM Tris-HCl (pH 8.4) / 500 mM KCl   |            |
| 50 mM MgCl <sub>2</sub>                           |   |            |
| <i>Thermus aquaticus</i>                          |   |            |
| Elongase Enzyme Mix                               |   | Invitrogen |
| Polymerase Mix:                                   | 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) /   |            |
|   | 0,1 mM EDTA / 1 mM DTT / stabilizers /  |            |
|   | 50% (v/v) Glycerin  |            |
| 5x Buffer A:                                      | 300 mM Tris-SO <sub>4</sub> (pH 9,1, 25°C) /                                      |            |
|   | 90 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]                           |            |
| 5x Buffer B:                                      | 300 mM Tris-SO <sub>4</sub> (pH 9.1, 25°C) /                                      |            |
|   | 90 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 10 mM MgSO <sub>4</sub> ] |            |
| <i>Taq/Pyrococcus</i> species <i>GB-D</i>         |   |            |
| Expand 20kb <sup>PLUS</sup> PCR System            |   | Roche      |
| Enzyme Mix:                                       | 20 mM Tris-HCl (pH7.5, 25°C) /  |            |
|   | 100 mM KCl / 10 mM dithiothreitol (DTT) /   |            |
|   | 0,1 mM EDTA / 0,5% Nonidet P40 (v/v) /  |            |
|   | 0,5% Tween 20 (v/v) / 50% glycerol (v/v)]   |            |
| Reaction Buffer:                                  | 10x conc. with 27.5 mM MgCl <sub>2</sub>  |            |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> -Stock                    |   |            |
| <i>Taq</i> / <i>Tgo</i> DNA polymerase            |   |            |
| PCR Enzyme Selection Kit-High Fidelity            |   | Invitrogen |
| Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase High Fidelity  |   |            |
| Pfx50 DNA Polymerase                              |   |            |

|  |                      |
|--|----------------------|
| AccuPrime Pfx DNA Polymerase<br>Platinum PCR SuperMix High Fidelity  |                      |
| FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)  | Roche                |
| 2x Master Mix: FastStart Taq DNA Polymerase /<br>Reaction Buffer /<br>dATP, dCTP, dGTP, dUTP /<br>SYBR Green I, $\lambda_{Amax} = 494 \text{ nm}$ ,<br>$\lambda_{Emax} = 520 \text{ nm}$ /<br>Reference Dye ROX, $\lambda_A = 587 \text{ nm}$ ,<br>$\lambda_E = 607 \text{ nm}$  |                      |
| SALSA MLPA kit P070 Human Telomere-5   | MRC Holland          |
| Probemix, SALSA MLPA Buffer, Ligase-65,<br>Ligase-65 Buffer A, Ligase-65 Buffer B, SALSA PCR Buffer,<br>SALSA PCR primer mix, SALSA polymerase,<br>SALSA Enzyme dilution Buffer, Denaturation Buffer   |                      |
| Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit   | Applied Biosystems   |
| Ready Reaction Mix<br>5x BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer  |                      |
| ExoSAP-IT  | USB                  |
| ExoSAP-IT  |                      |
| MEGA-spin Agarose Gel Extraction Kit   | Intron Biotechnology |
| MEGA-spin™ column, Agarose Lysis Buffer,<br>Washing Buffer, Elution Buffer   |                      |
| DIG-Nick Translation Mix   | Roche                |
| 5x Mix DIG Mix: DNA Polymerase I / DNase I /<br>0,25 mM each dATP, dCTP, dGTP /<br>0,17 mM dTTP, 0,08 mM DIG-11-dUTP   |                      |
| BioNick Labeling System  | Invitrogen           |
| 10x Enzyme Mix: 0,5 U/μl DNA Polymerase /<br>0,007 U/μl DNase I  |                      |
| 10x dNTP Mix: 0,2 mM each dCTP, dGTP, dTTP /<br>0,1 mM dATP, 0,1 mM biotin-14-dATP   |                      |
| Stop Buffer 0,5 M EDTA pH 8  |                      |
| Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit   | Agilent Technologies |
| Exo-Klenow, Random Primers<br>Cyanine 3-dUTP, 1 mM, $\lambda_A = 550 \text{ nm}$ , $\lambda_E = 570 \text{ nm}$<br>Ozon-sensitiv $\geq 100 \text{ ppb}$<br>Cyanine 5-dUTP, 1 mM, $\lambda_A = \sim 650 \text{ nm}$ , $\lambda_E = 670 \text{ nm}$<br>Ozon-sensitiv $\geq 5-10 \text{ ppb}$<br>5x Reaction Buffer, 10X dNTP Mix |                      |
| DAPI, Stock: 10 μg/μl, Endkonz.: 3 ng/μl<br>$\lambda_A = 340 \text{ nm}$ , $\lambda_E = 488 \text{ nm}$ ; 1:333 (v/v)  | Roche                |
| Cy3-conjugated Streptavidin (red)<br>Biotin-specific<br>$\lambda_A = 550 \text{ nm}$ , $\lambda_E = 570 \text{ nm}$ ; 1:500 (v/v)  | Dianova              |
| Anti-digoxigenin-fluorescein, Fab fragments (green)<br>$\lambda_A = 494 \text{ nm}$ , $\lambda_E = 523 \text{ nm}$ pH 8,0; 1:100 (v/v)   | Roche                |
| Ethidium bromide solution (~ 1% in water)  | Fluka Chemie         |

|   |                      |
|---|----------------------|
| $\lambda_A = 254-366$ nm, $\lambda_E = 530$ nm in 50 mM Phosphat pH 7 |                      |
| 0,1-0,5 $\mu\text{g/ml}$ in Agarosegelen                              |                      |
| Oligo aCGH Hybridization Kit  | Agilent Technologies |
| 2x Hi-RPM Hybridization Buffer  |                      |
| 10x Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Blocking Agent                            |                      |

## 2.3 Sonstiges Material und kommerzielle Reagenzien

|   |                        |
|---|------------------------|
| Acetonitrile, anhydrous, 99.8%  | Sigma-Aldrich          |
| BactoAgar   | Difco Laboratories     |
| BactoTryptone   | Difco Laboratories     |
| BactoYeast  | BD and Company         |
| Biocoll, Dichte 1,077g/ml   | Biochrom               |
| BSA   | Sigma-Aldrich          |
| CD3 MicroBeads human  | Miltenyi Biotec        |
| Chloroform  | Roth                   |
| dNTPs, Arbeitslsg.:10 mM – je dNTP 2,5 mM                             | Amersham               |
| Dulbecco's PBS  | Paa                    |
| Ethanol pro analysis  | Merck                  |
| Ficoll 400  | PharmaciaChemicals     |
| Filmabstreifer  | Jobo                   |
| Fixogum Rubber Cement   | Marabuwerke            |
| Formamid (entionisiert)   | Sigma-Aldrich          |
| Fötale Kälberserum  | Cytogen                |
| GenClean Dye Terminator Removal                                       | Genomics Genetix       |
| Histokitt   | Roth                   |
| Human Cot-1 DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )                        | Invitrogen             |
| Hybridization Chamber gasket slides, for 1x, 2x or 4x Microarrays     | Agilent Technologies   |
| KaryoMax Colcemid Solution  | Gibco                  |
| Isopropanol pro analysis  | Merck                  |
| L-Glutamin  | Sevamed                |
| LS Columns  | Miltenyi Biotec        |
| Marrow Max Medium   | Gibco                  |
| MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate                               | Applied Biosystems     |
| MicroAmp Optical Adhesive Film  | Applied Biosystems     |
| Microcon YM-30 Centrifugal filter Units Millipore                     | Agilent Technologies   |
| NP-40 (Nonidet P40)   | Roche                  |
| NuSieve 3:1 Agarose   | Cambrex BioScience     |
| Oligo aCGH Wash Buffer 1 and 2 set                                    | Agilent Technologies   |
| Parafilm  | Pechiney Packaging     |
| peqGOLD Low Melt Agarose  | peq Lab Biotechnologie |
| Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1                              | Roth                   |
| Proteinase K  | Roche                  |
| QuadroMACS-Separator  | Miltenyi Biotec        |
| RNase Out Ribonuclease Inhibitor, recombinant (400 U/ $\mu\text{l}$ ) | Invitrogen             |
| RPMI 1640-Medium  | Biochrom               |
| Salmon Testes DNA (9,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )                    | Sigma                  |
| SeaKem LE Agarose   | Cambrex BioScience     |
| Stabilization and Drying Solution                                     | Agilent Technologies   |

|                                  |                      |
|----------------------------------|----------------------|
| TE, 1x, pH 8.0, molecular grade  | Promega              |
| Tris EDTA Buffer solution pH 7,4 | Fluka Bio Chemica    |
| Trockenblock (Löschblatt)        | Schleicher & Schuell |
| Trypsin 250                      | Difco                |
| Tween-20                         | Sigma                |
| Vectashield Mounting Medium      | Vector Laboratories  |

## 2.4 Größen- und Konzentrationsmarker

|  |            |
|--|------------|
| TrackIt 1 kb DNA Ladder (0,1 µg/µl)<br>500 ng/5 µl auftragen<br>bp: 75 / 134 / 154 / 201 / 220 / 298 / 344 / 396 / 506, 517 /<br>1.018 / 1.636 / 2.036 / 3.054 / 4.072 / 5.090 / 6.108 /<br>7.126 / 8.144 / 9.162 / 10.180 / 11.198 / 12.216 | Invitrogen |
|--|------------|

|   |            |
|---|------------|
| 100 bp DNA Ladder (0,1 µg/µl)<br>500 ng/5 µl auftragen<br>100 / 200 / 300 / 400 / 500 / 600 / 700 / 800 / 900 /<br>1.000 / 1.100 / 1.200 / 1.300 / 1.400 / 1.500 / 2.072 bp | Invitrogen |
|---|------------|

|   |            |
|---|------------|
| Smart Ladder (0,144 µg/µl)<br>720 ng/5µl auftragen<br>bp: 200 / 400 / 600 / 800 / 1.000 / 1.500 / 2.000 / 2.500 / 3.000 /<br>4.000 / 5.000 / 6.000 / 8.000 / 10.000 | Eurogentec |
|---|------------|

## 2.5 BACs und PACs für FISH-Sonden

Alle BACs und PACs wurden über den UCSC-, Ensembl- oder den DGV-Genome Browser ausgewählt und auf ihre genomische Lokalisation überprüft. Bestellt wurden die bereits transformierten Klone, immer *E. coli*-Wirtstamm DH10B, über ImaGenes, ehemals Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin). Bei allen 71 BACs handelte es sich um denselben Grundvektor pBACe3.6 mit einer integrierten Chloramphenicolresistenz, bei dem einen PAC um den Vektor pCYPAC2 mit einer Kanamycinresistenz.

**Tabelle 2.5-1:** Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten BAC- und PAC-Klone und ihrer wichtigsten Charakteristika. Die BACs 3, 6, 9, 21, 22, 25, 30, 32, 34, 36, 37, 39-43, 45, 48, 53, 63 und 72 (29%) konnten in den späteren Patienten-Analysen nicht als FISH-Sonden eingesetzt werden, da diese bei ihrer Etablierung nicht an den gewünschten genomischen Lokus hybridisierten. Ca. 30 der 72 Klone wurden von Dipl. Biol. V. Moeller aufgearbeitet und etabliert.

| Nr. | BAC/PAC      | Biblio-<br>thek | Chr.-Lokus | Genom-Lokus (bp)        | Größe<br>(bp) | Test-<br>FISH |
|-----|--------------|-----------------|------------|-------------------------|---------------|---------------|
| 1   | RP11-259N12  | 753             | 1p21.1     | 103.956.056-104.113.271 | 157.222       | gut           |
| 2   | RP11-724N3   | 737             | 2p23.3     | 24.057.379-24.247.849   | 190.471       | gut           |
| 3   | RP11-845E8   | 753             | 2q13       | 110.177.474-110.348.641 | 171.168       | falsch        |
| 4   | RP11-963F8   | 753             | 2q33.2     | 203.804.972-204.003.029 | 198.058       | gut           |
| 5   | RP11-356A16  | 753             | 8p11.23    | 39.279.349-39.460.205   | 180.857       | gut           |
| 6   | RP11-776C8   | 753             | 8p23.1     | 8.440.431-8.624.184     | 183.754       | falsch        |
| 7   | RP11-1060C20 | 753             | 7q22.1     | 100.545.820-100.728.336 | 182.517       | gut           |

| Nr. | BAC/PAC     | Biblio-<br>thek | Chr.-Lokus    | Genom-Lokus (bp)        | Größe<br>(bp) | Test-<br>FISH |
|-----|-------------|-----------------|---------------|-------------------------|---------------|---------------|
| 8   | RP11-347A2  | 737             | 7q22.1        | 101.532.191-101.726.167 | 193.977       | gut           |
| 9   | RP11-203D11 | 753             | 7q22.1        | 102.566.145-102.752.206 | 186.062       | falsch        |
| 10  | RP11-456G14 | 753             | 11q22.1       | 99.230.416-99.403.441   | 173.026       | gut           |
| 11  | RP11-319H1  | 753             | 14q11.2       | 21.640.982-21.809.595   | 168.614       | gut           |
| 12  | RP11-953L20 | 753             | 14q32.33      | 104.832.391-105.027.068 | 194.678       | gut           |
| 13  | RP11-299D9  | 753             | 21q22.12      | 35.063.081-35.202.401   | 139.321       | gut           |
| 14  | RP11-483M4  | 753             | 21q22.12      | 35.208.903-35.381.013   | 172.111       | gut           |
| 15  | RP11-419G6  | 753             | 21q22.12      | 35.516.647-35.693.145   | 176.499       | gut           |
| 16  | RP11-836E15 | 737             | 21q22.3       | 43.905.790-44.108.003   | 202.214       | gut           |
| 17  | RP11-1G6    | 753             | 8p23.1        | 8.242.249-8.404.570     | 162.322       | gut           |
| 18  | RP11-702L6  | 737             | 3q13.13       | 110.593.449-110.796.151 | 202.703       | gut           |
| 19  | RP11-211C9  | 737             | 8p23.1        | 8.489.836-8.677.701     | 187.866       | gut           |
| 20  | RP11-111M12 | 753             | 4q24          | 106.387.724-106.569.602 | 181.879       | gut           |
| 21  | RP11-206H15 | 737             | 13q21.33      | 69.324.434-69.448.839   | 124.406       | falsch        |
| 22  | RP11-19I2   | 753             | 19p13.2       | 11.643.369-11.816.255   | 172.887       | falsch        |
| 23  | RP11-96F10  | 737             | 5p14.1        | 26.853.475-27.013.435   | 159.961       | gut           |
| 24  | RP11-27M5   | 737             | 2q33.1~33.2   | 202.986.989-203.101.847 | 114.859       | gut           |
| 25  | RP11-404O21 | 737             | 2q13          | 111.008.549-111.171.002 | 162.453       | falsch        |
| 26  | RP11-9E13   | 737             | 10q21.3       | 69.773.794-69.912.526   | 138.733       | gut           |
| 27  | RP11-11I5   | 753             | 19p13.2~13.13 | 12.587.923-12.782.977   | 195.055       | gut           |
| 28  | RP11-348B12 | 737             | 19p13.3       | 4.960.408-5.144.570     | 184.163       | gut           |
| 29  | RP11-578G22 | 753             | 14q13.1~13.2  | 34.012.388-34.227.432   | 215.045       | gut           |
| 30  | RP11-692M12 | 737             | 11p11.2       | 47.625.642-47.845.924   | 220.282       | falsch        |
| 31  | RP11-709C9  | 737             | 11p11.2       | 48.047.112-48.247.226   | 198.114       | gut           |
| 32  | RP11-227H15 | 737             | 10q21.3       | 70.598.662-70.779.209   | 178.548       | falsch        |
| 33  | RP11-505P4  | 737             | 6q13          | 74.172.931-74.307.034   | 134.103       | gut           |
| 34  | RP11-629N4  | 737             | 4q12          | 53.679.856-53.869.569   | 189.713       | falsch        |
| 35  | RP11-214J9  | 737             | 2p23.3        | 26.126.585-26.307.794   | 179.449       | gut           |
| 36  | RP11-299P9  | 737             | 21q22.12      | 35.818.395-36.010.468   | 192.074       | falsch        |
| 37  | RP11-120K9  | 737             | 15q21.2       | 48.602.466-48.768.604   | 166.138       | falsch        |
| 38  | RP11-83O12  | 737             | 9p21.1        | 28.202.458-28.293.952   | 91.495        | gut           |
| 39  | RP11-197O4  | 737             | 19p13.2       | 10.249.508-10.410.618   | 161.111       | falsch        |
| 40  | RP11-121J6  | 737             | 13q21.33      | 69.542.630-69.709.332   | 166.703       | falsch        |
| 41  | RP11-44M6   | 737             | 7q22.1        | 99.925.039-100.038.725  | 113.686       | falsch        |
| 42  | RP11-586I18 | 753             | 22q11.21      | 18.859.173-18.981.805   | 122.633       | falsch        |
| 43  | RP11-701A10 | 737             | 2q13          | 110.564.295-110.739.535 | 175.240       | falsch        |
| 44  | RP11-957K9  | 753             | 21q22.12      | 35.911.832-36.093.358   | 181.527       | gut           |
| 45  | RP11-468M15 | 737             | 7q34          | 142.488.747-142.592.533 | 103.786       | falsch        |
| 46  | RP11-143H23 | 753             | 5q23.2        | 124.700.559-124.851.206 | 150.648       | gut           |
| 47  | RP11-815P21 | 753             | 14q32.33      | 105.149.438-105.332.624 | 183.186       | gut           |
| 48  | RP11-144B8  | 737             | 2p12          | 76.517.909-76.684.200   | 166.292       | falsch        |
| 49  | RP11-562A8  | 737             | 15q21.2       | 48.432.585-48.631.136   | 198.551       | gut           |
| 50  | RP11-465A21 | 737             | 12p13.32      | 5.132.587-5.164.844     | 32.257        | gut           |
| 51  | RP11-419M2  | 753             | 5p14.3        | 20.970.991-21.136.670   | 165.680       | gut           |
| 52  | RP11-568G5  | 737             | 12q12         | 38.938.059-38.993.059   | 55.000        | gut           |
| 53  | RP11-139C3  | 753             | 14q21.3       | 45.576.191-45.752.637   | 176.447       | falsch        |
| 54  | RP11-345F18 | 737             | 4q12          | 56.346.678-56.541.832   | 195.154       | gut           |
| 55  | RP11-393M11 | 737             | 4q12          | 56.958.301-57.098.144   | 139.843       | gut           |
| 56  | RP11-314L21 | 737             | 16q21         | 58.483.217-58.658.319   | 175.102       | gut           |
| 57  | RP11-166J22 | 737             | 5q31.2        | 137.542.266-137.734.108 | 191.843       | gut           |
| 58  | RP11-440N18 | 753             | 8q24.21       | 128.665.938-128.847.168 | 181.231       | gut           |
| 59  | RP11-118O8  | 753             | 8q21.3        | 92.998.431-93.166.789   | 168.359       | gut           |
| 60  | RP11-759G10 | 753             | 5q33.1        | 149.543.080-149.727.151 | 184.072       | gut           |
| 61  | RP11-688K20 | 753             | 7q31.2        | 115.826.398-115.986.985 | 160.588       | gut           |
| 62  | RP11-411H5  | 737             | 1p21.2~21.1   | 101.879.592-102.009.471 | 128.879       | gut           |
| 63  | RP11-283D18 | 737             | 7q33          | 132.945.537-133.153.327 | 207.790       | falsch        |
| 64  | RP4-687K1   | 737             | 14q24.2       | 72.613.813-72.674.730   | 60.918        | gut           |
| 65  | RP11-527B14 | 737             | Xp22.31       | 8.012.262-8.127.696     | 115.434       | gut           |

| Nr. | BAC/PAC     | Bibliothek | Chr.-Lokus | Genom-Lokus (bp)        | Größe (bp) | Test-FISH |
|-----|-------------|------------|------------|-------------------------|------------|-----------|
| 66  | RP11-552F24 | 737        | Xq25       | 126.029.587-126.099.537 | 69.950     | gut       |
| 67  | RP11-144B9  | 737        | 2p16.3     | 52.233.819-52.347.707   | 113.888    | gut       |
| 68  | RP11-354C13 | 753        | 5q35.3     | 177.410.194-177.581.223 | 171.030    | gut       |
| 69  | RP11-1107L7 | 753        | 14q21.3    | 45.675.364-45.760.842   | 85.479     | gut       |
| 70  | RP11-622P3  | 737        | 3p26.2     | 4.376.629-4.562.896     | 186.267    | gut       |
| 71  | RP11-978I1  | 753        | 12p13.31   | 7.556.104-7.766.805     | 210.702    | gut       |
| 72  | RP11-31H22  | 753        | 2p21       | 46.875.976-47.042.696   | 166.721    | falsch    |

Zusätzlich wurden Subtelomer-BAC-Sonden, die im Institut für Humangenetik in der Diagnostik eingesetzt werden, als Referenzsonden verwendet.

Hinweis:

Alle Genom-Lokus-Angaben dieser Arbeit beziehen sich auf die Referenzgenomangaben hg 18' (Human Genome Build') bzw. NCBI 36 ('National Center for Biotechnology Information') bzw. UCSC März 2006 ('University of California, Santa Cruz').

## 2.6 Kommerzielle FISH-Sonden

Alle kommerziellen Sonden, Puffer und DAPI wurden von Vysis-Abbott bezogen.

LSI 21 SpectrumOrange (21q22.13-q22.2)  
 LSI *EGR1* SpectrumOrange (5q31) / D5S23, D5S721 SpectrumGreen (5p15.2)  
 LSI *TEL* SpectrumGreen (12p13) / LSI *AML* SpectrumOrange (21q22)  
 LSI *ETO* SpectrumOrange (8q22) / LSI *AML1* SpectrumGreen (21q22)  
 LSI *BCL6* SpectrumGreen / SpectrumOrange (3q27) Break Apart  
 LSI *ELN* SpectrumOrange (7q11.23) / LSI D7S486, D7S522 SpectrumGreen (7q31)  
 LSI *IGH* SpectrumGreen (14q32) / LSI *FGFR3* SpectrumOrange (4p16)  
 LSI *STS* SpectrumOrange (Xp22.3) / CEP X SpectrumGreen (Xp11.1-q11.1)  
 CEP 7 SpectrumOrange (7p11.1-q11.1) DNA Probe  
 CEP 8 SpectrumGreen (8p11.1-q11.1) DNA Probe  
 WCP 21q SpectrumOrange Probe  
 DAPI II Counterstain; LSI/WCP Hybridization Buffer; CEP Hybridization Buffer

## 2.7 Verwendete Mikroarrays

Alle verwendeten Mikroarrays wurden von der Firma Agilent Technologies bezogen. Die 'custom'-Arrays wurden mit Hilfe der eArray-Plattform von Agilent Technologies entworfen und werden unter Methoden spezifiziert.

Kommerzielle Formate:

HD-Human Genome CGH Microarray Kit 1x44B k (ersetzt gegen 4x44 k), Design 13282  
 HD-Human Genome CGH Microarray Kit 4x44A k, Design 14950  
 HD-Human Genome CGH Microarray Kit 2x105A k, Design 14698  
 HD-Human Genome CGH Microarray Kit 1x244A k, Design 14693

'Custom' Formate:

'Custom'-Array1: HD-Human Genome CGH Microarray, 4x44 k, Design 021122

'Custom'-Array2: HD-Human Genome CGH Microarray, 4x44 k, Design 024793

## 2.8 DHPLC

Folgendes Schmelzmethoden-Programm wurde für die *TET2*-Mutationsanalyse mit Hilfe der Auswertesoftware erstellt.

**Tabelle 2.8-1:** Übersicht über die Amplikon-spezifischen, generierten Schmelzprogramme.

| <i>TET2</i> -Amplikon (Exon) | Schmelz-Programm (°C) | Misch-Wildtyp DNA | <i>TET2</i> -Amplikon (Exon) | Schmelz-Programm (°C) | Misch-Wildtyp DNA |
|------------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------|
| <b>3Aa</b>                   | 51 / 56 / 60          | KC                | <b>3C</b>                    | 54 / 56,5             | KC                |
| <b>3Ab</b>                   | 55,5 / 57,5           | KA                | <b>4</b>                     | 53 / 55 / 56          | KC                |
| <b>3Ac</b>                   | 55 / 58 / 60          | KC                | <b>5</b>                     | 56 / 59 / 61          | KC                |
| <b>3Ad</b>                   | 56 / 58               | KA                | <b>6</b>                     | 52 / 54 / 57,5        | KC                |
| <b>3Ae</b>                   | 57 / 58 / 59          | KA                | <b>7</b>                     | 52,5 / 54 / 55        | KA                |
| <b>3Af</b>                   | 54 / 57 / 58          | KA                | <b>8</b>                     | 55 / 57 / 60,5        | KC                |
| <b>3Ag</b>                   | 54,5 / 56,5           | KA                | <b>9</b>                     | 54 / 57,5 / 59        | KA                |
| <b>3Ah</b>                   | 57 / 59 / 60          | KC                | <b>10a</b>                   | 55 / 57 / 58 / 62     | KC                |
| <b>3Ai</b>                   | 58,5 / 59,5           | KA                | <b>10b</b>                   | 57                    | KA oder KC        |
| <b>3AJ</b>                   | 55 / 56               | KA                | <b>10c</b>                   | 58,5 / 61             | KC                |
| <b>3B</b>                    | 55 / 56               | KC                | <b>10d</b>                   | 57,5 / 59             | KC                |

## 2.9 Software und Internettools

|  |                        |
|--|------------------------|
| Genomic Workbench V5.0.14 (GW)   | Agilent Technologies   |
| Feature Extraction V10.1.1.1 (FE)  | Agilent Technologies   |
| Scan Control V7.0.3  | Agilent Technologies   |
| Sequence Detection Software V2.2 (SDS)   | Applied Biosystems     |
| ISIS V5.2.20   | MetaSystems            |
| Office 2003- Word, Excel, Powerpoint   | Microsoft              |
| Chromas LITE V2.01   | Technelysium Pty. Ltd. |
| WAVEMaker V4.1   | Transgenomic           |
| WAVE Analysis Software D-7000 HSM  | Transgenomic           |
| NanoDrop-1000 Software V3.71   | Thermo Scientific      |
| <a href="https://earray.chem.Agilent Technologies.com/earray/">https://earray.chem.Agilent Technologies.com/earray/</a> (Custom Array Design)      |                        |
| <a href="http://www.operon.com/technical/toolkit.aspx">http://www.operon.com/technical/toolkit.aspx</a> (Oligo Analysis Tool, Tm)                  |                        |
| <a href="http://projects.tcag.ca/variation/">http://projects.tcag.ca/variation/</a> (DGV, Kopienzahlvarianten-Datenbank, Genome Browser)           |                        |
| <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> (Biomedizin- und Genetik-Informationsplattform)                            |                        |
| <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp</a> (SNP-Datenbank)                      |                        |
| <a href="http://www.r-projekt.org/hc3.asp">http://www.r-projekt.org/hc3.asp</a> (Statistical Computing verwendet von M. Beier)                     |                        |
| <a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a> (Genome Browser, Referenzsequenzen)                              |                        |
| <a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a> (Genome Browser, Referenzsequenzen)  |                        |
| <a href="http://bioinfo.ut.ee/genometester/">http://bioinfo.ut.ee/genometester/</a> (GenomeTester V1.3)  |                        |
| <a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</a> (Primerdesign V0.4.0)  |                        |
| <a href="http://www.fr33.net/seqedit.php">http://www.fr33.net/seqedit.php</a> (Sequenzeditor)  |                        |
| <a href="http://www.imagenes-bio.de/">http://www.imagenes-bio.de/</a> (BAC-Klon-Informationen)   |                        |
| <a href="http://bioinfo-out.curie.fr/projects/glad/">http://bioinfo-out.curie.fr/projects/glad/</a> (Gain and Loss Package verwendet von M. Beier) |                        |
| <a href="http://www.bioconductor.org/">http://www.bioconductor.org/</a> (Grafikpakete verwendet von M. Beier)                                      |                        |
| <a href="http://www.abbottmolecular.com/">http://www.abbottmolecular.com/</a> (Informationen zu kommerziellen FISH-Sonden)                         |                        |

## 2.10 Geräte

### Zentrifugen:

- Hermle Zentrifuge Z 200 M/H, maximal  $120000 \text{ min}^{-1}$  (12000 rpm); Rotor 220.59 V04 (R = 89 mm)
- Hermle Zentrifuge Z 233 MK, Temperaturwahl, speed rpm / rcf g x 10, fast / slow, maximal  $13500 \text{ min}^{-1}$  (13500 rpm); Rotor 220.59 V07
- Sorvall Instruments Du Pont RC-3B Refrigerated Centrifuge, maximal 4000 rpm; Rotor H 6000A
- Sorvall Instruments Du Pont RT 7, maximal 3800 (3200) rpm, rcf/min x 1000,  $-10^{\circ}$ - $45^{\circ}\text{C}$ , Bremse an / aus; Rotor RTH-250
- Hettich Zentrifugen, maximal 4000 rpm; Rotor 5094A, 594
- Heraeus Instruments Megafuge 3.0 R

### qPCR-, Array-, DHPLC- und FACS-Geräte:

- Transgenomic WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System D-7000
- Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System mit 96 well Block
- Agilent Technologies DNA Microarray Scanner G2565CA/G2505B
- Agilent Technologies Hybridization Oven G2545A,  $+5^{\circ}$ - $70^{\circ}\text{C}$ , 5-20 rpm
- Becton, Dickinson (BD) Science FACSCalibur™ platform
- Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer (BMFZ Düsseldorf Gelauftragservice)

### Inkubatoren, Wasserbäder und Cycler:

- National Labnet Co. Schüttelinkubator, Vortemp 56 EVC
- Eppendorf Thermomixer 5436,  $10^{\circ}\text{C}$ - $95^{\circ}\text{C}$
- Certomat BS-1 Braun Biotech International, Brutschrank mit Schüttler
- Grant Instruments Wasserbäder
- MJ Research Inc. PTC-200 Peltier Thermal Cycler, 0,2 oder 0,5 ml tubes
- MJ Research Inc. PTC-100 Peltier Thermal Cycler, 0,2 ml tubes
- Eppendorf Mastercycler gradient, 0,2 oder 0,5 ml tubes

### Mikroskope und Zubehör:

- Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop; Filter: Aqua, Triple, Rhodamin, FITC  
Okulare: PI 10 x 25, 444034; Kamera: PCO CCD Imaging VC45; Lampe: Typ HBO 103 W/2, 300 h; Objektive (Zeiss): PH3 Plan-Neofluar 100 x/1,30 oil, 440481; Plan-Neofluar 63x/1,25 oil, 440460
- Leitz Orthoplan 860351 MT 407E15; Okulare: Periplan GW 10 x M; Objektive: PI Apo 16/0,40 Phaco 1 170/0,17; PI Apo oel 100/1,32 170/0,17 c87033; PI Apo oel 40/1,00 170/0,17 c109066; 40/0,65 170/0,17

### Sonstige Laborgeräte:

- Knick pH-Meter 766 Calimatic
- Kern Waage 440-47
- Thermo Scientific NanoDrop® ND-100 Spectrophotometer
- TPX 35 M Vilber Labourmat UV-Lampe 6 x 15 W, 312 nm Tube und Intas Science Imaging Instruments GmbH Kamera
- IDL Taumelrollenmischer TRM-V
- Heizplatten, Magnetrührer, Vortexer

## 2.11 Primer

Alle Primer wurden unmodifiziert und von der Firma Eurofins MWG Operon als Lyophilisat bezogen. Die qPCR-Primer wurden HPLC ('high performance liquid chromatography')-aufgereinigt, alle anderen HPSF ('high purity salt free')-aufgereinigt bestellt. Es wurden immer 100 pmol/μl-Stocks und 10 pmol/μl-Arbeitslösungen mit PCR-Wasser hergestellt und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 2.11-1:** Übersicht aller Primer mit denen ein Produkt zu amplifizieren war oder die für eine Sequenzierung eingesetzt wurden. NP = Nebenprodukt; Del.spez = Deletions-spezifisch; f / for / + = forward; r / rev / - = reverse; Genom. = genomischer; EX = in Exon; IX = in Intron; TD = touchdown PCR; App. Bios. = Applied Biosystems

| Forward-Primer                | Reverse-Primer | Ungefährer Genom. Lokus (bp) | Forward-Sequenz (5'→3')  | Reverse-Sequenz (5'→3')  | Produkt (bp) | Annealing PCR/qPCR (°C) | Optimale Konz. (nM) |
|-------------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|-------------------------|---------------------|
| <b>Multiplex-PCRs</b>         |                |                              |                          |                          |              |                         |                     |
| 1q24NME7+                     | 1q24NME7-      | chr1:167493519-167493800     | cagtctctttcattgtgttgc    | ctgggtcataatgccttttct    | 282          | 56                      | 500/500             |
| PAX_E5+                       | PAX_E5-        | chr1:18763723-18763841       | gaggaccaagctgacagagg     | tccattaaaccactgacc       | 119          | 61,1                    | 500/500             |
| 4q24+                         | 4q24-          | chr4:106375340-106375451     | cactcaccatcgcatacc       | agcatcatcagcatcacagg     | 112          | 60,2                    | 500/500             |
| 5p15f                         | 5p15r          | chr5:12778071-12778279       | gcagaaagactatggggagttc   | atgtgggacacctgttcacc     | 209          | 57,1                    | 500/500             |
| 6q14Redon+                    | 6q14Redon-     | chr6:79058590-79058789       | tgcttgagggatggttctc      | gagccatgggagatctgaat     | 200          | 57                      | 500/500             |
| 6q27unknown+                  | 6q27unknown-   | chr6:165645979-165646297     | actattgttctttgctaggactgc | aactggaatcacttattgtgacct | 319          | 58                      | 500/500             |
| 8pRedon+                      | 8pRedon-       | chr8:39373798-39373979       | cccattgtagccctttggag     | agcagaatggggatgatgaa     | 182          | 55                      | 500/500             |
| NEL_110E11+                   | NEL_110E11-    | chr11:20925450-20925557      | gctccagggtggagtttag      | ctctacagacacggcagcac     | 108          | 60,7                    | 500/500             |
| 11q11Redon+                   | 11q11Redon-    | chr11:55162754-55162919      | gatggcctatgaccgctatg     | atttgggccacaaaatggta     | 166          | 53-55                   | 500/500             |
| 14q21f                        | 14q21r         | chr14:45593058-45594000      | tcaggaagaaaaatgacctcca   | tgagactgtgccaagaaatgaa   | 232          | 57,1                    | 500/500             |
| EPB+                          | EPB-           | chr15:41285827-41286064      | tgagaaagacaacggcatcc     | ggcactgagcgtgaggtg       | 238          | 59,4                    | 500/500             |
| LYS_11E2+                     | LYS_11E2-      | chr15:49804589-49804732      | caaatccaagaaagcattgtg    | tggccctttaatctgttcc      | 144          | 57,1                    | 500/500             |
| Xq25+                         | Xq25-          | chrX:126089396-126089624     | tgaaggggcaaaagcaaattc    | tggaggaggggctagagaag     | 229          | 55,7                    | 500/500             |
| <b>Bruchpunktbestimmungen</b> |                |                              |                          |                          |              |                         |                     |
| 2p24klonf                     | 2p23klonr      | chr2:20736628-27440954       | gtgactgggcaaaagatggtc    | gcaatgtaagcgggggagaac    | Del.spez.    | 59                      | 200/200             |
| 2p21klonf                     | 2p21klonr      | chr2:46953823-47027834       | tctccattcctcctctca       | cagagcaaaaaaccctgt       | Del.spez.    | 57                      | 200/200             |
| 4q24klonf                     | 4q24klonr      | chr4:106238012-106509404     | caatctggatgctgttgaag     | taacgatgactcccaaatctcc   | Del.spez.    | 58                      | 200/200             |
| 4q24nestf                     | 4q24nestr      | chr4:106239711-106508845     | tctcctgacatctctctcag     | tgtcaggaaaccatcctacag    | Del.spez.    | 60                      | 200/200             |
| 5p15klonf                     | 5p15klonr      | chr5:12725304-12796123       | tccatgttcaagggtacttt     | tctctgaaaggactgtgggaaa   | Del.spez.    | 55                      | 200/200             |
| 5p15seq2f                     |                | chr5:12728128                | tccttagtattgtgctagatggg  |                          | seq          |                         | 500                 |
| MDS5q31for1                   | MDS5q31rev1    | chr5:137230849-138995756     | acctccctacctcccagtg      | catcagtccttcagcacacc     | Del.spez.    | Kati                    | 400/400             |
| neMDS5q31for1                 | MDS5q31rev1    | chr5:137231199-138995510     | ttccctattcactgccctccc    | ccacagatccaagacacccttc   | Del.spez.    | Kati                    | 400/400             |
| seq5q31for2                   | seq5q31rev     | chr5:137233023-138993079     | tttcatggcaaatgttcatc     | aagaacagggaccacctcag     | seq          |                         | 500                 |
| 7q11klonf                     | 7q11klonr      | chr7:68968613-69028819       | cccctgtgtactgcatca       | tataggcgcaccaccatacc     | Del.spez.    | 59                      | 200/200             |

|                              |             |                          |                             |                          |           |         |            |
|------------------------------|-------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------|---------|------------|
| 7q22klonf                    | 7q22_Er     | chr7:99848678-101700624  | ctccccatactccatctcca        | ttgggggatagggagcacag     | Del.spez. | 57      | 400/400    |
| 7q34klonf                    | 7q34klonr   | chr7:142533965-142605912 | tcccttctcctaagcataca        | ctttgaaaacgggtgctcctg    | Del.spez. | 57      | 200/200    |
| 7q34seq1f                    |             | chr7:142534601           | gactctggcataacaaggaagaaa    |                          | seq       |         | 500        |
| 15q21klonf                   | 15q21klonr  | chr15:53288440-53345189  | gaaggagaatggaatcagcaag      | atcagtcagcccaagatgtgtt   | Del.spez. | 57      | 400/400    |
| 15q21seq2f                   | 15q21seq2r  | chr15:53290513-53340263  | cctttcccctctgttcttgg        | ccccactccaaccctaata      | Del.spez. | 59,5    | 400/400    |
| 21q21klonf                   | 21q21klonr  | chr21:26093898-26157082  | gccagggacatcatcataccta      | aggtcagtcagaggctacaga    | Del.spez. | 60      | 300/300    |
| 21q21klon2f                  | 21q21klon2r | chr21:26094578-26156907  | gctccagtttcacacaaacac       | ttgccactaggagggtctct     | Del.spez. | 58      | 400/400    |
| 5upBRUNf                     | 3upRUNr     | chr21:35072226-35763917  | caccaaccgataattcctgttag     | gtcctcaccagaaccaacc      | Del.spez. | 58      | 500/500    |
| 5upRUNXf                     | RUNXI1r     | chr21:35211465-35915368  | ctgggtgtaaaatgaagtgtgg      | cagagattgaaagcccatcg     | Del.spez. | 56      | 500/500    |
| <b>TET2-Mutationsanalyse</b> |             |                          |                             |                          |           |         |            |
| TET3Aaf                      | TET3Aar     | chr4:106374377-106374770 | ttgctatgtctaggtattccgatattt | cacacgactattctggcttcc    | 394       | 63,7    | 500/500    |
| TET3Abf                      | TET3Abr     | chr4:106374678-106375182 | gctcatccagaagtaaaggaga      | tagcaccattaggttagcac     | 505       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Acf                      | TET3Acr     | chr4:106375098-106375500 | gagcaggaggggaaagtg          | tctgaaaggaacaggtatttagca | 403       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Adf                      | TET3Adr     | chr4:106375438-106375873 | atgctgatgatgctgataatgc      | ttactttggtgggtagtgg      | 436       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Aef                      | TET3Aer     | chr4:106375823-106376324 | tctgaatggtggagttttagaaga    | atactgaagaattgatggcagtg  | 502       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Aff                      | TET3Afr     | chr4:106376277-106376842 | tcccctcaaaacgtaatgagg       | ctttgggggtgaggaaaagt     | 566       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Agf                      | TET3Agr     | chr4:106376759-106377221 | tctcccctcaaaaccagcaac       | ttgtgacttctgctcctgttct   | 463       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Ahf                      | TET3Ahr     | chr4:106377111-106377492 | gcaggaaacaagacccaaaa        | taattggcctgtgcatctga     | 382       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Aif                      | TET3Air     | chr4:106377397-106377838 | ctgctcaaggtggcatctctt       | gctgttctttggtgtgtct      | 442       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Ajf                      | TET3Ajr     | chr4:106377773-106378127 | tagccacacccagcttttag        | gacacaagcatcggttaactga   | 355       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Bf                       | TET3Br      | chr4:106377817-106378136 | agacaccaaccaaagaacagc       | cttcacaagacacaagcatcg    | 320       | TD60-57 | 500/500    |
| TET3Cf                       | TET3Cr      | chr4:106381850-106382116 | ccttaatgtgtagttggggggtta    | ctttgtgtgtgaaggctgga     | 267       | TD60-57 | 500/500    |
| TET4f                        | TET4r       | chr4:106383281-106383758 | cagtttgcttggcgtagacc        | agaatggaccttctctcatca    | 478       | TD60-57 | 500/500    |
| TET5f                        | TET5r       | chr4:106383986-106384468 | ctagggtcaaagcccactttt       | cgctgaactctcttcttcaa     | 483       | TD60-57 | 500/500    |
| TET6f                        | TET6r       | chr4:106400088-106400585 | tggttatgccacagcttaataca     | ccaaagaggaagttttgttgc    | 498       | TD63-60 | 500/500    |
| TET7f                        | TET7r       | chr4:106402266-106402588 | gggattcaaaatgtaaggggaat     | tgacagtggttcaacaattaagag | 323       | TD63-60 | 500/500    |
| TET8(b)f                     | TET8(b)r    | chr4:106410152-106410517 | gtgagtttccggtgtaagagtaaaa   | ctcctcattgccttcagctat    | 366       | 57,8    | 500/500    |
| TET10af                      | TET10ar     | chr4:106415500-106416089 | tcagaaccctgactttgctctt      | agatccatcggctgagactg     | 590       | TD60-57 | 500/500    |
| TET10bf                      | TET10br     | chr4:106415953-106416474 | aatcccatgaacccttacc         | ctcctgtttggagatgcag      | 522       | TD60-57 | 500/500    |
| TET10cf                      | TET10cr     | chr4:106416346-106416826 | ctgagcaatccaaacatggac       | gctggtaaaagacgaggggaga   | 481       | TD63-60 | 500/500    |
| TET10df                      | TET10dr     | chr4:106416783-106417224 | caataggaatcaccaccag         | tactgtgaccttccccactg     | 442       | TD60-57 | 500/500    |
| <b>SybrGreen qPCR</b>        |             |                          |                             |                          |           |         |            |
| C1orfE3f                     | C1orfE3nr   | chr1:43521015-43521151   | acaggtggctgaagatgagg        | gagtgaggagggtctaaa       | 137       | 57,9/60 | E: 300/300 |
| MMAE1f                       | MMAE1e      | chr1:45738551-45738653   | gagactcattcccagcaag         | aagccaaaaggacatagcgtgt   | 103       | 61,6/60 | E: 300/300 |
| AGBE3f                       | AGBI3r      | chr1:49935549-49935630   | gtaatccacgcttccgagtct       | aaggtatccactattccctcacc  | 82        | 59/60   | E: 300/300 |
| PGM1I2f                      | PGM1E3r     | chr1:63868167-63868315   | cgaagtaaccactgtttgc         | aactgctgcttccagaac       | 149       | 57,2/60 | E: 300/300 |
| MCFE3f                       | MCFI3r      | chr2:46988356-46988486   | actctccacagccatcactca       | ggcacataaggacaacacaagtc  | 131       | 56,3/60 | F: 900/300 |

|            |            |                          |                           |                            |     |         |            |
|------------|------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-----|---------|------------|
| KCNHE2f    | KCNHE2r    | chr2:163401327-163401412 | catgcacctgcgactttctc      | ctctctgaccccagcaatg        | 86  | 61/60   | E: 300/300 |
| MREGE5f    | MREGE16r   | chr2:216517839-216517917 | cgctgaacttaccccaagaa      | ttggaacggaaggtagtgc        | 79  | 58,7/60 | H: 300/900 |
| VHLE1f     | VHLE1r     | chr3:10158739-10158808   | gagccctcccaggatcatct      | cgctgaagttgagccatacg       | 70  | 57/60   | F: 900/300 |
| RHOE2f     | RHOE2r     | chr3:49387941-49388013   | ggaagaaactggatgattgttg    | tggtccttgctgaagactatga     | 73  | 59,8/60 | I: 900/900 |
| EIFE8f     | EIFE8      | chr3:71816457-71816582   | ttctgtcctttagcccatgaag    | tcctcctgttaagaccgtttc      | 126 | 59,8/60 | I: 900/900 |
| SCF14f     | SCFE5r     | chr4:53706489-53706653   | ccaggacaagaacacacaaataaaa | tgctgactcccaatgctc         | 165 | 61,6/60 | F: 900/300 |
| TET2E2f    | TET2E2r    | chr4:106330975-106331128 | cattcagcagcacaccctct      | tgttccactgtcttaccagca      | 154 | 59,9/60 | E: 300/300 |
| TET2isoE5f | TET2isoE5r | chr4:106413226-106413300 | gcagcttcacgtttcgcctta     | ttctcctctgagctccacac       | 75  | 59,9/60 | H: 300/900 |
| CCNBE5f    | CCNBE5r    | chr5:68505860-68505954   | cctactgggtcgggaagtca      | tggtctcctgcaacaacctg       | 95  | 59/60   | E: 300/300 |
| SECE3f     | SECE3r     | chr5:134024902-134025010 | ccttcgcttcatagtggctct     | gtggcaggttggtctcag         | 109 | 60,3/60 | E: 300/300 |
| CDC25E12f  | CDC25E12r  | chr5:137650061-137650155 | cctttggacaccagaagag       | gccagacccatttagacac        | 95  | 58,7/60 | E: 300/300 |
| HSPA9e11f  | HSPA9e11r  | chr5:137923441-137923562 | gatgtgctgctccttgatgtc     | atggctcttacctggctctc       | 122 | 60,7/60 | E: 300/300 |
| COQE7f     | COQE7r     | chr6:99924231-99924318   | ctgtgaaatccagggtccag      | gtgcaggcattagctggag        | 88  | 60,1/60 | A: 50/50   |
| PDEE18f    | PDEE18r    | chr6:165721793-165721921 | gctgattgcgtgtctgtgtc      | gtctgggagaagtggtgctg       | 129 | NP      | E: 300/300 |
| AUT11f     | AUTE2r     | chr7:69002176-69002279   | ccacttccctttctctcttc      | ttctcgtttctcttggtcagg      | 104 | 57,9/60 | E: 300/300 |
| CUX11f     | CUXE2r     | chr7:101346084-101346177 | tctcacttttcttctctgtttcc   | tctggactgctcactttcatcc     | 94  | 56,3/60 | F: 900/300 |
| EXO_E10f   | EXO_I10r   | chr7:132965394-132965505 | ggagccagaaacattaccgtca    | ggcattcagtagaccagcataaataa | 110 | 63/60   | E: 300/300 |
| PIP_I1f    | PIP_E2r    | chr7:142542348-142542457 | ccccctcactcaaagattgg      | tggacgtactgactgggaatg      | 112 | 61,4/60 | E: 300/300 |
| CLDN23E1f  | CLDN23E1r  | chr8:8598279-8598366     | acacttgccctcactggt        | ccaaaccaacctgaactaatc      | 88  | 56,3/60 | I: 900/900 |
| ADAM5P+    | ADAM5P-    | chr8:39370023-39370142   | tttggaaagtattgatgatggacac | tgctttgtaacttggtgaaac      | 120 | 56,3/60 | F: 900/300 |
| 9p21f      | 9p21r      | chr9:31318969-31319041   | ccttgtaatacggaggctacc     | gttatggaggcaaggggaaac      | 73  | 59/60   | F: 900/300 |
| TET1E4f    | TET1E4r    | chr10:70075232-70075335  | gagaaggatgaggaatcagagc    | ccctgtaagttgggtcttg        | 104 | 57,9/60 | E: 300/300 |
| CD163I2f   | CD163E4r   | chr12:7542963-7543073    | tctggtctttctctgctcca      | tgttccccaccgtcctg          | 111 | 58,8/60 | D: 50/300  |
| LRRK_E37f  | LRRK_E37r  | chr12:39002442-39002584  | ggttccctgggttctgctggag    | catacctcctctgctttctcatc    | 143 | 63/60   | E: 300/300 |
| RABE3f     | RABI(3-)4r | chr15:53314172-53314306  | caacagtgggcattgattcag     | tccaacctttgtcctcctaat      | 135 | 56,3/60 | E: 300/300 |
| 16q21f     | 16q21r     | chr16:58778062-58778189  | aaacaggtcaggggtggaag      | ccaggttgtcaggtcattgc       | 128 | 60,9/60 | A: 50/50   |
| WWOXE5f    | WWOXI5     | chr16:76755686-76755773  | gggtaagtgtgactgtgtgtgt    | tttacacactccactgaaatctcca  | 88  | 59,9/60 | I: 900/900 |
| ACOE2f     | ACOE2r     | chr17:71486245-71486361  | atcctgaacgaccagacttc      | gccaaactccctcatcttcttc     | 117 | 61,6/60 | B: 300/50  |
| 18q21E8r   | 18q21E8r   | chr18:44538541-44538702  | ccaaaactggaggacactgc      | gcgctcgggaagaataactgt      | 162 | 60,1/60 | H: 300/900 |
| PRNP_E2+   | PRNP_E2-   | chr20:4628384-4628492    | acaactttgtgcacgactgc      | acgcgctccatcatcttaac       | 109 | 57,9/60 | F: 900/300 |
| PYGB_E17f  | PYGB_I17r  | chr20:25221189-25221312  | ccgagaacctcttcatcttcg     | cagcccaacaccttcatc         | 124 | 61,4/60 | F: 900/300 |
| RUNXampf   | RUNXamp    | chr21:35085864-35085990  | cggagggaaactgtgaatgc      | cccacccaacaaaattcc         | 127 | 57,9/60 | H: 300/900 |
| TOP_E2+    | TOP_E2-    | chr20:39091434-39091493  | ggaggggttaaagtggctgt      | cgcttcgatctggaaaaga        | 60  | 58,5/60 | I: 900/900 |
| RRP1BI5f   | RRP1BE6r   | chr21:43919290-43919383  | gtgggacgtgtggcactact      | ggacctccttcatcaggaca       | 94  | 58,9/60 | I: 900/900 |

## 3 Patienten

### 3.1 105-Patienten-Kollektiv

Das Studienkollektiv dieser Arbeit setzte sich aus 105 zytogenetisch unauffälligen MDS-Patienten, bezogen auf die Erstdiagnose, zusammen. Ihre klinischen Daten wurden freundlicherweise von Prof. U. Germing aus der Düsseldorfer Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie aus dem MDS-Register zur Verfügung gestellt. Ein Abgleich mit den der tumorzytogenetischen Arbeitsgruppe von Dr. B. Hildebrandt im Institut für Humangenetik in Düsseldorf vorliegenden Informationen wurde durchgeführt. Das Kollektiv umfasste, entsprechend der aktuelleren WHO-Klassifikation, einen RCUD-Fall, 57 RCMD-, 13 RAEB-1-, 15 RAEB-2- und 19 AML-Patienten (17 RAEBt + zwei AML) mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 62 (24-86) Jahren. 33 Patienten zeigten im Verlauf ihrer Erkrankung nach durchschnittlich 14 Monaten eine AML-Transformation. Am Ende der Studie waren 70 Patienten nach durchschnittlich 2 Jahren und zwei Monaten Überlebenszeit (im Alter von durchschnittlich 66 Jahren) definitiv verstorben.

### 3.2 Patientenproben

Die Untersuchungen fanden retrospektiv mit asserviertem Restmaterial der tumorzytogenetischen Routinediagnostik (B. Hildebrandt, B. Royer-Pokora) statt. Dieses bestand aus Methanol-Eisessig fixierten Leukozyten. Zuvor wurde das eingesandte, frische Gesamtknochenmark von Mitarbeitern der Tumorzytogenetik in ein bis drei verschiedenen Ansätzen (je nach Zellzahl und gewünschter Fragestellung) über 24 bis 72 Stunden (ohne Zugabe von Antibiotikum oder Stimulationsagenzien) kultiviert, die Zellteilung in der Metaphase über die Zugabe von Colcemid gestoppt und die Leukozyten isoliert und fixiert.

Von einigen Patienten standen gleichartige Verlaufspalten (VPa-z) samt Informationen zur Verfügung. In 4 Fällen (P24, P39, P40, P79) wurden diese für FISH-Analysen verwendet.

Von 5 Patienten wurde uns von M. Wulfert aus dem Institut für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie Düsseldorf DNA aus frischem Knochenmark zur Verfügung gestellt. In zwei Fällen (P25, P49) reichte das Material aus, um Vergleichsarrayanalysen durchzuführen.

Von wenigen Patienten wurden über die Jahre Zellen kryokonserviert (B. Hildebrandt, B. Royer-Pokora). In 5 Fällen (P57, P58, P60, P66, P71) wurden diese für eine DNA-Isolation und Vergleichsarrayanalysen genutzt.

Zur Etablierung der T-Zellseparation (CD3<sup>+</sup>) wurden aktuelle, frische Gesamtknochenmarkproben anonymisierter MDS-Patienten verwendet.

Alle verwendeten Patientenproben des Hauptkollektives (n = 105) und eingesetzte Verlaufspalten sind in folgender Tabelle 3.2-1 aufgeführt.

**Tabelle 3.2-1:** Zusammenfassung aller wichtigen Daten des 105-starken Patientenkollektivs. Bei P1-P105 handelt es sich immer um die Erstdiagnoseprobe zytogenetischer unauffällig diagnostizierter MDS-Patienten verschiedener Subtypen und Prognosestufen. P = Patient(enprobe), VP = Verlaufsprobe; WHO = world health organization Klassifikation; FAB = french american british Klassifikation; IPSS = international prognostic scoring system; KMT = Knochenmarktransplantation; PBSZ = Transplantation peripherer Blutstammzellen; ‡ = lebend mit bekanntem Alter der letzten Verlaufsprobe (VP); † = verstorben; nn = nicht bekannt oder untersucht; oB = ohne Befund; mar = Makerchromosom; inv = Inversion; add = additives Chromosomenmaterial; Z = Zentromersonde

| P-Nr.<br>(Patienten) | WHO       | FAB   | IPSS | Array<br>(k) | ♀/♂ | Alter<br>bei<br>ED (J) | Karyotyp  | AML<br>nach (J<br>M) | KMT/<br>PBSZ     | Sta-<br>tus | Zeit<br>bis<br>Tod<br>(J M) | Alter<br>bei<br>Tod<br>(J) | Letztes<br>VP-<br>Alter<br>(J) | Todes-<br>ursache       |
|----------------------|-----------|-------|------|--------------|-----|------------------------|---|----------------------|------------------|-------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| P1                   | RAEBt/AML | RAEBt | 2    | 244A         | ♀   | 58                     | 46,XX[16]   | 00 03                | /                | †           | 03 07                       | 62                         | /                              | AML                     |
| P2                   | RCMD      | RA    | 0    | 2x105        | ♀   | 77                     | 46,XX[18]   | /                    | /                | †           | 04 10                       | 82                         | /                              | nn                      |
| P3                   | RCMD      | RA    | 0    | 244A         | ♂   | 52                     | 46,XY[21]   | /                    | /                | †           | 04 07                       | 57                         | /                              | unklar                  |
| P4                   | RAEB-1    | RAEB  | 1    | 44B          | ♂   | 45                     | 46,XY[18]   | /                    | /                | ‡           | /                           | /                          | 55                             | nn (lebt)               |
| P5                   | RCMD      | RA    | 1    | 4x44         | ♀   | 66                     | 46,XX[20]   | /                    | /                | ‡           | /                           | /                          | 80                             | nn (lebt)               |
| P6                   | RAEBt/AML | RAEBt | 3    | 244A         | ♂   | 67                     | 46,XY[20]   | 00 01                | /                | †           | 00 11                       | 68                         | /                              | AML                     |
| P7                   | RAEB-2    | RAEB  | 2    | 244A         | ♂   | 69                     | 46,XY[21]/47,XY,+15[1]                              | 05 04                | /                | †           | 05 05                       | 75                         | /                              | AML                     |
| P8                   | RAEB-2    | RAEB  | 1    | 244A         | ♀   | 24                     | 46,XX[21]   | 00 01                | allogene<br>PBSZ | †           | 02 07                       | 26                         | /                              | AML                     |
| P9                   | RAEB-1    | RAEB  | 1    | 44B          | ♂   | 63                     | 46,XY[15]   | /                    | /                | †           | 01 12                       | 65                         | /                              | krankheits-<br>abhängig |
| P10                  | RAEB-2    | RAEB  | 2    | 44B          | ♂   | 51                     | 46,XY[20]   | /                    | /                | †           | 10 02                       | 61                         | /                              | Infektion               |
| P11                  | RCMD      | RA    | 0    | 244A         | ♀   | 67                     | 46,XX[18]/46,XX,del(6)(q?)[1]/46,XX,del(17)(p11)[1] | 04 04                | /                | †           | 04 05                       | 71                         | /                              | AML                     |
| P12                  | RAEB-2    | RAEB  | 2    | 44B          | ♀   | 53                     | 46,XX[16]   | /                    | autologe<br>PBSZ | †           | 01 07                       | 54                         | /                              | unklar                  |
| P13                  | RAEB-2    | RAEB  | 2    | 44B          | ♂   | 75                     | 46,XY[21]   | /                    | /                | †           | 00 07                       | 76                         | /                              | nn                      |
| P14                  | RAEBt/AML | RAEBt | 2    | 244A         | ♂   | 53                     | 46,XY[20]   | 00 01                | autologe<br>PBSZ | †           | 05 05                       | 58                         | /                              | AML                     |
| P15                  | RAEB-1    | RAEB  | 1    | 44B          | ♂   | 64                     | 46,XY[20] / FISH #MLL: 26x oB.                      | /                    | /                | †           | 01 03                       | 65                         | /                              | Infektion               |
| P16                  | RAEBt/AML | RAEBt | 3    | 244A         | ♂   | 51                     | 46,XY[20]   | 00 07                | /                | †           | 01 11                       | 53                         | /                              | AML                     |
| P17                  | RAEBt/AML | RAEBt | 3    | 244A         | ♀   | 68                     | 46,XX[20]   | 00 07                | /                | †           | 01 05                       | 69                         | /                              | AML                     |
| P18                  | RCMD      | RA    | 1    | 244A         | ♂   | 65                     | 46,XY[20]   | /                    | /                | †           | 05 02                       | 70                         | /                              | nn                      |
| P19                  | RCMD      | RA    | 0    | 2x105        | ♀   | 75                     | 46,XX[20]   | /                    | /                | ‡           | /                           | /                          | 81                             | nn (lebt)               |
| P20                  | RAEBt/AML | RAEBt | 1    | 244A         | ♂   | 31                     | 46,XY[20]   | /                    | /                | †           | 00 08                       | 31                         | /                              | nn                      |
| P21                  | RAEB-2    | RAEB  | 1    | 244A         | ♂   | 60                     | 46,XY[20]   | /                    | allogene<br>PBSZ | †           | 03 10                       | 64                         | /                              | nn                      |
| P22                  | RAEB-1    | RAEB  | 2    | 244A         | ♂   | 61                     | 46,XY[22]/46,XY,del(9p)[1]/47,XY,+8[1]              | /                    | /                | †           | 02 04                       | 63                         | /                              | nn                      |
| P23                  | RAEB-2    | RAEB  | 2    | 44B          | ♀   | 52                     | 46,XX[19]/47,XX,+c[1]                               | 00 01                | /                | ‡           | /                           | /                          | 62                             | nn (lebt)               |
| P24                  | RAEBt/AML | RAEBt | 3    | 244A         | ♀   | 32                     | 46,XX[20]   | /                    | autologe<br>PBSZ | †           | 01 09                       | 34                         | /                              | unklar                  |

|       |           |       |   |       |   |    |  |       |               |   |       |    |    |                       |  |
|-------|-----------|-------|---|-------|---|----|--|-------|---------------|---|-------|----|----|-----------------------|--|
| VP24a |           |       |   |       |   |    | 46,XX[24]/45,XX,-7[1]/47,XX,+13[1]/ Verlust versch. Chr. inkl. immer -7[4] |       |               |   |       |    |    |                       |  |
| VP24b |           |       |   |       |   |    | 46,XX[20]/47,XX,del(9p),+mar[1]/ 47,XX,del(9p),+mar                        |       |               |   |       |    |    |                       |  |
| VP24c |           |       |   |       |   |    | 46,XX[17]/45,XX,-5[1]<=komplex   |       |               |   |       |    |    |                       |  |
| P25   | RAEBt/AML | RAEBt | 3 | 244A  | ♂ | 58 | 46,XY[14]/47,XY,+17[1]   | 00 01 | /             | † | 01 05 | 59 | /  | AML                   |  |
| P26   | RCMD      | RA    | 1 | 2x105 | ♂ | 37 | 46,XY[15]/46,XY,del(6q)[1] / FISH #inv16: 35 Metap. oB.                    | /     | /             | ‡ | /     | /  | 42 | nn (lebt)             |  |
| P27   | RCMD      | RA    | 1 | 244A  | ♂ | 61 | 46,XY[21]  | /     | /             | † | 00 01 | 61 | /  | unklar                |  |
| P28   | RCMD      | RA    | 0 | 244A  | ♂ | 64 | 46,XY[19]/46,XY,del(11q)[1]  | 01 08 | /             | † | 01 09 | 65 | /  | AML                   |  |
| P29   | RCMD      | RA    | 0 | 2x105 | ♂ | 69 | 46,XX[20]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 79 | nn (lebt)             |  |
| P30   | RCMD      | RA    | 1 | 244A  | ♂ | 72 | 46,XY[21]/47,XY,+8[1]  | /     | /             | † | 00 07 | 73 | /  | Blutung               |  |
| P31   | RCMD      | RA    | 2 | 2x105 | ♂ | 70 | 46,XX[20]/47,XX,+mar,+mar,+mar,+mar[1]                                     | /     | /             | † | 02 08 | 72 | /  | unklar                |  |
| P32   | RCMD      | RA    | 1 | 244A  | ♂ | 58 | 46,XY[21]/46,XY,del(11q)[1]  | /     | /             | † | 00 03 | 59 | /  | krankheits-unabhängig |  |
| P33   | RCMD      | RA    | 0 | 2x105 | ♂ | 46 | 46,XY[19]/46,XY,del(15)(q)[1]/46,XY,add(18p)[1]                            | 06 11 | allogene PBSZ | † | 07 08 | 54 | /  | krankheits-abhängig   |  |
| P34   | RAEB-1    | RAEB  | 1 | 44B   | ♂ | 75 | 46,XX[19]  | /     | /             | † | 04 01 | 79 | /  | Infektion             |  |
| P35   | RAEB-1    | RAEB  | 1 | 44B   | ♂ | 65 | 46,XY[20]  | 04 04 | /             | † | 04 11 | 70 | /  | AML                   |  |
| P36   | RCMD      | RA    | 1 | 244A  | ♂ | 72 | 46,XY[19]/45,XY,-5[1]  | /     | /             | † | 00 11 | 73 | /  | nn                    |  |
| P37   | RCMD      | RA    | 1 | 4x44  | ♂ | 16 | 46,XX[20]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 26 | nn (lebt)             |  |
| P38   | RCMD      | RA    | 1 | 244A  | ♂ | 63 | 46,XX[20]  | /     | /             | † | 03 09 | 66 | /  | Blutung               |  |
| P39   | RAEB-2    | RAEB  | 3 | 44B   | ♂ | 62 | 46,XY[15]  | /     | /             | † | 00 11 | 63 | /  | unklar                |  |
| VP39a |           |       |   |       |   |    | 46,XY[17]/46,XY,der(8)[1]/46,XY,del(1q)[1]/46,XY,add(19q)[1]               |       |               |   |       |    |    |                       |  |
| P40   | RAEBt/AML | RAEBt | 3 | 244A  | ♀ | 57 | 46,XX[15]  | 00 04 | /             | † | 00 10 | 58 | /  | AML                   |  |
| VP40a |           |       |   |       |   |    | 46,XX[21]  |       |               |   |       |    |    |                       |  |
| P41   | RCMD      | RA    | 0 | 244A  | ♀ | 75 | 46,XX[21]  | /     | /             | † | 00 04 | 76 | /  | unklar                |  |
| P42   | RCMD      | RA    | 0 | 2x105 | ♂ | 59 | 46,XY[21]  | /     | /             | † | 02 09 | 62 | /  | unklar                |  |
| P43   | RCMD      | RA    | 0 | 4x44  | ♂ | 72 | 46,XX[19]/46,XX,-7,+mar[1]   | /     | /             | ‡ | /     | /  | 78 | nn (lebt)             |  |
| P44   | RAEB-2    | RAEB  | 2 | 44B   | ♂ | 77 | 46,XX[20]/46,XX,del(17)(p10)[1]  | 00 09 | /             | † | 02 06 | 80 | /  | nn                    |  |
| P45   | RCMD      | RA    | 0 | 4x44  | ♂ | 25 | 46,XY[20]/48,XY,B(14),+mar[1]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 29 | nn (lebt)             |  |
| P46   | RCMD      | RA    | 0 | 2x105 | ♂ | 86 | 46,XX[20]  | /     | /             | † | 03 10 | 90 | /  | nn                    |  |
| P47   | RCMD      | RA    | 0 | 2x105 | ♂ | 58 | 46,XX[19]/46,XX,t(8;22)(q?;q?)[1]  | 01 11 | /             | † | 02 01 | 60 | /  | AML                   |  |
| P48   | RCMD      | RA    | 1 | 244A  | ♂ | 62 | 46,XY[18]/46,XY,del(13q)[1]/46,XY,der(12)[1]                               | ?     | /             | † | 00 10 | 63 | /  | AML                   |  |
| P49   | RCMD      | RA    | 0 | 244A  | ♂ | 66 | 46,XY[20]  | /     | /             | † | 00 01 | 66 | /  | unklar                |  |
| P50   | RCMD      | RA    | 1 | 2x105 | ♂ | 56 | 46,XY[20]/46,XY,del(10q)[1]/46,XY,del(11q)[1]/47,XY,+mar[1]                | /     | allogene KMT  | † | 02 05 | 59 | /  | Infektion             |  |
| P51   | RAEB-1    | RAEB  | 0 | 4x44  | ♀ | 72 | 46,XX[19]/45,XX,-13[2]   | 03 01 | /             | ‡ | /     | /  | 76 | nn (lebt)             |  |
| P52   | RCMD      | RA    | 0 | 244A  | ♀ | 86 | 46,XX[19]/46,XX,add(11p)[1]  | /     | /             | † | 03 05 | 90 | /  | nn                    |  |

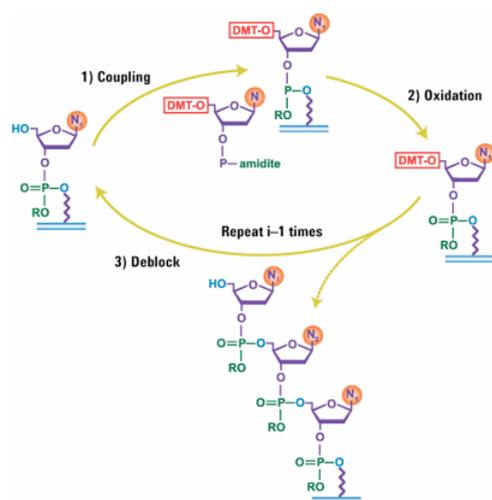
|              |           |       |      |       |     |    |   |       |   |   |       |    |    |           |
|--------------|-----------|-------|------|-------|-----|----|---|-------|---|---|-------|----|----|-----------|
| <b>P53</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 2x105 | ♂   | 73 | 46,XY[20]   | /     | / | ‡ | /     | /  | 77 | nn (lebt) |
| <b>P54</b>   | RAEBt/AML | RAEBt | 3    | 244A  | ♂   | 71 | 46,XY[19]/46,XY,del(13q)[1] / FISH:<br>46,XY[500]/45,XY,-7[16]/46,XY[500]/45,XY,-8[22]                                    | 00 01 | / | † | 02 07 | 74 | /  | AML       |
| <b>P55</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 2x105 | ♂+0 | 74 | 46,XX[21]   | /     | / | ‡ | /     | /  | 77 | nn (lebt) |
| <b>P56</b>   | RAEBt/AML | RAEBt | 3    | 244A  | ♂+0 | 46 | 46,XY[20]   | /     | / | ‡ | /     | /  | 54 | nn (lebt) |
| <b>P57</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 2x105 | ♂+0 | 65 | 46,XY[21]   | /     | / | ‡ | /     | /  | 70 | nn (lebt) |
| <b>P58</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 2x105 | ♂+0 | 31 | 46,XX[20]/46,XX,del(14q)[1]   | /     | / | ‡ | /     | /  | 39 | nn (lebt) |
| <b>P59</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 2x105 | ♂+0 | 70 | 46,XX[18]/46,add(3p)[1],46,XX,del(11q)[1]   | /     | / | ‡ | /     | /  | 75 | nn (lebt) |
| <b>P60</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 244A  | ♂   | 70 | 46,XY[17]/46,XY,del(8p)[1]/46,XY,del(9q)[1]/47,idem,+21[1]  | /     | / | † | 02 03 | 73 | /  | unklar    |
| <b>P61</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 4x44  | ♂+0 | 51 | 46,XX[21]   | /     | / | ‡ | /     | /  | 57 | nn        |
| <b>P62</b>   | RAEBt/AML | RAEBt | 3    | 244A  | ♂+0 | 67 | 46,XX[18]/46,XX,del(6q)[1]/46,XX,add(9p)[1]   | 00 01 | / | † | 00 04 | 68 | /  | AML       |
| <b>P63</b>   | RCMD      | RA    | 1    | 4x44  | ♂+0 | 70 | 46,XY[20]/46,XY,del(12p)[1]   | /     | / | † | 01 03 | 72 | /  | Blutung   |
| <b>P64</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 4x44  | ♂+0 | 61 | 46,XY[21]   | /     | / | ‡ | /     | /  | 64 | nn (lebt) |
| <b>P65</b>   | RAEB-1    | RAEB  | 2    | 244A  | ♂+0 | 69 | 46,XY[18]/45,XY,-22[2]<br>46,XY[17]/45,XY,-   | 05 05 | / | ‡ | /     | /  | 76 | nn (lebt) |
| <b>P66</b>   | RAEB-2    | RAEB  | 2    | 44B   | ♂   | 72 | 22[2]/46,XY,del(13q)[1]/46,XY,t(X;8)[1]/46,XY,del(6q)[1]  | 00 01 | / | † | 01 01 | 73 | /  | AML       |
| <b>P67</b>   | RCMD      | RA    | 1    | 2x105 | ♂   | 71 | 46,XY[21]/46,XY,del(12p)[1]   | /     | / | † | 00 10 | 72 | /  | unklar    |
| <b>P68</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 244A  | ♂+0 | 67 | 46,XX[18]/46,XX,del(12p)[1]/46,XX,del(10p)[1]<br>/46,XX,add(18p)[1]   | /     | / | † | 03 07 | 71 | /  | Infektion |
| <b>P69</b>   | RCMD      | RA    | 10.2 | 244A  | ♂+0 | 67 | 46,XX[23]   | /     | / | † | 01 05 | 68 | /  | unklar    |
| <b>P70</b>   | AML       | AML   | /    | 244A  | ♂+0 | 62 | 46,XY[19]/46,XY,del(11q)[2]/47,XY,+mar[1]   | 00 01 | / | † | 00 06 | 62 | /  | AML       |
| <b>P71</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 244A  | ♂+0 | 68 | 46,XY[22]   | /     | / | † | 00 01 | 68 | /  | nn        |
| <b>P72</b>   | RCMD      | RA    | 1    | 244A  | ♂+0 | 58 | 46,XY[21]/47,XY,+20[1]  | /     | / | † | 02 02 | 60 | /  | Infektion |
| <b>P73</b>   | AML       | AML   | 3    | 244A  | ♂+0 | 67 | 46,XY[22]/add(10q)[1]   | 00 01 | / | † | 00 03 | 67 | /  | unklar    |
| <b>P74</b>   | RAEBt/AML | RAEBt | 2    | 244A  | ♂+0 | 68 | 46,XY[20]/del(6q)/del(17)(p11)  | 00 04 | / | † | 00 05 | 68 | /  | AML       |
| <b>P75</b>   | RCMD      | RA    | 0    | 244A  | ♂   | 58 | 46,XY[22] / FISH #Z7: 339x 2, 9x 1, #Z8:<br>313x 2, 32x 1   | /     | / | † | 00 02 | 58 | /  | nn        |
| <b>P76</b>   | RCMD      | RA    | 1    | 4x44  | ♂   | 66 | 46,XY[22] / FISH #Z7: 28x 1, 1000x 2, 6x 3,<br>19x 4, #Z8: 28 x 1, 1060x 2, 2x 4  | /     | / | ‡ | /     | /  | 68 | nn (lebt) |
| <b>P77</b>   | RCMD      | RA    | 1    | 244A  | ♂   | 49 | 46,XY[22]   | /     | / | ‡ | /     | /  | 55 | nn (lebt) |
| <b>P78</b>   | RCMD      | RA    | 1    | 4x44  | ♂   | 70 | 46,XY[22]/inv(14)/der(9)+16,+19,+22   | /     | / | † | 04 09 | 75 | /  | nn        |
| <b>P79</b>   | RAEB-1    | RAEB  | 1    | 244A  | ♂   | 56 | 46,XY[19]/45,XY,-21[2]/46,XY,del(11q)[1]<br>46,XY[12]/45,XY,del(5)(q14q22),add(13)(p11)<br>,-14,-15,-17,-19,-21,+4mar[10] | /     | / | † | 00 05 | 56 | /  | nn        |
| <b>VP79a</b> |           |       |      |       |     |    |   |       |   |   |       |    |    |           |
| <b>P80</b>   | RAEBt/AML | RAEBt | 3    | 244A  | ♂   | 34 | 46,XY[12] / FISH #Z7: 187x 1, 666x 2  | 00 01 | / | ‡ | /     | /  | 39 | nn (lebt) |
| <b>P81</b>   | RAEB-1    | RAEB  | 1    | 4x44  | ♂   | 65 | 46,XY[20]/47,XY,+mar[2]   | 00 01 | / | † | 01 07 | 67 | /  | AML       |
| <b>P82</b>   | RAEB-2    | RAEB  | 3    | 244A  | ♂+0 | 70 | 46,XX[18]/del(13q)/del(5q)/del(20q)/del(17q)  | 00 08 | / | ‡ | /     | /  | 75 | nn (lebt) |

|             |           |       |   |       |   |    |  |       |               |   |       |    |    |           |
|-------------|-----------|-------|---|-------|---|----|--|-------|---------------|---|-------|----|----|-----------|
| <b>P83</b>  | RCUD      | RA    | 1 | 4x44  | ♂ | 35 | 46,XY[22]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 36 | nn (lebt) |
| <b>P84</b>  | RCMD      | RA    | 1 | 4x44  | ♂ | 79 | 46,XY[22]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 80 | nn (lebt) |
| <b>P85</b>  | RAEB-2    | RAEB  | 2 | 44B   | ♂ | 66 | 46,XX[21]/50,XX,+4mar[2]   | /     | /             | ‡ | /     | /  | 68 | nn (lebt) |
| <b>P86</b>  | RCMD      | RA    | 1 | 4x44  | ♂ | 57 | 46,XY[21]/45,XY,-7[1] / FISH #Z7: 24x 1, 690x 2  | /     | allogene KMT  | † | 03 06 | 61 | /  | nn (lebt) |
| <b>P87</b>  | RAEB-1    | RAEB  | 1 | 44B   | ♂ | 78 | 46,XY[21]/45,X,t(Y;22)[1]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 79 | nn (lebt) |
| <b>P88</b>  | RCMD      | RA    | 0 | 4x44  | ♂ | 53 | 46,XX[22]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 58 | nn (lebt) |
| <b>P89</b>  | RCMD      | RA    | 0 | 4x44  | ♀ | 63 | 46,XY[22]  | 00 10 | allogene PBSZ | † | 03 01 | 67 | /  | AML       |
| <b>P90</b>  | RCMD      | RA    | 0 | 244A  | ♀ | 75 | 46,XX[21]/47,XX,+3[1] / FISH #D13S319: 632x oB., 17x mono, 15x del, 11x deltel           | /     | /             | † | 00 09 | 75 | /  | nn        |
| <b>P91</b>  | RAEB-1    | RAEB  | 2 | 2x105 | ♀ | 74 | 46,XX[21]/+3/-7 / FISH #Z7: 84x 1 (16,7%), 420x 2  | /     | /             | † | 00 05 | 74 | /  | unklar    |
| <b>P92</b>  | RCMD      | RA    | 0 | 2x105 | ♂ | 76 | 46,XY[21]/46,XY,del(17p)[1]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 78 | nn (lebt) |
| <b>P93</b>  | RCMD      | RA    | 0 | 4x44  | ♂ | 72 | 46,XY[23]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 76 | nn (lebt) |
| <b>P94</b>  | RCMD      | RA    | 0 | 244A  | ♂ | 83 | 46,XX[21]/del(1q)/add(1p)  | /     | /             | † | 00 03 | 83 | /  | nn        |
| <b>P95</b>  | RCMD      | RA    | 0 | 4x44  | ♂ | 63 | 46,XX[21]/46,XX,del(2p)[1]   | /     | /             | ‡ | /     | /  | 67 | nn (lebt) |
| <b>P96</b>  | RAEBt/AML | RAEBt | 2 | 244A  | ♂ | 77 | 46,XY[16]/X0[2]/der(3)/del(15)/der(15)/add(11q) / FISH #ZXY: 1112x XY, 30x X0            | 00 02 | /             | ‡ | /     | /  | 78 | nn (lebt) |
| <b>P97</b>  | RAEB-2    | RAEB  | 2 | 44B   | ♂ | 47 | 46,XX[22]/47,XX,+mar[1]  | /     | /             | ‡ | /     | /  | 47 | nn (lebt) |
| <b>P98</b>  | RAEBt/AML | RAEBt | 3 | 244A  | ♂ | 57 | 46,XX[24]  | 00 01 | /             | † | 00 03 | 57 | /  | AML       |
| <b>P99</b>  | RAEB-2    | RAEB  | 2 | 44B   | ♂ | 83 | 46,XY[21]/46,XY,del(6q)[1]   | 00 01 | /             | ‡ | /     | /  | 87 | nn (lebt) |
| <b>P100</b> | RCMD      | RA    | 1 | 4x44  | ♂ | 68 | 46,XX[19]/del(15q)/+19,+20/del(12q)  | /     | /             | † | 01 01 | 69 | /  | nn        |
| <b>P101</b> | RAEB-1    | RAEB  | 2 | 44B   | ♂ | 66 | 46,XY[7]   | /     | /             | † | 03 01 | 69 | /  | nn        |
| <b>P102</b> | RAEB-2    | RAEB  | 2 | 44B   | ♂ | 66 | 46,XY[22] / FISH #9: an beiden Chr.9 wurde der Zentromerbereich für die Sonde ausgespart | /     | /             | † | 00 01 | 66 | /  | nn        |
| <b>P103</b> | RCMD      | RA    | 1 | 4x44  | ♀ | 61 | 46,XX[22]  | /     | /             | † | 02 05 | 63 | /  | nn        |
| <b>P104</b> | RAEBt/AML | RAEBt | 2 | 244A  | ♂ | 78 | 46,XY[22]/del(10p)   | 00 01 | /             | ‡ | /     | /  | 78 | nn (lebt) |
| <b>P105</b> | RCMD      | RA    | 1 | 2x105 | ♂ | 74 | 46,XY[22]  | /     | /             | † | 00 12 | 75 | /  | nn        |

## 4 Methoden

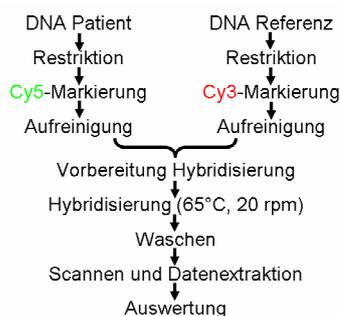
### 4.1 Oligonukleotidmikroarray-basierte CGH-Analysen

In dieser Arbeit wurden aCGH ('array comparative genomic hybridisation')-Analysen mit Mikroarrays der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Diese sind charakterisiert durch eine Vielzahl von durchschnittlich 60-mer Oligonukleotiden, die über eine *in situ* 'SurePrint'-Technologie willkürlich auf einen Objektträger aufgebracht das gesamte menschliche Genom in einer hohen Auflösung repräsentieren. Somit können auf dem Array entsprechend vorbereitete fluoreszenzmarkierte Patienten- und Referenz-DNAs vergleichend hybridisiert werden. Der Array wird mit Hilfe eines Lasers gescannt und das entstandene Bild von einer speziellen Software in bereinigte Datenwerte umgewandelt. Diese Textdatei kann von Auswerteprogrammen grafisch oder tabellarisch umgesetzt werden, so dass genomische, submikroskopische als auch große Imbalancen der Patienten-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA genomweit detektiert werden können.



**Abbildung 4.1.1:** Dargestellt ist ein Oligonukleotid-Syntheszyklus des Phosphoramiditverfahrens (Abbildung zur 'SurePrint'-Technologie, der Agilent-Homepage entnommen). Ein freies Nucleotid (N) bindet über eine Phosphodiesterbindung an die 5'-Gruppe der wachsenden Kette, die über einen Linker auf dem Glasträger befestigt ist. Das nun gebundene Nucleotid (N<sub>x</sub>) kann seinerseits erst dann eine Bindung eingehen, wenn die säurelabile Schutzgruppe (DMT) am 5'-Ende entfernt wird. Ein Agilent Echtzeit-Kontrollsystem sichert das Beenden und Freigeben der Oligonukleotidprobe. DMT = Dimethoxytrityl

Die aCGH ist eine Weiterentwicklung und Verbindung der in der Routinediagnostik bestehenden klassischen Chromosomenbanden- und FISH-Analysetechniken. Die Vorteile bestehen in der hochauflösenden, genomweiten Möglichkeit der Detektion von Deletionen und Duplikationen durch den Einsatz von DNA aus unkultivierten (Proliferation unnötig) Zellen. Durch die kommerziell angebotenen Formate können Imbalancen ab mittlerweile 2 kb aufgedeckt, durch 'custom'-Arrays kann die Detektionsgrenze sogar auf Exonebene gebracht werden. Mit dieser Methode können keine (balancierten) Translokationen aufgedeckt werden und der hohe Kostenfaktor der Technik ist als Nachteil zu nennen. In dieser Arbeit wurden die kommerziellen 44 k-, 105 k- und 244 k-Arrays (43, 22 und 9 kb medianer Oligonukleotidabstand), als auch zwei 'custom'-Arrays (auf 44 k-basierend, zwischen 125 bp und 2 kb Oligonukleotidabstand in den untersuchten Regionen) eingesetzt. Anfänglich wurde die Agilent-Protokollversion 2.0 von August 2005 verwendet, im Verlauf hauptsächlich die Version 5.0 von Juni 2007, gegen Ende des Weiteren die Versionen bis 6.1 von August 2009. Zwischen den Versionen 2.0 und 5.0 gab es kleinere Änderungen des Ablaufs und der Reagenzien, danach nur noch wenige Optimierungen.



**Abbildung 4.1.2:** Ablauf der aCGH-Methode nach Agilent Technologies, wie sie in dieser Arbeit zuletzt durchgeführt wurde.

## 4.1.1 DNA-Isolation

### 4.1.1.1 DNA-Isolation aus fixierten Leukozyten

Die Isolation der DNA aus Methanol-Eisessig-fixierten Leukozyten erfolgte mit dem 'QIAamp DNA Blood Midi Kit' von Qiagen mit leichter Modifikation der 'Midi Spin'-Herstellerangaben. Die Hauptschritte der Methode bestehen in der Lyse der Zellen mit Lysepuffer und einem Proteinverdau bei einer 70 °C-Inkubation, dem Binden der Gesamt-DNA an eine spezifische Säulenmembran unter spezifischen Alkohol-, Salz- und pH-Bedingungen, Waschschrirte mit zwei Puffern und die Elution der DNA.

#### Anleitung:

- Zellsuspension bei 1.250 rpm und RT 10 min abzentrifugieren (Hermle Z200)
- Überstand verwerfen und Pellet in 1 ml PBS resuspendieren
- in 15 ml Röhrchen 200 µl Qiagen-Protease (~0,27 AU) vorlegen, Zelllösung zugeben, mit 2,4 ml AL-Lysepuffer versetzen und 15x invertieren
- 10 min bei 70 °C inkubieren
- 2 ml 100% Ethanol zugeben, 10x invertieren und eine Hälfte des Lysats auf die QIAamp-Säule in 15 ml Auffangröhrchen pipettieren, Deckel schließen und 3 min bei 3.000 rpm zentrifugieren (Sorvall RC-3B)
- Durchfluss verwerfen und die übrige Lysathälfte auf die gleiche Säule pipettieren, erneut zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen, 2 ml AW1-Waschpuffer auf die Säule geben und 1 min bei 4.000 rpm zentrifugieren (2x)
- Durchfluss verwerfen, 2 ml AW2-Waschpuffer auf die Säule pipettieren und 15 min bei 4.000 rpm zentrifugieren (2x)
- Durchfluss verwerfen, Säule in ein steriles 15 ml Röhrchen setzen und für die Elution 200 µl AE-Elutionspuffer auf die Säule geben, 5 min bei RT inkubieren, dann 5 min bei 4.000 rpm zentrifugieren
- Eluat erneut auf die Säule geben, 5 min inkubieren, dann zentrifugieren
- Eluat I in ein steriles 1,5 ml Gefäß überführen (Eluat I = hoch konzentriert)
- für den Erhalt einer maximalen Ausbeute erneut 200 µl AE-Puffer auf die Säule geben, 5 min bei RT inkubieren und zentrifugieren
- Eluat ein weiteres Mal auf die Säule geben, 5 min inkubieren, dann zentrifugieren
- Eluat II in weiteres steriles 1,5 ml Gefäß geben (Eluat II = niedriger konzentriert)
- DNA-Konzentration per NanoDrop messen und bei 4 °C oder -20 °C lagern

#### 4.1.1.2 DNA-Isolation aus kryokonservierten Knochenmarkzellen

Die Isolation von DNA aus kryokonservierten Zellen erfolgte über eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Nach dem Antauen der Zellen werden sie in wässrigem DNA-Puffer resuspendiert, durch Zugabe von Proteinase K (Serinprotease) und SDS bei 55°C lysiert. Nach Erhöhung der SDS-Konzentration wird mit dem gleichem Volumen Phenol-Chloroform (v/v 1:1) 5 min die DNA extrahiert, anschließend zentrifugiert und aus der oberen wässrigen Phase (Phenolreste, RNA, DNA) erneut extrahiert. Um das Phenol auszuwaschen wird ein- bis zweimal mit demselben Volumen Chloroform extrahiert. Die untere, organische Phase (Chloroform, Phenol, Proteine) wird jeweils entsorgt. In Folge wird die DNA mittels einer Natriumacetat-Ethanol präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol, wird das Pellet getrocknet und in TE aufgenommen.

##### Anleitung:

- besondere Schutzkleidung bei Arbeiten mit Flüssigstickstoff (-196°C) beachten!
- sowohl Phenol als auch Chloroform sind organische, stark gesundheitsschädliche Lösungsmittel, mit denen unter dem Abzug gearbeitet werden muss und die entsprechend Lösungsmittel-resistente Plastikware oder Glasgefäße voraussetzen!
- Kryoröhrchen aus flüssigem Stickstoff holen und in 37°C Wasserbad antauen
- Zellen in 15 ml Röhrchen (Falcon) überführen und mit 5 ml kaltem RPMI-Medium (20% FKS) auf Eis langsam verdünnen – alle 5 min ein paar Tropfen
- bei 1.100 rpm 5 min zentrifugieren (Heraeus Instruments Megafuge 3.0 R)
- Überstand abkippen und Zellen in einer Konzentration  $5 \times 10^6$ - $10^7$ /ml in DNA-Puffer (ca. 2,5 ml) resuspendieren
- Zugabe von Proteinase K (500 µg/ml), dann Zugabe von 0,5% SDS und 60 min (oder bis die Lösung viskos ist) bei 55°C inkubieren
- Zugabe von SDS auf 1% und mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform (untere Phase der Flasche) bei RT extrahieren
  - o ca. 5 min, vorsichtig schütteln, bei 1.600 rpm 5 min zentrifugieren
  - o wässrige, obere Phase mit Glaspipette abnehmen und in neues Röhrchen überführen; evtl. bei hoher Viskosität mit DNA-Puffer (1 ml) verdünnen
- mit der wässrigen Phase letzten Schritt wiederholen
- 1-2x mit gleichem Volumen Chloroform extrahieren, um Phenol auszuwaschen
  - o 5 min schütteln, dann 5 min zentrifugieren
  - o obere Phase in neues Röhrchen geben
- DNA präzipitieren, vgl. Kapitel 4.1.2

#### 4.1.2 Aufkonzentrierung der DNA mittels Natriumacetat-Ethanol-Fällung

Je nach Arrayformat wird eine bestimmte DNA-Menge und -Konzentration gefordert. In dieser Arbeit wurde eine DNA-Menge von 700 ng in einem Volumen von 20,2 µl bzw. für eine Arrayanalyse nicht unterschritten. Dementsprechend wurden DNAs, die eine Konzentration von unter 35 ng/µl aufwiesen, aufkonzentriert.

##### Anleitung:

- (evtl.) Eluat I und II (vgl. Kapitel 4.1.1.1) vereinigen (400 µl) und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2-3x Volumen 100% Ethanol versetzen und gut mischen
- die genomische DNA 15 min auf Eis fällen, dann 15 min bei 12.000 rpm abzentrifugieren (Hermle Z200)

- Überstand verwerfen, dann das Pellet mit 300 µl 70% Ethanol waschen, dazu erneut 15 min zentrifugieren, danach Überstand komplett abnehmen und verwerfen
- das Pellet trocknen lassen bis es durchsichtig erscheint, dann in X µl (~40 µl - richtet sich nach der DNA-Ausgangsmenge) Qiagen-AE-Puffer aufnehmen und ÜN bei 4°C lösen lassen
- DNA-Konzentration per NanoDrop messen und bei 4°C oder -20°C lagern

#### 4.1.3 Restriktion der genomischen DNA

Zur optimalen Hybridisierung der DNA an die Arrayoligonukleotide wird die genomische DNA in 200-500 bp große Fragmente restringiert.

##### **Anleitung:**

- bei 4x 44 k-, 2x 105 k- und 1x 244 k-Arrays 1,5 µg genomische Patienten-DNA in einem Volumen von 20,2 µl Wasser vorbereiten
- ebenso dieselbe DNA-Menge der genomischen Referenz-DNA (gleichgeschlechtlicher Promega-DNA-Pool) vorbereiten
- je 5,8 µl Restriktionsansatz zugeben:
 

|                                    |
|------------------------------------|
| 2,6 µl 10x Puffer C                |
| 0,2 µl acetyliertes BSA (10 µg/µl) |
| 0,5 µl <i>AluI</i> (10 U/µl)       |
| 0,5 µl <i>RsaI</i> (10 U/µl)       |
| ad 5,8 µl H <sub>2</sub> O         |
- Proben für 2 h bei 37°C und 20 rpm inkubieren
- Enzyme bei 65°C für 20 min inaktivieren, danach auf Eis stellen
- die Restriktion in 200-500 bp Fragmente über eine Gelelektrophorese kontrollieren, dazu je 2 µl der Proben auf ein 0,8% Agarosegel auftragen und mit dem 100 bp-Standard (5 µl; Invitrogen) vergleichen
- danach mit der Markierung fortfahren oder DNAs bei -20°C lagern

#### 4.1.4 Fluoreszenzmarkierung der DNA mittels 'random-priming'

Bei dieser Methode binden 'random'-Oktamernukleotide an die denaturierte DNA-Matrize. Diese werden von dem Exo-Klenow-Fragment (mutierte Form des Klenow-Fragments der Polymerase I) in Gegenwart von u. a. dATP, dGTP, dCTP (je 1,2 mM) und dTTP (0,6 mM) verlängert. Dem Exo-Klenow-Enzym fehlt die 5'-3'- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch die Einbau-Effektivität von modifizierten Nukleotiden gesteigert ist. Die direkte Markierung der DNA erfolgt über die Zugabe von mit Cyanin 3 (Cy3)- (Extinktion ~550 nm, Emission ~568 nm) oder Cyanin 5 (Cy5)- (Extinktion 650 nm, Emission 668 nm) modifiziertem 2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat (dUTP). Durch den Einbau des dUTP-Cyanins (1 mM) in die DNA, kann diese später als Sonde zur Hybridisierung der Array-Oligonukleotide eingesetzt und mittels Scanner ausgelesen werden. Zudem resultiert eine 7-10fache (lineare) Amplifizierung der Ausgangsprobe.

##### **Anleitung:**

- Fluoreszenzfarben vor direkter und langer Lichteinstrahlung schützen!
- sowohl 1,5 µg der restringierten Patienten- als auch der Referenz-DNA (je 24 µl) in getrennte 0,5 ml Gefäße überführen, je 5 µl 'random'-Primer zusetzen und mischen
- Probe für 3 min bei 95°C im Thermocycler (PTC-200) denaturieren, danach Proben 5 min auf Eis inkubieren

- währenddessen je Probe einen Markierungsansatz auf Eis zusammenpipettieren (die Patienten-DNA wurde hier mit Cy5, die Referenz-DNA mit Cy3 markiert):
 

|                             |                            |
|-----------------------------|----------------------------|
| 10,0 µl                     | 5x Reaktionspuffer         |
| 5,0 µl                      | 10x dNTP                   |
| 3,0 µl                      | Cy3-dUTP/Cy5-dUTP (1,0 mM) |
| 1,0 µl                      | Exo-Klenow-Fragment        |
| ad 21,0 µl H <sub>2</sub> O |                            |
- 21 µl des entsprechenden Markierungsansatzes der Probe zusetzen, resuspendieren und 2 h bei 37°C, danach 10 min bei 65°C im Thermocycler (PTC-200) inkubieren
- Proben bei -20°C lagern oder auf Eis stellen und mit der Aufreinigung fortfahren

#### 4.1.5 Aufreinigung der markierten DNA

Die Aufreinigung der markierten DNA erfolgt über 'Microcon (jetzt Amicon) YM-30'-Zentrifugiersäulen von Millipore. Mit Hilfe dieser wird die DNA effizient konzentriert, entsalzt, und es werden Primerreste und freie Nukleotide entfernt. Die niedrig-Adsorptionscharakteristik der 'Ultracel YM'-Membran und der spezielle Aufbau der Säule gewähren eine hohe Ausbeuterate (> 95%) und einen hohen Aufkonzentrationsfaktor (< 100x).

##### **Anleitung:**

- zu den markierten Proben 430 µl TE (pH 8) geben und die komplette Lösung auf eine YM-30-Säule (30 = 30.000 'Nominal Molecular Weight Limit') in Zentrifugiergefäß geben
- Deckel schließen und 10 min bei 8.000x g (8.960 rpm) zentrifugieren (Hermle Z200)
- Durchfluss verwerfen und zum Waschen Säule mit 480 µl TE beladen, verschließen und erneut 10 min zentrifugieren
- Säule umdrehen, in ein steriles 1,5 ml Zentrifugiergefäß stellen, 1 min zentrifugieren und das Volumen des Eluats messen
- überschreitet das Volumen den in Tabelle 4.1-1 angegebenen Wert X µl, bezogen auf das jeweilige Arrayformat, werden die folgenden 2 Schritte so oft wiederholt bis  $\leq X$  µl erreicht wurden:
  - A das Eluat wieder auf die zurückgedrehte Säule geben, 1 min zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen
  - B Säule umdrehen und in ein steriles 1,5 ml Zentrifugiergefäß stellen, 1 min zentrifugieren und erneut das Volumen des Eluats messen
- Eluat mit 1x TE auf X µl bringen
- die spezifische Aktivität als auch Quantität und Qualität per NanoDrop-Messung (je 1,5 µl) (vgl. Kapitel 4.1.6) bestimmen
- die Cy5- und Cy3-markierten Proben in einem 1,5 ml hitzestabilem Gefäß (wie in Tabelle 4.1-1) zusammenführen

**Tabelle 4.1-1:** Übersicht der Einzelproben- und Gesamtprobenvolumina.

|   | 4x 44 k | 2x 105 k | 1x 244 k |
|---|---------|----------|----------|
| Nach Aufreinigung der Cy3- und Cy5-Proben ad 1x TE (µl) | 21      | 41       | 80,5     |
| Volumen nach NanoDrop-Messung und Zusammenführung (µl)  | 39      | 79       | 158      |

#### 4.1.6 Bestimmung der Spezifischen Aktivität und der Ausbeute (NanoDrop)

Die zur Berechnung nötigen Parameter werden durch eine NanoDrop-Messung (vgl. Kapitel 4.8.4) bestimmt. Hierzu wird in der ND-1.000-Software 'microarray-measurement' im Hauptmenü gewählt und darauf geachtet, dass DNA-50, Cy3 mit einer Absorption bei 550 nm und Cy5 mit einer Absorption bei 650 nm voreingestellt sind. Die spezifische Aktivität und die Ausbeute ergeben sich aus folgenden Formeln:

$$1) \text{ Spezifische Aktivität (pmol/}\mu\text{g)} = \text{pmol/}\mu\text{l Farbe} / \mu\text{g/}\mu\text{l gDNA}$$

$$2) \text{ Ausbeute (}\mu\text{g)} = \text{ng/}\mu\text{l DNA-Konzentration} \times \mu\text{l Probenvolumen} / 1.000 \text{ ng/}\mu\text{g}$$

Die Ergebnisse werden mit den folgenden erwarteten Werten verglichen:

**Tabelle 4.1-2:** Erwartete Ausbeute und Spezifische Aktivität nach der Markierung und Aufreinigung der genomischen DNA (gDNA).

| Einsatz gDNA ( $\mu\text{g}$ ) | Ausbeute gDNA ( $\mu\text{g}$ ) | Spez. Aktivität der Cy3-markierten Probe (pmol/ $\mu\text{g}$ ) | Spez. Aktivität der Cy5-markierten Probe (pmol/ $\mu\text{g}$ ) |
|--------------------------------|---------------------------------|---|---|
| 0,5                            | 5-7                             | 25-40   | 20-35   |
| 3,0                            | 7-10                            | 35-55   | 25-40   |

#### 4.1.7 Vorbereitung der Proben und Hybridisierung auf dem Array

Für eine spezifische und Hintergrund-reduzierte Hybridisierung auf dem Array wird die markierte DNA-Probe mit Cot-1-DNA (vgl. Kapitel 4.2.3.4), Agilent-Blocking-Reagenz und Hybridisierungspuffer versetzt. Durch eine Denaturierung und anschließende Vorinkubation bei 37°C werden so repetitive Sondenanteile geblockt. Anschließend wird die Probe auf einen im Stahlträger ('surehyb chamber') liegenden Agilent-'gasket slide' in 'drag and drop'-Manier pipettiert, ohne dass die Flüssigkeit die Ummantelung berührt. Daraufhin wird die aktive Arrayseite seitlich auf den Glasträger gesetzt und langsam auf den Probentropfen luftblasenfrei herabgelassen, so dass der Barcode nach oben zeigt. Den Stahlträger vorsichtig schließen und handfest zudrehen. Dieses 'Arraysandwich' von Hand langsam rotieren, mögliche Luftblasen losklopfen und im Hybridisierofen inkubieren.

##### **Anleitung:**

Einmalig wird das lyophilisierte 10x Blocking-Reagenz (Agilent) in 1.350  $\mu\text{l}$  Nuklease-freiem Wasser aufgenommen, 1 h bei RT gelöst, gevortext und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

|  |                                      |                                       |                                       |
|--|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| - Hybridisierungsmix/Format vorbereiten: | <u>4x 44 k</u>                       | <u>2x 105 k</u>                       | <u>1x 244 k</u>                       |
| Cy5- und Cy3-markierter DNA-Mix          | 39,0 $\mu\text{l}$                   | 79,0 $\mu\text{l}$                    | 158,0 $\mu\text{l}$                   |
| Cot-1 DNA (1 $\mu\text{g/}\mu\text{l}$ ) | 5,0 $\mu\text{l}$                    | 25,0 $\mu\text{l}$                    | 50,0 $\mu\text{l}$                    |
| Agilent 10x Blocking-Reagenz             | 11,0 $\mu\text{l}$                   | 26,0 $\mu\text{l}$                    | 52,0 $\mu\text{l}$                    |
| <u>Agilent 2x Hybridisierungspuffer</u>  | <u>55,0 <math>\mu\text{l}</math></u> | <u>130,0 <math>\mu\text{l}</math></u> | <u>260,0 <math>\mu\text{l}</math></u> |
| Gesamtvolumen                            | 110,0 $\mu\text{l}$                  | 260,0 $\mu\text{l}$                   | 520,0 $\mu\text{l}$                   |

- abzentrifugieren und 3 min bei 95°C denaturieren, 30 min bei 37°C inkubieren
- 1 min bei RT und 6.000x g (7.758 rpm) zentrifugieren (Hermle Z200)
- ein 'gasket slide'-Areal des 4x 44 k-Arrays mit 100  $\mu\text{l}$ , des 2x 105 k-Arrays mit 245  $\mu\text{l}$  und des 1x 244 k-Arrays mit 490  $\mu\text{l}$  beladen, Array mit aktiver Seite auflegen, Stahlzwinge schließen, langsam rotieren und Luftblasen losklopfen

- 4x 44 k-Arrays 24 h und 2x 105 k- bzw. 1x 244 k-Arrays 40 h bei 65°C und 20 rpm im Hybridisierofen (Agilent) inkubieren

#### **4.1.8 Waschen der Mikroarrays**

Das Waschen erfolgt stringent mit zwei Puffern bei verschiedenen Temperaturen. Da vor allem Cyanin 5 empfindlich gegenüber der Degradation durch Ozon bei einem Level von höher als 5 ppb ist, wird entweder a) das Waschen in einem Ozon-freien Zelt oder b) das zusätzliche Behandeln des Arrays mit Stabilisierungs- und Trocknungslösung von Agilent empfohlen. Beide Methoden wurden eingesetzt, als Anleitung wird hier nur b) aufgeführt.

##### **Anleitung:**

In einem Waschvorgang können bis zu 5 Arrays gleichzeitig behandelt werden, die Puffer 1 und 2 immer frisch angesetzt, die Temperaturen sollten exakt eingehalten, die Pufferübertragung von einer in die andere Küvette vermieden und die Arrays sollten so kurz wie möglich der Luft ausgesetzt werden. Zudem müssen die Waschschrte unter einem Abzug durchgeführt werden, da sowohl Acetonitril als auch die Stabilisierungs- und Trocknungslösung (Stab-Dry-Lsg.) gesundheitsschädlich ist. Beide Lösungen sind leichtentzündlich.

- Puffer 2 (Agilent; ca. 300 ml) und Küvette 3 ÜN in 37°C-Inkubator vorwärmen
- zur vollständigen Lösung der ausflockenden Stab-Dry-Lsg. (Agilent; kann bis zu 4x mit je 5 Arrays/Ansatz verwendet werden) ÜN bei ca. 42°C und 180 rpm schütteln; kurz vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen
- Stahlzwinde öffnen und geschlossenes Arraysandwich untergetaucht in frischem Puffer 1 bei RT in Küvette 1 mit Hilfe einer Pinzette öffnen, so dass das 'gasket slide' zu Boden fällt
- den Array in den Objektträgerhalter der mit Puffer 1 gefüllten Küvette 2 setzen (alle 4 weiteren Arrays dazusetzen) und bei RT 5 min unter Rühren (Magnetrührer) inkubieren
- kurz vor Gebrauch die vorgewärmten Utensilien bereitstellen
- den befüllten Objektträgerhalter in den auf 37°C erwärmten Puffer 2 in Küvette 3 überführen und 1 min unter Rühren inkubieren
- Halter in Acetonitril in Küvette 4 setzen und 10 s bei RT unter Rühren inkubieren
- Halter in Stab-Dry-Lsg. in Küvette 5 überführen und 30 s bei RT inkubieren (rühren)
- das Herausziehen des Objektträgerhalters sollte ca. 10 s dauern, wodurch auf Grund der Oberflächenspannung der Array trocken und ohne Tropfen erhalten wird
- zum Scannen wird der Array mit der aktiven Seite nach oben bzw. dem Barcode nach unten in den 'slide holder' gesetzt und sollte direkt gescannt werden
- Gegenstände, die mit der Stab-Dry-Lsg. in Kontakt kamen mit Acetonitril säubern
- alle anderen Gegenstände mit Millipore-Wasser ausspülen und an Luft trocknen

#### **4.1.9 Scannen und Feature Extraction**

Das Scannen der Arrays erfolgt mit dem Agilent Mikroarray Scanner unter Verwendung der Agilent 'Scan Control Software'. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden mit zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge angeregt. Dabei absorbieren die Fluorophore das Laserlicht und emittieren ein längerwelliges Licht. Die Zuordnung der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt über entsprechende Emissionsfilter. Die Lichtsignale werden durch einen Photomultiplier (Elektronenröhre) detektiert, in elektronische Signale

umgewandelt, verstärkt und digitalisiert. Die entstehende Bild-Datei (tif) wird mit Hilfe der 'Feature Extraction Software' in eine bereinigte Textdatei umgesetzt (txt). Hierzu wird neben einem digitalen Auswerteprotokoll zusätzlich ein digitales, sogenanntes 'grid template' oder 'design file' benötigt, dessen Nummer auch im Array-Barcode enthalten ist. Dieses enthält alle Informationen zur Anordnung der Oligonukleotide auf dem Array und Informationen zu den Oligonukleotiden selber. Durch dieses Raster werden die Messpunkte für die anschließende Datenanalyse entsprechend des gewählten Protokolls festgelegt. Zunächst werden die Intensitäten der beiden Fluoreszenzfarbstoffe einander angeglichen. Für jeden Spot wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten berechnet und als Logarithmus der Base 10 angegeben. Unspezifische Hintergrundsignale werden der Auswertung entzogen, indem die Hintergrundfluoreszenz jedes Spots in einem definierten Radius bestimmt und in die Auswertung mit einberechnet wird.

#### **Anleitung:**

- Scanner einschalten und 'Agilent Scan Control Software' öffnen
- Voreinstellung für aCGH anwählen (Zwei-Farben-Scan mit voller Intensität für rot und grün, Einzel-Scan, Speicherort)
- für 4x 44 k-, 2x 105 k- und 1x 244 k-Arrays beträgt die Scanauflösung 5  $\mu\text{m}$  (die älteren 1x 44 k-Arrays wurden mit 10  $\mu\text{m}$ -Auflösung gescannt)
- Arraystellplätze angeben und scannen
- das entstandene tif-Bild mit Hilfe der 'Feature Extraction Software' öffnen und auf eine gleichmäßige Hybridisierung kontrollieren
  - o durch Hineinzoomen können die einzelnen Oligonukleotidspots betrachtet und die Gitterlage überprüft werden
- zur Extraktion muss ein neues Extraktionsset angelegt werden – dem folgende Dateien zugeordnet werden müssen:
  - o die tif-Datei
  - o die gewünschte, aktuellste Protokolldatei (hier immer CGH-v4\_10\_Apr08)
  - o die benötigte, Arrayformat-spezifische 'grid template'-Datei
- extrahieren, danach kann die Text-Datei in Auswertesoftware geladen werden

#### **4.1.10 Array-Auswertung**

Die Array-Auswertung erfolgte einerseits a) visuell über die 'Genomic Workbench Software' (GW) von Agilent (vgl. 'Agilent User/Manual Guides') und andererseits von M. Beier b) über die Statistikumgebung 'R' und darauf aufsetzenden, speziellen Analysepaketen der aCGH- und GLAD ('gain and loss analysis of DNA')-Bibliotheken von Bioconductor (frei verfügbar). Letzteres Auswertevorgehen erleichtert die exakte Bestimmung möglicher Bruchpunkte anhand einheitlicher, objektiver Kriterien, das Zusammenfassen sämtlicher Array-Daten sowie einen Abgleich der eigenen Daten mit denen öffentlicher Datenbanken. Die einzelnen Schritte dieser mit Hilfe eines von M. Beier geschriebenen R-Skripts zu automatisierenden Analyse-Pipeline werden nachfolgend kurz beschrieben: Nach Einlesen der Textdatei werden die jedem Oligonukleotid entsprechenden  $\log_2$ Ratios bestimmt und dabei Spots, die durch die interne Qualitätskontrolle gefallen sind, entfernt. Die Detektion von Bruchpunkten erfolgt mit Hilfe des GLAD-Analysepaktes. Dazu werden zunächst die vom Bruchpunkte-Detektions-Algorithmus benötigten Parameter durch Variieren so optimiert, dass eine maximale Anzahl von aus einer Referenzdatenmenge stammenden, bereits bestätigten Aberrationen, korrekt identifiziert wird. Die Ausgabe des Algorithmus besteht in einer Aufteilung der Chromosomen in zusammenhängende Bereiche von Oligonukleotiden

gleicher logRatios (Segmente). Positionen und Level dieser Bereiche werden für alle Arrays anhand der optimierten Parameter bestimmt und als Datensätze in einer Datenbank gesammelt. Anschließend wird jeder Datensatz um Informationen bezüglich Lage und Größe von Überlappungen mit bekanntermaßen varianten oder aberranten Regionen ergänzt. Wichtigste Quelle hierfür ist die 'Database of Genomic Variants' (DGV), aber auch anderweitig publizierte Daten können jederzeit in die Datenbank eingepflegt werden. Weiterhin können die Bereiche wahlweise um weitere Annotationen, wie betroffene Gene, automatisch ergänzt werden. Da die Datenbank aus einer einzigen Tabelle besteht, lässt sie sich leicht zur interaktiven Bearbeitung in eine Tabellenkalkulation importieren, wo die Datensätze schließlich anhand diverser Kriterien (minimale logRatio, Größe, maximale prozentuale Überlappung mit bekannten CNVs usw.) gefiltert und sortiert werden können.

## 4.2 FISH

Mit der lokusspezifischen Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bzw. FISH lassen sich spezifische chromosomale Aberrationen auf Zellebene aufspüren. Zuvor sollte anhand anderer Experimente oder des Phänotyps eine Vermutung bestehen, welche Veränderung vorliegt und wo sie sich befindet. Sonden können kommerziell und direkt fluoreszenzmarkiert bezogen oder mit Hilfe von aus Klondatenbanken ausgewählten BAC-Klonen selber hergestellt werden. Im Vergleich zur klassischen Chromosomenbandenanalyse in der Tumorzytogenetik, die eine durchschnittliche Auflösung von 5 bis 10 Mb bietet, liegt die höchste Auflösung der FISH (abhängig von Mikroskop und Sondengröße) bei etwa 30 kb. Durch den gezielten Einsatz von Sondenkombinationen können fast alle Aberrationsarten detektiert werden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass viele Zellen, meist sowohl Meta- als auch Interphasen, in einem Ansatz kontrolliert werden können. Somit dient diese Technik auch dazu, eine bekannte Aberration auf ihre Ausbreitung im Verlaufe der Erkrankung auf Remission oder Progression oder den Erfolg einer z. B. gegengeschlechtlichen Transplantation zu überprüfen. Das Grundprinzip der Technik bei selbst hergestellten Sonden besteht darin, dass eine mittels Nick-Translation indirekt markierte, sequenzspezifische DNA-Sonde ebenso wie das Chromosomenpräparat denaturiert wird, so dass eine Hybridisierung erfolgen kann. Mit Hilfe von sekundären Antikörpern findet die Fluoreszenzmarkierung statt. Später werden die vorhandenen Signale je Zelle unter einem Fluoreszenzmikroskop verfolgt und ausgezählt. Durch den Einsatz von andersfarbigen Referenzsonden können verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden. In dieser Arbeit wurden die FISH-Sonden überwiegend selber hergestellt, teilweise aber auch fertige Sondenkits verwendet.

### 4.2.1 Objektträgervorbehandlung und Präparatherstellung

Als Vorbehandlung müssen die Objektträger durch Alkohol entfettet und eiskalt gelagert vorliegen. Die ebenfalls kalte Kernsuspension (nach Kultivierung des Knochenmarks, Aufarbeitung zur Gewinnung der Leukozytenkerne und Fixierung) wird in einer ausreichenden Zelldichte aufgetropft und es wird mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes kontrolliert, ob sich mögliche Metaphasechromosomen ausreichend gespreitet haben. Das Altern (Trocknung) der Präparate über zwei Tage erfolgt bei Raumtemperatur und die Anwendung einer Alkoholreihe im Anschluss bezweckt den

vollständigen Wasserentzug. Lagern lassen sich die Präparate über Wochen in reinem Alkohol bei -20 °C ohne erwähnenswerten Qualitätsverlust.

**Anleitung:**

- Objektträger 24 h in 100% Ethanol bei RT entfetten, dann in einem 12% Ethanol-Wasser-Gemisch bei -20 °C bis zum Gebrauch lagern
- asservierte Zellsuspension in Fixativ 5 min bei 1.500 rpm (Hermle Z200) zentrifugieren, Überstand vorsichtig abziehen und Zellen mit frischem Fixativ (3 Teile Methanol, ein Teil Eisessig) soweit resuspendieren, dass eine durchscheinende Suspension entsteht
- Objektträger entnehmen, mit Abzieher und Löschblock vollständig trocknen und 10 µl Zellsuspension auftropfen
- Präparat kurz trocknen lassen und unter dem Mikroskop auf Zelldichte und Chromosomenspreitung kontrollieren; evtl. Suspension verdünnen
- die Präparate ein bis drei Tage an der Luft bei RT altern lassen und dann durch eine Alkoholreihe (70%, 85%, 100%, je 2 min) entwässern
- direkt verwenden oder bei -20 °C in 100% Ethanol lagern

**4.2.2 FISH mit kommerziellen Fluoreszenzsonden**

Der Vorteil dieser eingesetzten Sonden ist, dass ihre Hybridisierung an den vorgesehenen Chromosomenbereich gesichert, die Signal-Ausfallrate ('cut off') klar definiert und die Signalintensität optimiert ist. Die Handhabung käuflicher Sonden ist einfach und zeitsparend, häufig werden fertige Sondenmixe angeboten, die die Referenzsonde bereits enthalten. Nachteile dieser Sonden sind ihr hoher Preis und die Tatsache, dass nur Sonden angeboten werden, die die geläufigsten Aberrationen detektieren. Firmen- und Sondentyp-abhängig (Anleitungen s. Herstellerangaben) weichen die Durchführungsschritte nur leicht voneinander ab. Die Bindung der meisten Sonden (Ausnahmen sind z. B. Ganzchromosomenfärbungen) kann sowohl an Metaphasen als auch an Interphasen erfolgen. Man unterscheidet überwiegend zwischen Chromosomen-, Chromosomenarm- und Locus (wie Zentromer und Telomer)-spezifischen Sondentypen.

**4.2.3 FISH mit BAC-Sonden**

In Genomdatenbanken (UCSC, Ensembl, DGV) werden sogenannte BACs ('bacterial artificial chromosomes') mit einer Größe von durchschnittlich ca. 170 kb aufgeführt, die fast das gesamte menschliche Genom repräsentieren. Bei BACs handelt es sich um einen Vektor, der sich vom *E. coli*-Fertilitätsfaktor ableitet und zwischen 30 und 250 kb große z. B. humane DNA-Fragmente aufnehmen kann. Er besteht aus einer ca. 10 kb großen, eigenen DNA mit Regulationssequenzen, u. a. für die autonome Replikation, einem Fertilitätsfaktor (Weitergabe an Tochterzellen) und einem Antibiotika-Resistenzgen (Selektionsmarker). BACs kommen nur in 1 bis 2 Kopien pro Bakterium vor. Die stabile Weitergabe des Vektors an Tochterzellen über den F-Faktor, die zirkuläre Natur des Plasmids und die schnelle Reproduktionszeit von *E. coli* machen dieses Konstrukt zu dem perfekten 'biologischen Werkzeug', um genomische DNA-Bibliotheken zu erstellen. Neben BAC-Klonen werden auch oft PAC ('phage artificial chromosome')- und YAC ('yeast artificial chromosome')-Klone verwendet, die sich in der Aufnahmekapazität der Fremd-DNA (Sonde) unterscheiden. Wenigstens die Start- und Schlusssequenzen der Fragmente sind

ansequenziert und somit bekannt. Entsprechend der gewünschten Region wählt man einen BAC in passender Größe aus und bezieht ihn als *E. coli*-Bakterienklon.

#### 4.2.3.1 Bakterienkultur und Glycerinstock

Die *E. coli*-BACs werden in einem Agar-Stock geliefert und zur Verhinderung von Kontaminationsbakterien wird ein Verdünnungsaustich durchgeführt. Dem LB-Nähragar wird hierzu das Selektionsantibiotikum zugesetzt. Nach der Inkubation wird ein Einzelklon gepickt und in LB-Nährmedium, ebenfalls mit Antibiotikum versetzt, angezüchtet. Ein Aliquot der Bakteriensuspension wird als Glycerinstock konserviert.

##### Anleitung:

- diese Arbeiten müssen im S1-Bereich durchgeführt werden, zudem besteht Kontaminationsgefahr; sterile Reagenzien, Gefäße und Materialien verwenden!
- Bakterien mit Impfüse oder Spatel auf Agarplatte mit spezifischem Antibiotikum in angegebener Konzentration (Chloramphenicol 1:1.000) verdünnend ausstreichen
- ÜN in Brutschrank bei 37°C inkubieren
- Einzelklon von der Platte picken und in 5 ml LB-Medium, versetzt mit Antibiotikum, (in Falcon) geben und ÜN in Schüttler bei 37°C und 180 rpm inkubieren
- 500 µl dieser Startkultur für den Glycerinstock mit 25-30% Glycerin mischen und einfrieren (1x -20°C, 1x -80°C)
  - o zur Verwendung kurz antauen, Aliquot abnehmen u. zügig wieder einfrieren
- 100 µl der Startkultur zu 50 ml LB-Medium, versetzt mit Antibiotikum, in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Deckel geben und ÜN bei 37°C und 180 rpm inkubieren
- Bakteriensuspension in 250 ml-Zentrifugationsgefäß (Sorvall) umfüllen
- 15 min bei 6.000x g (6.282 rpm, Sorvall RC-5B, SLA-1.500) und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet einfrieren oder weiter mit BAC-Isolation

#### 4.2.3.2 Plasmidpräparation

Die BAC-DNA-Isolation wurde mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen durchgeführt. Dieses funktioniert über eine alkalische Lyse. Zuerst werden die *E. coli*-Zellen durch Zugabe von Puffer1 (Tris/HCl, EDTA, RNaseA) resuspendiert. Der alkalische Puffer2 (SDS, NaOH) löst die Phospholipide der Zellwand und denaturiert Proteine. Der eisgekühlte saure Puffer3 (Kaliumacetat) führt wieder zur Neutralisation, wobei auf Eis Proteine und das große Bakterienchromosom ausfallen, während die topologisch stabilere, zirkuläre Vektor-DNA schneller renaturiert (in Lösung geht). Nach Zentrifugation wird die Lösung auf die Anionen-Austauscher Säule gegeben, die selektiv die Plasmid-DNA unter entsprechend niedriger Salzkonzentration und optimierten pH-Bedingungen bindet. RNA-, Protein-, Metaboliten-Reste und niedermolekulargewichtige Verunreinigungen werden durch einen Waschschriff mit leicht erhöhter Salzkonzentration entfernt. Die ultrareine Plasmid-DNA wird mit einem stark salzhaltigen Puffer eluiert und durch eine Isopropanolpräzipitation aufkonzentriert und wieder entsalzt. Zum Schluss wird das komplett getrocknete Pellet zur DNA-Stabilisation in TE-Puffer aufgenommen.

##### Anleitung:

- Fortsetzung von Bakterienkultur und Glycerinstock
- Zellpellet in 4 ml Puffer P1 (mit RNase A 100 µg/ml) vollständig resuspendieren
- 4 ml Puffer P2 zugeben, 4-6x invertieren und bei RT exakt 5 min inkubieren
- 4 ml gekühlten Puffer P3 zugeben, 4-6x invertieren und 20 min auf Eis inkubieren

- 30 min bei 4°C u. 20.000x g (11.470 rpm, Sorvall RC-5B, SLA-1.500) zentrifugieren
- Überstand in 40 ml Gefäß (Nalgene) überführen und 15 min bei 4°C und 20.000x g (12.909 rpm, Sorvall RC-5B, SS-34) zentrifugieren, währenddessen Säule durch Zugabe von 4 ml Puffer QBT äquilibrieren
- Lysat auf Säule geben und durchlaufen lassen
- Säule 2x mit 10 ml Puffer QC waschen
- an Säule gebundene BAC-DNA mit 5 ml auf 65°C erwärmten Puffer QF eluieren und in 30 ml Röhrchen (Corex) auffangen
- für die Fällung der DNA, Lösung mit 0,7x Volumen Isopropanol mischen und 30 min bei 15.000x g (11.180 rpm) und 4°C zentrifugieren (erwartete Pelletposition markieren, da das Pellet durchsichtig ist)
- Überstand vorsichtig abnehmen und Pellet mit 2 ml 70% Ethanol waschen, dafür 15 min bei 15.000x g und 4°C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen und Pellet 5-10 min an der Luft trocknen
- Pellet in 100-150 µl 1x TE-Puffer pH 8 ÜN bei 4°C lösen und bei 4°C oder -20°C lagern

#### 4.2.3.3 Indirekte Markierung von BAC-DNA

Für eine effektive Hybridisierung mit dem Chromosomenpräparat ist es wichtig, dass die Sonden-DNA eine Größe zwischen 200 und 500 bp besitzt. Zusätzlich muss sie für die spätere Detektion markiert sein. Diese Voraussetzungen werden durch die Inkubation bei 15°C mit einem Enzym-Mix geschaffen. Dieser enthält u. a. DNaseI und DNA-PolymeraseI. Die DNaseI setzt im gesamten Vektor-Doppelstrang Einzelstrangbrüche, während die PolymeraseI mit Hilfe ihrer Exonukleasefunktion an solch einem Bruch in 5'-3'-Richtung (Syntheserichtung) Nukleotide abbaut und gleichzeitig neue Nukleotide an das 3'-OH-Ende knüpft (Nick-Translation). Hierzu werden der Polymerase alle Desoxynukleotid-Triphosphate angeboten, wobei beim verwendeten Invitrogen-System an 50% der dATPs (Adenin) Biotin gebunden ist. Biotin kann später vom Reportermolekül Streptavidin, das mit rot-fluoreszierendem Cyanin3 konjugiert ist (Dianova), detektiert werden. Statt mit Biotin kann auch mit Digoxigenin (DIG) (Roche) markiert werden, das an dUTPs gebunden neben den anderen vier Nukleotidtypen im Mix vorliegt. Später wird das grün-fluoreszierende Anti-DIG-Fluorescein als Reportermolekül (Roche) zur Detektion eingesetzt. Die DNA-Fragmentgrößen müssen zwischendurch über Gelelektrophoresen kontrolliert und möglicherweise bei 37°C weiter restringiert werden. Ist die gewünschte Größe erreicht, wird die Probe durch Zugabe von EDTA, welches die von den Enzymen benötigten Magnesiumionen komplexiert, gestoppt.

#### Anleitung a) mit dem Invitrogen-System für eine rote Markierung (Biotin ↔ Cy3):

- Markierungsansatz:
 

|                                    |
|------------------------------------|
| 5,0 µl 10x dNTP-Mix                |
| 5,0 µl 10x Enzym-Mix               |
| <u>    X µl BAC-DNA (1 µg)</u>     |
| <i>ad</i> 50,0 µl H <sub>2</sub> O |
- 100 min in 15°C Wasserbad inkubieren, dann Reaktion auf Eis unterbrechen
- zur Fragmentgrößenkontrolle folgenden Mix herstellen und auf ein 1% Agarosegel auftragen:
 

|   |
|---|
| 2,5 µl 5x Auftragungspuffer                 |
| <u>    3,5 µl Markierungsansatz (70 ng)</u> |
| <i>ad</i> 12,5 µl H <sub>2</sub> O          |
- als Standard 5 µl der 100 bp Leiter auftragen

- liegt die Fragmentgröße zwischen 200 und 500 bp, Markierungsreaktion auf Eis durch Zugabe von 3 µl Stopp-Puffer (0,5 M EDTA pH 8) beenden
  - o sind die Fragmente zu groß, Probe bei 37°C weiter inkubieren, über eine erneute Gelelektrophorese kontrollieren und schließlich Reaktion beenden
- mit Biotin markierte DNA-Fragmente bei -20°C lagern

#### **Anleitung b) mit dem Roche-System für eine grüne Markierung (DIG ↔ FITC):**

- Markierungsansatz:
 

|                                    |
|------------------------------------|
| 4,0 µl 5x DIG-Nick Translation Mix |
| <u>  X µl BAC-DNA (1 µg)</u>       |
| ad 20,0 µl H <sub>2</sub> O        |
- 100 min in 15°C Wasserbad inkubieren, dann Reaktion auf Eis unterbrechen
- zur Fragmentgrößenkontrolle folgenden Mix herstellen und auf ein 1% TBE-Agarosegel auftragen:
 

|   |
|---|
| 2,5 µl 5x Auftragungspuffer               |
| <u>  1,5 µl Markierungsansatz (75 ng)</u> |
| ad 12,5 µl H <sub>2</sub> O               |
- Fragmentgröße (s. o.) kontrollieren und die Markierungsreaktion durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8 und Inkubation bei 65°C für 10 min endgültig beenden
- mit Digoxigenin markierte DNA-Fragmente bei -20°C lagern

#### **4.2.3.4 Fällung und Hybridisierung der indirekt markierten Sonde**

Der Natriumacetat-Ethanol-Fällungsansatz enthält neben der Biotin- und/oder DIG-markierten Sonden noch Lachssperma ('salmon testes')- und Cot-1-DNA. Lachssperma-DNA, als artfremde DNA, besetzt unter renaturierenden Bedingungen unspezifisch die Sonden- und Präparat-DNA und wird nur an den Stellen verdrängt, wo die spezifisch-komplementäre, markierte Sonden-DNA hybridisiert. Cot-DNA, gewonnen aus humaner Plazenta-DNA, besteht überwiegend aus schnell renaturierenden, repetitiven Elementen, wie SINES und LINES. Die Inkubation von markierter Sonde, Cot-DNA und Präparat unter Renaturierungsbedingungen ermöglicht die schnelle Hybridisierung der repetitiven Cot-DNA mit den repetitiven Sonden- und Präparatanteilen. Somit dient die Cot-DNA der Suppression von Kreuzhybridisierungen in *in situ* Hybridisierungsexperimenten. Später wird die Sonden-DNA bei 37°C in deionisiertem Formamid wieder gelöst. Formamid destabilisiert die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Basenpaaren, welches eine Reduzierung der Schmelztemperatur erzeugt. Dann wird das Chromosomenpräparat bei 72°C mit Formamid/SSC denaturiert und durch eine Alkoholreihe Wasser entzogen, um den denaturierten Zustand zu bewahren. Nach Zugabe von Dextransulfat/SSC wird dann die Sonden-DNA bei 72°C denaturiert. Hierbei wird der DNA ebenfalls Wasser entzogen und es erfolgt eine Aufkonzentrierung, die die folgende Hybridisierung begünstigt. Zügig wird der Sonden-Mix (bei Test- und Referenzsonde) dann auf das Präparat pipettiert. Ein Deckglas und Fixogum schützen das Präparat und verhindern eine Austrocknung bei der folgenden Über-Nacht-Inkubation in feuchter Atmosphäre bei 37°C. Eine neu hergestellte Sonde muss beim ersten Mal auf einem Kontrollpräparat hybridisiert werden, um sie auf ihre Hybridisierungseigenschaften (Kreuzhybridisierung, Signalintensität usw.) zu überprüfen.

**Anleitung:**

- Fällungsansatz/Präparat:
 

|                                     |
|-------------------------------------|
| 5,0 µl Biotin-Sonde (100 ng)        |
| 2,0 µl DIG-Nick-Sonde (100 ng)      |
| 3,0 µl Lachssperma-DNA (30 µg)      |
| 5,0 µl Cot-1 DNA (5 µg)             |
| ad 45,0 µl H <sub>2</sub> O         |
| 4,5 µl 3 M NaAc pH 5,2 (1/10x Vol.) |
| 150,5 µl 100% EtOH (3x Vol.)        |
| 200,0 µl                            |
- vortexen, 15 min bei -80°C fällen, dann 10 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Hermle Z200)
- Überstand verwerfen und Pellet mit 150 µl 70% Ethanol waschen, dazu 10 min zentrifugieren
- Überstand komplett abnehmen und verwerfen, Pellet lufttrocknen bis es durchsichtig ist, dann in 2,5 µl Formamid aufnehmen und 30 min bei 37°C lösen
- Objektträger aus 100% Alkohol holen, lufttrocknen und frische 70% Formamid/2x SSC-Lösung aufpipettieren:
 

|                              |
|------------------------------|
| 140,0 µl FA                  |
| 20,0 µl 20x SSC              |
| ad 200,0 µl H <sub>2</sub> O |
- großes Deckglas aufsetzen und Präparat in Metallbox 3 min bei 72°C denaturieren
- Deckglas verwerfen, Präparat zügig mit Wasser spülen, dann durch Alkoholreihe ziehen (70%, 85%, 100% Ethanol, je 2 min) und an Luft trocknen lassen
- je 2,5 µl 20% Dextransulfat / 4x SSC-Lösung zu Sondenlösung geben und 5 min bei 72°C denaturieren
- kurz abzentrifugieren, dann zügig 5 µl der denaturierten Sonde auf OT mit denaturierten Chromosomen geben
- kleines Deckglas auflegen und mit Fixogum gut abdichten
- in feuchter Atmosphäre (Metallboxboden mit nassen Papiertüchern auskleiden) bei 37°C ÜN hybridisieren

**4.2.3.5 Sondendetektion und Präparatwaschung**

Zur Detektion der auf den Chromosomen gebundenen Sonden müssen die Präparate vorerst mit Hilfe von zwei Puffern gewaschen werden. Die beiden Waschschriffe weisen eine Erhöhung der Stringenz auf, d. h. die Temperatur wird gesteigert und der Salzgehalt erniedrigt. Dies hat zur Folge, dass unspezifische Hybridisierungen gelöst werden und ungebundene DNA entfernt wird. Eine Inkubation mit proteinhaltiger Blocking-Lösung hat ähnliche Aufgaben wie die Lachssperma-DNA (s. o.). Streptavidin-Cyanin3 (Extinktion ~550 nm, Emission ~570 nm) kann während eines 37°C-Inkubationsschritts nun spezifisch Biotin binden, während anti-Dig-Antikörper-Fluorescein (Extinktion ~492 nm, Emission ~520 nm) spezifisch Digoxigenin detektiert. Das Präparat wird dann erneut einfach gewaschen, um überschüssige Proteine zu entfernen. Für eine eindeutigere Analyse werden die Chromosomen spezifisch mit DAPI (Extinktion ~360 nm, Emission ~460 nm) gegengefärbt und eine Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop vorgenommen. Zur Konservierung des Fluoreszenzpräparates wird Antifade-Medium eingesetzt.

**Anleitung:**

- Fluoreszenzfarben vor direkter und langer Lichteinstrahlung schützen!
- 37°C Waschlösung (700 ml) im 37°C Bad 30 min vorwärmen
- 42°C Waschlösung (300 ml) im 42°C Bad 30 min vorwärmen
- Fixogum und Deckglas des hybridisierten Präparates verwerfen

- Präparat bei 37°C 3x 5 min in Küvette mit 37°C-Waschlösung inkubieren (schütteln)
- Präparat bei 42°C 3x 5 min in Küvette mit 42°C-Waschlösung inkubieren (schütteln)
- 200 µl frische Blocking-Lösung (5 ml 37°C Waschlösung mit 0,25 g BSA) auf Präparat geben, großes Deckglas auflegen und 30 min bei 37°C inkubieren, danach Deckglas verwerfen und Lösung abtropfen lassen
- Antikörper-Mix/Präparat (OT):
  - 150,0 µl Blocking-Lsg.
  - 0,6 µl 50% StreptavidinCy3 (1:500)
  - 1,5 µl anti-DIG-FITC (1:100)
- 150 µl des Mixes auf das Präparat pipettieren, großes Deckglas auflegen und 60 min bei 37°C inkubieren
- Präparat bei 37°C 3x 5 min in Küvette mit 37°C-Waschlösung inkubieren
- 500 µl frische DAPI-Lösung (500 µl 37°C-Waschlösung + 0,15 µl DAPI (1:333) auf Präparat geben und ohne Deckglas in Box 3 min bei RT inkubieren
- 3x in Küvette mit Wasser spülen und Objektträger in Box lufttrocknen
- einen Tropfen Vectashield Mounting Medium (Antifade) auf das Präparat geben, großes Deckglas auflegen und unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten
- Präparate bei 4°C und dunkel lagern

### 4.3 PCR-Varianten

Die 'polymerase chain reaction' (PCR) ist eine effektive Methode, bei der der Einsatz geringster Mengen an DNA ausreicht, um ein Produkt zu amplifizieren. Dazu nötig ist, in optimalen Konzentrationen, eine hitzestabile DNA-Polymerase II (z. B. die rekombinante *Taq*-Polymerase mit 5'-3'-DNA-Polymerase- und -Exonukleaseaktivität), spezifische Primer (vgl. Materialteil), die den zu vervielfältigenden Abschnitt flankieren, alle desoxy-Nukleotid-Triphosphate sowie entsprechende Pufferbedingungen, die die Salzkonzentration, den pH-Wert und die nötige Magnesiumkonzentration sichern. Durch eine optimierte Temperaturabfolge über 25-40 Zyklen in einem PCR-Gerät findet in der Probe eine theoretisch exponentielle Amplifikation statt. Diese Temperaturabfolge gliedert sich in:

- einmalige Startdenaturierung bei etwa 95°C
- zyklische Denaturierung bei etwa 95°C
- zyklisches Annealing bei etwa 55-65°C
- zyklische Extension/Elongation bei etwa 72°C
- einmalige finale Elongation bei 72°C

Angepasst wurden jeweils die Annealing-Temperatur entsprechend der Primer- $T_m$ -Werte und die Elongationszeit entsprechend der erwarteten Produktgröße.

#### 4.3.1 Singleplex- und multiplex-PCR

Für eine gewöhnliche singleplex- oder multiplex (2 Produkte)-PCR wurde sich weitestgehend an das Basis-Protokoll zur rekombinanten *Taq*-Polymerase von Invitrogen gehalten, außer dass 50 µl-Ansätze anstelle von 100 µl-Ansätzen analysiert wurden.

**Tabelle 4.3-1:** Generelles Pipettierschema der durchgeführten singleplex- und multiplex-PCR-Ansätze (Invitrogen). F = 'forward' Primer; R = 'reverse' Primer

| PCR-Reagenzien                            | Singleplex final | Singleplex $\mu$ l | Multiplex final | Multiplex $\mu$ l |
|---|------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| 10x Puffer, + KCl, - MgCl <sub>2</sub>    | 1x               | 5                  | 1x              | 5                 |
| 50mM MgCl <sub>2</sub> (50 nmol/ $\mu$ l) | 75 nmol          | 1,5                | 75 nmol         | 1,5               |
| 10 mM dNTP (10 nmol/ $\mu$ l)             | 10 nmol          | 1                  | 20 nmol         | 2                 |
| 10 $\mu$ M 5'-F (10 pmol/ $\mu$ l)        | 25 pmol          | 2,5                | 25 pmol         | 2,5               |
| 10 $\mu$ M 3'-R (10 pmol/ $\mu$ l)        | 25 pmol          | 2,5                | 25 pmol         | 2,5               |
| 10 $\mu$ M 5'-F (10 pmol/ $\mu$ l)        | -                | -                  | 25 pmol         | 2,5               |
| 10 $\mu$ M 3'-R (10 pmol/ $\mu$ l)        | -                | -                  | 25 pmol         | 2,5               |
| Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)             | 2,5 U            | 0,5                | 5 U             | 1                 |
| H <sub>2</sub> O                          | ad 45 $\mu$ l    | 32                 | ad 45 $\mu$ l   | 25,5              |
| Gesamt                                    | 45 $\mu$ l       | 45                 | 45 $\mu$ l      | 45                |
| Pro Ansatz                                | 45 $\mu$ l       | 45                 | 45 $\mu$ l      | 45                |
| + DNA/H <sub>2</sub> O (20 ng/ $\mu$ l)   | 100 ng           | 5                  | 100 ng          | 5                 |
| Insgesamt                                 | 50 $\mu$ l       | 50                 | 50 $\mu$ l      | 50                |

### 4.3.2 'Long range'- bzw. Deletions-spezifische PCR

'Long range'-PCRs wurden mit dem Expand 20 kb<sup>PLUS</sup> PCR System (Roche) durchgeführt. Dazu wurden Primer so nah wie möglich an den erwarteten Deletionsbruchpunkten gewählt (vgl. Ergebnisse).

**Tabelle 4.3-2:** Pipettier- und Temperaturschemata der durchgeführten 'long range'-PCRs (Roche).

| Reagenzien                              | final         | $\mu$ l |                       |
|---|---------------|---------|-----------------------|
| 10x Expand Puffer                       | 1x            | 2,5     | 10 Zyklen {           |
| 10 mM dNTP (10nmol/ $\mu$ l)            | 500 $\mu$ M   | 1,25    |                       |
| 10 $\mu$ M 5'-F (10 pmol/ $\mu$ l)      | 400 nM        | 1       |                       |
| 10 $\mu$ M 3'-R (10 pmol/ $\mu$ l)      | 400 nM        | 1       |                       |
| Expand Mix (5 U/ $\mu$ l)               | 2,5 U         | 0,5     | 25 Zyklen {           |
| H <sub>2</sub> O                        | ad 20 $\mu$ l | 13,75   |                       |
| Gesamt                                  | 20 $\mu$ l    | 20      |                       |
| Pro Ansatz                              | 20 $\mu$ l    | 20      |                       |
| + DNA/H <sub>2</sub> O (20 ng/ $\mu$ l) | 100 ng        | 5       | 8. Schluss-Elongation |
| Insgesamt                               | 25 $\mu$ l    | 25      | 9. Ende               |

|                        |      |              |
|------------------------|------|--------------|
| 1. Start-Denaturierung | 92°C | 2 min        |
| 2. Denaturierung       | 92°C | 10 s         |
| 3. Annealing           | °C   | 30 s         |
| 4. Elongation          | 68°C | min          |
|                        |      | 1 min ~ 1 kb |
| 5. Denaturierung       | 92°C | 10 s         |
| 6. Annealing           | °C   | 30 s         |
| 7. Elongation          | 68°C | min          |
|                        |      | +10 s/Zyklus |
| 8. Schluss-Elongation  | 68°C | 7 min        |
| 9. Ende                | 4°C  | for ever     |

Neben dem aufgeführten System wurde auch das 'PCR Enzyme Selection Kit-High Fidelity' von Invitrogen getestet (s. Herstellerangaben).

### 4.3.3 Touchdown-PCRs

Touchdown (TD)-PCRs wurden verwendet, um mehrere PCR-Ansätze mit leicht unterschiedlichen Annealingtemperaturen der spezifischen Primer (*TET2*) in einem Cycler mit einem Temperaturprogramm zu analysieren. Als Beispiel ist der TD60-57°C gezeigt:

| Bsp. TD60-57 |         |       |            |             |          |
|--------------|---------|-------|------------|-------------|----------|
| 6 Zyklen {   | 1. 95°C | 5 min | 6 Zyklen { | 8. 95°C     | 30 s     |
|              | 2. 95°C | 30 s  |            | 9. 58°C     | 30 s     |
|              | 3. 60°C | 30 s  |            | 10. 72°C    | 1 min    |
|              | 4. 72°C | 1 min |            | 20 Zyklen { | 11. 95°C |
| 6 Zyklen {   | 5. 95°C | 30 s  | 12. 57°C   |             | 30 s     |
|              | 6. 59°C | 30 s  | 13. 72°C   |             | 1 min    |
|              | 7. 72°C | 1 min | 14. 72°C   |             | 8 min    |
|              |         |       | 15. 4°C    | for ever    |          |

## 4.4 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die in dieser Arbeit durchgeführten real-time PCRs unter Einsatz des SybrGreen-Farbstoffes (FastStart Universal SYBR Green Master inklusive Rox, Roche) wurden auf DNA-Ebene zur Bestimmung von relativen Kopienzahl-Unterschieden angewandt. SybrGreen I ist ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff, der sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA, mit einer etwa 100 mal höheren Affinität als Ethidiumbromid einlagert. Das gebundene SybrGreen I fluoresziert nach Anregung (Extinktion ~497 nm; Emission ~530 nm) etwa 1.000 mal stärker als der freie Farbstoff, weshalb es sehr gut geeignet ist, die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte in der qPCR zu detektieren. Zur Berechnung von relativen Kopienzahlen wurde die 'delta delta threshold cycle'- bzw.  $\Delta\Delta Ct$ -Methode verwendet. Diese Technik beruht auf dem Vergleich der Kopienzahl eines Testgens mit der eines bekannten 'single copy'-Referenzgens. Unterscheiden sich die Startkopienzahlen beider Gene auf Grund einer Deletion oder Duplikation wird entsprechend die Akkumulation des einen oder des anderen Gens in einem früheren Zyklus einen gesetzten Schwellenwert (Ct) überschreiten. Wichtig bei dieser Methode ist, dass beide PCRs effektiv ablaufen, d. h. bei maximaler Spezifität größte Produktmengen gebildet werden. Nur so kommt die Annahme, dass eine PCR einen exponentiellen Anstieg aufweist (Verdopplung des Produktes pro Zyklus) der Realität nahe und zur Berechnung eines Ratios kann die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel verwendet werden. Dagegen wird bei zwei PCRs, die keine parallelen, exponentiellen Anstiege aufweisen, der Fehlerwert bei der Berechnung zu groß. Beide PCRs werden nicht nur mit der Test-DNA, sondern ebenfalls mit einer Kontroll-DNA (Kalibrator), um Verdünnungs- und Pipettierungenauigkeiten herauszurechnen, durchgeführt. Der im SybrGreen-Master-Mix von Roche enthaltene passive Referenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin; Extinktion ~575 nm; Emission 600 nm) wiederum bleibt während der Reaktion unverändert und dient der Normalisierung nicht-PCR-abhängiger Fluoreszenzfluktuationen des Reporterfarbstoffes. Bei Verwendung von SybrGreen müssen unspezifische Nebenprodukte oder Primerdimere unbedingt ausgeschlossen werden, weil sich der Farbstoff unspezifisch in jede doppelsträngige DNA einlagert und somit zum unspezifischen Anstieg des Fluoreszenzsignals über den Schwellenwert beiträgt. Deshalb sind bei dieser qPCR-Technik ein optimales Primerdesign und eine Schmelzkurvenanalyse der Proben im Anschluss an die eigentliche PCR nötig.

### 4.4.1 Primerdesign

Das Primerdesign für die durchgeführten qPCR-Analysen wurde mit der Unterstützung mehrerer Internettools durchgeführt und überprüft. Generell wurde wenigstens einer der Primer, wenn die Aberration ein Gen umfasste, in ein Exon des Gens gelegt. Alle qPCR-Analysen wurden bei 60°C durchgeführt, weshalb darauf geachtet wurde, dass der  $T_m$ -Wert (Schmelztemperatur) der Primer zwischen 58-62°C lag. Das Produkt sollte eine Größe zwischen 70-160 bp haben, um eine möglichst hohe Effektivität zu erreichen. Da die Primer von Eurofins MWG Operon bezogen wurden, wurden die auf der Homepage aufgeführten Informationen zur Pufferung und Schmelzwertberechnung übernommen: Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) charakterisiert die Stabilität eines DNA-Hybrids, das von einem Oligonukleotid und seinem komplementären Strang gebildet wird. Bei  $T_m$  50% bindet ein Oligonukleotid an seinem komplementären Strang. Bei einer Primersequenz > 15 Basen kann (nach MWG) zur Berechnung folgende Formel verwendet werden:

$$1) T_m (\text{°C}) = 41 \times (C+G)/\text{Länge} - 650/\text{Länge} + 69,3$$

**Vorgehen:**

- mit Hilfe der Arrayauswertungen wurde die genomische Lage der zu testenden Imbalance notiert und über UCSC die Referenzsequenz einer Teilregion oder eines Gens der Imbalance erhalten
- diese wurde in Primer3 eingeladen und unter Änderung/Variieren einiger voreingestellter Kriterien ein Primerpaar generiert:
  - Produktgröße: 70-160 bp
  - maximale Selbstkomplementarität der Primer: optimal 3 bp, variiert bis 5 bp
  - GC-Clamp der Primer: optimal 2 bp, variiert bis 0 bp
  - Primergröße: variiert 18-27 bp
  - Primer-T<sub>m</sub>: variiert 58-62 °C
  - Primer-GC-Gehalt: variiert 20-70%
- MWG-T<sub>m</sub>-Berechnung und Kontrolle, dass die T<sub>ms</sub> von 'forward'- u. 'reverse'-Primer nicht mehr als 1 °C voneinander abweichen und sich zwischen 58-62 °C befinden
- Überprüfung der genomischen Lage und Spezifität mit dem UCSC-PCR- und dem GenomeTester-Tool
  - binden die Primer zu oft im Genom oder konnte es zur Bildung eines weiteren Produktes kommen, wurden neue Primer entworfen

**4.4.2 Primeretablierung mittels Temperaturgradienten-PCR**

Die lyophilisierten Primerstocks wurden in Wasser aufgenommen (100 pmol/μl) und als Arbeitslösungen verdünnt (10 pmol/μl); die Aufnahme in TE, enthält EDTA und chelatiert Magnesiumionen, wurde vermieden. In einer folgenden Temperaturgradienten-PCR (über 4-5°C in ca. 5 Ansätzen) mit einer Kontroll-DNA wurde getestet, ob das gewünschte Produkt spezifisch und stabil über mehrere Temperaturen amplifiziert wird (Pipettierschema, s. Tabelle 4.3-1). Eine Wasserprobe wurde zur Kontaminationskontrolle mitgeführt. Waren die PCRs erfolgreich (minimale Nebenprodukte oder Primerdimere wurden hier noch akzeptiert), wurde eine Primeroptimierung mittels qPCR durchgeführt.

**4.4.2.1 Primeroptimierung mittels qPCR**

Um die Effizienz der qPCR zu optimieren, wurde ihr Ablauf durch das Ausprobieren verschiedener Primerkonzentrationskombinationen verglichen. Die Konzentration, bei der das meiste Produkt gebildet wurde bzw. die den niedrigsten Ct-Wert aufwies ohne die Bildung von Nebenprodukten zu fördern, wurde als optimale Primerkonzentration für alle weiteren qPCRs festgesetzt (s. Materialteil). Die Etablierung des *PRNP*-Referenzgens, das in sämtliche qPCR-Analysen eingesetzt wurde, ist im Ergebnisteil dargestellt.

**Anleitung:**

- 9 verschiedene Kombinationen (A-I) zwischen 50 nM und 900 nM sollen getestet werden, zudem wird eine Wasserkontrolle in der Konzentration E eingeplant - die Single-Ansätze sehen wie folgt aus:

**Tabelle 4.4-1:** Übersicht der getesteten Primerkonzentrationskombinationen A-I.

| 20 μl PCR-Ansatz       | Forward Primer (10 μM) |                        |                        |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                        | 50 nM                  | 300 nM                 | 900 nM                 |
| Reverse Primer (10 μM) |                        |                        |                        |
| 50 nM                  | <b>A</b> 0,1 μl/0,1 μl | <b>B</b> 0,6 μl/0,1 μl | <b>C</b> 1,8 μl/0,1 μl |
| 300 nM                 | <b>D</b> 0,1 μl/0,6 μl | <b>E</b> 0,6 μl/0,6 μl | <b>F</b> 1,8 μl/0,6 μl |
| 900 nM                 | <b>G</b> 0,1 μl/1,8 μl | <b>H</b> 0,6 μl/1,8 μl | <b>I</b> 1,8 μl/1,8 μl |

- eine qPCR erfolgt immer in Triplikationsansätzen, deshalb werden folgende Master-Mixe angesetzt:

**Tabelle 4.4-2:** Pipettierschema der Master-Mixe bei geplanten Triplikationsansätzen.

| Reagenzien       | A (µl)<br>3,5x | B (µl)<br>3,5x | C (µl)<br>3,5x | D (µl)<br>3,5x | E (µl)<br>7x             | F (µl)<br>3,5x | G (µl)<br>3,5x | H (µl)<br>3,5x | I (µl)<br>3,5x |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 2x SYBR Mix      | 35             | 35             | 35             | 35             | 70                       | 35             | 35             | 35             | 35             |
| 10 µM 5'-F       | 0,35           | 2,1            | 6,3            | 0,35           | 4,2                      | 6,3            | 0,35           | 2,1            | 6,3            |
| 10 µM 3'-R       | 0,35           | 0,35           | 0,35           | 2,1            | 4,2                      | 2,1            | 6,3            | 6,3            | 6,3            |
| 2 mM DNA         | 17,5           | 17,5           | 17,5           | 17,5           | *H <sub>2</sub> O / DNA* | 17,5           | 17,5           | 17,5           | 17,5           |
| H <sub>2</sub> O | 16,8           | 15,05          | 10,85          | 15,05          | 26,6                     | 9,1            | 10,85          | 9,1            | 4,9            |
| Insgesamt        | 70             | 70             | 70             | 70             | 105:2+17,5*              | 70             | 70             | 70             | 70             |
| Pro Ansatz       | 20             | 20             | 20             | 20             | 20                       | 20             | 20             | 20             | 20             |

- auf einer 96well-Platte können 3 Gene/Amplikons gleichzeitig optimiert werden
- Platte bei RT luftblasenfrei belegen, mit optischer Folie schließen, 'Teppich' und 7900-qPCR über SDS-Software starten – folgende Einstellungen beachten:
  - o absolute Quantifizierung
  - o passive Referenz ROX
  - o evtl. neuen Detektor anlegen (SybrGreen, 'non-fluorescent quencher')
  - o 20 µl Probenvolumen, 40 Zyklen
  - o richtige Temperatur- + Rampenprofile:

#### qPCR

|                        |        |      |      |
|------------------------|--------|------|------|
| Startdenaturierung     | 10 min | 95°C | 100% |
| Z-Denaturierung        | 15 s   | 95°C | 100% |
| Z-Annealing/Elongation | 1 min  | 60°C | 100% |

#### Schmelzkurve

|                 |      |      |      |
|-----------------|------|------|------|
| Aufschmelzen    | 15 s | 95°C | 100% |
| Rehybridisieren | 15 s | 60°C | 100% |
| Aufschmelzen    | 15 s | 95°C | 2%   |

- Amplifikations- und Schmelzkurven aller Konzentrationen auf Lage, Höhe und Nebenprodukte per SDS2.2 kontrollieren und optimale Konzentration wählen

### 4.4.3 qPCR-Durchführung und -Auswertung

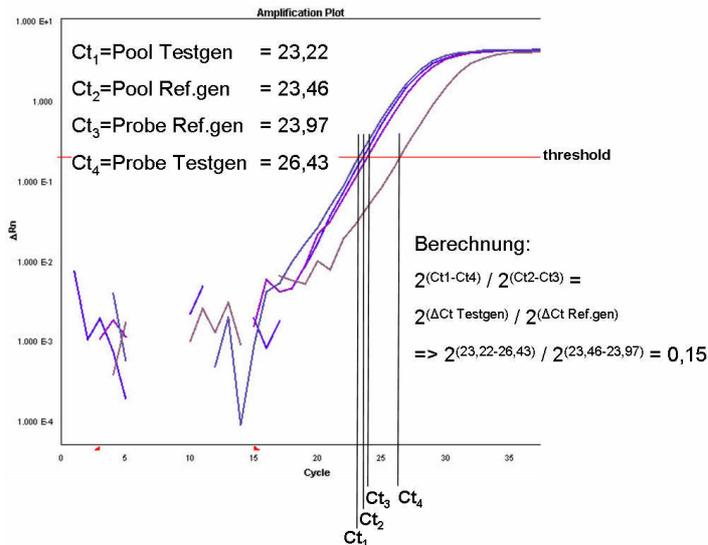
Die eigentliche qPCR-Analyse läuft unter den optimierten Bedingungen ab. Auf jeder Platte muss das (PRNP-)Referenzgen in folgenden Proben gemessen werden:

- o 3 Wasserkontrollen
- o 3 Kalibrator-Proben (DNA-Pool)
- o 2x 3 Normal-DNAs (KA und KB)
- o Xx 3 Patientenproben

Das Testgen muss in ebensolchen Ansätzen gemessen werden. Zur Auswertung wird die folgende  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel benutzt:

$$1) 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{\text{Pool Testgen} - \text{Probe Testgen} - \text{Pool Referenzgen} + \text{Probe Referenzgen}}$$

Diese Beziehung geht davon aus, dass der Schwellenwert in der exponentiellen Phase der Amplifikation überschritten wird, in der eine Verdopplung ( $2^n$ ) der Produktmenge pro Zyklus angenommen wird. Zum Verständnis wird ein Beispiel aufgeführt:



**Abbildung 4.4.1:** Beispiel für eine relative Berechnung eines Testgen-Kopienzahlunterschiedes in einer Patientenprobe zu einem Wildtyppool bei Normalisierung mit einem Referenzgen unter Anwendung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel. Anstelle der Kurven für die jeweiligen Triplikate ist nur eine Kurve gezeigt. Die zugehörigen Ct-Werte spiegeln die Mittelwerte der Triplikate wider. Die Patientenprobe enthält in diesem Fall nur 0,15 mal so viele Testgenkopien wie der Kontrollpool.  $\Delta R_n$  = normalisiertes Reportersignal (logarithmisch); Ct = 'threshold cycle'

Jedes Experiment wurde mit neuen DNA-Verdünnungen mindestens einmal an einem anderen Tag wiederholt. Alle erhaltenen Ct-Werte wurden von M. Beier zur  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - und Signifikanz-Berechnung eingesetzt (Balkendiagramme wurden von ihm mittels R-Programmierung erstellt):

- Entfernung von Ausreißern mittels Dixon und Dean-Test: ab einer Probengröße von 3, Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$
- Zusammenfassen der Triplikate (Mittelwert, Varianz als Streumaß, Stichprobenumfang)
- *Delta Ct*-Berechnung mit den Mittelwerten für Test- und Referenzgen (gemeinsame Varianz- und Stichprobenumfangbestimmung)
- *Delta Delta Ct*-Berechnung (die Kontrolle wird als beliebige Konstante betrachtet, deshalb ist ihre Streuung unbedeutend)
- Zusammenfassen von Wiederholungen
- Signifikanztests mittels zweiseitigem t-Test (Teststatistik, Freiheitsgrade); die ermittelten p-Werte werden nach Holm auf multiples Testen adjustiert
- $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , Foldchange und Errorbars: 95%-Konfidenzintervall mit Standardfehler

#### 4.4.4 Umrechnung von Array- $\log_2$ Ratio, qPCR-Ratio und FISH-Zellanteil

Von M. Beier wurden für Vergleiche der drei Methoden folgende Formeln aufgestellt:

|   |   |
|---|---|
| <p>Zusammenhang zwischen Anteil aberranter Zellen (FISH), Art der Aberration (Deletion, Amplifikation) und Verhältnis der DNA-Mengen (Ratio) bei Array-CGH oder qPCR:</p> $ratio = \frac{fish \cdot copies + (100 - fish) \cdot 2}{200}$ $fish = \frac{200(1 - ratio)}{2 - copies}$ <p>ratio = DNA-Mengenverhältnis Probe/Kontrolle<br/> copies = Kopienzahl in aberranten Zellen<br/> (1 = heterozygote Deletion, 2 = normal etc.)<br/> fish = Anteil aberranter Zellen in Prozent</p> | <p>Zusammenhang zwischen Ratio, Logratio und Foldchange:</p> $ratio = 2^{logratio} = \begin{cases} foldchange & \text{für positiven foldchange} \\ \frac{1}{-foldchange} & \text{für negativen foldchange} \end{cases}$ $logratio = \log_2(ratio) = \begin{cases} \log_2(foldchange) & \text{für positiven foldchange} \\ \log_2\left(\frac{1}{-foldchange}\right) & \text{für negativen foldchange} \end{cases}$ $foldchange = \begin{cases} 2^{logratio} & \text{für } logratio > 0 \\ -2^{-logratio} & \text{für } logratio < 0 \end{cases} = \begin{cases} ratio & \text{für } ratio > 1 \\ -\frac{1}{ratio} & \text{für } ratio < 1 \end{cases}$ |
|---|---|

## 4.5 Mutationsanalyse (DHPLC)

Die Technik der DHPLC ('denaturing high-performance liquid chromatography') dient der Detektion von einfachen Sequenzveränderungen, wie Punktmutationen, kleineren

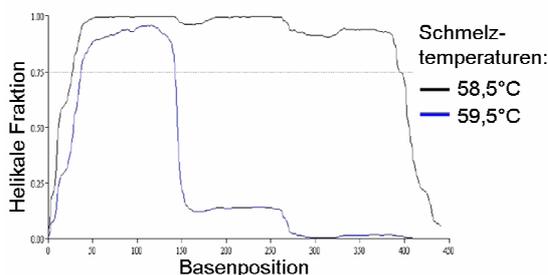
Deletionen und Insertionen in DNA-Fragmenten (150-1.500 bp). Die zuvor denaturierten DNA-Fragmente bilden durch die Anwendung eines spezifischen Renaturierungs-Programms Homo- oder, bei Vorliegen einer Veränderung, Heteroduplices (mit Basenfehlpaarung). Diese lassen sich unter partiell denaturierenden Bedingungen auf Grund unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften auf einer Polymermatrix voneinander trennen. Die thermoinstabileren Heteroduplices eluieren bei entsprechenden Pufferkonzentrationen schneller von der Chromatographiesäule des Wave-Systems (Transgenomic) als die Homoduplices. Ihre Detektion erfolgt mit einem UV-Detektor (260 nm) und mit Hilfe der Wave-Analysis Software wird ein Absorptions-Zeit-Chromatogramm erstellt. Die DNA Fragmente werden in Form von Schmelzpeaks dargestellt, im Fall einer heterozygoten Mutation als zwei Heteroduplex- und zwei Homoduplex-Peaks. Praktisch werden auf Grund zu geringer Retentionszeiten im beschriebenen Fall meist nur zwei Peaks sichtbar.

In dieser Arbeit wurde eine vollständige Mutationsanalyse der Exons des *TET2*-Gens bei mehreren Patientenproben durchgeführt. Als Vorarbeiten wurden 22 Primerpaare (überlappend) entworfen (s. Materialteil), deren Produkte eine Größe zwischen 267 und 582 bp aufwiesen. Ihre Amplifikation wurde mit Hilfe von Touchdown-PCRs (TD) durchgeführt, um in möglichst wenigen Ansätzen viele Proben prozessieren zu können.

#### 4.5.1 Theoretische Bestimmung der Schmelztemperaturen

Sämtliche Produktsequenzen wurden in die DHPLC-Auswertesoftware eingeladen und das Schmelzverhalten jedes Produktes bei verschiedenen Temperaturen simuliert. Es wurden spezifisch für jedes Produkt so viele Temperaturen wie nötig ausgewählt, um es über die gesamte Sequenzlänge partiell aufzuschmelzen. Dabei musste beachtet werden, dass Mutationen am besten detektiert werden, wenn die Schmelzkurve zwischen 0,75 und 0,9 der helikalen Fraktion liegt. Dies bedeutet, dass hier der Doppelstrang erst zu 10% bis 25% aufgeschmolzen wurde. Da diese Prozedur Sequenz-abhängig ist, musste für jedes Amplikon ein eigenes Schmelzprogramm (Methode) generiert werden, das zwischen einer und vier Schmelztemperaturen pro Produkt aufwies. Dieses Programm wurde gespeichert und später auf die jeweilige DNA-Probe angewandt (vgl. Materialteil).

Thermales Profil des *TET2*-Ex3Ai-Amplikons



**Abbildung 4.5.1:** Simulation eines Schmelzprofils des theoretischen *TET2*-PCR-Produktes von Exon 3A, Abschnitt i, bei zwei Temperaturen (58,5°C: obere schwarze Linie und 59,5°C: untere blaue Linie). Bei 59,5°C liegt der Sequenzbereich ab 150 bp schon annähernd völlig aufgeschmolzen vor, weshalb eine zweite Temperatur von 58,5°C nötig ist, um Mutationen auch in dieser Region identifizieren zu können (wavemaker-Software, modifiziert).

#### 4.5.2 Probenvorbereitung und Beurteilung der Kontroll-DNAs

Mit den 22 etablierten Primersets wurden PCR-Produkte von den Kontroll-DNAs (KA, KC) und der Patienten-DNA (P41, mit heterozygoter *TET2*-Deletion) für alle *TET2*-Exons hergestellt. Die Spezifitäts- und Größenkontrollen erfolgten über Gelelektrophoresen. Alle Produkte wurden über das Wave-Programm im Cyler denaturiert und bei -20°C gelagert.

Denaturierungsprogramm:

|           |      |                            |
|-----------|------|----------------------------|
|           | 95°C | 3 min                      |
| 29 Zyklen | {    | 95°C 1 min                 |
|           |      | minus 1°C/min bis auf 65°C |
|           |      | 4°C for ever               |

Auf Grund der Erstetablierung wurden als Vorschritt die Amplikons der Kontrollen auf Mutationen bzw. SNPs mittels DHPLC und dem festgelegten Schmelzprogramm getestet. Dafür wurden sie luftblasenfrei in 96well-Platten pipettiert, pro Amplikon ein 'well' und pro Schmelztemperatur 6-8 µl (+ Überschuss) – je nach Intensität der Produktbande in der Gelelektrophorese. Benötigte Puffer des Wave-Gerätes wurden kontrolliert, mit Hilfe der Software die spezifischen Einstellungen vorgenommen und das Analyseprogramm gestartet. Die Bestimmung des unauffälligen Wildtyps (ohne SNPs/Mutationen) ist wichtig, weil heterozygot deletierte Patientenproben mit Wildtyp-DNA gemischt (~1:1) werden müssen. Dies ist nötig, damit das einzige vorhandene, mutierte Patientenallel mit den zugegebenen Wildtypallelen Heteroduplices bilden kann. Solche Mischproben wurden vor der eigentlichen Analyse erneut denaturiert. Die Schmelzkurven von KA und KC aller Temperaturen eines Amplikons wurden miteinander verglichen und das optimale Wildtypprofil bestimmt (Erfahrungswerte B. Betz). Zudem wurde überprüft, ob das Injektionsvolumen für einen auswertbaren Schmelzpeak ausreichte und wurde teilweise angepasst. Alle DNA-Fragmente, die in der DHPLC ein auffälliges Laufverhalten zeigten, wurden daraufhin sequenziert. Zur Identifikation von bekannten SNPs oder Mutationen wurde die SNP-Datenbank von NCBI und Informationen aus Veröffentlichungen verwendet.

## 4.6 'Custom'-Array-Design

Die beiden eingesetzten 'custom'-Arrayformate wurden mit Hilfe des eArray-Internettools von Agilent spezifisch designet. Das (aktuelle) empfohlene Vorgehen ist unterteilt in:

- die Wahl des Arrayformats
- das Erstellen von Anwender-spezifischen Probengruppen (hier Bereiche mit demselben mittleren genomischen Abstand für vermutete Imbalancen)
- die Übernahme eines Format-spezifischen Kontrollgitters
- das Hinzufügen von Kontrollprobengruppen, wie Agilent Kontrollen, Normalisierungsoligonukleotide, Replikatoligonukleotide
- das Auffüllen des Arrays mit Katalogoligonukleotiden (am sinnvollsten mit denen des 1 M kommerziellen Arrays)

### 4.6.1 'Custom'-Array1-Design

- **'Custom'-Array1:** HD-Human Genome CGH Microarray, 4x 44 k, Design 021122

|                            |                                      |
|----------------------------|--------------------------------------|
| Übermittelt:               | 08.08.2008                           |
| Kontrollgitter:            | IS-45220-4-V1_4x44K_CGH_Hs_V20060724 |
| Oligonukleotid Layout:     | Zufällig                             |
| Agilent Kontrollen:        | 2.118                                |
| *Zwei Probengruppen:       | 34.340 + 8.762                       |
| Oligonukleotid-Gesamtzahl: | 45.220                               |

\*Probengruppe 1 – 125 bp-Oligonukleotidabstand:

Genintervallsuche:

|                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| chr5: 135.800.000 - 137.500.000 | chr7: 101.700.000 - 102.300.000 |
| chr5: 138.500.000 - 138.800.000 | chr21: 35.000.000 - 35.300.000  |
| chr7: 99.500.000 - 100.700.000  | chr21: 35.800.000 - 36.000.000  |

Weitere Charakteristika:

Katalogproben bevorzugt, Länge: 4.300.066, RM-Länge: 2.057.895, Oligonukleotide gesamt und einzigartig: 34.340, Oligonukleotide pro Intervall: 5.723, exonische Oligonukleotide: 9.758 (28%), intragenische Oligonukleotide: 29.224 (85%), durchschnittliche Anzahl an Oligonukleotiden pro 1.000 bp: 7

\*Probengruppe 2 – 44 kb-Oligonukleotidabstand:

Genintervallsuche unter Ausschluss der Probengruppe 1-Intervalle:

chr5: 1 - 180.857.866

chr7: 1 - 158.821.424

chr21: 1 - 46.944.323

Weitere Charakteristika:

Katalogproben bevorzugt, Länge: 382.323.622, RM-Länge: 194.156.941, Oligonukleotide gesamt und einzigartig 8.762, Oligonukleotide pro Intervall: 2.920, exonische Oligonukleotide: 420 (4%), intragenische Oligonukleotide: 4.159 (47%), durchschnittliche Anzahl an Oligonukleotiden pro 1.000 bp: 0

#### 4.6.2 'Custom'-Array2-Design

- **'Custom'-Array2:** HD-Human Genome CGH Microarray, 4x 44 k, Design 024793

Übermittelt: 29.07.2009  
 Kontrollgitter: IS-45220-4-V1\_4x44K\_CGH\_Hs\_V20060724  
 Oligonukleotid Layout: Zufällig  
 Agilent Kontrollen: 2.118  
 Replikatoligonukleotide: 1.505 (Agilent 'replicate probe group')  
 Normalisierungsoligonukleotide: 11.488 (Agilent 11 k 'normalization probe group')  
 \*Zwei Probengruppen: 12.819 + 3.300  
 Fill-Array Probengruppe: Design 021529 (Agilent 1x 1 M-Array)  
 Oligonukleotid-Gesamtzahl: 45.220

\*Probengruppe 1 – 1 kb-Oligonukleotidabstand:

Genintervallsuche:

|                                 |                                  |
|---------------------------------|----------------------------------|
| chr2: 20.650.000 - 20.850.000   | chr9: 127.100.000 - 127.250.000  |
| chr2: 27.150.000 - 27.500.000   | chr10: 69.050.000 - 69.800.000   |
| chr2: 46.800.000 - 47.100.000   | chr10: 70.450.000 - 70.950.000   |
| chr4: 106.200.000 - 106.300.000 | chr12: 116.100.000 - 116.250.000 |
| chr4: 106.450.000 - 106.600.000 | chr12: 38.700.000 - 39.350.000   |
| chr4: 129.000.000 - 129.350.000 | chr14: 72.000.000 - 72.350.000   |
| chr4: 25.000.000 - 25.450.000   | chr14: 92.400.000 - 93.000.000   |
| chr5: 12.700.000 - 12.850.000   | chr15: 53.200.000 - 53.400.000   |
| chr5: 132.200.000 - 132.300.000 | chr15: 73.500.000 - 73.800.000   |
| chr5: 132.400.000 - 132.600.000 | chr16: 88.000.000 - 88.150.000   |
| chr5: 133.150.000 - 133.600.000 | chr16: 88.300.000 - 88.450.000   |
| chr5: 133.800.000 - 134.000.000 | chr18: 27.600.000 - 28.050.000   |
| chr5: 134.200.000 - 134.450.000 | chr18: 72.800.000 - 73.050.000   |
| chr6: 73.950.000 - 74.600.000   | chr19: 44.100.000 - 44.500.000   |
| chr6: 74.000.000 - 74.650.000   | chr20: 24.600.000 - 25.150.000   |
| chr7: 142.400.000 - 142.700.000 | chr20: 25.300.000 - 25.600.000   |
| chr7: 2.200.000 - 2.500.000     | chr20: 4.800.000 - 5.100.000     |
| chr7: 68.900.000 - 69.050.000   | chr20: 5.400.000 - 5.750.000     |
| chr7: 91.500.000 - 91.700.000   | chr21: 26.000.000 - 26.200.000   |
| chr8: 74.750.000 - 75.200.000   | chrY: 12.400.000 - 12.450.000    |
| chr8: 95.800.000 - 96.100.000   | chrY: 12.950.000 - 13.100.000    |
| chr9: 126.550.000 - 126.800.000 |                                  |

Weitere Charakteristika:

Katalogproben bevorzugt, durchschnittl. Oligonukleotidabstand: 1.000, Länge: 12.850.042, RM-Länge: 4.440.557, Oligonukleotide gesamt und einzigartig 12.819, Oligonukleotide pro Intervall: 291, exonische Oligonukleotide: 1.261 (9%), intragenische Oligonukleotide: 8.311 (64%), durchschnittliche Anzahl an Oligonukleotiden pro 1.000 bp: 0

\*Probengruppe 2 – 2 kb-Oligonukleotidabstand:

Genintervallsuche:

chr5: 137.000.000 - 140.000.000

chr7: 99.400.000 - 103.000.000

Weitere Charakteristika:

Katalogproben bevorzugt, durchschnittl. Oligonukleotidabstand: 2.000, Länge: 6.600.002, RM-Länge: 2.475.886, Oligonukleotide gesamt und einzigartig 3.300, Oligonukleotide pro Intervall: 1.650, exonische Oligonukleotide: 483 (14%), intragenische Oligonukleotide: 2.602 (78%), durchschnittliche Anzahl an Oligonukleotiden pro 1.000 bp: 0

## 4.7 T-Zell-Separation mittels MACS

Zellen können mit Hilfe von auf ihrer Oberfläche exprimierten CD-Molekülen ('cluster of differentiation') aus einem Zellgemisch separiert werden. In dieser Arbeit wurden T-Zellen mit Hilfe des MACS-Systems ('magnetic cell separation'; Miltenyi) aus peripheren Blutlymphozyten selektioniert. Die Lymphozyten wurden zuvor aus Gesamtblut unter Anwendung eines Ficollgradienten gewonnen. Zur Separation wurden bereits an magnetische 'beads' gekoppelte monoklonale humane CD3-Antikörper (Isotop: Maus IgG2a) eingesetzt. CD3 wird von allen T-Zellen und deren Subtypen als spezifischer Oberflächenmarker getragen und stellt einen Teil des T-Zellrezeptorkomplexes dar. 70-80% aller humanen peripheren Blutlymphozyten sind CD3-positiv (CD3<sup>+</sup>). Beim MACS-Prinzip werden CD3<sup>+</sup>-Zellen mit den CD3-'microbeads' magnetisch markiert. Die Zellsuspension wird auf eine MACS-Säule gegeben, die an einem MACS-Magneten steht. Die an 'beads' gebundenen Zellen werden durch das magnetische Feld in der Säule gehalten, während die unmarkierten Zellen hindurchfließen. Nach Entfernen der Säule vom Magneten können die CD3<sup>+</sup>-Zellen als positive Zellfraktion eluiert werden.

### 4.7.1 T-Zell-Positivselektion (MACS)

Die T-Zellseparation aus Blut diente in dieser Arbeit zur Gewinnung von Normal-DNA der MDS-Patienten. T-Zellen sind bei MDS nicht von tumor-spezifischen, chromosomalen Aberrationen betroffen.

Bei der Positivselektion werden spezifisch die mittels 'beads' markierten Zellen gewonnen, während das unmarkierte Zellgemisch als Negativfraktion erhalten wird.

**Anleitung:**

- 5-15 ml frisches Gesamtblut höchstens 1 Tag bei RT unter Taumeln lagern
- Ficollgradienten-Methode:
  - o 1 Volumen Ficoll in 50 ml Gefäß (Falcon) mit dem Blut überschichten
  - o bei RT und 2.000 rpm 20 min zentrifugieren (Heraeus 3.0R), ungebremst: sich ergebende Schichtung von unten: 1. Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und tote Zellen; 2. Ficoll; 3. mononukleäre Zellen (Monozyten und Lymphozyten) = PBL; 4. Plasma/Serum

- periphere Blutlymphozyten abnehmen und in 15 ml Gefäß überführen
- waschen, dazu *ad* 10 ml PBS und 7 min bei 4°C und 700 rpm zentrifugieren und bremsen, Überstand abziehen und Zellen resuspendieren
- in 15 ml PBS aufnehmen, 10 µl entnehmen und Zellen eines Großquadrats auszählen (Neubauerkammer mit 0,1 mm Kammerhöhe)
  - 1) Zellzahl/ml = Zellen x 10<sup>4</sup>
- MACS-Separation:
  - MACS-Puffer frisch ansetzen und bei 4°C lagern
 

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 2 M EDTA  | 74,45 mg EDTA                        |
| 0,5% BSA  | 500,00 mg Bovine Serum Albumin Fr. V |
| in PBS (Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> frei) | ad 100 ml PBS                        |
  - Zellen bei 700 rpm und 4°C 7 min abzentrifugieren, Überstand abnehmen
  - Zellpellet in 80 µl kühlem MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendieren (höchstens 2x 10<sup>9</sup> Zellen pro Ansatz / LS-Säule / 200 µl MACS-Puffer)
  - 20 µl CD3 -'beads' pro 10<sup>7</sup> Zellen zugeben und 15 min bei 4°C inkubieren
  - Zellen waschen, dazu Zugabe von 1-2 ml MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen und 10 min bei 700 rpm und 4°C zentrifugieren
  - Überstand abnehmen und je 10<sup>8</sup> Zellen in 500 µl MACS-Puffer aufnehmen
  - LS-Säule in QuadroMACS-Separator mit 3 ml MACS-Puffer äquilibrieren
  - Zellsuspension auf die Säule laden, negativen Durchfluss auffangen
  - 3x mit je 3 ml MACS-Puffer waschen (Säule an Magneten lassen und Durchfluss als Negativfraktion bei Bedarf aufbewahren)
  - Säule von Separator entfernen, auf Auffangröhrchen setzen und positive Zellen mit 5 ml MACS-Puffer durch direktes Spritzen eluieren, Zellen zählen
  - Zellen 7 min bei 4°C und 700 rpm abzentrifugieren, Puffer vorsichtig abkippen und Tropfen zurücklaufen lassen
  - zur DNA-Isolation samt gebundenen 'beads' wegfrieren oder direkt per FACS analysieren (1 Tag im Kühlschrank lagerbar)

#### 4.7.2 Durchflusszytometrie mittels FACS

Die FACS-Analyse wurde durchgeführt, um die Reinheit der MACS-selektionierten T-Zellfraktion zu bestimmen.

Für die durchflusszytometrische bzw. FACS-Untersuchung ('fluorescence-activated cell sorting') blieben die 'beads' an den Zellen gebunden. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte von A. Böckmann in der Hämatologie mit Hilfe von CD3- und CD45-Antikörpern mit gekoppeltem Phycoerythrin (PE)- bzw. Fluorescein (FITC)-Farbstoff (BD). CD45 wird von allen Leukozyten an der Oberfläche exprimiert. Die markierte Zellsuspension wird in ein FACS-Gerät gesogen und die Zellen per Laserlicht in entsprechender Wellenlänge (PE: Extinktion 488 nm, Emission 575 nm; FITC: Extinktion 495 nm, Emission 517 nm) bestrahlt. Durch die Zell-spezifischen, gemessenen Forwärtstreulicht ('forward scatter', FSC, Größe der Zellen)- und Seitwärtstreulicht ('side scatter', SSC, innere Struktur und Granularität der Zellen)-Ablenkungen konnten die Zellen eingegrenzt bzw. gefiltert werden.

## 4.8 Weitere molekularbiologische Methoden

### 4.8.1 Gelelektrophoresen

Gelelektrophorese-Analysen wurden durchgeführt, um DNA-Gemische mit Fragmenten unterschiedlicher Größe aufzutrennen bzw. die erwartete Größe zu kontrollieren und Mengenunterschiede zu registrieren. Als DNA-Trägermaterial wurde mit TBE-Puffer aufgekochte und ausgehärtete Agarose (Polysaccharid) eingesetzt. Die Agarosekonzentration wurde der jeweiligen Produktgröße angepasst – je höher die Konzentration, desto kleiner die Porengröße. Nach Anlegen von Spannung an die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer wandert die DNA auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Gel dem Positivpol entgegen. Durch das Auftragen von definierten Standard-Fragmentgemischen können die Größe und grob die Menge der DNA bestimmt werden. Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wird dem Gel vor der Aushärtung Ethidiumbromid, ein (mutagener) roter Phenanthridin-Farbstoff, der in die DNA interkaliert und bei Anregung durch UV-Licht (260 nm) fluoresziert, zugegeben. Durch die Interkalation (zwischen ca. jeder 10. Base) von Ethidiumbromid in DNA oder RNA nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50–100 zu.

#### **Anleitung:**

- Ethidiumbromid (EtBr) ist mutagen, muss entsprechend entsorgt und sollte nicht verbreitet werden; das Arbeiten mit EtBr sollte nur mit Nitrilhandschuhen erfolgen!
- Elektrophoresekammer mit Puffer 1x TBE (oder 1x TAE) füllen
- Agarose ist das verwendete Trägermaterial, folgende Typen verwenden:
  - o LE Agarose bei normaler Auftrennung
  - o NuSieve 3:1 Agarose für eine schärfere Auftrennung
  - o Low Melt Agarose, wenn eine DNA-Elution folgen soll
- die Agaroseprozentigkeit bestimmt die Porengröße und richtet sich nach der DNA-Fragmentgröße, die aufgetrennt werden soll – je kleiner, desto schneller
- Beispiel: 1% TBE-Agarosegel bei Schlitten, der 75 ml fasst:
  - o zu 75 ml 1x TBE 0,75 g Agarose in Flasche (Schott mit losem Deckel) geben
  - o aufkochen und quellen und handwarm kühlen (Agarose komplett lösen)
  - o 7,5 µl EtBr (Endkonzentration 0,2 µg/ml) zupipettieren und schwenken
  - o luftblasenfrei in Schlitten mit Taschenkamm gießen und aushärten lassen
  - o Schlitten in mit TBE-Laufpuffer gefüllte Kammer setzen und Kamm ziehen
  - o mit beschwerendem Auftragungspuffer versetzte DNA-Proben auftragen
  - o an Netzgerät (80 V, 300 mA, 150 W) anschließen
  - o Gel mit 100% UV-Licht (bei noch zu extrahierender DNA 70%) bestrahlen, um das sich in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid anzuregen und somit die DNA-Banden sichtbar zu machen und fotografisch dokumentieren

### 4.8.2 Gelextraktionen

Gelextraktionen wurden exakt entsprechend der Anleitung des Herstellers mit dem MEGA-spin Agarose Gel Extraction Kit (Intron Biotechnology) inklusive des optionalen Schritts zur Ausbeuteerhöhung durchgeführt.

### **4.8.3 PCR-Produktaufreinigungen**

PCR-Produktaufreinigungen für eine anschließende Sequenzierreaktion erfolgten entsprechend der Herstelleranleitungen mit dem 'QIAquick PCR Purification Kit' von Qiagen, dessen Technik auf der Bindung von DNA-Fragmenten (100 bp-10 kb) an eine Säulenmembran und Zentrifugierschritten beruht, oder mit dem 'ExoSAP-IT Kit' von USB, bei dem zwei hydrolytische Enzyme zum Einsatz kommen, um die Produkte (100 bp-20 kb) aufzureinigen. Bei letzterer Methode degradiert Exonuklease I einzelsträngige DNA, wie Primerreste, und 'Shrimp Alkaline Phosphatase' hydrolysiert dNTPs, ohne Materialverluste durch Zentrifugations- und Pufferaustauschschritte. Nach dieser Aufreinigungsart musste das Ergebnis der DNA-Konzentrationsmessung per NanoDrop durch 3 (Erfahrungswert) geteilt werden (, da die Messung wahrscheinlich auf Grund von Nukleinsäureresten ungenau ist). Anschließende Sequenzierungen konnten nach beiden Aufreinigungsarten erfolgreich durchgeführt werden.

### **4.8.4 DNA-Konzentrationsmessung mittels NanoDrop**

Mit Hilfe des NanoDrop-Spektralphotometers können u. a. Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmungen vorgenommen werden. Nur 1,5 µl Lösung wird bei dieser Art der Messung benötigt. Ultraviolettes Licht durchdringt den Tropfen und wird von denen im Strahlengang schwebenden Teilchen absorbiert. Das durchgedrungene Licht wird bestimmt und über die Absorption oder Extinktion (optischen Dichte OD), im Fall von Nukleinsäure bei 260 nm, die Nukleinsäuremenge per Computer berechnet. Die Formel zur DNA- bzw. RNA-Konzentrationsberechnung lautet:  $c = OD \times V \times F$  oder Konzentration (in µg/ml) ist gleich gemessener OD-Wert multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert mit dem Multiplikationsfaktor. Dieser Multiplikationsfaktor hat für doppelsträngige (ds) DNA den Wert 50, für RNA 40 und für einzelsträngige (ss) DNA den Wert 33 (OD 1 entspricht 50 µg dsDNA, 40 µg RNA, 33 µg ssDNA). Zudem wird die Absorption bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  von 1,8 spiegelt eine reine DNA-Präparation, das von 2,0 eine reine RNA-Präparation (höher auf Grund des Uracils) wider. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch aromatische Aminosäuren (Proteine), Phenole oder andere Kontaminationen hin, die nahe 280 nm absorbieren. Niedrige  $OD_{260}/OD_{230}$ -Ratios stehen für die Verunreinigung durch überwiegend organische Komponenten (Phenole, EDTA, Kohlenhydrate). Für reine Nukleinsäuren sollte das Verhältnis zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

#### **Allgemeine Anleitung:**

- NanoDrop-Spektralphotometer-Software (ND-1.000 V3.7.1) starten, Nukleinsäuremessung wählen und DNA-50 einstellen
- mit 1,5 µl Wasser initialisieren und mit 1,5 µl des Probenpuffers (TE) einen Nullwert als Referenz messen (blanken)
- 1,5 µl der Probe messen und Quantität und Qualität kontrollieren

### **4.8.5 Sequenzierreaktion und Gelauftrag**

Zur Sequenzierung des aufgereinigten DNA-Fragments wurde die Methode von Sanger, die enzymatische Kettenabbruchreaktion, gewählt. Sie beruht auf einer DNA-Synthese in Gegenwart von Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTP). Diese modifizierten, in niedriger Konzentration zugesetzten Nukleotide führen bei zufälligem Einbau in die wachsende DNA-Kette zu einem Abbruch der weiteren Synthese. Auf Grund der ihnen fehlenden 3'-OH-Gruppe kann kein weiteres Nukleotid angehängt werden. Ursprünglich

wurde diese Reaktion in 4 Ansätzen, heute in nur einem einzigen durchgeführt. Dies funktioniert auf Grund einer unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung der 4 ddNTPs, die neben den normalen dNTPs, dem Template, der Primer, der Polymerase und dem Reaktionspuffer zugegeben werden. Als Folge entsteht ein Gemisch von Fragmenten, die die verschiedensten Längen aufweisen und mit einer ddNTP-Art enden. Dieses Gemisch wird in einer Spur eines Polyacrylamidgel (oder Kapillaren) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers ausgelesen. Die Sequenz wird computergestützt ermittelt und als Kurvenpeak-Diagramm abgebildet.

Für die Sequenzierung wurde das 'Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit' von Applied Biosystems verwendet. Die Auftrennung und Sequenzbestimmung der Probe wurde in Auftrag gegeben und mit Hilfe eines ABI PRISM Analyzers im BMFZ-Düsseldorf durchgeführt. Die graphische Darstellung und Auswertung erfolgte mit Chromas lite.

#### Anleitung:

- die im 'BigDye Mix' enthaltenen Fluoreszenzpigmente vor Licht schützen!
- für jeden zu sequenzierenden Strang einen Ansatz in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vorbereiten: a) 'forward'-Primer, b) 'reverse'-Primer
  - X µl reines PCR-Produkt (15 ng bis 500 bp, 75 ng bis 500 bp-1 kb)
  - 1,5 µl 5x BigDye Reaktionspuffer
  - 1,0 µl BigDye Terminator Mix
  - 0,5 µl spezifischer Primer (10 mol/µl)
  - ad 10,0 µl H<sub>2</sub>O
- Sequenzreaktion im PTC-200-Cycler durchrühren:
 

|     |   |              |
|-----|---|--------------|
| 25x | { | 94°C 2 min   |
|     |   | 96°C 10 s    |
|     |   | 50°C 5 s     |
|     |   | 60°C 4 min   |
|     |   | 4°C for ever |
- die Produktaufreinigung erfolgt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß durch Präzipitation:
  - 10,0 µl Sequenzieransatz
  - 46,0 µl H<sub>2</sub>O
  - 6,3 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2
  - 156,0 µl 100% Ethanol
- mischen und 30 min bei 4°C fällen, dann 30 min bei 12.000 rpm und RT zentrifugieren (Hermle Z233 MK), Überstand werfen
- (unsichtbares) Pellet mit 300 µl 70% Ethanol waschen, dazu 10 min zentrifugieren
- Überstand vollständig abnehmen und Pellet (bei 37°C) trocknen lassen
- der Gellauf zur Sequenzbestimmung wurde im BMFZ durchgeführt

## 4.9 Sequenzanalysen

Für die Sequenzanalysen zur Aufdeckung von Repeatstrukturen oder Homologien in der Nähe von Bruchpunkten wurden hpts. die UCSC-Informationen ('repeat masker') und – Referenzsequenzen ('get DNA') verwendet. Das Vorgehen ist im Ergebnisteil erläutert.

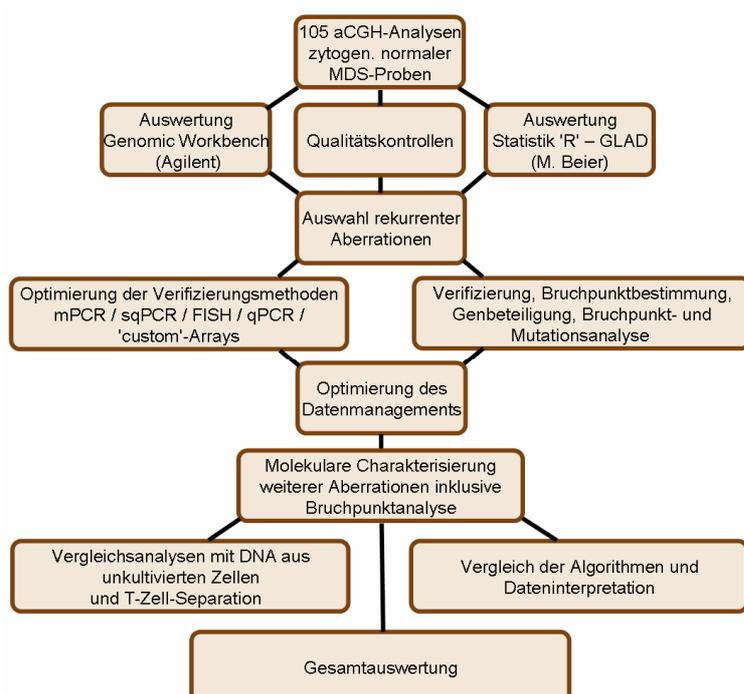
## 4.10 MLPA

'Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification' bzw. MLPA ist ein semiquantitatives Verfahren, mit dem Gendosisveränderungen spezifischer genomischer DNA-Segmente

nachgewiesen werden können. Dieses Verfahren ist von der Firma MRC Holland (s. Herstellerangaben) optimiert worden und fertige Kits für verschiedene Fragestellungen werden angeboten. Prinzipiell funktioniert der Test ähnlich wie eine FISH-Analyse über die Hybridisierung der Sonden an die zu testende DNA. Anstatt aber die Gendosis in einzelnen Zellen auszuzählen, wird bei der MLPA die Menge der vorhandenen spezifischen DNA-Abschnitte ins Verhältnis zur der entsprechenden Menge bei Kontrollproben gesetzt. Die Auswertung erfolgt nach Auftrennung der PCR-Fragmente in einem Kapillarsequenziergerät und durch eine mathematische Flächenbestimmung mit Excel. Diese Analysen und Auswertungen wurden von S. Slanz / B. Leube durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

Innerhalb dieser Arbeit wurden 105 zytogenetisch unauffällige MDS-Proben mit der Oligonukleotid-aCGH-Technik auf submikroskopische Imbalancen analysiert. Die Qualität der Methode wurde registriert und im Anschluss gefundene, rekurrente Aberrationen zusammengestellt. Anhand derer wurden geeignete Verifizierungstechniken, wie FISH und qPCR getestet. Nach Bestätigung der Imbalancen wurde ein spezifischer 'custom'-Array entworfen und die Bruchpunkte der Aberrationen eingegrenzt. Mit Hilfe von 'long range'-PCRs wurden die Bruchpunkte, wo möglich, molekular bestimmt und Homologieanalysen zur Ermittlung des Bruchmechanismus durchgeführt. Im Falle der heterozygoten *TET2*-Deletion wurde eine Mutationsanalyse des *TET2*-Allels durchgeführt. Daraufhin wurden weitere Aberrationen verifiziert und teilweise mit einem zweiten 'custom'-Array die Bruchpunkte bestimmt. Durch aCGH-Experimente mit DNA aus unkultivierten Zellen einiger direkt eingefrorener Knochenmarkproben wurde der Einfluss der Zellkultivierung analysiert. Zur Abgrenzung von CNVs wurde neben der Verwendung von Datenbanken als weitere Möglichkeit die Methode der T-Zellseparation etabliert. Ein Vergleich der verwendeten aCGH-Auswertesysteme erbrachte Erkenntnisse zur Genauigkeit der komplizierten Algorithmen. Die Gesamtzusammenstellung konnte verdeutlichen, in welcher Häufigkeit Imbalancen mit aCGH bei MDS aufgedeckt werden können. In folgendem Schema (Abbildung 5.1-1) wurde der Ablauf des Projektes zusammengefasst.



**Abbildung 5.1-1:** Übersicht über den Ablauf des durchgeführten Projektes.

## 5.1 Array-CGH-Analysen bei MDS – Qualität und Technik

Insgesamt wurden retrospektiv 105 DNA-Proben von zuvor als zytogenetisch normal diagnostizierten MDS-Patienten verschiedener Untergruppen (FAB-Klassifikation: 103 MDS- und zwei AML-Fälle) über Oligonukleotidarray-CGH hochauflösend analysiert. Dabei wurden ca. 40 Untersuchungen inklusive der Vorbereitungen und der Patientenkollektiv-Zusammenstellung durch C. Evers vorgenommen. Die verwendeten 44 k-Arrays (n = 38) von Agilent haben eine mittlere genomische Auflösung von 43 kb, die ebenfalls eingesetzten 105 k- (n = 19) und 244 k-Arrays (n = 48) haben Auflösungen von 21,7 und 8,9 kb. So wurde(n) entsprechend der neueren WHO-Klassifikation ein RCUD-, 57 RCMD-, 13 RAEB-1-, 15 RAEB-2- und 19 AML-Patienten (17 RAEBt + zwei AML) mit einem durchschnittlichen Alter von 62 (24-86) Jahren genomweit untersucht.

Die Mehrschritt-Methode der aCGH von Agilent bietet an mehreren Stellen Qualitäts- bzw. Erfolgskontrollen an, die eingehalten wurden. Sowohl die DNA-Qualität nach Isolierung (und Fällung) als auch die DNA-Restriktion wurden über Gelelektrophoresen kontrolliert. Der Erfolg der Fluoreszenz-Markierungsreaktion wurde nach Aufreinigung und Aufkonzentrierung der DNA mit Hilfe der Berechnung der Spezifischen Aktivität überprüft. Die spezifische Aktivität aller durchgeführten Markierungsreaktionen befand sich im vorgeschriebenen Bereich. Über die 'Feature Extraction'-Software wurde das nach dem Scannen des Arrays entstandene tif-Bild in Datenwerte umgewandelt. Mit Hilfe des integrierten Extraktionsprotokolls (v4\_10\_Apr08) und des Array-spezifischen Designs wurden dabei gleichzeitig kritische Parameter berechnet und Ausreißer fehlhybridisierter Oligonukleotide eliminiert. Neben der entstandenen txt-Datei mit u. a. den logarithmierten Fluoreszenzintensitäts-Verhältnissen ( $\log_2$ Ratios), erhielt man einen Qualitätsreport, der auf von Agilent vorgegebenen Grenz- bzw. Erfahrungswerten der enzymatischen Markierungsreaktion und allgemeinen Handhabung beruht (Tabelle 5.1-1).

**Tabelle 5.1-1:** Vorgegebene Grenzwerte für die 9 wichtigsten Qualitätsparameter der Agilent-aCGH-Methodik ('Genomic Workbench-Quality Control Metrics' bzw. GW-QC-Metrics).

| Qualität                                   | Exzellent | Gut       | Schlecht |
|--|-----------|-----------|----------|
| Hintergrundrauschen rot/grün               | < 5       | 5 – 15    | > 15     |
| Signalintensität rot/grün                  | > 150     | 50 – 150  | < 50     |
| Signal/Rausch-Verhältnisse rot/grün        | > 100     | 30 – 100  | < 30     |
| Reproduzierbarkeit rot/grün                | < 5       | 5 – 20    | > 20     |
| Verteilung des Log Ratio Derivativs (DLRS) | < 0,2     | 0,2 – 0,3 | > 0,3    |

Die durchgeführten 105 Arrayexperimente wurden auf ihre Qualität hin überprüft. Als erstes Maß wurde die Reproduzierbarkeit der Analysen kontrolliert. Diese ergibt sich aus dem Variationskoeffizienten der Signale der Replikatoligonukleotide, bezogen auf den jeweiligen Farbkanal. Daraufhin wurde sich der angemessenen Signalintensitäten, die überwiegend die Spezifische Aktivität nach der Markierung widerspiegeln, vergewissert. Zudem wurden das Hintergrundrauschen, definiert über die Standardabweichung der unspezifischen Fluoreszenzsignale der Negativkontrolloligonukleotide, und die Signal/Rausch-Verhältnisse ausgemacht. Der erhaltene, wichtigste Qualitätsparameter, der DLRS ('derivative of log<sub>2</sub>ratio spread') (de Witte *et al.*, 2006), der allgemein ein Anhaltspunkt für die Auswertbarkeit und Güte der Ergebnisse ist, wurde für alle Analysen festgehalten und entsprechend der obigen Bewertungen eingeteilt. Er misst die Standardabweichung der log<sub>2</sub>Ratio-Unterschiede von Oligo- zu Oligonukleotidprobe des Arrays. Je kleiner der Wert, desto weniger Rauschen wurde in den biologischen Signalen verzeichnet.

**Tabelle 5.1-2:** Übersicht aller Patientenproben, bei denen mindestens einer der 9 Qualitätsparameter im vorgegebenen schlechten Bereich (vgl. Tabelle 5.1-1) lag. N = Anzahl; BG = 'background'; DLRS = 'derivative log<sub>2</sub>ratio spread'

| N  | Pat. Nr. | Array-Design | DLRS | Signal/Rauschen<br>Grün | Signal/Rauschen<br>Rot | BG-Rauschen<br>Grün |
|----|----------|--------------|------|-------------------------|------------------------|---------------------|
| 1  | P1       | 14693        | 0,58 | 4,93                    |                        | 46,83               |
| 2  | P8       | 14693        | 0,40 | 10,91                   |                        |                     |
| 3  | P16      | 14693        | 0,47 | 6,09                    |                        | 38,80               |
| 4  | P17      | 14693        | 0,40 | 6,56                    |                        | 34,48               |
| 5  | P20      | 14693        | 0,39 | 7,12                    |                        | 32,77               |
| 6  | P22      | 14693        |      | 18,96                   |                        |                     |
| 7  | P24      | 14693        | 0,37 | 26,02                   | 8,82                   |                     |
| 8  | P25      | 14693        | 0,40 | 6,60                    |                        | 33,74               |
| 9  | P27      | 14693        | 0,39 | 10,86                   |                        |                     |
| 10 | P28      | 14693        |      | 26,69                   |                        |                     |
| 11 | P30      | 14693        |      | 24,07                   |                        |                     |
| 12 | P32      | 14693        |      | 29,01                   |                        |                     |
| 13 | P36      | 14693        | 0,43 | 10,25                   |                        |                     |
| 14 | P40      | 14693        | 0,76 | 2,38                    | 17,39                  | 98,12               |
| 15 | P44      | 13282        |      | 28,64                   |                        |                     |
| 16 | P48      | 14693        |      | 27,48                   |                        |                     |
| 17 | P49      | 14693        |      | 19,51                   | 19,48                  |                     |
| 18 | P52      | 14693        | 0,44 |                         |                        |                     |
| 19 | P54      | 14693        | 0,58 | 4,03                    | 22,16                  | 56,08               |

| N  | Pat. Nr. | Array-Design | DLRS | Signal-Rauschen<br>Grün | Signal-Rauschen<br>Rot | BG-Rauschen<br>Grün |
|----|----------|--------------|------|-------------------------|------------------------|---------------------|
| 20 | P56      | 14693        | 0,79 | 1,64                    | 10,18                  | 96,24               |
| 21 | P62      | 14693        | 0,69 | 3,59                    | 20,53                  | 58,80               |
| 22 | P67      | 14698        | 0,32 |                         |                        |                     |
| 23 | P69      | 14693        | 0,37 |                         |                        |                     |
| 24 | P70      | 14693        |      | 28,14                   |                        |                     |
| 25 | P71      | 14693        |      | 20,01                   |                        |                     |
| 26 | P73      | 14693        | 0,69 | 3,14                    |                        | 30,82               |
| 27 | P74      | 14693        | 0,64 | 2,95                    | 21,81                  | 28,88               |
| 28 | P80      | 14693        | 0,42 | 6,57                    |                        |                     |
| 29 | P82      | 14693        |      | 24,34                   |                        |                     |
| 30 | P94      | 14693        | 0,40 |                         |                        |                     |
| 31 | P96      | 14693        | 0,51 | 6,57                    |                        |                     |
| 32 | P98      | 14693        |      | 16,46                   |                        |                     |
| 33 | P101     | 13282        |      | 27,97                   |                        |                     |

Bei allen 105 Analysen konnte eine gute Reproduzierbarkeit, bestimmt anhand der internen Replikatiligonukleotide des Arrays, festgestellt werden. Die Signalintensitäten sowohl für grün (22,9% gut und 77,1% exzellent) als auch für rot (15,2% gut und 84,8% exzellent) lagen im akzeptierten Bereich. Während das Hintergrundrauschen für rot kein Mal im schlechten Bereich lag, dafür 29,5% im guten und 70,5% im exzellenten, kamen beim Hintergrundrauschen für grün in 10,5% schlechte Werte vor (26,7% gut, 62,8% exzellent). Variablere Signal/Rausch-Verhältnisse fielen für beide Farbkanäle auf. Für rot waren es 13,3% exzellente, 80% gute und 6,7% schlechte, für grün waren es zu 1% exzellente, 71,4% gute und 27,6% schlechte Verhältnisse. Für den DLRS ergab sich folgendes Bild: Von 48 244 k-Arrayanalysen wiesen 11 (22,9%) einen exzellenten, 17 (35,4%) einen guten und 20 (41,7%) einen schlechten DLRS-Wert (> 0,3) auf. Von 19 105 k-Arrayanalysen verliefen 4 (21%) exzellent, 14 (73,7%) gut und eine Analyse (5,3%) verlief, bezogen auf den DLRS-Wert, schlecht. Bei den 38 44 k-Arrays lag der DLRS-Wert bei 26 (68,4%) im exzellenten und bei 12 (31,6%) im guten Bereich. Insgesamt zeigten 21 (20%) von allen 105 Untersuchungen keine guten DLRS-Bewertungen, wovon die 244 k-Analysen einen Anteil von 95,2% einnahmen.

Anhand aller Parameter verliefen 94,7% (36) der 44 k-Analysen, 94,7% (18) der 105 k-Analysen und 37,5% (19) der 244 k-Analysen technisch gut. Dementsprechend sollten insgesamt 68,6% (72) der 105 durchgeführten Arrayanalysen ohne Bedenken auswertbar sein, die restlichen oben aufgeführten (Tabelle 5.1-2) eher mit Vorsicht.

Zur Auswertung wurden alle txt-Dateien mit den zugehörigen Designangaben in die Auswertesoftware von Agilent, 'Genomic Workbench' (GW), als Experimente eingeladen und visuell ausgewertet. Als Algorithmus wurde ADM-2 mit einem Schwellenwert ('threshold') von 6 für alle Auswertungen gewählt. ADM-2 identifiziert, basierend auf einem statistischen Wert, alle aberranten Intervalle einer Probe mit durchgehend hohen oder niedrigen  $\log_2$ Ratios. Der statistische Wert spiegelt die Abweichung des  $\log_2$ Ratio-Durchschnitts von dem erwarteten Wert 0 unter Einbezug der Qualitäts- bzw.  $\log_2$ Ratio-Fehlerinformation jeder Oligonukleotidmessung wider. Bei Überschreiten des Benutzer-spezifischen Schwellenwertes wird die betroffene Region als statistisch signifikant aberrant angezeigt. Durch das Berücksichtigen benachbarter Oligonukleotide wird das wahre Ausmaß des aberranten Segments erfasst, wodurch dieser Algorithmus unabhängig von der gewählten Fenstergröße ('window size') ist. Parallel fand eine Auswertung mit Hilfe einer von M. Beier an Oligonukleotidarrays angepassten Software statt. Diese beruht auf der Statistikumgebung 'R' und arbeitet auf der Basis des GLAD ('gain and loss analysis of DNA')-Paketes, frei erhältlich von 'bioconductor open source'. Da die produzierten Rohdaten sehr umfangreich waren, werden sie hier nicht im Ganzen vorgestellt. Überwiegend werden nur jene Imbalancen dargestellt, die verifiziert wurden.

## 5.2 Auswahl rekurrent auftretender Aberrationen

In unserem Kollektiv konnten mit Hilfe der aCGH-Analysen einige interessante rekurrente Aberrationen, wie z. B. 7q22-, 5q31-, 21q22- und 4q24-Deletionen, identifiziert werden. Da diese Imbalancen teilweise Chromosomen betreffen, die ebenfalls bei der zytogenetischen Analyse von MDS am häufigsten verändert vorkommen und bereits als prognostische Marker genutzt werden, wurden sie bevorzugt eingehender untersucht.

### 5.2.1 7q22-Deletionen bei drei Patientenproben (P15, P70, P100)

Anhand dreier Fälle mit einer über die aCGH aufgedeckten 7q22-Deletion wird der gesamte Ablauf der Charakterisierung einer Aberration, wie sie auszugsweise auch bei den anderen verifizierten Aberrationen vorgenommen wurde, detailliert vorgestellt.

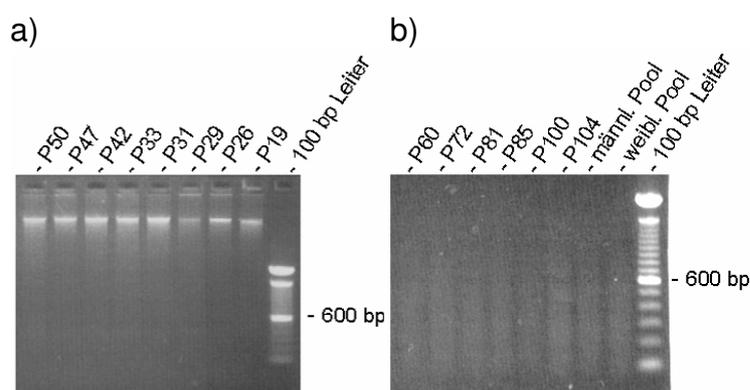
Die Patientenproben P15, P70 und P100 zeigten in der aCGH-Analyse eine fast identische submikroskopische 7q22.1-Deletion. Zytogenetisch sichtbare Chromosom 7-Aberrationen sind häufige Ereignisse bei MDS und verbunden mit einer schlechten Prognose und einer Einstufung in die zytogenetische Hochrisikogruppe. Da diese versteckte Aberration in unserem Kollektiv bei drei Patienten vorkam wurde sie molekularzytogenetisch und -genetisch näher charakterisiert.

Die Aberrationen wurden mit Hilfe der FISH und qPCR verifiziert. Mittels 'custom'-Arrays sollten die Endpunkte weiter eingegrenzt werden, um eine Deletions-spezifische 'long range'-PCR und eine anschließende Sequenzierung durchführen zu können. Mit der exakten Bestimmung des Bruchpunktes könnten die involvierten Gene identifiziert werden. Zudem könnte eine Sequenzanalyse der Bruchpunktumgebung helfen, Aufschluss über den Mechanismus der Entstehung solcher DNA-Rearrangements zu geben.

### 5.2.1.1 Identifizierung der Deletionen – detailliertes Vorgehen bei der aCGH

#### DNA-Isolierung, -Qualitätskontrolle und -Restriktion

Die genomische DNA wurde aus asservierten Methanol-Eisessig-fixierten Leukozytenkernen isoliert; aus Material, das von der tumorzytogenetischen Analyse übrig geblieben war. Die DNA-Ausbeute und -Reinheit wurde mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers bestimmt. Fiel die Konzentration unter 50 ng/μl wurde die DNA über eine Natriumacetat-Ethanol-Behandlung gefällt und konzentriert. Zudem wurde die Qualität der DNA über ein 1% Agarosegel überprüft. Wie in Abbildung 5.2-1 beispielhaft zu sehen ist, sind die DNAs überwiegend hochmolekular und der anschließende Verdau mit den Restriktionsenzymen *AluI* und *RsaI* ergab die erforderlichen 200 bis 500 bp großen Fragmente.



**Abbildung 5.2-1:** a) Elektrophoretische Kontrolle der genomischen DNAs (80-150 ng) in einem 1% Agarosegel. Keine der DNAs ist wesentlich degradiert (exemplarisch). b) Kontrolle der Fragmentgrößen nach Doppelrestriktion der genomischen DNAs (exemplarisch; je 77 ng) in einem 1% Agarosegel. Der Vergleich mit dem 100 bp-Standard zeigt, dass der Hauptanteil der Fragmente eine Größe unter 600 bp hat.

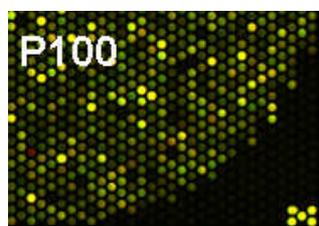
### Fluoreszenzmarkierung, Aufreinigung und Spezifische Aktivität

Mit der Methode des 'random primings' wurden die Patienten-DNA mit Cyanin-5-dUTP und die Referenz-DNA (DNA-Pool) mit Cyanin-3-dUTP markiert und mit Hilfe des Microcon-Filtersystems aufgereinigt und konzentriert. Der erfolgreiche Einbau der Fluoreszenz-beladenen dUTPs wurde per NanoDrop-Messung bestimmt und die Spezifische Aktivität und die Gesamt-DNA-Ausbeute berechnet.

Für die Cy5-markierten Patientenproben sollte eine Spezifische Aktivität von über 22, für die Cy3-markierten Referenzproben eine von über 30 pmol/ $\mu$ g erreicht werden. Die erwartete Ausbeute lag bei über 5  $\mu$ g DNA. Sowohl bei den Patienten- als auch den Referenz-DNAs konnten die erwarteten Einbauraten und DNA-Ausbeuten erzielt werden.

### Array-Hybridisierung, Scannen und FE

Entsprechend des Protokolls wurden die DNAs daraufhin für die Hybridisierung vorbereitet. Die Proben P15 und P100 wurden auf einem 44 k- und die P70-Probe auf dem 244 k-Arrayformat hybridisiert. Als ersten Hinweis für die optimal verlaufene Hybridisierung wurden die durch das Scannen erzeugten tif-Bilder inspiziert.



**Abbildung 5.2-2:** Zoom-in der rechten unteren Ecke des Array-tifs P100. Sichtbar werden die einzelnen komparativ hybridisierten Oligonukleotidspots, die auf Grund der unterschiedlich markierten DNAs eine variable Färbung aufweisen. Völlig unhybridisierte Spots und die Eckoligonukleotide sind u. a. wichtig für die Positionsfindung ('gridding') und die Bestimmung des Hintergrundrauschens.

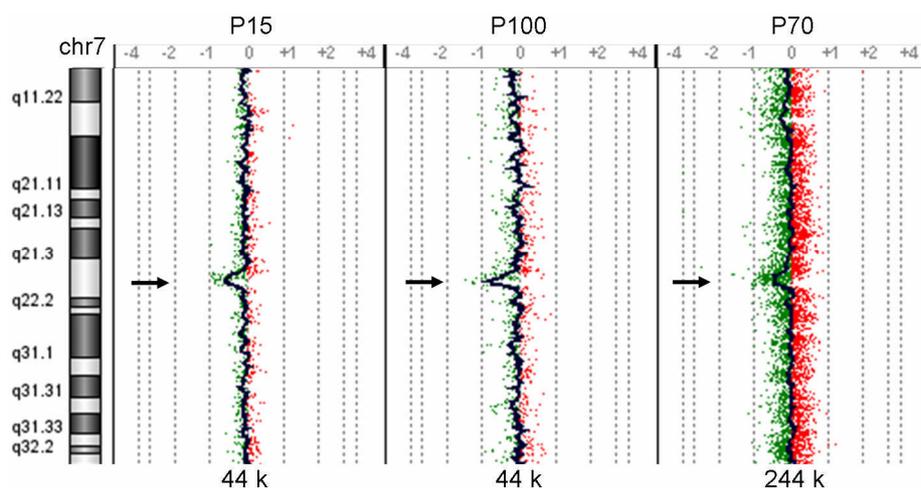
Die Datenextraktion wurde mit der FE-Software durchgeführt. Der Textreport und die pdf-Qualitätsdatei wurden begutachtet, wobei das Hauptaugenmerk auf den DLRS-Wert gelegt wurde. Dieser betrug 0,19 bei P15, 0,28 bei P70 und 0,27 bei P100 und befand sich somit bei allen Analysen im exzellenten bis guten Bereich (vgl. Tabelle 5.1-1).

### Auswertung der aCGH-Analysen

Nach Einladen der Text- und Designdateien erfolgte die Grobauswertung mit Hilfe der GW-Software von Agilent. Von Imbalancen betroffene Regionen wurden in der jeweiligen Chromosomenansicht identifiziert. Eindeutige Imbalancen, d. h. die Abweichung vieler Oligonukleotide über einen größeren Bereich auch mit einem niedrigen  $\log_2$ Ratio oder kleinere Imbalancen mit weit abweichenden Oligonukleotiden (hohes  $\log_2$ Ratio) wurden

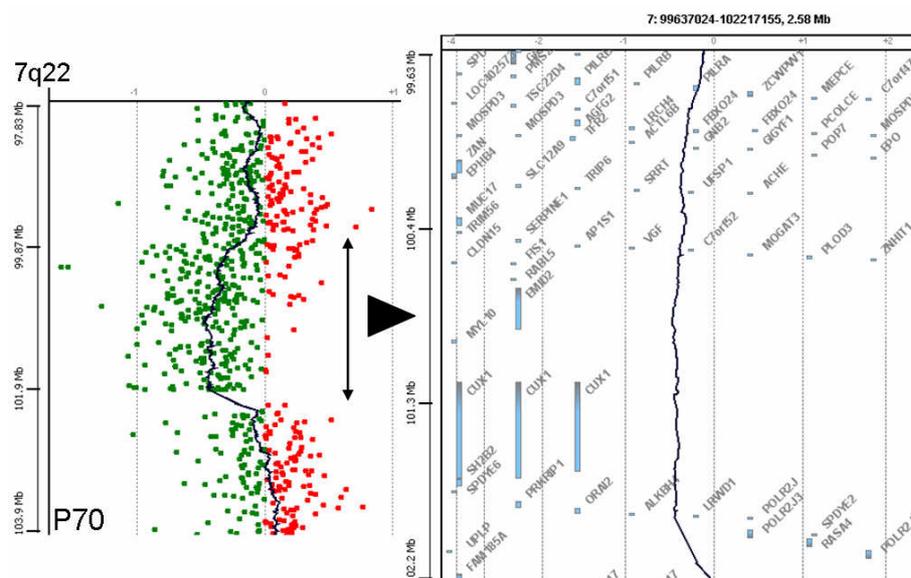
(anfänglich ohne Definition einer  $\log_2$ Ratio-Schwelle) vorrangig beachtet. Abweichend heißt in diesem Fall, dass die jeweiligen Patienten- und Kontroll-DNAs an der entsprechenden Oligonukleotidsequenz keine Hybridisierung im Verhältnis 1:1 aufwiesen.

In den Proben P15, P70 und P100 war in 7q22.1 eine nahezu identische Imbalance mit einem negativen  $\log_2$ Ratio zu sehen – d. h. es wurde eine Deletion bzw. ein genomischer Verlust im Vergleich zur gegenhybridisierten Referenz-DNA als logarithmisches Verhältnis der unterschiedlichen Fluoreszenzfarben angezeigt. Trotz der verschiedenen Formate, die eingesetzt wurden, konnte die Deletion sicher erkannt werden. Die leichten  $\log_2$ Ratio-Unterschiede der Deletionen spiegeln wider, wie viel Prozent der Zellen der Probe diese Deletion tragen. Mit dieser Technik konnte jedoch keine Information darüber erhalten werden, ob die Deletion hetero- oder homozygot vorliegt. Beim Vergleich der Arrayprofile fiel auf, dass die allgemeine Streuung im Fall P100 erhöht war.



**Abbildung 5.2-3:** GW-Chromosomenansicht von Chromosom 7 der aCGH-Analysen der Proben P15, P100 und P70. In allen Fällen war trotz verschiedener Arrayformate in Bande q22.1 eine negative Abweichung zu sehen: Einstellungen: ADM-2; 'threshold' 6; 'moving average window size' 2 Mb; Pfeil = Deletion

In der GW-Genansicht werden weitere Details der Deletion sichtbar, wie die genaue genomische Lokalisation, die Größe und die beinhalteten Gene. Im Beispielfall P70 sind in Abbildung 5.2-4 zwei Darstellungsvarianten veranschaulicht. Zum Einen erkennt man die Dichte der Oligonukleotide (244 k-Array) und dass diese im Deletionsbereich (Pfeil) nach ca.  $-0,5 \log_2$ Ratio verschoben sind. Zum Anderen erhält man die Information, dass die Deletion auf Chromosom 7 eine Größe von über 2 Mb (genomischer Locus: 99,6-101,2 Mb) hat und viele Gene enthält (u.a. *PILRA*, *TRIP6*, *SERPINE1*, *VGF*, *CUX1*, *RASA4*).



**Abbildung 5.2-4:** Verschiedene GW-Genansichten im Fall P70. Links liegt der Schwerpunkt der Ansicht auf der Verteilung der Oligonukleotide in und um die Deletion herum, die beinhalteten Gene wurden ausgeblendet. Ein weiterer Zoom-in der Deletion, rechts, zeigt den Anfang und das Ende der Deletion, den genomischen Locus, die Größe und die involvierten Gene, wobei hier die Oligonukleotide ausgeblendet wurden.

Des Weiteren konnte mit Hilfe der GW überprüft werden, ob sich die bei dem Patienten vorliegende Deletion mit einem CNV, der bereits bei gesunden Probanden bekannt ist, überschneidet, welche  $\log_2$ Ratios die Oligonukleotide aufwiesen und welchen Bezeichner sie haben. Einfacherhalts halber wurde hierzu meistens das GLAD-Programm von M. Beier genutzt und gewisse Differenzen der beiden Softwares, die auf unterschiedlichen Detektionsalgorithmen beruhen, akzeptiert. Mit Hilfe dieser ebenfalls umfangreichen Auswertung konnten übersichtliche, flexibel sortierbare, beliebig erweiterbare und vergleichbare Daten aller Arrayanalysen in Tabellenform erhalten werden.

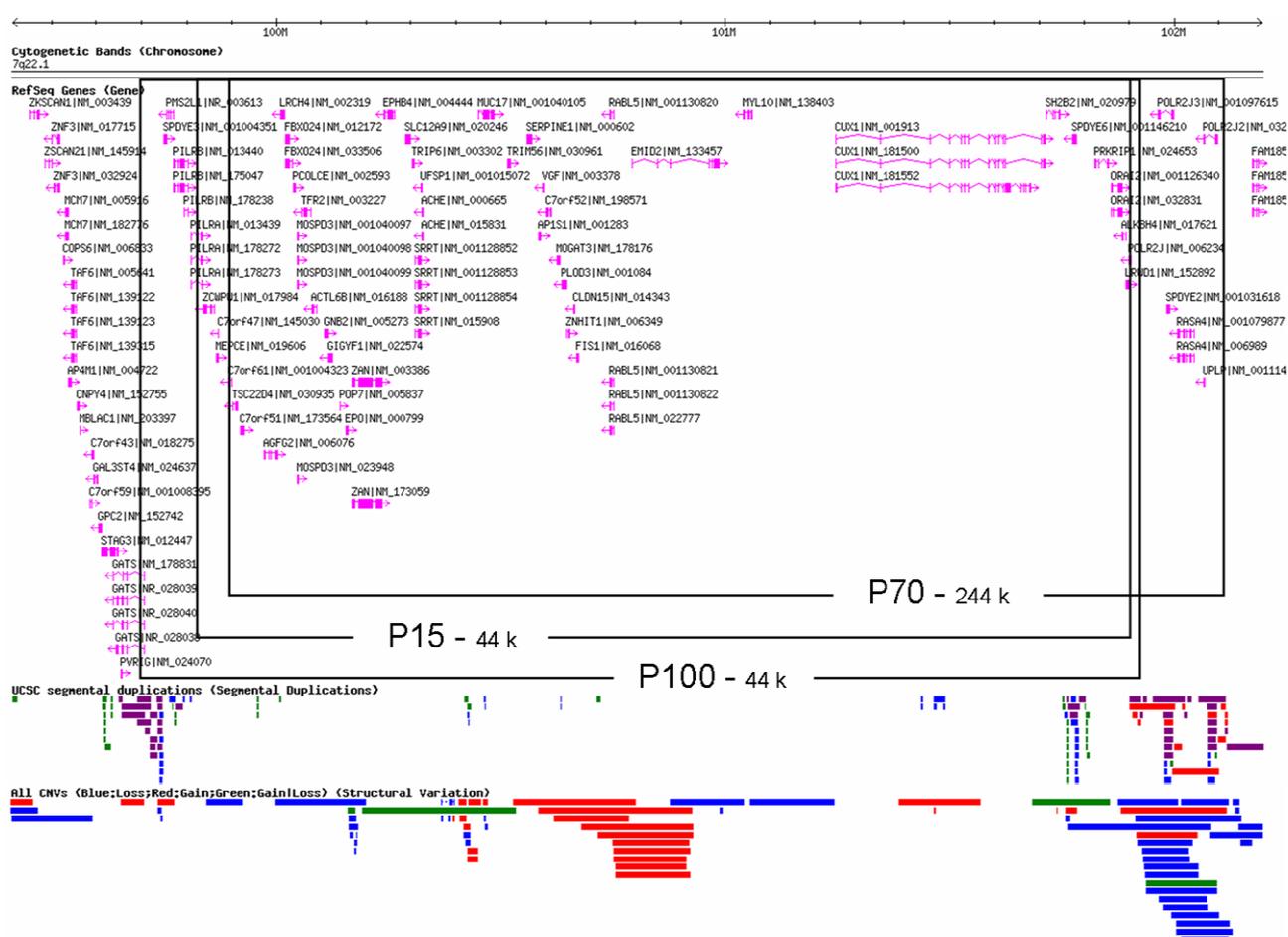
**Tabelle 5.2-1:** Auszug der Software-Auswertung von M. Beier. Dargestellt sind die wichtigsten Angaben, wie genomischer Locus der Aberration,  $\log_2$ Ratio (negativ = Deletion), die Anzahl der betroffenen Oligonukleotide und die Anzahl der CNV-Loci und -Überschneidungen.

| Probe | Array-format (k) | Chr.   | Max. Aberration (bp)   | Max. Größe (bp) | nOligo. | $\log_2$ Ratio | n CNV | % CNV |
|-------|------------------|--------|------------------------|-----------------|---------|----------------|-------|-------|
| P15   | 44               | 7q22.1 | 99.812.708-101.895.949 | 2.083.241       | 64      | -0,526         | 5     | 81    |
| P70   | 244              | 7q22.1 | 99.897.691-102.120.062 | 2.222.371       | 256     | -0,362         | 5     | 84    |
| P100  | 44               | 7q22.1 | 99.702.890-101.901.100 | 2.198.210       | 68      | -0,492         | 7     | 79    |

Die Größen der drei Deletionen wurden mit der GLAD-basierten Auswertung auf ca. 2,1, 2,2 bzw. 2,2 Mb bestimmt. Je nach verwendeter Arrayplattform waren 64, 256 bzw. 68 Oligonukleotide in ihrem Hybridisierungsverhältnis um ein  $\log_2$ Ratio von ca. 0,53, 0,36 bzw. 0,49 nach negativ verschoben. Die deletierten Regionen zeigten Überlappungen mit CNVs der DGV (Stand 08/09) zu 81, 84 bzw. 79%.

### 5.2.1.2 Theoretische Charakterisierung der Deletionen – Datenbankrecherche

Über einen Hyperlink aus der GLAD-Tabelle in die Variantendatenbank und dort spezifisch gewählten Anzeigeoptionen konnte der Überschneidungsgrad mit bekannten CNVs oder segmentalen Duplikationen überprüft werden. In Abbildung 5.2-5 lässt sich erkennen, dass fast der gesamte Deletionsbereich mit bekannten CNVs überlappt. Hierbei handelt es sich allerdings um kleine CNVs, ein über 2 Mb großer CNV ist in dieser Region bisher nicht beschrieben. Auffällig ist auch, dass der deletierte Bereich von segmentalen Duplikationen flankiert ist. Zudem handelt es sich um eine Gen-reiche Region, auch in den vermuteten Bruchregionen. Die Deletionslagen und -größen (Arrayformat-abhängig) der drei Patientenproben unterscheiden sich nur geringfügig.



**Abbildung 5.2-5:** DGV-Ausschnitt (leicht modifiziert). Dargestellt ist der erweiterte Deletionsbereich 7q22.1 mit den eingezeichneten drei identifizierten Deletionen. Neben den jeweils betroffenen Genen können flankierend segmentale Duplikationen und in der ganzen Region kleinere CNVs vorgefunden werden.

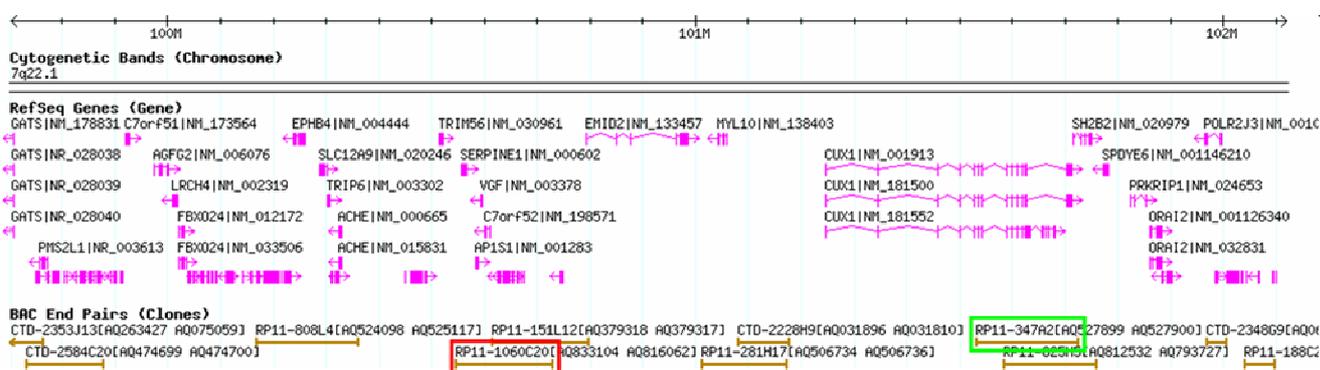
Wichtig für weitere Schritte, wie 'custom'-Array- und Primer-Design, waren vor allem die Oligonukleotid-genauen Tabellenangaben der detektierten Deletion. Somit waren die mögliche minimale und maximale Größe der Deletion bekannt.

### 5.2.1.3 Verifizierung der Deletionen – FISH

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) dient dem Nachweis des Vorhandenseins bzw. Fehlens einer chromosomalen Region mit Hilfe von spezifischen, fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden, die im denaturierten Zustand mit dem denaturierten Chromosomenpräparat unter bestimmten Voraussetzungen renaturieren. Die in der Arbeit eingesetzten RP11-BAC-Sonden wurden auf Grundlage des Arrayergebnisses individuell aus verschiedenen Datenbanken ausgewählt. Abhängig von den angebotenen BAC-*E. coli*-Klonen und deren Vektorkapazität, hatten die eingesetzten Sonden dieser Arbeit eine Größe zwischen 32 und 210 kb.

#### Sondenwahl und -etablierung

Der in allen drei Fällen deletierte Bereich von 99,9 bis 101,8 Mb auf 7q22.1 wurde als Ausgangspunkt für die Wahl zweier BACs für die FISH-Sondenherstellung bestimmt. Hierzu wurde der 'genome browser' der UCSC- (nicht gezeigt) und der Varianten-Datenbank (Abbildung 5.2-6) verwendet.



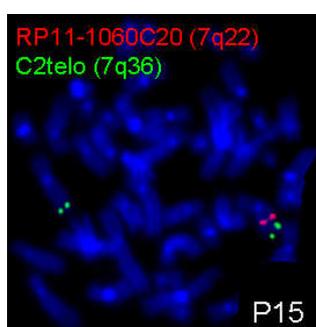
**Abbildung 5.2-6:** 7q22.1-Ausschnitt der DGV (leicht modifiziert) mit den ausgewählten BACs, deren Sequenz und Größe spezifisch ein bis mehrere Gene abdecken sollte. rot = RP11-1060C20 (100,4 Mb; später rot markiert), grün = RP11-347A2 (101,5 Mb; später grün markiert)

Entsprechend des FISH-Protokolls wurden indirekt-markierte BAC-Sonden hergestellt und an einem Normalpräparat mit vorhandenen Metaphasen durchgeführt. Eine zweite, andersfarbig markierte Sonde desselben Zielchromosoms wurde eingesetzt, um die Hybridisierung des richtigen Lokus verfolgen zu können. Es wurden mindestens 500 Zellen des Präparates, sowohl Metaphasen als auch Interphasen, ausgewertet. Die getesteten Sonden RP11-1060C20 und RP11-347A2 konnten als zuverlässig eingestuft werden. Das Testen von BAC-Sonden an Kontrollpräparaten hat sich als essentiell

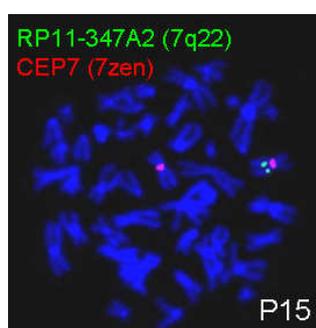
herausgestellt. Von 72 in dieser Arbeit eingesetzten BAC-Sonden zeigten 21 (29%) Kreuz- oder Fehlhybridisierungen (nicht gezeigt).

### FISH-Ergebnis der Chromosomenpräparate der drei Patienten

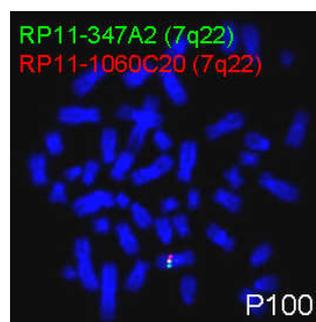
Daraufhin wurden bei allen drei Patientenpräparaten mehrere FISH-Analysen mit verschiedenen Sondenkombinationen durchgeführt. Die folgenden drei Abbildungen zeigen jeweils eine Metaphase von P15 bzw. P100, in der die Signale für die BAC-Sonden RP11-1060C20 (rot) und/oder RP11-347A2 (grün) auf 7q22 heterozygot fehlen.



**Abbildung 5.2-7:** Zwei-Farben-FISH an dem Patientenpräparat P15. Die grün fluoreszierende Kontrollsonde (C2telo) bindet an die Telomerregion beider Chromosomen 7 der Metaphase, während die rote Testsonde RP11-1060C20 nur einmal an 7q22 hybridisiert hat.



**Abbildung 5.2-8:** FISH mit der BAC-Sonde RP11-347A2 für Region 7q22 und einer Kontrollsonde (Vysis; CEP7) für Zentromer 7 an einer Metaphase des Patientenpräparates P15. Auch hier fällt der Verlust des einen 7q22-Signals (grün) auf, während beide Kontrollsignale (rot) vorhanden sind.



**Abbildung 5.2-9:** FISH mit beiden unterschiedlich markierten BAC-Testsonden für den Bereich 7q22 in Fall P100. Die Metaphase zeigt nur ein Chromosom 7 mit Signalen, während das zweite Chromosom 7 unangefärbt bleibt.

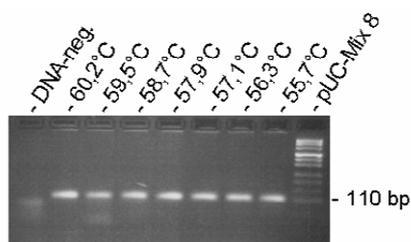
Auch in Fall P70 konnte das Fehlen beider Sonden RP11-1060C20 und -347A2 bestätigt werden (nicht gezeigt). Wenn möglich wurden jeweils mehr als 200 Interphasekerne ausgezählt, mindestens jedoch 100. In P15 konnte die Deletion des überprüften Bereiches in 7q22.1 in 73% der Zellen nachgewiesen werden, in P70 in 86% und in P100 in 87% der Zellen.

#### 5.2.1.4 Verifizierung der Deletionen – qPCR

Da die hier eingesetzte FISH-Technik nicht für den Nachweis kleinerer Aberrationen (< 30 kb) und Tandemduplikationen geeignet war und um einen Vergleich verschiedener Verifizierungsmethoden möglich zu machen, wurde zusätzlich die Technik der qPCR entsprechend der relativen *delta delta* 'threshold-cycle' ( $\Delta\Delta Ct$ )-Auswertung angewandt. Sie beruht auf der relativen Bestimmung der Kopienzahl des überprüften genomischen Lokus der Patientenprobe. Mit Hilfe der PCR-Technik und dem Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen, der sich in doppelsträngige DNA einlagert, kann die Menge des Test-Amplikons im Verhältnis zu einer Kontroll-DNA und zu einem Referenzlokus sensibel in Echtzeit ('real-time') quantifiziert werden. Vor jeder qPCR mit neuen Primern wurde eine aufwendige Primeroptimierung durchgeführt. Hierzu wurde immer ein DNA-Pool-Mix (ca. 16 DNAs) verwendet.

##### Etablierung der qPCR für das Referenzgen *PRNP*

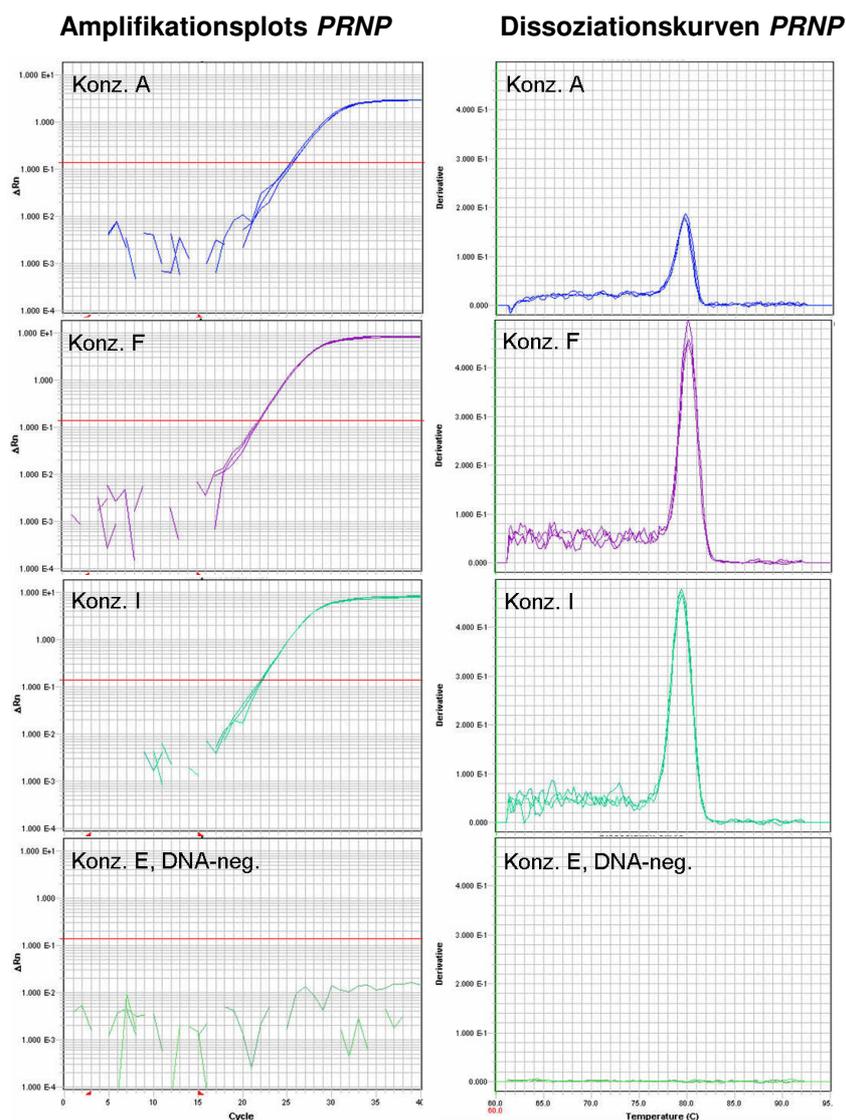
Als Referenzgen wurde das Gen *PRNP* auf 20p13 gewählt. Dieses ist ein 'single copy gene' und bisher wurden keine Überschneidungen mit CNVs beschrieben. Die Primer wurden in das Exon 2 gelegt und das Produkt sollte eine Größe von 109 bp haben. Als Vorschritt wurde eine Temperaturgradienten-PCR durchgeführt. Jeweils 5  $\mu$ l wurden auf ein 3% Agarosegel aufgetragen und die Produkte mit dem pUC-Mix 8-Standard (Fermentas) verglichen. Bei allen Temperaturen wurde das erwartete Produkt von 109 bp Größe spezifisch gebildet. In diesem Fall verlief die PCR bei allen getesteten Annealingtemperaturen spezifisch.



**Abbildung 5.2-10:** Ergebnis der Temperaturgradienten-PCR zur *PRNP*-Primeretablierung. Das Produkt mit einer Größe von 109 bp konnte bei allen Annealingtemperaturen spezifisch gebildet werden (3% Agarosegel, 5  $\mu$ l PCR-Produkt).

Die relative  $\Delta\Delta Ct$ -Auswertung ist eine Näherungsauswertung und funktioniert nur verlässlich, wenn die zu vergleichenden qPCRs effizient ablaufen. Deshalb wurde zusätzlich eine qPCR-Primeroptimierung durchgeführt und 9 verschiedene Konzentrationskombinationen des 'forward'- und 'reverse'-Primers jeweils in Triplikaten ausgetestet. Mit Hilfe der Auswertesoftware SDS2.2 wurden die erzeugten Amplifikations- und

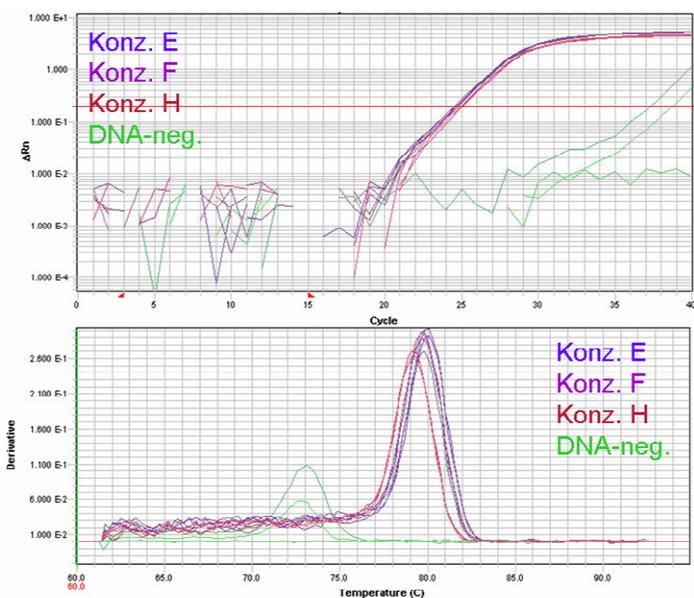
Schmelzkurven miteinander verglichen. Im Falle von *PRNP* wurde die Primerkonzentrationskombination F (900 nM des 'forward'-Primers und 300 nM des 'reverse'-Primers) als optimal bestimmt, da hier am meisten Produkt und trotzdem kein Nebenprodukt gebildet wurde. D. h. in allen folgenden qPCRs wurde das *PRNP*-Primerpaar in der Konzentration F als Referenzgen eingesetzt.



**Abbildung 5.2-11:** Amplifikationsplots und Dissoziationskurven (SDS2.2) der qPCR-Primeroptimierung für das Referenzgen *PRNP*. Die 'threshold'- und 'baseline'-Parameter (rote Linie = 0,14; rote Dreiecke = 3-15) wurden automatisch festgelegt. Die dargestellten Amplifikationskurven A, F, I zeigen, dass die jeweiligen Triplikate sehr nah beieinander liegen, bei allen Konzentrationskombinationen Produkt gebildet wurde und die Wasser-Kontrolle negativ ist. Die Schmelzkurven zeigen, dass bei keinem der Ansätze ein Nebenprodukt oder Primerdimere gebildet wurden und dass bei den Konzentrationen F und I am meisten Produkt gebildet werden konnte.

### Etablierung der qPCR für das Testgen *CUX1*

Für den Nachweis der 7q22-Deletionen wurde ein Primerpaar für das Testgen *CUX1*, das innerhalb der Deletion liegt, in Intron 1/Exon 2 etabliert. Die Temperaturgradienten-PCR bestätigte eine stabile Amplifikation und eine Produktgröße von 94 bp. In der anschließenden qPCR-Primeroptimierung konnten die Konzentrationen E, F und H als die optimalen bestimmt werden (Abbildung 5.2-12).

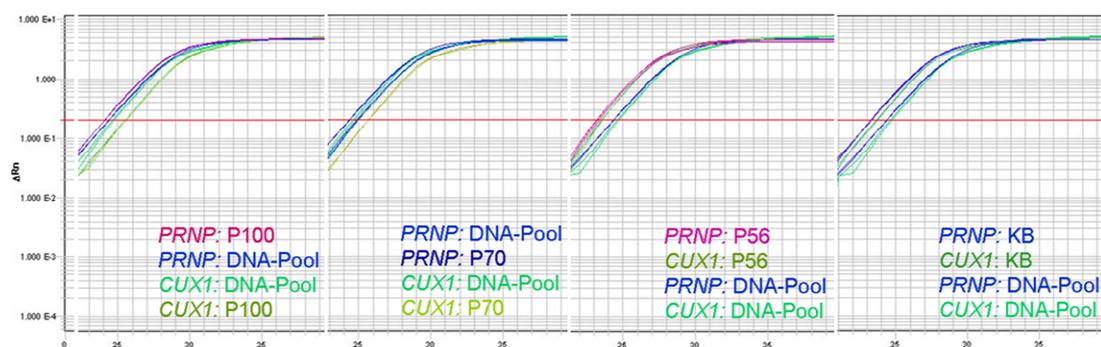


**Abbildung 5.2-12:** *CUX1*-qPCR-Primeroptimierung. Gezeigt sind die überlagerten Amplifikations- und Dissoziationskurven (SDS2.2) der Primerkonzentrationen E, F, H und DNA-negativ. In zwei Wasserkontrollen haben sich Primerdimere ausgebildet.

Zusätzlich wurde eine Kontrolle der spezifischen Produkte, deren Größe und Menge per Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, dass die PCR im Falle der Konzentration F am effizientesten abgelaufen ist. Die in den Dissoziationsplots der Wasserkontrollen detektierten Nebenprodukte mit geringerer Schmelztemperatur konnten durch die Auftrennung eindeutig als Primerdimere identifiziert werden (nicht gezeigt).

### Ergebnis der *CUX1*-qPCR der Patienten-DNA-Proben

In der folgenden Analyse wurde eine relative Quantifizierung von *CUX1* in P70 und P100 (P15 wurde nicht getestet) im Vergleich zu *PRNP* und der Pool-DNA durchgeführt. In diesem Fall wurde ebenfalls die Probe P56 auf eine Amplifikation hin getestet und die Negativkontrolle KB mitanalysiert.



**Abbildung 5.2-13:** Darstellung der qPCR-Amplifikationsplots der für die Berechnung verwendeten Proben. Anhand der vier abzulesenden Cts (Wildtyp Referenzgen, Wildtyp Testgen, Mutante Referenzgen, Mutante Testgen) pro Ansatz wird über die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode die relative Kopienzahl der Testprobe (P100, P70, P56, KB) bestimmt.

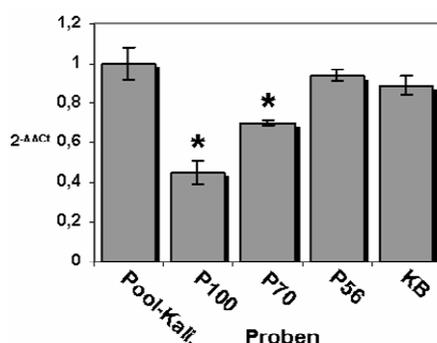
Durch den Einbezug aller 4 Ct-Werte in die Berechnung (s. Methoden) werden Pipettier- und Verdünnungsungenauigkeiten ausgeglichen. In der folgenden Tabelle werden die gemessenen und berechneten Parameter aufgeführt.

**Tabelle 5.2-2:** Beispiel der berechneten Werte der qPCR mit Triplikaten. Bei einer Standardabweichung (Stabw) > 0,2 wurde der Ausreißer eliminiert. Die gesamte Analyse wurde mindestens einmal wiederholt, wodurch eine statistische Auswertung möglich wurde (im Beispiel nicht einbezogen).

| Probe      | Detektor         | Ct-Mittelwert | Stabw | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Fold Change |
|------------|------------------|---------------|-------|------------------------|-------------|
| DNA-neg.   | <i>CUX1</i>      | 37,87         |       |                        |             |
| Pool-Kali. | <i>CUX1</i>      | 24,74         | 0,08  | 1                      | 1           |
| P100       | <i>CUX1</i>      | 25,57         | 0,06  | 0,45                   | -2,22       |
| P70        | <i>CUX1</i>      | 25,71         | 0,01  | 0,7                    | -1,42       |
| P56        | <i>CUX1</i>      | 23,60         | 0,03  | 0,94                   | -1,09       |
| KB         | <i>CUX1</i>      | 23,74         | 0,05  | 0,89                   | -1,12       |
| DNA-neg.   | <i>PRNP-Ref.</i> | 36,60         |       |                        |             |
| Pool-Kali. | <i>PRNP-Ref.</i> | 24,49         | 0,14  |                        |             |
| P100       | <i>PRNP-Ref.</i> | 24,18         | 0,14  |                        |             |
| P70        | <i>PRNP-Ref.</i> | 24,95         | 0,05  |                        |             |
| P56        | <i>PRNP-Ref.</i> | 23,26         | 0,08  |                        |             |
| KB         | <i>PRNP-Ref.</i> | 23,32         | 0,02  |                        |             |

Anhand der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte und des 'fold change' konnte die 7q22-Deletion in P100 und P70 bestätigt werden. P100 hat angenähert nur 0,45 mal so viele *CUX1*-Kopien wie die Pool-DNA. P70 nur 0,7 mal so viele. Sowohl die Probe P56 als auch die KB-Negativkontrolle hatten keine signifikant unterschiedliche Kopienzahl.

#### qPCR – *CUX1* (7q22.1)



**Abbildung 5.2-14:** Diagramm zur relativen *CUX1*-Kopienzahl. Bei P100 und P70 konnte im Vergleich zur Pool-Referenz (Kali. = Kalibrator) eine Deletion von *CUX1* signifikant ( $p \leq 0,05$ ) nachgewiesen werden.

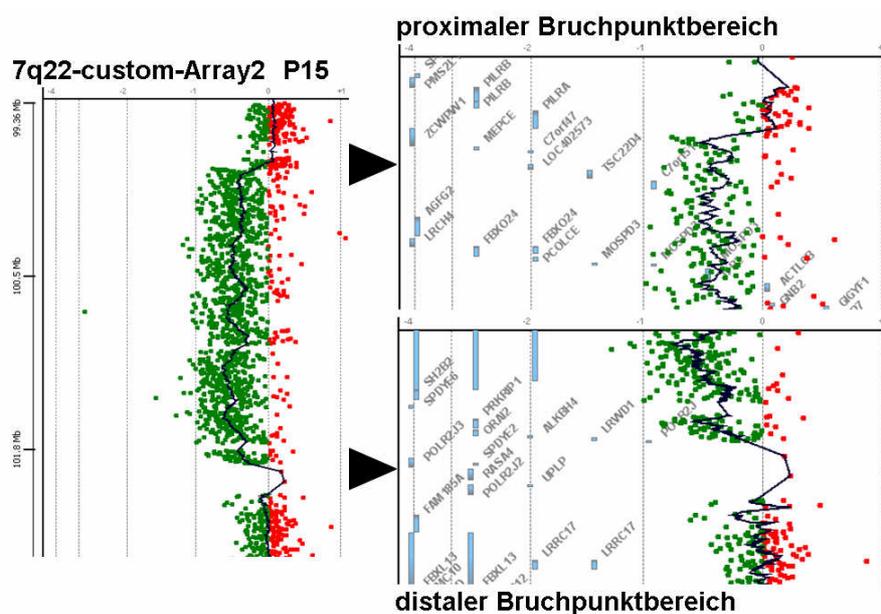
Alle weiteren in dieser Arbeit durchgeführten Ratio- und Signifikanzbestimmungen nach qPCR-Analysen wurden von M. Beier über statistische Tests (s. Methoden) berechnet und mit Hilfe der Programmiersprache R in Balkendiagrammen dargestellt.

### 5.2.1.5 Molekulare Charakterisierung – 'custom'-Array1 und 2

Die Deletionen sollten molekulargenetisch charakterisiert werden. Dabei ist von Interesse, ob die Bruchpunkte in Genen liegen, sich möglicherweise ein chimäres Fusionsgen gebildet hat und ob in den Bruchpunktregionen Sequenzhomologien vorkommen, die zur Entstehung der Deletion beigetragen haben. Um die exakten Bruchpunkte der Deletionen zu identifizieren, wurde ein spezifischer 'custom'-Array hybridisiert.

Ausgehend von den GLAD-Tabellenangaben wurde ein 'custom'-Array (Version 1, 4x 44 Format, Design 021122) designt. D. h. der proximale und distale Bruchpunktbereich der 7q22-Deletionen wurde über die von Agilent angebotenen Oligonukleotide (alle, die 07/08 verfügbar waren) hochauflösend (125 bp genomischer Abstand) abgedeckt. Die Proben P15 und P100 wurden wie zuvor beschrieben hybridisiert und über die GW-Software ausgewertet (nicht gezeigt). Mit diesem zoom-in-Array konnten die Deletionen auf Chromosom 7 auf Grund übermäßig streuender Oligonukleotide nicht eingegrenzt werden, obwohl sich der DLRS-Wert und auch alle anderen Qualitätsparameter im exzellenten bis guten Bereich befanden.

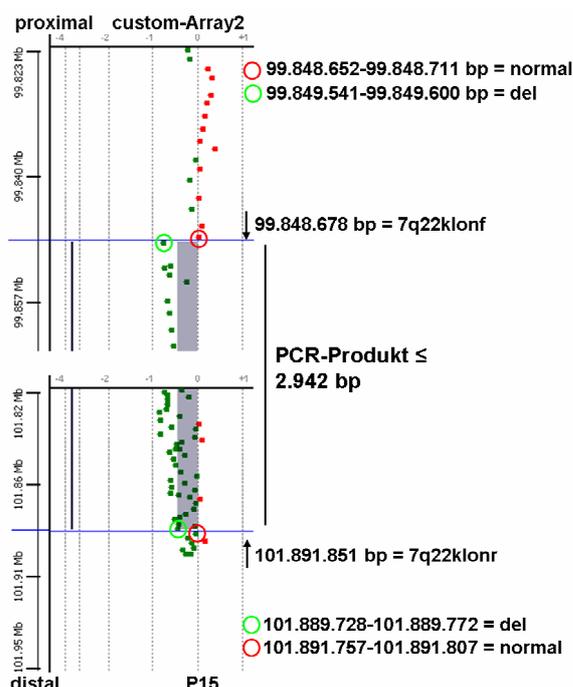
Daraufhin wurde ein zweiter spezifischer 'custom'-Array (Version 2), wieder 4x 44 k, entworfen, um den Deletionsbereich 7q22 näher einzugrenzen. Das Design (024793) wurde im Vergleich zum ersten Array völlig verändert. Diesmal wurde die komplette 7q-Region von 99,4 Mb bis 103,0 Mb in einer durchschnittlichen genomischen Auflösung von 2 kb mit Oligonukleotiden abgedeckt. Die gewählten Oligonukleotide entsprachen ungefähr denen des kommerziellen 1 M-Arrays von Agilent und sollten deshalb ein verlässliches Ergebnis liefern. Zudem wurden alle anderen Chromosomen ebenfalls durch Oligonukleotide repräsentiert, mit einem 'genomic tiling' von ca. 100 kb plus weitere spezifische Bereiche mit 1-2 kb Auflösung (zur Verifizierung anderer identifizierter Imbalancen). Die gewählte 2 kb-Auflösung sollte ausreichend sein, um später per 'long range'-PCRs die Bruchpunkte bestimmen zu können. Wieder wurden die Proben P15 und P100 hybridisiert. Als Beispiel wird das Ergebnis der Hybridisierung von P15 gezeigt (Abbildung 5.2-15). Die Deletion und auch die Bruchpunktbereiche sind eindeutig zu erkennen. Der proximale Bruchpunkt wurde in Gen *ZCWPW1*, welches für ein Zinkfingerprotein kodiert, angezeigt. Der distale Bruch ereignete sich in der Nähe eines CNV-Cluster-Bereiches (durch nur wenige Oligonukleotide repräsentiert) im *ALKBH4*-Lokus, ein Gen, das eine Rolle bei der Reparatur von alkylierter DNA spielen soll.



**Abbildung 5.2-15:** GW-Auswertung der 7q22-Region von P15 nach Hybridisierung mit dem 'custom'-Array2. In der Übersichtsdarstellung links lässt sich die Verschiebung des log<sub>2</sub>Ratios ins Negative über 2 Mb erkennen. In den Detailausführungen rechts sind der proximale und distale Bruchpunktbereich vergrößert aufgenommen ('moving average window size' 0,1 Mb bzw.20 kb).

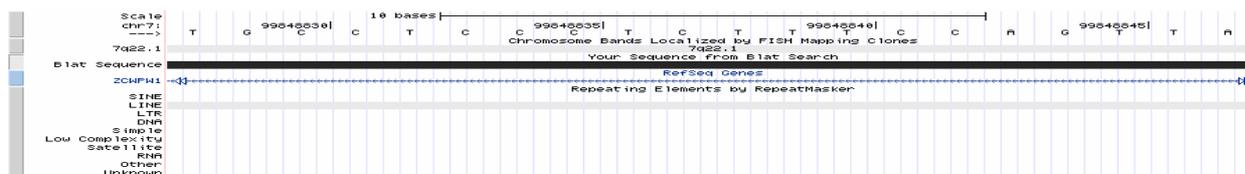
### 5.2.1.6 Molekulare Charakterisierung – 'long range'-PCR

Im nächsten Schritt sollte der genaue Bruch- und Fusionspunkt der 7q22-Deletion identifiziert werden. Hierzu wurde der zoom-in-Array mit Hilfe der GW-Software eingehender ausgewertet. Zuerst wurde sich auf die Programm-interne Auswertung verlassen, d. h. die 'show-aberration'-Funktion bei Verwendung des ADM-2-Algorithmus genutzt. Entsprechend der GW-Tabellenwerte wurde eine Deletions-spezifische 'long range'-PCR geplant. Mit der Unterstützung diverser Internettools (s. Methoden) wurden die entsprechenden Referenzsequenzen erhalten und ein Primerpaar designt. Der Abstand zwischen dem Oligonukleotid, an das die Patienten- und Referenz-DNA im Verhältnis 1:1 gebunden hat und dem Oligonukleotid, an das mehr Referenz-DNA gebunden hat, ist der 'Bruchpunktbereich'. Im Beispielfall betrug dieser Abstand proximal 830 bp und distal 1.985 bp. Vom Algorithmus als sicher deletiert angezeigt wurde der Bereich von 99.849.541 bp bis 101.889.772 bp. Somit hatte die erwartete Deletion eine Größe von 2.040.231 bp plus/minus der Bruchpunktebereiche von 2.815 bp. Bei Vorliegen der erwarteten Deletion sollte mit dem in Folge eingesetzten 'Expand 20 kb<sup>PLUS</sup> PCR-System' und den spezifischen Primern ein PCR-Produkt von höchstens 2.942 bp erhalten werden. Zur Sicherheit, falls der Bruch unerwarteterweise erst weiter innen stattfinden sollte, wurde eine Elongationszeit von 10 min (plus 10 s/Zyklus in den Zyklen 11-35) gewählt. Somit wäre das Erhalten eines Produktes der Größe von über 10 kb möglich.



**Abbildung 5.2-16:** Planung der 'long range'-PCR für die Bruchpunktidentifizierung der 7q22-Deletion in P15. Dargestellt ist ein Auszug der proximalen und distalen Bruchpunktumgebung mit den vermuteten letzten noch gleichmäßig hybridisierten (normal) und den ersten ungleichmäßig hybridisierten (del = in Deletion) Oligonukleotiden. Der graue Schatten markiert die vom ADM-2-Algorithmus ermittelte Deletion. Die Primer (schwarze Pfeile) wurden in oder kurz hinter das jeweilige normale Oligonukleotid gelegt. Nach Berechnung des größtmöglichen Abstandes von Primer zu Bruch, sowohl distal als auch proximal, ergab sich eine maximale Größe von 2.942 bp für das PCR-Produkt.

Mit diesen Primern konnte in der anschließenden PCR kein Produkt erhalten werden. Auch nach vielen weiteren Optimierungen und Tests mit anderen Primern konnte innerhalb dieser Arbeit kein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden. Eine Sequenzanalyse konnte als eine Ursache ein repetitives Element der Klasse LINE ('long interspersed nuclear element') in der Region der 'forward'-Primer-Lagen aufdecken.



**Abbildung 5.2-17:** Überprüfung des proximalen Bruchpunktbereiches der 7q22-Deletion in P15, dargestellt mit UCSC. Mit Hilfe des Repeat Masker konnte der mögliche Primerloкус in einem LINE bestätigt werden.

### 5.2.1.7 Zusatzaberrationen bei Patienten mit 7q22-Deletion

Von 105 Arrayanalysen wiesen drei Patienten (P15, P70, P100) diese ca. 2 Mb große, verifizierte 7q22-Deletion auf. Patient P15 litt an einem RAEB-1-MDS mit der Prognosestufe Int-1, zeigte keine AML-Transformation und verstarb bereits nach 15 Monaten an einer Krankheits-abhängigen Infektion. Neben der detektierten 7q22-Deletion war das aCGH-Profil völlig unauffällig. Patient P70 verstarb an einer AML, nur 6 Monate nach der Erstdiagnose. Zusätzlich zu der 7q22-Deletion konnte bei diesem Patienten ein 28,6 Mb

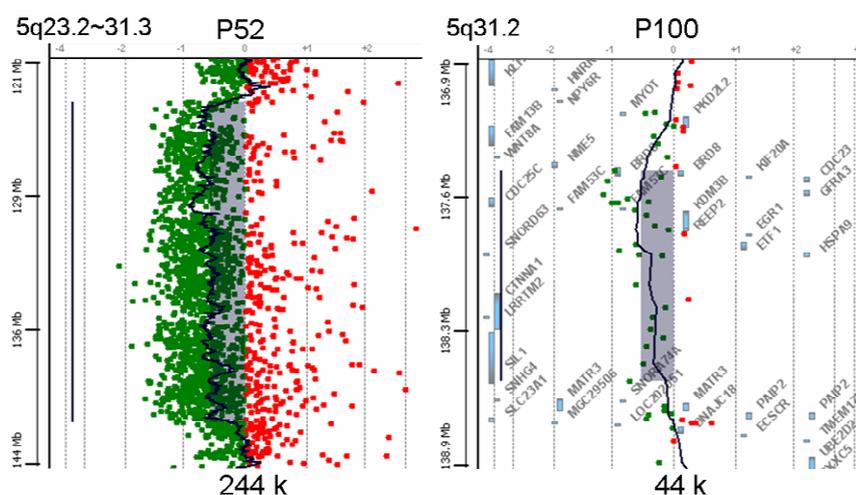
großer interstitieller Verlust in 11q identifiziert werden, der zuvor in der zytogenetischen Analyse nur als Einzelaberration gesehen wurde. Mit einer BAC-Sonde wurde dieser in 64% der Zellen per FISH verifiziert (vgl. Tabelle 5.9-3). Zwei der gesehenen CNVs wurden per multiplex-PCR getestet; sowohl in 1q24.2 in *NME7* (2 Oligonukleotide) als auch in 6q14.1 in einem genleeren Bereich (3 Oligonukleotide) konnten homozygote Deletionen verifiziert werden (nicht gezeigt). Patient P100, der an RCMD mit IPSS Int-1 erkrankte, starb 12 Monate nach der Diagnose. Auch bei diesem Patienten konnte eine Zusatzaberration (5q-Deletion, s. Kapitel 5.2.2) detektiert werden.

## 5.2.2 5q31-Deletionen bei zwei Patientenproben (P52, P100)

Bei zwei der 105 analysierten Patientenproben konnten versteckte interstitielle Deletionen des langen Arms von Chromosom 5 aufgedeckt werden. Große isolierte 5q-Deletionen (> 30 Mb) (Evers *et al.*, 2007) sind typische MDS-Aberrationen und prognostisch relevant.

### 5.2.2.1 Identifizierung der Deletionen – aCGH

Bei einem der Patienten (P52) wurde mit Hilfe der 244 k-Arrayanalyse eine ca. 17,9 Mb große Deletion identifiziert. P100 wies dagegen nur eine 1,4 Mb kleine Deletion auf, detektiert per 44 k-Array (Abbildung 5.2-18).



**Abbildung 5.2-18:** GW-Genansichten der detektierten interstitiellen 5q-Deletionen bei P52 und P100. Bei der 17,9 Mb großen Deletion von P52 wurden die involvierten Gene auf Grund ihrer Dichte ausgeblendet. Der 1,4 Mb kleine deletierte Bereich in P100 enthält nur wenige, teilweise bereits beschriebene wichtige Kandidatengene ('moving average window size' 0,5 Mb).

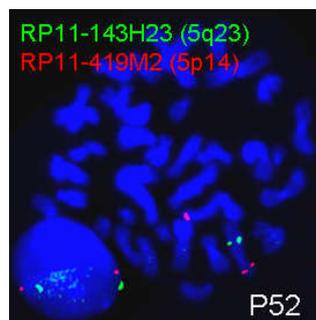
**Tabelle 5.2-3:** Übersicht der von der GLAD-Software bestimmten 5q-Deletionen nach aCGH.

| Probe | Array-format (k) | Chr.        | Max. Aberration (bp)    | Max. Größe (bp) | nOligo. | log <sub>2</sub> Ratio | %CNV |
|-------|------------------|-------------|-------------------------|-----------------|---------|------------------------|------|
| P52   | 244              | 5q23.2~31.3 | 124.049.584-141.931.520 | 17.874.042      | 1.713   | -0,818                 | 25   |
| P100  | 44               | 5q31.2      | 137.351.108-138.706.114 | 1.355.006       | 30      | -0,414                 | 4    |

Zur Verifizierung der genomischen Verluste wurden FISH- und qPCR-Analysen durchgeführt. Zudem sollte der Bruchpunkt der kleinen Aberration von P100, wie zuvor beschrieben, mit zoom-in-Arrays identifiziert werden.

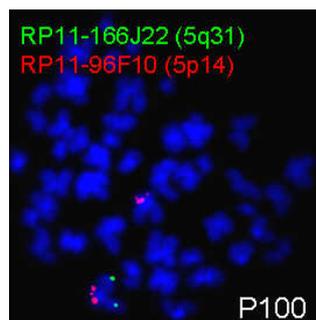
### 5.2.2.2 Verifizierung der Deletionen – FISH

In P52 konnte die heterozygote Deletion sowohl mit dem LSI *EGR1*-Sondenmix (137,8 Mb; Vysis) als auch mit der etablierten BAC-Sonde RP11-143H23 (124,7 Mb) in 45% der Zellen verifiziert werden.



**Abbildung 5.2-19:** Ergebnis der FISH-Analyse mit der BAC-Sonde RP11-143H23. Diese Metaphase trägt auf beiden homologen Chromosomen 5 die rote Kontrollsonde (5p14), während ein grünes Signal (5q23) fehlt. Die benachbarte Interphase ist unauffällig.

Auch bei P100 konnte die heterozygote Deletion mit zwei Sonden nachgewiesen werden. Sowohl die *EGR1*- als auch die RP11-166J22-BAC-Sonde (137,5 Mb) zeigten eine Deletion in 71% der Zellen.

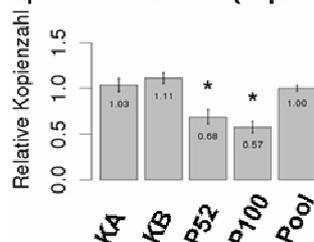


**Abbildung 5.2-20:** FISH-Analyse mit der grünen Testsonde RP11-166J22 auf 5q31 und der roten Kontrollsonde RP11-96F10 auf 5p14 bei P100. Nur ein Chromosom 5 zeigt eine Hybridisierung beider Sonden, dem zweiten fehlt das grüne Signal auf Grund der Deletion.

### 5.2.2.3 Verifizierung der Deletionen – qPCR

Für die folgende qPCR-Untersuchung wurde ein Primerpaar in Gen *HSPA9* (137,9 Mb) entworfen und im Hinblick auf eine zuverlässige Amplifikation optimiert. Mit Hilfe dieses Primerpaares konnte der Verlust des untersuchten genomischen Bereiches in beiden Patientenproben nachgewiesen werden.

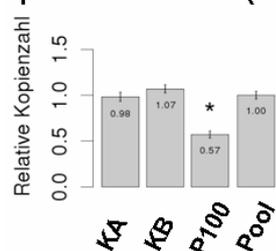
qPCR – *HSPA9* (5q31.1)



**Abbildung 5.2-21:** Relative *HSPA9*-Kopienzahlen der Patientenproben P52 und P100 im Vergleich zu zwei Kontrollproben KA und KB. Als Referenzgen wurde das *PRNP*-Primerpaar und als Kalibrator-DNA der Pool-Mix in die qPCR eingesetzt. In die Kopienzahl- und Signifikanzberechnung ( $p \leq 0,05$ ) durch M. Beier wurden jeweils zwei Triplikate einbezogen.

Die Patientenprobe P100 wurde zusätzlich mit einem etablierten Primerpaar für das Gen *CDC25C* (137,6 Mb) auf die kleine Deletion hin getestet. Die relativen Kopienzahlen von P100 waren für beide getesteten Gene identisch ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,57$ ).

qPCR – *CDC25C* (5q31.2)



**Abbildung 5.2-22:** Relative *CDC25C*-Kopienzahl der Patientenprobe P100 im Vergleich zu zwei Kontrollproben KA und KB. Als Referenzgen wurde das *PRNP*-Primerpaar und als Kalibrator-DNA der Pool-Mix in die qPCR eingesetzt. In die Kopienzahl- und Signifikanzberechnung ( $p \leq 0,05$ ; M. Beier) wurden jeweils zwei Triplikate einbezogen.

### 5.2.2.4 Molekulare Charakterisierung – 'custom'-Array2 und 'long range'-PCR

Bei P52 wurde der proximale Bruch in dem Zinkfingeren *ZNF608* und der distale Bruch in *FGF1*, ein für einen Fibroblasten-Wachstumsfaktor kodierendes Gen, angezeigt.

Da die kleine Deletion in P100 zur Eingrenzung der Kandidatengenregion dienen könnte, sollten hier die Endpunkte identifiziert werden. Wie schon beim Versuch den 7q22-Deletionsbruchpunkt bei P100 zu bestimmen (s. Kapitel 5.2.1.5), führte die 'custom'-Array1-Analyse auf Grund der starken Streuung nicht zur Annäherung an den Bruchpunkt. Erst die 'custom'-Array2-Analyse führte zu einer Bruchpunkteingrenzung und die folgenden Primerdesigns und 'long range'-PCRs wurden von Dr. K. Servan durchgeführt. Sie konnte die Lage der Deletion mit einer genomischen Größe von etwa 1,8 Mb zwischen den Genen *MYOT* und *CXXC5* bestimmen (nicht gezeigt).

### 5.2.2.5 Zusatzaberrationen bei Patienten mit 5q-Deletion

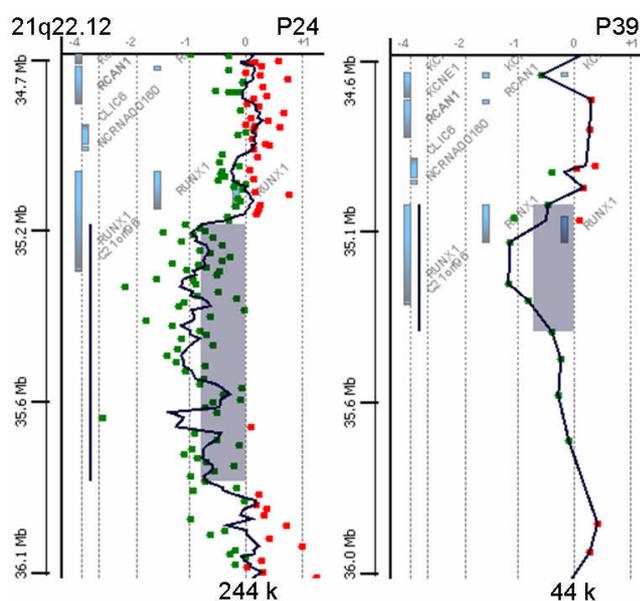
Mit Hilfe der aCGH-Analysen konnten bei P52 und P100 Deletionen auf Chromosom 5q23.2~31.3 bzw. 5q31.2 nachgewiesen werden. Neben der 5q-Deletion wies P100 die bereits verifizierte 7q22-Deletion auf (s. Kapitel 5.2.1). Bei P52 wurden keine weiteren Aberrationen detektiert. Patient P52 hatte die Diagnose RCMD, Int-1 und überlebte 3 Jahre und 5 Monate. Dagegen überlebte Patient P100, der ebenfalls an RCMD mit Int-1 erkrankt war, mit den submikroskopischen 7q22- und 5q31-Deletionen nur ein Jahr.

### 5.2.3 21q22-Deletionen bei zwei Patientenproben (P24, P39)

Eine weitere rekurrente Aberration, die mittels aCGH aufgedeckt werden konnte, war die interstitielle 21q22.12-Deletion mit Beteiligung des *RUNX1* (*AML1*)-Gens. Das für einen Transkriptionsfaktor kodierende Gen ist ein häufiger Translokationspartner in Leukämien und nicht selten in Amplifikationen involviert.

#### 5.2.3.1 Identifizierung der Deletionen – aCGH

Die aCGH-Analyse von P24 mit einem 244 k-Array deckte eine 710 kb große Deletion auf, da 63 Oligonukleotide ein negatives  $\log_2$ Ratio aufwiesen (GLAD). Die Hybridisierung von P39 mit einem 44 k-Array zeigte dagegen nur 5 Oligonukleotide mit negativem  $\log_2$ Ratio an, die einer Deletionsgröße von ca. 330 kb entsprachen (GLAD).



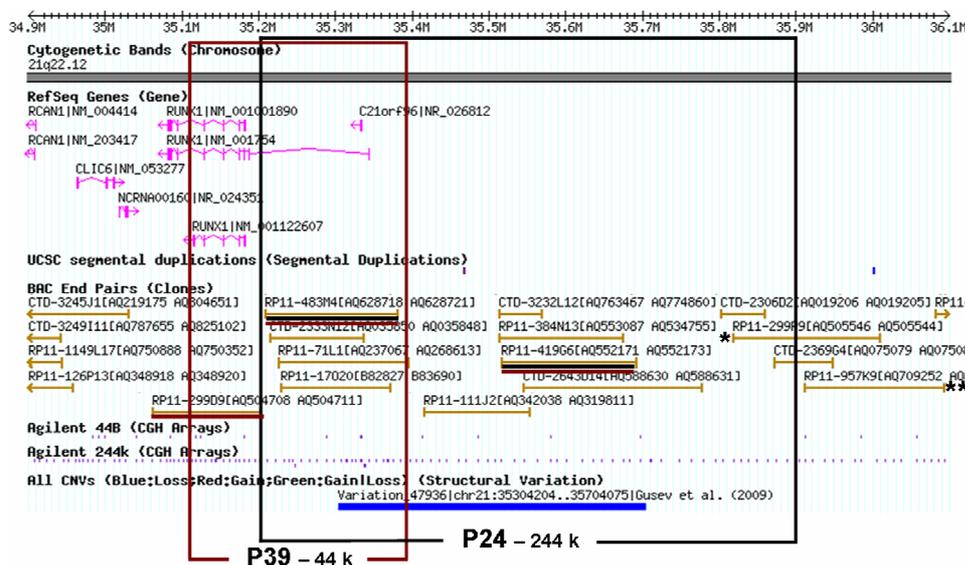
**Abbildung 5.2-23:** GW-Ergebnis der aCGH-Analyse von P24 und P39 in der chromosomalen Region 21q22.12. In beiden Fällen wird eine Deletion angezeigt, die das *RUNX1*-Gen betrifft ('moving average window size' 50 kb bzw. 20 kb).

**Tabelle 5.2-4:** Übersicht der von der GLAD-Software bestimmten 21q22-Deletionen nach aCGH.

| Probe | Array-format (k) | Chr.     | Max. Aberration (bp)  | Max. Größe (bp) | nOligo. | log <sub>2</sub> Ratio |
|-------|------------------|----------|-----------------------|-----------------|---------|------------------------|
| P24   | 44               | 21q22.12 | 35.201.032-35.911.372 | 710.340         | 63      | -0,745                 |
| P39   | 244              | 21q22.12 | 35.084.180-35.413.600 | 329.420         | 5       | -1,03                  |

### 5.2.3.2 Verifizierung der Deletionen – FISH

Mit Hilfe von 5 unterschiedlichen BAC-Sonden sollte der deletierte Bereich in beiden Fällen verifiziert werden. Die Veranschaulichung der Sonden- und Deletionsloci ist in Abbildung 5.2-24 dargestellt. Eine der ausgewählten BAC-Sonden (\*) zeigte in der Kontroll-FISH eine Kreuzhybridisierung und wurde daraufhin nicht eingesetzt. Eine weitere Sonde (\*\*\*) konnte erwartungsgemäß weder bei P24 noch P39 eine Deletion detektieren. Mit den Sonden RP11-483M4 (35,2 Mb) und RP11-419G6 (35,5 Mb) konnte dagegen in beiden Patientenpräparaten ein heterozygoter Verlust in 21q22.12 bestätigt werden. In P24 war die Deletion in 89% der Zellen nachzuweisen, in P39 sogar in 95% der Zellen. Ebenfalls fiel eines der beiden Signale für RP11-299D9 (35,05 Mb) im Fall von P39 aus. Bei vorhandenen Verlaufskontrollpräparaten der Patienten wurde überprüft, ob sich die Größe des aberranten Klon verändert hat. Von Patient P24 wurden drei weitere Proben, von P39 nur eine weitere Probe analysiert. Die Anzahl von 89% Zellen mit Deletion bei Erstdiagnose fiel bei P24 bereits nach einem Monat auf 22%, nach einem Jahr auf 2%. Dagegen war bei P39 nach 5 Monaten eine Expansion des aberranten Klon mit Deletion von 95% auf 100% Zellen nachzuweisen. Auf Grund der nicht 100% aberranten Zellen konnte das Vorliegen eines CNVs ausgeschlossen werden.



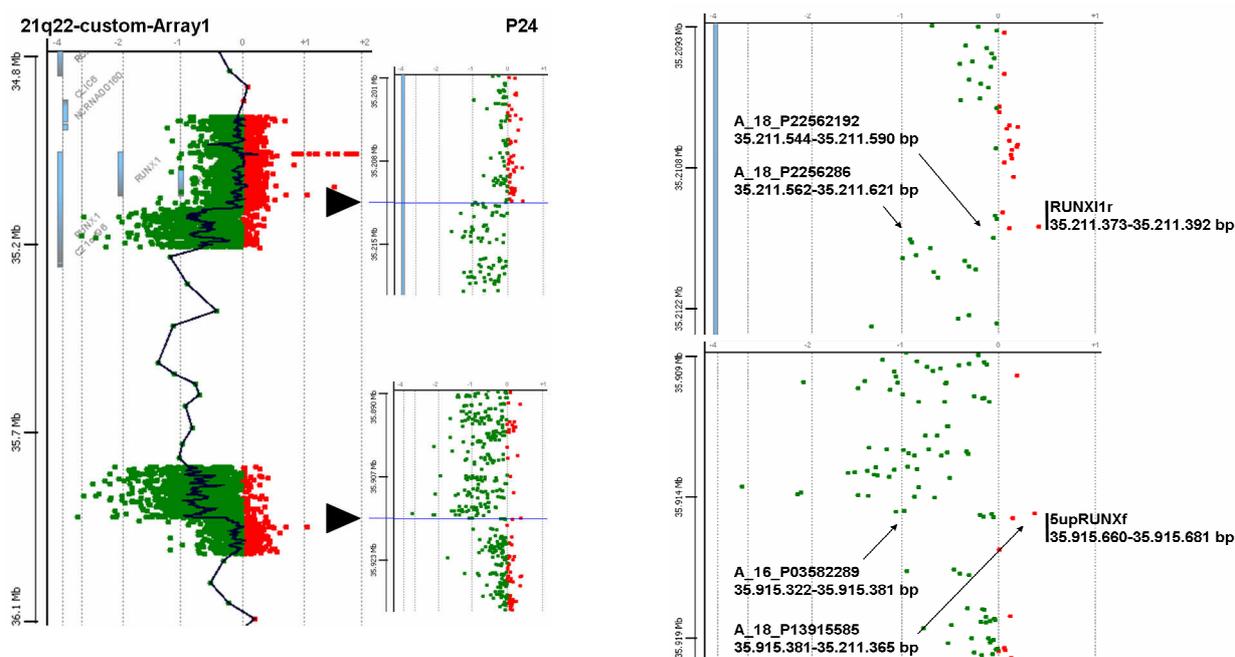
**Abbildung 5.2-24:** Schema der BAC-Sondenlagen und der mit aCGH detektierten Deletionen bei P24 und P39 (braune Linie = deletiert bei P39; schwarze Linie = deletiert bei P24). Das Vorliegen eines CNVs (blaue Linie) konnte ausgeschlossen werden.

Mittels der FISH-Analysen konnte in Fall P39 veranschaulicht werden, dass das per 44 k-aCGH identifizierte Ausmaß der Deletion ungenau war, denn entgegen der Erwartungen war auch die RP11-419G6-BAC-Sonde deletiert.

### 5.2.3.3 Molekulare Charakterisierung – 'custom'-Array1 und 'long range'-PCR

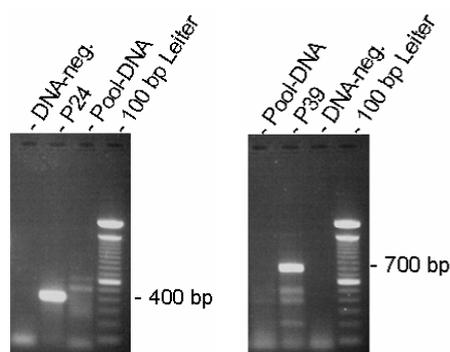
Zur genauen Eingrenzung der Bruchpunkte wurde der 'custom'-Array1 mit der 125 bp-Auflösung in den potentiellen Bruchpunktregionen erfolgreich eingesetzt.

Die Streuung der Oligonukleotide war erwartungsgemäß groß (vgl. Kapitel 5.2.1.5), jedoch war die Annäherung an die Bruchpunkte in beiden Fällen möglich. In der folgenden Abbildung 5.2-25 ist das 21q22-'custom'-Array1-Ergebnis von P24 beispielhaft dargestellt. Die Endpunktregionen wurden heraus vergrößert und die blauen Linien zeigen die vermuteten Bruchpunkte an. Die Bezeichner der Oligonukleotide und Primer inklusive ihrer genomischen Lokalisation wurden eingezeichnet. Die Lage der letzten normal hybridisierten Oligonukleotide wurde als Ausgangspunkt für das Primerdesign gewählt. In P24 wurde ausgehend vom letzten proximalen Oligonukleotid A\_18\_P22562192 (35.211.544-35.211.590 bp) der Primer RUNX1r (35.211.373-35.211.392 bp) und an das letzte distale Oligonukleotid A\_18\_P13915585 (35.915.381-35.211.365 bp) der Primer 5upRUNXf (35.915.660-35.915.681 bp) in eine Deletions-spezifische PCR eingesetzt.



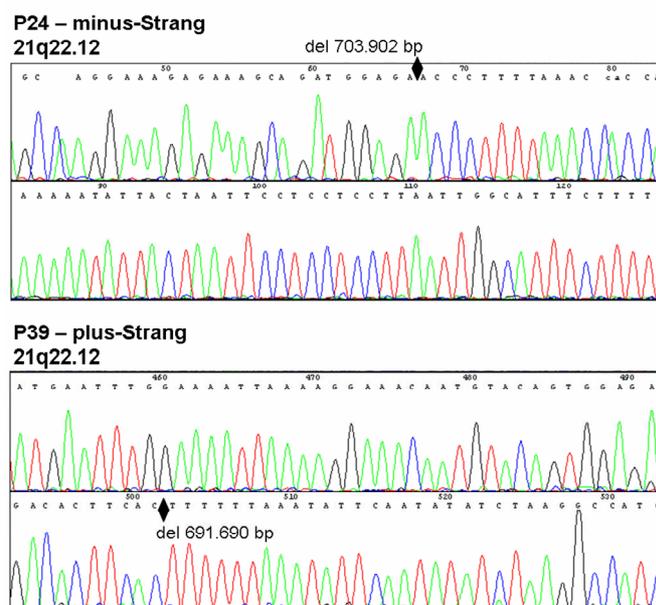
**Abbildung 5.2-25:** GW-Ergebnis der 21q-'custom'-Array1-Analyse von P24. Die Bruchpunktbereiche wurden heraus vergrößert (schwarze Dreiecke) und die vermuteten Endpunkte über die blaue Linie gekennzeichnet. Zur Planung der Deletions-spezifischen PCR wurden die genomischen Lokalisationen und Bezeichner der wichtigen Oligonukleotide und Primer beschriftet.

Sowohl bei P24 als auch bei P39 konnten mit den jeweils spezifischen PCR-Bedingungen Produkte amplifiziert werden, die in den Pool-DNA-Kontrollen nicht vorkamen.



**Abbildung 5.2-26:** Ergebnisse der 21q-Deletions-spezifischen PCRs bei P24 (links) und T39 (rechts), aufgetrennt auf einem 1% Agarosegel. In beiden Patienten-DNAs konnte ein deutliches Produkt amplifiziert werden, das in der Pool-DNA nicht sichtbar ist.

Das PCR-Produkt von P24 konnte direkt aufgereinigt und sequenziert werden, während das Produkt von P39 auf Grund von Nebenprodukten zuvor aus dem Gel extrahiert wurde. Das Sequenzierergebnis wurde über die Chromas Lite Software ausgewertet und konnte durch ein Blat-Alignment (UCSC) der erwarteten 21q22.12-Sequenz zugeordnet werden.

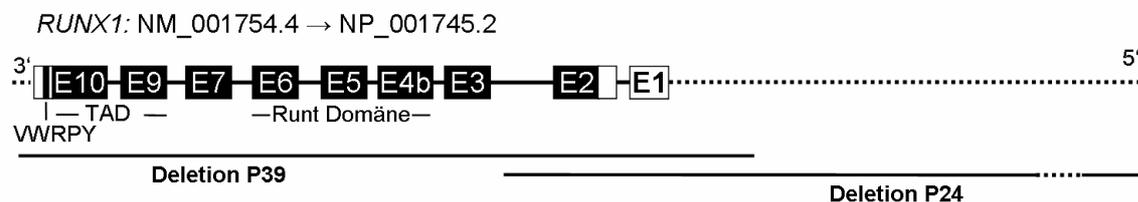


**Abbildung 5.2-27:** Ausschnitte der 21q-Produkt-Sequenzierungen von P24 und P39. Bei P24 konnte eine 703.902 bp-große und bei P39 eine 691.690 bp-große Deletion festgestellt werden. Zur Darstellung wurde die Chromas Lite-Software verwendet. Mit Hilfe der Blat-Funktion des UCSC-Genome Browsers wurden die Deletionsgrößen bestimmt.

#### 5.2.3.4 Bruchpunktbestimmung

Die exakte genomische Lokalisation der Deletion wurde mit Hilfe der Referenzsequenz (UCSC) bestimmt. In Fall P24 startete die Deletion auf 21q22.12 bei 35.211.465 bp und endete bei 35.915.368 bp. Somit hatte die Deletion eine Größe von knapp 704 kb. Am Bruchpunkt wurden die drei Nukleotide ACC eingebaut. Bei P39 reichte die Deletion von

35.072.226 bis 35.763.917 bp, war also knapp 692 kb groß. Im folgenden Schema wurde das Ausmaß der Deletionen bezogen auf die Patienten dargestellt.



**Abbildung 5.2-28:** Schema des Ausmaßes und der Lage der bei P39 und P24 identifizierten Deletion. Im Falle von P39 ist *RUNX1* (21q22.12, NCBI: Transkriptvariante bzw. Isoform NM\_001754.4 → NP\_001745.2, reverse Orientierung) komplett deletiert. In P24 umfasst die Deletion nur einen Teil des Introns 2, die Exons 2 und 1 (schwarz = kodierend, weiß = nicht kodierend) und einen größeren Bereich der 5'-stromaufwärts-Region (TAD = 'transactivating domain', VWRPY = spezifisches Aminosäuremotiv).

### 5.2.3.5 Zusatzaberrationen bei Patienten mit 21q22-Deletion

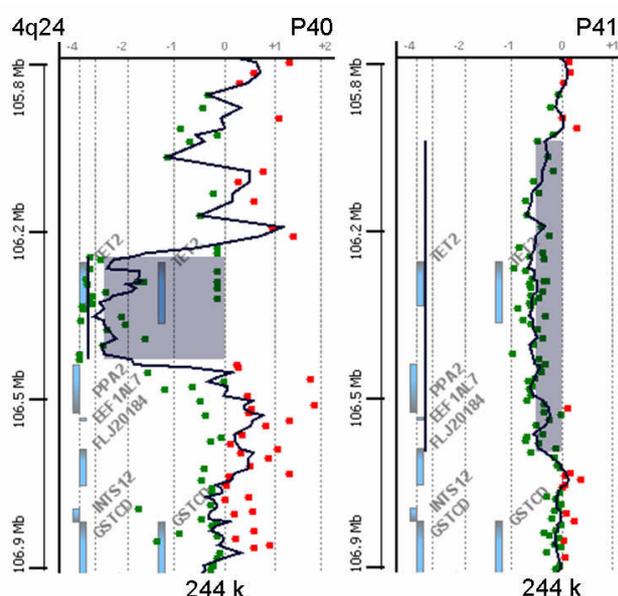
Bei beiden Patienten P39 und P24 konnten die submikroskopischen 21q22.12-Deletionen durch die Sequenzierung genau identifiziert werden. Weitere Aberrationen konnten bei keinem der beiden Patienten identifiziert werden. Patient P39 war als ein RAEB-2-MDS mit einem IPSS von Int-3 diagnostiziert und verstarb bereits 10 Monate nach dem Erstbefund. P24 litt entsprechend der FAB-Nomenklatur an RAEBt mit der Hochrisikostufe 3. Der WHO-Klassifikation zufolge wird dieses MDS-Stadium bereits als AML gewertet. Trotz einer versuchten autologen Stammzelltransplantation im Verlaufe der Erkrankung verstarb die Patientin nur 20 Monate nach der Erstdiagnose.

### 5.2.4 4q24-Deletionen bei zwei Patientenproben (P40, P41)

Zytogenetisch sichtbare Veränderungen von Chromosom 4 gehören nicht zu den bei MDS häufig vorkommenden Aberrationen. In dem untersuchten Kollektiv konnten jedoch zwei submikroskopische 4q24-Deletionen aufgedeckt werden, die das *TET2*-Gen umfassten. Zu Beginn der Doktorarbeit war dieses Gen auf 4q24 relativ unbekannt und nur unter *KIAA1546* in den geläufigen Genomdatenbanken gelistet. Mittlerweile gibt es eine größere Anzahl von Veröffentlichungen, in denen sowohl *TET2*-Deletionen als auch -Mutationen bei Erkrankungen myeloproliferativen Ursprungs beschrieben und bewertet werden.

### 5.2.4.1 Identifizierung der Deletionen – aCGH

Mit 244 k-Arrayanalysen konnten bei zwei Patienten 4q24-Deletionen identifiziert werden, bei P40 eine ca. 240 kb und bei P41 eine ca. 700 kb große (GLAD). Die Aberrationen unterschieden sich nicht nur in ihrer Größe, sondern auch in ihren mittleren  $\log_2$ Ratios. Im Fall von P40 wurde auf Grund des negativen  $\log_2$ Ratios von -4 eine homozygote Deletion in 100% der Zellen postuliert. In P41 wurde eine heterozygote Deletion in einer geringeren Anzahl von Zellen vermutet. Während bei P40 nur *TET2* als deletiert angezeigt wird, sind es bei P41 die 4 Gene, *TET2*, *PPA2*, *EEF1AL7* und partiell auch *FLJ20184* (Abbildung 5.2-29).



**Abbildung 5.2-29:** GW-Genansicht der mittels aCGH detektierten 4q24-Deletionen in P40 und P41. Die  $\log_2$ Ratio-Ausschläge spiegeln den Zustand der Kopienzahlen wider. In P40 scheint es sich um eine homozygote Deletion zu handeln, während bei P41 das geringe  $\log_2$ Ratio durch eine heterozygote Aberration in einem heterogenen Zellgemisch hervorgerufen worden sein könnte ('moving average window size' 50 kb).

**Tabelle 5.2-5:** Übersicht der von der GLAD-Analyse bestimmten Daten der 4q24-Deletionen nach aCGH.

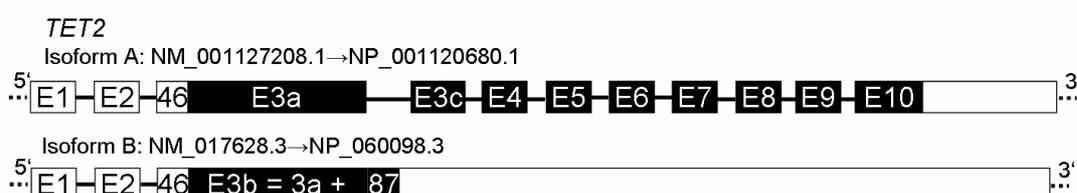
| Probe | Array-format (k) | Chr. | Max. Aberration (bp)    | Max. Größe (bp) | nOligo. | $\log_2$ Ratio |
|-------|------------------|------|-------------------------|-----------------|---------|----------------|
| P40   | 244              | 4q24 | 106.268.743-106.510.206 | 241.463         | 23      | -2,92          |
| P41   | 244              | 4q24 | 106.012.352-106.712.569 | 700.217         | 55      | -0,513         |

### 5.2.4.2 Verifizierung der Deletionen – FISH

Mit der BAC-Sonde RP11-111M12 (106,4 Mb) auf 4q24 konnte die Deletion in Fall P41 in 67% der Zellen heterozygot nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auf Grund der Sondenlage war bei P40 erwartungsgemäß kein Signalausfall zu beobachten.

### 5.2.4.3 *TET2*-Genstruktur

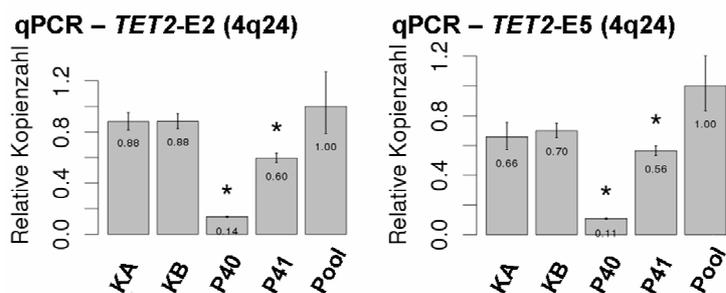
Von *TET2* sind verschiedene Transkriptvarianten und Isoformen bekannt. Die Informationen zu den beiden Hauptisoformen A und B wurden der NCBI-Datenbank entnommen. Die mRNA der Isoform A ist 9.766 Nukleotide groß, wobei die kodierende Region zwischen 387-6.395 bp liegt, so dass ein 2.002 Aminosäure-großes Protein exprimiert wird. Die Isoform B-mRNA ist mit einer Größe von 9.215 Nukleotiden nicht wesentlich kleiner, der von 387 bis 3884 bp Bereich kodiert allerdings nur für ein 1.165 Aminosäure-langes Protein.



**Abbildung 5.2-30:** Veranschaulichung der beiden Hauptisoformen des *TET2*-Gens als Exon-Intron-Schema (NCBI). Isoform A besteht aus den Exons (E) 1, 2, 3a, 3c-10. Isoform B umfasst die Exons 1, 2 und 3b. Die schwarz unterlegten Boxen markieren die Protein-relevanten Sequenzen.

### 5.2.4.4 Verifizierung der Deletionen – qPCR

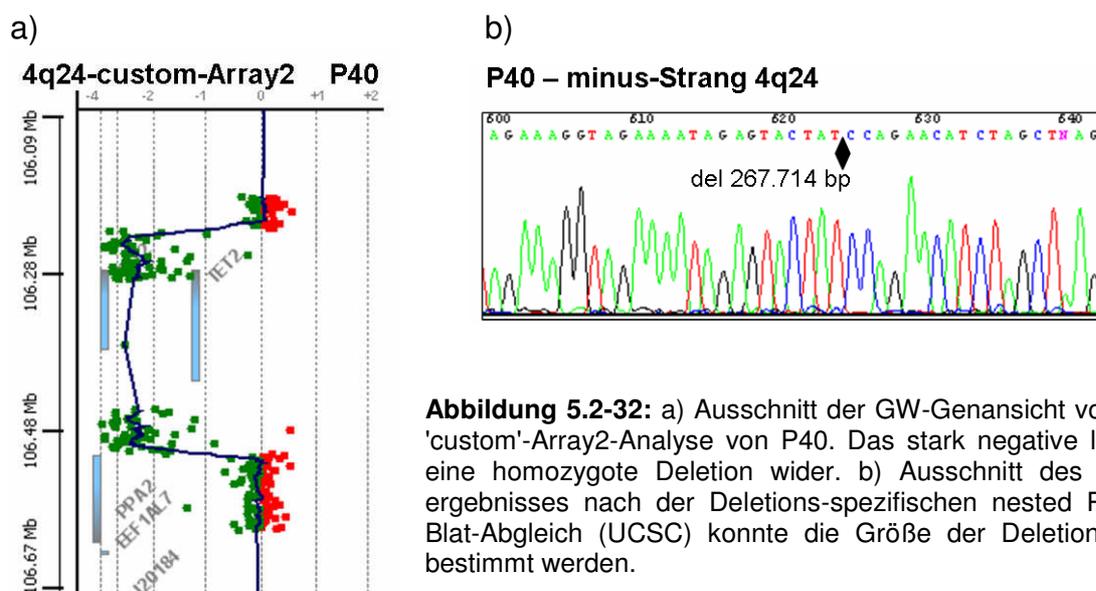
Zur weiteren Verifizierung der Deletionen wurden qPCR-Analysen mit DNA von P40 und P41 mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren (spezifisch für Exon 2 und Exon 5) für *TET2* durchgeführt. Sowohl mit der Exon 2-qPCR als auch der Exon 5-qPCR konnte in beiden Patientenproben, wie durch die aCGH-Ergebnisse vorhergesagt, die unterschiedlich reduzierte Kopienzahl von *TET2* relativ zu *PRNP* nachgewiesen werden. In P40 konnte die homozygote Deletion in annähernd 100% der Zellen bestätigt werden. P41 enthielt nur etwa 0,58 mal soviel DNA in dem untersuchten Bereich wie die Kontroll-Pool-DNA.



**Abbildung 5.2-31:** Relative *TET2*-Kopienzahlen (Primer in Exon 2 bzw. 5) der Proben P40 und P41 im Vergleich zu zwei Kontrollproben (KA, KB), bezogen auf das Referenz-gen *PRNP* und die Pool-Kalibrator-DNA. In die Berechnungen (M. Beier) der qPCR wurde jeweils ein Triplikat einbezogen ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.2.4.5 Molekulare Charakterisierung – 'custom'-Array2 und 'long range'-PCR

Mit Hilfe des 'custom'-Arrays2 konnte das 4q24-Deletionsausmaß von P40 exakt eingegrenzt und über eine 'long range'-PCR inklusive anschließender Sequenzierung der Bruchpunkt lokalisiert werden. (Eine Bruchpunktbestimmung von P41 war hier nicht vorgesehen.) Zwischen den beiden proximalen bzw. distalen Grenzoligonukleotiden lag ein Abschnitt von 3.044 bp bzw. 1.095 bp. Dies bedeutete, dass mit der Deletions-spezifischen 'long range'-PCR ein Produkt von höchstens 4.139 bp zuzüglich 284 bp auf Grund der Primerlokalisationen gebildet werden konnte. Im ersten PCR-Durchgang mit dem Elongaseenzym war ein schwaches Produkt im Gel zwischen 3.000 und 4.000 bp sichtbar. Mit nested-Primern wurde versucht die Produktausbeute zu steigern und gleichzeitig die Produktgröße für eine anschließende Sequenzierung zu verringern. In diesem Ansatz konnte ein etwa 1,5 kb-Produkt amplifiziert werden.



### 5.2.4.6 Bruchpunktbestimmung

Durch den Vergleich mit der Referenzsequenz konnte die genaue Position der 4q24-Deletion in P40 ermittelt werden. Sie reicht von 106.240.481 bis 106.508.196 bp, ist also knapp 268 kb groß. Die Bruchstellen flankieren das *TET2*-Gen mit einem Abstand von 46,9 kb proximal und 124,8 kb distal in Gen-leeren Regionen.

### 5.2.4.7 *TET2*-Mutationsanalyse von insgesamt 9 Patienten – DHPLC

Auf Grund der fehlenden Informationen zur Rolle von *TET2* zu Beginn dieser Arbeit und einer möglichen Tumorsuppressorfunktion wurde eine vollständige Mutationsanalyse des Gens bei P41 durchgeführt. Hierzu wurde die Methode der DHPLC ('denaturing high-performance liquid chromatography') genutzt. Sie beruht auf dem veränderten Schmelzverhalten von Heteroduplices von Patientenproben gegenüber Homoduplices von Kontrollproben. Die DHPLC wurde als Vorscreeningstest eingesetzt, so dass im Anschluss nur die DNA-Fragmente sequenziert werden mussten, die ein auffälliges Schmelzprofil zeigten.

#### Primerdesign und -Etablierung der DHPLC mit Kontroll-DNAs

Auf Grund der Struktur und Größe des *TET2*-Gens mussten 22 Primerpaare in Folge, jeweils überlappend, etabliert werden, um die gesamte kodierende Sequenz analysieren zu können. Hierzu wurden die Kontroll-DNAs KA (♀) und KC (♂) und (u. a.) verschiedene 'touchdown'-PCR-Varianten eingesetzt.

#### Mutationsanalyse von P41 und 8 weiteren Proben

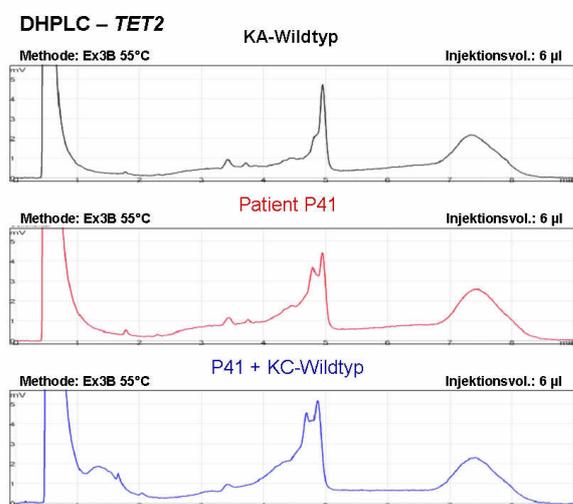
Pro Amplikon (Exon) wurden bei P41 (heterozygote Deletion) mindestens drei Proben analysiert: die reine Patienten-DNA P41, eine Misch-DNA aus P41 und des als optimal bestimmten 1. Wildtyps und die 2. reine Wildtyp-DNA. Ein auffälliges Schmelzverhalten wurde bei den folgenden aufgeführten Exon-spezifischen PCR-Produkten beobachtet.

**Tabelle 5.2-6:** Übersicht der Proben, die bei einer spezifischen DHPLC-Analysetemperatur ein auffälliges Schmelzverhalten zeigten.

| PCR-Produkt | <i>TET2</i> -Exon | Auffällige Proben         | Temperatur °C  |
|-------------|-------------------|---------------------------|----------------|
| <b>3Aa</b>  | 3A                | P41-KC-Mix / P41          | 51             |
| <b>3Ab</b>  | 3A                | P41-KA-Mix / P41          | 57,5           |
| <b>3B</b>   | 3B                | P41-KC-Mix / P41          | 56 / 55        |
| <b>4</b>    | 4                 | P41-KC-Mix / P41 / KA     | 53 / 55        |
| <b>9</b>    | 5                 | P41-KA-Mix / P41 / KC     | 54 / 57,5 / 59 |
| <b>10b</b>  | 10                | P41-KA / P41-KC / KA / KC | 57             |
| <b>10c</b>  | 10                | P41-KC / P41 / KA         | 58,5           |

Daraufhin wurden die PCRs der auffälligen Proben wiederholt, die Produkte aufgereinigt und sequenziert. Nicht nur die Patientenproben, sondern auch die Wildtypproben der Mischung und die ebenfalls auffälligen Wildtypproben wurden auf SNPs überprüft. Als

Beispiel für ein auffälliges DHPLC-Profil bei der Patientenprobe im Vergleich zur Wildtypprobe, wird die *TET2*-Mutationsanalyse von Exon 3B aufgeführt.



**Abbildung 5.2-33:** Ergebnis der *TET2*-DHPLC-Analysen des Exon-3B-Amplikons. Gezeigt sind nur die bei 55°C erhaltenen Schmelzkurven. Das Injektionsvolumen betrug hier einheitlich 6 µl. Bei Vergleich der drei Profile fällt auf, dass sich sowohl die Patient-Wildtyp-Mischprobe als auch die Patientenprobe (P41) allein von der Wildtypprobe (KA) unterscheiden.

Die anschließende Sequenzierung des Exons 3B-Produktes zeigte eine Mutation in Form eines heterozygoten Basenaustausches c.3404G>A. Diese 'missense'-Mutation führt auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch von Cystein nach Tyrosin an der Stelle 1.135 (p.C1.135Y). Die Mutation befindet sich 6 Nukleotide vor dem Ende von Exon 3A von *TET2* und konnte auf Grund der überlappenden Amplikons auch im Produkt des Exons 3B detektiert werden.

Frau E. Höricht analysierte entsprechend 8 weitere Proben des MDS-Kollektives. Keine der Proben zeigte in den aCGH-Analysen zuvor eine *TET2*-Deletion und wurde deshalb ungemischt in die DHPLC-Mutationstests eingesetzt.

Insgesamt wurden neben den detektierten, bereits bekannten SNP-Polymorphismen (NCBI) bei 4 Patienten 4 Mutationen, drei 'missense' und eine stille aufgedeckt.

**Tabelle 5.2-7:** Auflistung aller gefundenen und bestätigten Mutationen und SNPs der mittels DHPLC in *TET2* analysierten 9 Patienten (P41 mit heterozygoter Deletion) und zwei Normalkontrollen (KA, KC).

| Probe | Amplikon | Exon / Intron | cDNA-Mutation             | Hetero- / Homozygot | Protein-Mutation | Beurteilung     | Bekannter SNP (NCBI)      |
|-------|----------|---------------|---------------------------|---------------------|------------------|-----------------|---------------------------|
| P69   | 3Aa      | E3A           | c.86C>G                   | hetero.             | p.P29R           | miss.           | SNP rs12498609            |
| P69   | 3Aa      | E3A           | c.1-110_-<br>109insGATA   | hetero.             | -                | -               | ähnlich SNP<br>rs10569647 |
| P41   | 3Aa      | E3Ant         | c.1-93_-<br>86delATAGATAG | homo.<br>(~100%)    | -                | frame-<br>shift | ähnlich SNP<br>rs10569647 |
| P29   | 3Ad      | E3A           | c.1.088C>T                | hetero.             | p.P363L          | miss.           | SNP rs17253672            |
| P41   | 3Aj/3B   | E3A           | c.3.404G>A                | hetero.             | p.C1.135Y        | <b>miss.</b>    | <b>unbekannt</b>          |
| KA    | 4        | I4-5          | c.3.594+200T>G            | hetero.             | -                | -               | SNP rs55838312            |
| P41   | 4        | I4-5          | c.3.594+200T>G            | homo.<br>(~100%)    | -                | -               | SNP rs55838312            |

| Probe | Amplikon | Exon / Intron | cDNA-Mutation  | Hetero- / Homozygot | Protein-Mutation | Beurteilung | Bekannter SNP (NCBI) |
|-------|----------|---------------|----------------|---------------------|------------------|-------------|----------------------|
| P42   | 4        | I4-5          | c.3.594+200T>G | hetero.             | -                | -           | SNP rs55838312       |
| P19   | 5        | I5-6          | c.3.803+45G>A  | hetero.             | -                | -           | SNP rs17319679       |
| P49   | 9        | E9            | c.4.251C>T     | hetero.             | p.L1.418S        | miss.       | unbekannt            |
| P42   | 9        | E9            | c.4.513G>A     | hetero.             | p.A1.505T        | miss.       | unbekannt            |
| P29   | 10a      | E10           | c.4.872G>A     | hetero.             | p.Q1.624Q        | silent      | unbekannt            |
| P35   | 10b      | E10           | c.5.103G>A     | hetero.             | p.M1.701I        | miss.       | SNP rs62623390       |
| P41   | 10b      | E10           | c.5.162T>G     | homo.<br>(*~70%)    | p.L1.721W        | miss.       | SNP rs34402524       |
| KC    | 10b      | E10           | c.5.162T>G     | hetero.             | p.L1.721W        | miss.       | SNP rs34402524       |
| P35   | 10b      | E10           | c.5.284A>G     | homo.               | p.I1.762V        | miss.       | SNP rs2454206        |
| P41   | 10b/c    | E10           | c.5.284A>G     | homo.<br>(*~70%)    | p.I1.762V        | miss.       | SNP rs2454206        |
| KA    | 10b/c    | E10           | c.5.284A>G     | hetero.             | p.I1.762V        | miss.       | SNP rs2454206        |

\*homozygote Substitution zu ca. 70%; auf Grund des heterogenen Zellgemischs

#### 5.2.4.8 Zusatzaberrationen bei Patienten mit 4q24-Deletion

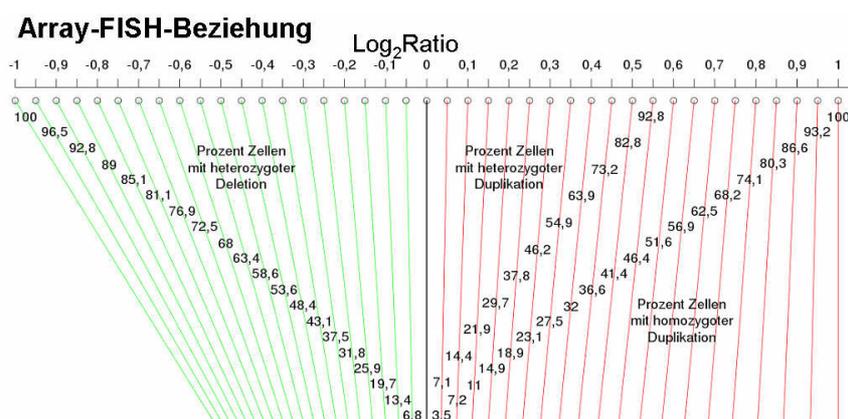
Mit Hilfe der aCGH konnten bei P40 eine homozygote und bei P41 eine heterozygote Deletion auf 4q24 identifiziert werden. Zudem wurden in P41 und in drei weiteren Patienten *TET2*-Mutationen aufgedeckt. Die übrigen Chromosomen der aCGH-Auswertungen beider Patienten konnten nicht als unauffällig beschrieben werden. Bei P40 wurde neben der 4q24-Deletion ein über 6,6 Mb großer genomischer Verlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 mittels FISH verifiziert und auch die Bruchpunkte bestimmt (Tabelle 5.5-1). Die Arrayanalyse P41 zeigte allgemein ein sehr unregelmäßiges log<sub>2</sub>Ratio-Profil, innerhalb dieser Arbeit konnte eine weitere Aberration in 5q13 (vgl. Tabelle 5.9-3) bestätigt werden. Patient P40, 57 Jahre bei Erstdiagnose, wurde mit einer RAEBt/AML diagnostiziert und starb bereits 10 Monate nach Diagnosestellung. Der Patient P41 hatte ein Niedrigrisiko-RCMD, überlebte jedoch nur 3 Monate.

### 5.3 Optimierung des Datenmanagements

Da die Auswertung von hochauflösenden 105 aCGH-Analysen eine riesige Datenmenge hervorbrachte, wurde es nötig, unterschiedliche Aspekte zu beachten, bevor eine computergestützte Filterung nach gewünschten Kriterien erfolgen konnte. Die Gefahr bei einer automatischen Auswertung echte Aberrationen zu verlieren (Falsch-Negative) bzw.

Falsch-Positive zu verfolgen sollte weitestgehend eingeschränkt werden. Neben den rekurrenten Aberrationen sollten auch so viele einzelne Aberrationen wie möglich mit anderen Methoden verifiziert werden. Um diese aus der Datensammlung von M. Beier herauszufiltern, wurden einige Kriterien, die zuvor theoretisch oder praktisch überprüft wurden, aufgestellt.

a) Bevorzugt untersucht werden sollten genomische Imbalancen, deren mittleres  $\log_2$ Ratio einen gesetzten Schwellenwert überschritt. Aus aCGH-Voranalysen mit Verdünnungsreihen der Firma Agilent selber war bekannt, dass dieselbe Aberration auch noch bis zu einer 70%igen 'Verdünnung' mit normal-DNA zuverlässig detektierbar ist (de Witte *et al.*, 2006). In diesem Projekt handelte es sich um heterogene Zellgemische mit einem unterschiedlich hohen Anteil an Tumorzellen. Von M. Beier wurde deshalb eine Beziehung zwischen dem Array- $\log_2$ Ratio der Aberration und dem Prozentsatz an theoretisch betroffenen Zellen berechnet und graphisch dargestellt. Anhand dieser wurde ein Schwellenwert von  $\pm 0,25$   $\log_2$ Ratio bestimmt, der theoretisch einer heterozygoten Deletion von 31,8% der Zellen und einer heterozygoten Duplikation von 37,8% der Zellen entspricht. Dieses Filterkriterium wurde auf alle Arraydaten der statistischen GLAD-Auswertung angewandt. Bei 100% Tumorzellen mit heterozygoter Deletion bzw. Duplikation würde man ein  $\log_2$ Ratio von -1 bzw. +0,59 erwarten.



**Abbildung 5.3-1:** Darstellung des Zusammenhangs von Array- $\log_2$  Ratio einer Aberration und dem Prozentsatz an betroffenen Zellen, aus deren Gemisch die Test-DNA isoliert wurde (erstellt von M. Beier mit Hilfe der Programmiersprache 'R').

Dies bedeutet aber nicht, dass man mit der Technik der Agilent-aCGH nicht doch Aberrationen mit einem geringeren  $\log_2$ Ratio als 0,25 aufdecken könnte. Deshalb wurde zusätzlich immer das Erkennen einer Aberration mit dem ADM-2-Algorithmus der GW-Software von Agilent kontrolliert.

b) Zudem wurde festgelegt, dass mindestens zwei aufeinander folgende Oligonukleotide in ihrem Hybridisierungsverhältnis verschoben sein mussten, um als Aberration gewertet zu werden. Erneut konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch dieses Kriterium Aberrationen übersehen werden. Die Festlegung einer minimalen Anzahl an aberranten Oligonukleotiden in Folge hatte erheblichen Einfluss auf die Menge an angezeigten Aberrationen und deren Größe. Für eine 2-Oligonukleotid-Schwelle liegt die Mindest-detektionsgrenze bei Einsatz von 244 k-Arrays bei 26 kb, von 105 k-Arrays bei 65,1 kb und von 44 k-Arrays bei 129 kb.

c) CNVs bei Normalpersonen werden mit den neuen hochauflösenden Techniken mittlerweile fast im gesamten Genom gefunden und in die DGV als dynamischer, relativ zeitnaher Prozess aufgenommen. In die Datenbank fließen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, die unterschiedliche Methoden und Probandenkollektive verwendeten. Auch in dieser Arbeit wurden viele, in der DGV bereits beschriebene, CNVs über die aCGH-Analysen detektiert und stichpunktartig auch verifiziert (nicht gezeigt). Imbalancen, die zu 100% mit einem bekannten CNV überlappten wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Überschneidungen ab 50% wurden gesondert betrachtet, z. B. ist ein großer CNV bekannt oder nur kleine, liegen neben oder im CNV wichtige Gene oder ist ein Gen-leerer Bereich betroffen usw. Da die DGV regelmäßig aktualisiert wird, wurden zu Beginn der Doktorarbeit auch Imbalancen analysiert, die mittlerweile als CNV bekannt wurden.

d) Weiterhin wurde das Y-Chromosom von der Auswertung ausgeschlossen. Der der statistischen GLAD-Auswertung zugrunde liegende Algorithmus war nicht fähig, verschobene  $\log_2$ Ratio-Level über dem Zentromer, welches selber nicht durch Oligonukleotide repräsentiert wird, auszugleichen. Hier angezeigte 'p-Arm/q-Arm-Sprünge' wurden deshalb ebenfalls eliminiert. Dafür wurden numerische Imbalancen, die ein komplettes Chromosom betrafen und der GLAD-Auswertung auf Grund von fehlenden Levelunterschieden entgingen, mit Hilfe der Angaben der Agilent-Auswertung eingefügt.

e) Trotz der o. g. Kriterien fielen manche Patientenanalysen, sowohl bei Agilent als auch in der GLAD-Tabelle, durch stark schwankende  $\log_2$ Ratio-Werte knapp über der Schwelle von 0,25 auf. Dadurch gab es (wenige) Patienten, bei denen mehr als 50 Aberrationen angezeigt wurden, neben solchen, die gar keine Imbalancen hatten. Über stichpunktartige FISH-Kontrollen und qPCRs in diesen Bereichen konnten einige als 'echte' Aberrationen

ausgeschlossen werden (s. Kapitel 5.8.1), manche ließen sich aber auch bestätigen. Subtelomer-MLPA-Analysen bei drei Patienten konnten angezeigte Imbalancen nicht nachweisen (vgl. Kapitel 5.8.2). Überlegungen, die  $\log_2$ Ratio-Schwelle bei 'zackeligen' aCGH-Profilen individuell anzupassen, wurde in dieser Arbeit nicht umgesetzt.

f) Um zu untersuchen, welchen Einfluss die vorherige Kultivierung der Zellen, aus denen die DNA für die Arrayuntersuchungen gewonnen wurde, auf das Ergebnis hat, wurden 7 aCGH-Analysen mit DNA aus unkultivierten Zellen derselben Patienten durchgeführt und mit den ersteren verglichen. Da von den wenigsten der untersuchten Patientenproben auch Zellen direkt eingefroren wurden, standen nur diese wenigen Proben für die Analyse zur Verfügung (s. Kapitel 5.6).

g) Weiterhin stand von keinem der Patienten normale DNA zur Verfügung, um evtl. neue, unbekannte CNVs von tumorspezifischen Aberrationen abzugrenzen. Hierzu wäre eine Vergleichsanalyse mit Material aus z. B. Hautzellen des Patienten nötig gewesen. Möglich wäre es auch aus dem Blut des Patienten CD3<sup>+</sup>-Zellen ('cluster of differentiation'), also alle T-Zellen und deren Subtypen, die nicht zur MDS-Pathogenese beitragen, zu separieren, DNA zu isolieren und eine Vergleichsanalyse durchzuführen. Die Methode der Separation wurde für die Zukunft anhand von Beispielmateriale etabliert (s. Kapitel 5.7).

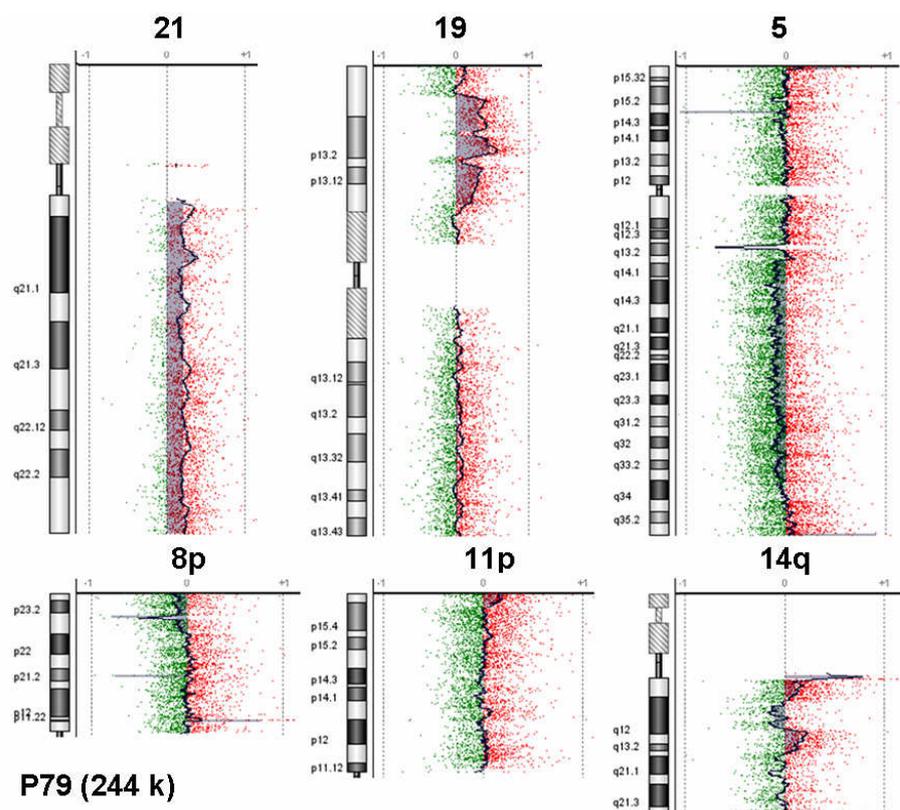
## **5.4 Weitere mit aCGH verifizierte Aberrationen**

Mit Hilfe der festgelegten Parameter- und Filterkriterien (vgl. 5.3) wurden die Rohdaten aller 105 aCGH-Analysen stringent bereinigt. Weitere individuelle Aberrationen wurden verifiziert und die Bruchpunkte, wo möglich, über den 'custom'-Array2 eingegrenzt und bestimmt. Einige interessante Beispiele werden im Folgenden vorgestellt. Eine Übersichtstabelle aller Aberrationen wird in Kapitel 5.9 aufgeführt.

### **5.4.1 Komplex aberranter Fall (P79)**

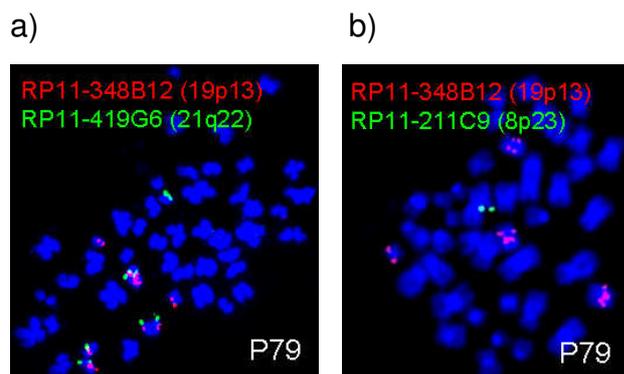
Im Fall von Patient P79 konnten mit Hilfe einer 244 k-aCGH-Analyse gleich mehrere Aberrationen, die zudem in Translokationen involviert waren, aufgedeckt und verifiziert

werden: ein Zugewinn des gesamten Chromosoms 21, ein Zugewinn von mindestens zwei Regionen des kurzen Armes von Chromosom 19 und ein Verlust von 8p23. Weiterhin vom ADM-2-Algorithmus (unter der  $\log_2$ Ratio-Schwelle von  $\pm 0,25$ ) detektiert und auf Grund von Materialmangel nicht verifiziert wurden: eine große interstitielle 5q-Deletion, ein Zugewinn von 11p15 und eine 14q12-Deletion mit folgender 14q13-Duplikation.



**Abbildung 5.4-1:** GW-Ansichten ('moving average window size' 1 Mb) der Chromosomenregionen von P79, die nach der 244 k-Arrayanalyse Imbalancen aufwiesen. Die Auswertung zeigt einen Chromosom 21-Zugewinn, einen unterbrochenen 19p-Zugewinn, eine interstitielle 5q-Deletion mit sehr geringem  $\log_2$ Ratio, eine 8p23-Deletion, die das Telomer einschließt und einen bekannten CNV beherbergt, eine 11p-Duplikation und eine 14q-Deletion mit folgender Duplikation.

Eine FISH-Verifizierung der Chromosomenimbilanzen 21, 19 und 8 gelang mittels mehrerer Sondenkombination. In 17% der Zellen handelte es sich um ein gleichzeitiges Auftreten aller drei Aberrationen mit Mehrfachamplifikationen von 21 und 19p, wobei mehrere derivative Chromosomen mit Material von 21 und 19 sichtbar wurden. Der Einsatz derselben FISH-Sonden in der Verlaufsprobe konnte diesen Zustand bestätigen und zeigte zudem eine Expansion dieses aberranten Klon auf 43%.



**Abbildung 5.4-2:** Die FISH-Bilder zeigen Metaphasen des Falls P79. Es wurde jeweils eine 19p13-Sonde (rot) mit einer grünen a) 21q22- bzw. b) 8p23-Sonde kombiniert. In a) fallen drei Chromosomen mit beiden Signalfarben für 19 und 21 und ein zusätzliches Markerchromosom mit einem 19er Signal auf. In b) wird deutlich, dass die Chromosomen teilweise zwei Signale für 19p tragen und dieselbe Metaphase eine 8p23-Deletion aufweist.

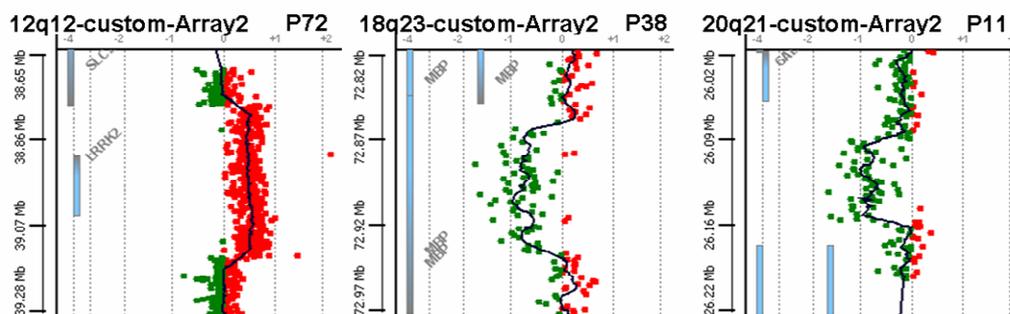
Die einzige Verlaufsprüfung, 4 Monate nach Erstdiagnose, wies bereits den folgenden komplexen Karyotyp auf, 46,XY[12]/45,XY,del(5)(q14q22),add(13)(p11),-14,-15,-17,-19,-21,+4mar[10]. Zehn Metaphasen trugen jeweils 8 identische Aberrationen, während 12 Mitosen völlig unauffällig waren. Bei Vergleich des bei der Verlaufsprüfung identifizierten Karyotyps mit den aCGH- und FISH-Analysen der Erstdiagnoseprobe, konnte eine eindeutige Korrelation gefunden werden. Eine weitere Aufklärung des Falls konnte nicht erfolgen, da kein ausreichendes Material zur Verfügung stand.

Bei diesem Patienten, wäre er schon damals zusätzlich zur zytogenetischen Analyse per aCGH und FISH untersucht worden, hätte man seinen auffälligen Karyotyp bereits früher diagnostiziert. So wurde der RAEB-1-Patient nur in Prognosestufe Int-1 eingruppiert, obwohl er mit einem komplexen Karyotyp in eine höhere Risikogruppe hätte eingestuft werden sollen. Er verstarb bereits nach 5-monatiger Erkrankung im Alter von 57 Jahren.

#### 5.4.2 Kleine Aberrationen (P72, P38, P11)

Mit Hilfe von aCGH-Analysen wurden nicht nur große und viele Gene umfassende Aberrationen nachgewiesen, sondern auch Ein-Gen-Aberrationen, nur ein bis mehrere Exons umfassende Aberrationen innerhalb oder am Ende eines Gens und Aberrationen in Gen-leeren Bereichen. Durch den designten 'custom'-Array2 konnten die involvierten Regionen noch deutlicher abgegrenzt und teilweise die Bruchpunkte bestimmt werden.

Die Größen der in Abbildung 5.4-2 beispielhaft gezeigten Imbalancen wurden per 244 k-Analyse auf 361,4 kb, 72,1 kb und auf 76,7 kb bestimmt. Mittels des eingesetzten hochauflösenden 'custom'-Arrays2 konnten die Aberrationsgrößen um -1,2%, +1,4% und -18,5% korrigiert werden.



**Abbildung 5.4-3:** Drei Beispiele für Aberrationen, die auf ein Gen (*LRRK2*, P72), ein Exon (*MBP*, P38) oder einen Gen-leeren Bereich (P11) beschränkt blieben und mittels der 'custom'-Array2-Analyse relativ genau lokalisiert werden konnten. Gezeigt sind die Ausschnitte der GW-Genansichten mit 'moving average window sizes' zwischen 50 und 10 kb.

## 5.5 Bruchpunktidentifizierungen, Gene und Sequenzanalysen

Neben den bereits beschriebenen drei molekularen Bruchpunktbestimmungen (4q24, 2x 21q22) konnten 7 weitere Bruchpunkte exakt aufgeschlüsselt werden. Alle Proben der betroffenen Fälle wurden zuvor auf dem 'custom'-Array2 hybridisiert. Durch anschließende Deletions-spezifische PCRs, nested-PCRs, Sequenzierungen und Blat-Analysen konnte die genaue Lokalisation des molekularen Bruchpunktes bestimmt und mit dem postulierten der GLAD-Auswertung verglichen werden.

Die Deletionsgrößen konnten durch die Bruchpunktbestimmung in 5 von insgesamt 10 Fällen im Vergleich zu den postulierten Größen reduziert werden, in 5 Fällen zeigte sich eine größere Aberration als angenommen. In wiederum 5 von den 10 Fällen fand mindestens einer der beiden Brüche (proximal und/oder distal) in einem bekannten Gen statt. Die genaueren Informationen wurden der UCSC- und NCBI-Datenbanken ('genome build' 18, 02/10) entnommen. In Patient P30 konnte der distale Bruch durch die Deletion in Chromosomenbande 2p21 in Intron 1 des *TTC7A* ('*tetratricopeptide repeat domain 7A*'; NCBI: NM\_020458.2 → NP\_065191.2)-Gens identifiziert werden. Dies hatte die Konsequenz, dass, neben dem kompletten Verlust des *MCFD2* ('*multiple coagulation factor deficiency 2*'; NCBI: NM\_139279.4 → NP\_644808.1)-Gens auf 2p21, das kodierende Exon 1 von *TTC7A* ebenfalls deletiert vorlag.

Bei Patient P60 fanden beide Bruchereignisse im *AUTS2* ('*autism susceptibility candidate 2*'; NCBI: NM\_015570.2 → NP\_056385.1)-Gen auf 7q11 statt; proximal in Intron 1 und distal in Intron 2, so dass nur das kodierende Exon 2 von der Deletion betroffen war.

Sowohl in der NCBI- als auch der UCSC-Datenbank ist keine derartige Genvariante beschrieben. Das Leseraster des Proteins bleibt trotz des Exon 2-'skippings' erhalten.

Patient P30 zeigte einen partiellen Verlust des *RAB27A* ('member RAS oncogene family'; NCBI: NM\_004580.3 → NP\_004571.2)-Gens auf 15q21. Das Gen hat eine reverse Orientierung und 4 verschiedene Transkriptvarianten kodieren für dieselbe Proteinisoform. Bezogen auf die längste Transkriptvariante (nicht kodierendes-E3a, E5-E9) findet der proximale Bruch der Deletion in Intron 8 und der distale Bruch in Intron 3a statt. Hierdurch wurden die Exons 5-8 deletiert, das kodierende letzte Exon 9 blieb unberührt.

Für die Lage der *RUNX1*-Deletion (21q22) in P24 vgl. Kapitel 5.2.3.4.

**Tabelle 5.5-1:** Übersicht über alle in dieser Arbeit molekular bestimmten Bruchpunkte im Vergleich zu den über die erste aCGH-Analyse angenäherten Lokalisationen der identifizierten Deletionen. In 4 von 10 Proben wurden durch den Bruch Gene (proximal und / oder distal) unterbrochen.

| Pro-be | Array-format (k) | Chr.    | Postulierte Lokalisation (bp) | Post. Grös-se (kb) | Exakte Lokalisation (bp) | Exakte Größe (bp) | Gene prox./dist.                 |
|--------|------------------|---------|-------------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|----------------------------------|
| P40    | 244              | 2p24~23 | 20.750.003-27.373.948         | 6.624,0            | 20.737.064-27.440.152    | 6.703,0           |                                  |
| P30    | 244              | 2p21    | 46.915.926-47.027.643         | 111,7              | 46.955.256-47.027.569    | 72,3              | - / <i>TTC7A</i>                 |
| P40    | 244              | 4q24    | 106.268.743-106.510.206       | 241,5              | 106.240.481-106.508.196  | 267,7             |                                  |
| P30    | 244              | 5p15    | 12.722.791-12.801.900         | 79,1               | 12.728.481-12.794.519    | 66,1+<br>GAAG     |                                  |
| P60    | 244              | 7q11    | 68.968.733-69.033.774         | 65                 | 68.969.150-69.028.313    | 59,2              | <i>AUTS2</i> /<br><i>AUTS2</i>   |
| P85    | 44               | 7q34    | 142.470.028-142.630.072       | 160                | 142.534.968-142.604.034  | 69,1              |                                  |
| P30    | 244              | 15q21   | 53.288.498-53.329.341         | 40,8               | 53.291.217-53.340.104    | 48,9              | <i>RAB27A</i> /<br><i>RAB27A</i> |
| P11    | 244              | 21q21   | 26.085.648-26.162.377         | 76,7               | 26.095.020-26.155.885    | 60,9              |                                  |
| P39    | 44               | 21q22   | 35.123.493-35.333.366         | 209,9              | 35.072.226-35.763.917    | 691,7             |                                  |
| P24    | 244              | 21q22   | 35.201.032-35.911.372         | 710,3              | 35.211.465-35.915.368    | 703,9+<br>ACC     | <i>RUNX1</i> / -                 |

Durch eine Sequenzanalyse wurde in der direkten Umgebung aller charakterisierten Bruchpunkte nach spezifischen Sequenzmotiven gesucht. Dazu wurden die proximalen und distalen Bruchpunktsequenzen (je ca. 60 Nukleotide) miteinander verglichen und Homologien markiert. Im Folgenden werden diese Analysen dargestellt, wobei die durch die Sequenzierung bestimmte, fusionierte neue Sequenz zwischen der proximalen und distalen Sequenz aufgeführt ist.

P40 2p24~23: 20.737.064 – 27.440.152 = 6.703.087 bp

prox.: AGTTCAGGTGGCACCCGGTGGGAGGGGTGT TGTCTTGACAGTGACTGTTCCCTTCCATG  
 fus.: **AGTTCAGGTGGCACCCGGTGGGAGGGGTGT TCAACAAATGCTAATTTATAAGGTTAGGAC**  
 dist.: CAGAACAGTTTCTGACACACAGTTAAATAT TCAACAAATGCTAATTTATAAGGTTAGGAC

P30 2p21: 46.955.256 - 47.027.569 = 72.312 bp

prox.: GGCCTTCCTCTATTTCCCCACGGAGGGGAC CTCTTCCCCTCTGGGTACCTCCCTCTTT  
 fus.: **GGCCTTCCTCTATTTCCCCACGGAGGGGAC CATGGTAAACAAACAACAAGTAGATTGAGT**  
 dist.: CCTGCTGAGTGTCTGGCCATGTTTGTTTAC CATGGTAAACAAACAACAAGTAGATTGAGT

P40 4q24: 106.240.481- 106.508.196 = 267.714 bp

prox.: TTCATCAATTATCTTAGCTAGATGTTCTGG ATAACTTGTGCAACTTCTACATTAGCACT  
 fus.: **TTCATCAATTATCTTAGCTAGATGTTCTGG ATAGTACTCTATTTTCTACCTTTCTACAAG**  
 dist.: TCCAGCTAACTTGTTACAACATTGCAATA ATAGTACTCTATTTTCTACCTTTCTACAAG

P30 5p15: 12.728.481 – 12.794.519 = 66.037 bp + GAAG

prox.: TCTTGTGGACTTGTACTGTTGGGAAATGA GTCCTAA<sup>GAAG</sup>AAATGTCTGAACTCTCATTTGAAG  
 fus.: **TCTTGTGGACTTGTACTGTTGGGAAATGAGAAG TAA<sup>GAAG</sup>GGATGTTACTGAATTGCTTCAGTC**  
 dist.: AGCAAGAGA<sup>GAAG</sup>ACTAGAATTAAGGGGAACC TAA<sup>GAAG</sup>GGATGTTACTGAATTGCTTCAGTCTCA

P60 7q11: 68.969.150 – 69.028.313 = 59.162 bp

prox.: GCCTTCATTGGCTCCCCATTGCCCAAAAAT GAATTCCAAACCTCCCAGTCTGGTGATTA  
 fus.: **GCCTTCATTGGCTCCCCATTGCCCAAAAAT ACCCCCAAATATTACTTTAGCAGCACCCCA**  
 dist.: TCTAATATAGCCTTTTGATGCTATAAATTT ACCCCCAAATATTACTTTAGCAGCACCCCA

P85 7q34: 142.534.968 – 142.604.034 = 69.065 bp

prox.: TCAACTAATTGTCAAACAGAAAATGTTTAA ATTTACCTATAGCCTAGACCCCTCCCCCG  
 fus.: **TCAACTAATTGTCAAACAGAAAATGTTTAA AAAGCTATAGAAATCAAAACAATATGGCAG**  
 dist.: ATCACACTTTCTGATTTCAAATATATTTAA AAAGCTATAGAAATCAAAACAATATGGCAG

P30 15q21.3: 53.291.217 – 53.340.104 = 48.886 bp

prox.: CAAGAAGGCCAGAAAAGTTAAGCGGTCTG ATCAATGTTATTCAGCTAATAAATGACAGA  
 fus.: **CAAGAAGGCCAGAAAAGTTAAGCGGTCTG AAATGAGCTATCAAGCCATGAAAAACATG**  
 dist.: GACAATGAAAATTATTCAGCACTAAAAAG AAATGAGCTATCAAGCCATGAAAAACATG

P11 21q21: 26.095.020 – 26.155.885 = 60.864 bp

prox.: GCAGTGAGCTGAGATCACACCTCTGCACTC CAGCCTGGGTGACCAAGTGAGACTTCGTCT  
 fus.: **GCAGTGAGCTGAGATCACACCTCTGCACTC AATATATTCTCAAGTGATCCATAAACTATA**  
 dist.: TTTCCAAAAGGAATAAGACCCACAGTTTTC AATATATTCTCAAGTGATCCATAAACTATA

P39 21q22.12: 35.072.226 - 35.763.917 = 691.690 bp

prox.: TGGCCTTAGATATATTGAATATTTAAAAA GCAAGATGGCAAATAAAAATGGCACATGGA  
 fus.: **TGGCCTTAGATATATTGAATATTTAAAAA GTGAAGTGTCTCTCCACTGTACATTGTTTC**  
 dist.: GTGGCAATGAAAATCCACATTCTGCACAT GTGAAGTGTCTCTCCACTGTACATTGTTTC

P24 21q22.12: 35.211.465 – 35.915.368 = 703.902 bp + ACC

prox.: GAAGCCAAGGAAAGAGAAAGCAGATGGAGA CAGGTGAAAGAGGACACTCAGAACTTTGG  
 fus.: **AGCCAAGGAAAGAGAAAGCAGATGGAGA ACC<sup>ACC</sup>CTTTTAAACCACCAAAAAATATTACTAA**  
 dist.: ACCTAAACATGCATAAAACATAGATATTA CTTTAAACCACCAAAAAATATTACTAATT

**Abbildung 5.5-1:** Dargestellt sind homologe Bereiche bzw. Mikrohomologien (roter Kasten) ab zwei Nukleotiden am Bruchpunkt nach erfolgter Deletion beim jeweiligen Patienten. Ausschnitte der proximalen (prox., braun) und distalen (dist., grün), sowie der Sequenzfusion (fus., braun-grün) sind gezeigt. Insertionen an den Endpunkten wurden rot hervorgehoben.

Es wurde nur eine Homologie ab zwei Nukleotiden in Folge zwischen überlappenden Sequenzen direkt am Bruchpunkt beachtet. Die größte Homologie dieser Art von 5 Nukleotiden konnte bei P85 (7q34-Deletion) ermittelt werden. In zwei von 10 molekular bestimmten Bruchpunkten wurde in der fusionierten Sequenz am Bruchpunkt eine Insertion gefunden. In Fall P30 mit der 5p15-Deletion konnte die Abfolge GAAG und in Fall P24 mit der 21q22-Deletion die Abfolge ACC weder der proximalen noch der distalen Sequenz zugeordnet werden.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob sich in der *erweiterten* Bruchpunktumgebung homologe Sequenzen wieder finden lassen, die die Ursache für das Rearrangement sein könnten. Gesucht wurde vor allem nach auf Retrotransposons oder Duplikationen basierenden, repetitiven Elementen (SINES, LINES, LTRs bzw. LCRs). Über die 'get'-DNA-Funktion (UCSC, 03/06) wurden dafür die beide Bruchstellen umgebenden DNA-Sequenzen erhalten. Die jeweils 2 kb großen Bereiche wurden daraufhin gegeneinander sensibel geblastet (Blastn NCBI). Das Alignment mit dem jeweilig höchsten erreichten 'score' als auch das längste Alignment wurden auf ihre Lage in einem repetitiven Element überprüft und ihre Distanz zum Bruchpunkt ermittelt (UCSC-Blat). Alle Ergebnisse wurden in Tabelle 5.5-2 zusammengefasst. Das größte Alignment, mit dem gleichzeitig besten 'score', konnte für Fall P30 mit der 15q21-Deletion ermittelt werden. Von 169 Nukleotiden waren bei Vergleich der proximalen mit der distalen 15q21-Bruchpunktsequenz von jeweils 2 kb 138 Basen identisch, wobei eine der Sequenzen auf dem minus-Strang gefunden wurde. Bezogen auf die proximale Bruchstelle bei 53.291.217 bp begann die Homologie 805 Basen später. Bezogen auf die distale Bruchstelle bei 53.340.104 bp begann die Homologie 629 Nukleotide später. Dabei fiel auf, dass die homologen Sequenzen beide in einem repetitiven Element der Familie ALU (Klasse SINE) lagen. Das zweite betrachtete Alignment lag zwar näher am Bruchpunkt, war aber viel kleiner (50 bp), und konnte proximal keinem repetitiven Element zugeordnet werden.

**Tabelle 5.5-2:** Homologie-Analyse von proximalem und distalem Bruchpunktbereich. Jeweils zwei Alignments wurden auf ihre Lage und Elementklasse überprüft (vgl. 5.5).

| Probe | Chr.    | Alignments<br>ident./ges. (bp)<br>u. Orientierung | Proximaler<br>Bruchpunkt<br>(bp) | Distanz zu prox.<br>Bruchpunkt (bp) | Element-zugehörigkeit<br>(Name/ Familie/<br>Klasse) | Distaler<br>Bruchpunkt<br>(bp) | Distanz zu dist.<br>Bruchpunkt (bp) | Elementzugehörigkeit<br>(Name/ Familie/ Klasse) |
|-------|---------|---|----------------------------------|-------------------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------------|---|
| P30   | 2p21    | 23+/30-   | 46.955.256                       | Start 9 nach                        | L2/L2/LINE  | 47.027.569                     | Ende 85 vor                         | GA-reich/LC/LC                                  |
|       |         | 22+/32+   |                                  | Start 964 nach                      | AluSx/Alu/SINE                                      |                                | Start 495 nach                      | AluSx/Alu/SINE +<br>MER5C/MER1/DNA              |
| P40   | 2p24~23 | 18+/21+   | 20.737.064                       | Start 836 nach                      | /   | 27.440.152                     | Ende 420 vor                        | MIR/MIR/SINE                                    |
|       |         | 38+/63+   |                                  | Start 40 nach                       | /   |                                | Ende 222 vor                        | AluSx/Alu/SINE                                  |
| P40   | 4q24    | 22+/28+   | 106.240.481                      | Start 177 nach                      | /   | 106.508.196                    | Start 243 nach                      | MIRb/MIR/SINE                                   |
|       |         | 23+/31+   |                                  | über                                | Tigger1/MER2/DNA                                    |                                | Ende 0 vor                          | /   |
| P30   | 5p15    | 21+/27+   | 12.728.481                       | Start 875 nach                      | LTR26/ERV1/LTR                                      | 12.794.519                     | Ende 918 vor                        | L1MEb/L1/LINE                                   |
|       |         | 29+/44-   |                                  | Start 207 nach                      | /   |                                | Start 253 nach                      | Tigger1/MER2/DNA                                |
| P60   | 7q11    | 27+/39+   | 68.969.150                       | Ende 178 vor                        | /   | 69.028.313                     | Ende 830 vor                        | L1MEc/L1/LINE +<br>AluSp/Alu/SINE               |
|       |         | 39+/66+   |                                  | Ende 559 vor                        | /   |                                | Ende 804 vor                        | L1MEc/L1/LINE +<br>AluSp/Alu/SINE               |
| P85   | 7q34    | 25+/33+   | 142.534.968                      | Start 878 nach                      | AluSq/Alu/SINE                                      | 142.604.034                    | Start 279 nach                      | L1M2/L1/LINE                                    |
|       |         | 27+/42+   |                                  | Start 882 nach                      | AluSq/Alu/SINE                                      |                                | Start 362 nach                      | L1M2/L1/LINE                                    |
| P30   | 15q21   | 138+/169-   | 53.291.217                       | Start 805 nach                      | AluY/Alu/SINE                                       | 53.340.104                     | Start 629 nach                      | AluSq/Alu/SINE                                  |
|       |         | 31+/50+   |                                  | Start 150 nach                      | /   |                                | Start 50 nach                       | L1MC1/L1/LINE                                   |
| P11   | 21q21   | 33+/40-   | 26.095.020                       | Ende 202 vor                        | AluSx/Alu/SINE                                      | 26.155.885                     | Ende 960 vor                        | AluJb/Alu/SINE                                  |
|       |         | 31+/37+   |                                  | Ende 773 vor                        | AluSx/Alu/SINE                                      |                                | Ende 963 vor                        | AluJb/Alu/SINE                                  |
| P39   | 21q22   | 28+/41-   | 35.072.226                       | Ende 39 vor                         | /   | 35.763.917                     | Ende 282 vor                        | MER53/DNA/DNA                                   |
|       |         | 27+/41-   |                                  | Start 708 vor                       | MLT1J/MaLR/LTR                                      |                                | Start 169 nach                      | AluJo/Alu/SINE                                  |
| P24   | 21q22   | 18+/22-   | 35.211.465                       | Ende 673 vor                        | /   | 35.915.368                     | Start 781 nach                      | L1M5/L1/LINE                                    |
|       |         | 28+/45+   |                                  | Start 447 nach                      | /   |                                | Ende 835 vor                        | /   |

## 5.6 Vergleichsanalysen

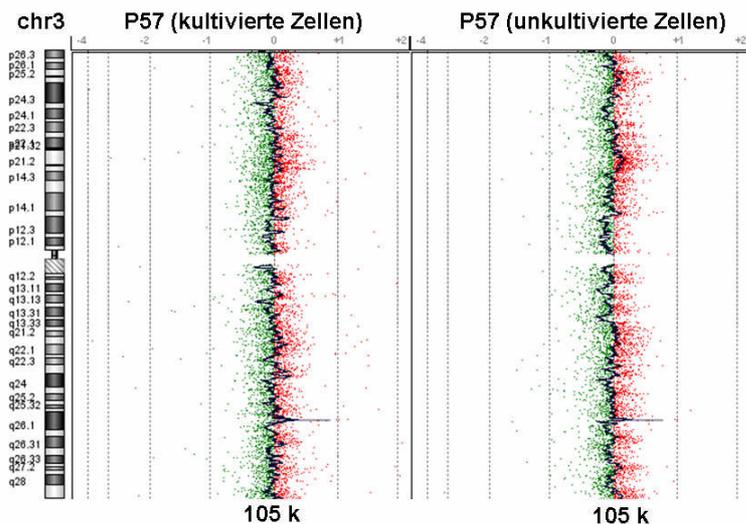
In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob die vorherige Kultivierung von Zellen einen Einfluss auf das Arrayergebnis hat. Dazu wurden einige Analysen mit DNA aus unkultivierten Zellen durchgeführt und mit den Analysen mit DNA aus fixierten kultivierten und über Jahre asservierten Leukozyten verglichen. Ebenso sollte untersucht werden, in wie weit sich die Ergebnisse der beiden verwendeten Auswertalgorithmen in Bezug auf die Größe und Lage der Bruchpunkt-bestimmten Deletionen unterscheiden. Diese Kontrollen sind nötig, denn die wichtigste, aber auch schwierigste Aufgabe erschien die letztendliche Interpretation der erhaltenen Daten.

### 5.6.1 aCGH-Vergleich mit DNA aus unkultivierten Zellen

Eine Arrayanalyse mit DNA aus Zellen vor und nach Kultivierung kann unterschiedliche Ergebnisse zur Folge haben, je nach dem, wie gut der 'aberrante' Zellklon unter den jeweiligen verwendeten Bedingungen gewachsen ist. Hierzu wurden im Nachhinein Vergleichsanalysen durchgeführt, mit DNA aus kryokonservierten Leukozyten vor Kultivierung (interne Kryokonservierung) und mit DNA aus frischen Zellen direkt nach der Knochenmarkentnahme (freundlicherweise von M. Wulfert aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Uniklinik Düsseldorf, zur Verfügung gestellt).

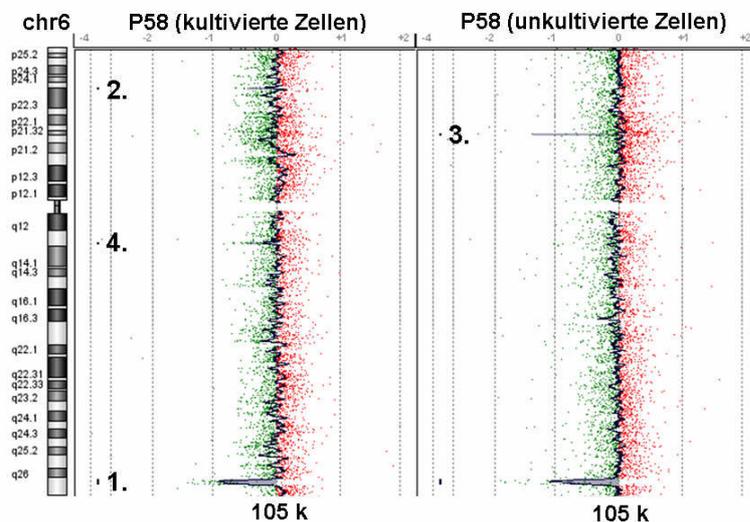
#### 5.6.1.1 DNA aus kryokonservierten Zellen vor Kultivierung (5 Patienten)

Für die Fälle P57, P58, P60, P66 und P71 konnte aus kryokonservierten, unkultivierten Zellen DNA für Vergleichsanalysen extrahiert werden. Bei Vergleich der beiden aCGH-Profile der Probe P57 konnte kein wesentlicher Unterschied identifiziert werden.



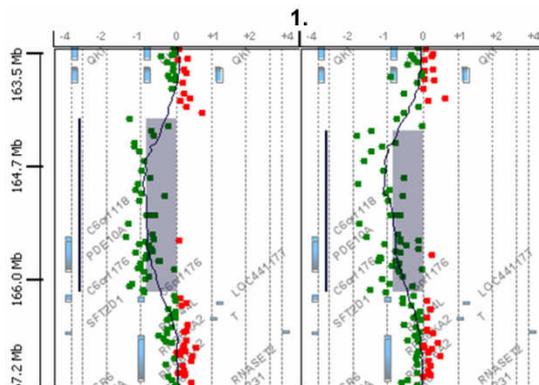
**Abbildung 5.6-1:** Vergleich zweier 105 k-aCGH-Analysen der Probe P57, hybridisiert mit DNA aus kultivierten bzw. aus unkultivierten Knochenmarkzellen. Dargestellt ist die GW-Chromosom 3-Ansicht, ausgewertet mit ADM-2 (Zusatzfilter: Schwellenwert 6; mindestens 3 Oligonukleotide in Folge mit einem  $\log_2$ Ratio über 0,25; 'moving average window size' 1 Mb). Die einzige angezeigte Imbalance, ein Zugewinn in 3q26.1, ist ein bekannter CNV.

Beim Vergleich der 244 k-Arrayprofile der P58-Proben, erzeugt mit dem ADM-2-Algorithmus, konnten ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede gesehen werden. Anhand der Chromosomenansicht in Abbildung 5.6-2, Chromosom 6, fällt auf, dass das Profil der Analyse mit DNA aus kultivierten Zellen leicht 'zackeliger' erscheint und nur sehr kleine Aberrationen vom Algorithmus teilweise unterschiedlich bewertet werden.

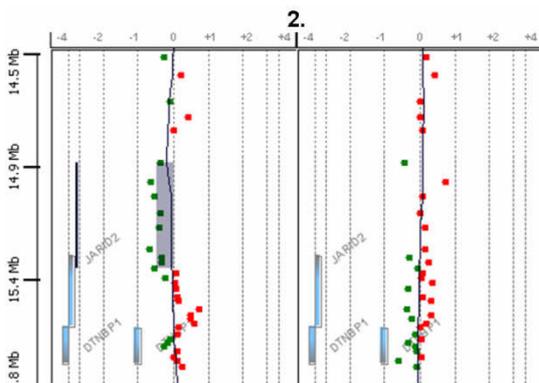


**Abbildung 5.6-2:** Vergleich zweier 244 k-aCGH-Analysen der Patientenprobe P58, hybridisiert mit DNA aus kultivierten (links) und hybridisiert mit DNA aus unkultivierten (rechts) Knochenmarkzellen. Dargestellt ist die GW-Chromosom 6-Ansicht, ausgewertet mit dem ADM-2-Algorithmus und dem Zusatzfilter (s.o.). Die vom Algorithmus angezeigten Imbalancen 1-4 werden in den folgenden Genansichten abgebildet.

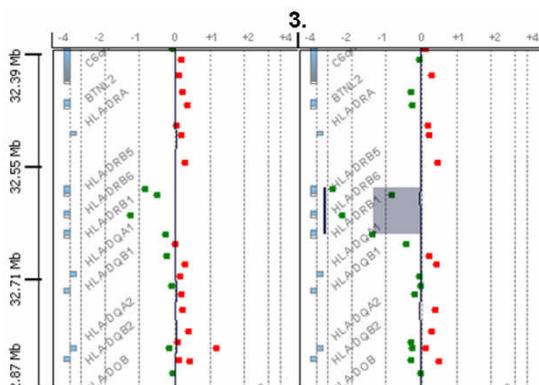
Alle 4 markierten Deletionen wurden in der Genansicht betrachtet und im Folgenden näher ausgewertet.



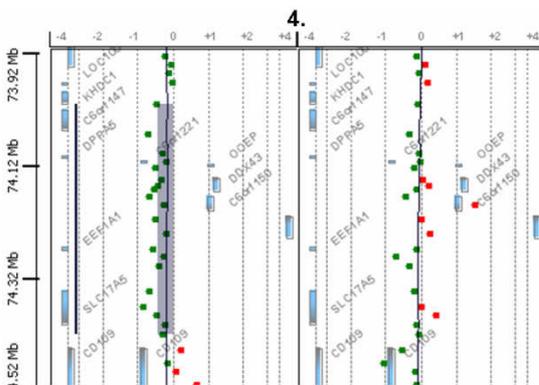
**Abbildung 5.6-3: Deletion 1:** In beiden Analysen, links kultivierte, rechts unkultivierte Zellen, wurde die um 2 Mb-große Deletion auf 6q26~27 (zuvor verifiziert) mit demselben durchschnittlichen  $\log_2$ Ratio (-0,8) erkannt.



**Abbildung 5.6-4: Deletion 2:** Diese Imbalance mit dem niedrigen  $\log_2$ Ratio von -0,4 wurde nur in der ersten Analyse (kultivierte Zellen) angezeigt. In der zweiten Analyse (unkultivierte Zellen) erscheinen dieselben Oligonukleotide normal hybridisiert.



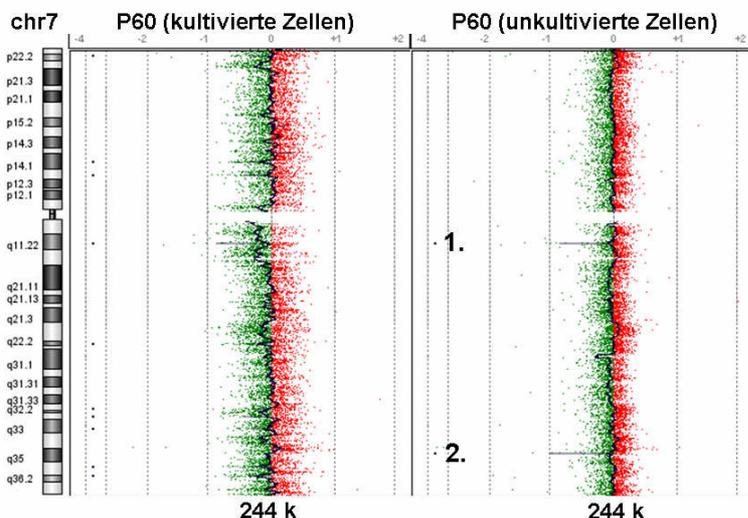
**Abbildung 5.6-5: Deletion 3:** Der ADM-2-Algorithmus mit den gewählten Filterkriterien konnte diese bekannte CNV-Region (HLA-Region) nur in der Analyse mit DNA aus unkultivierten Zellen als deletiert detektieren. Relativ deutlich erkennt man die Deletion per Auge allerdings auch in der Analyse mit DNA aus kultivierten Zellen, nur mit einem geringeren  $\log_2$ Ratio.



**Abbildung 5.6-6: Deletion 4:** Auch diese Region mit dem niedrigen  $\log_2$ Ratio von -0,4 wurde nur in der ersten Analyse (kultivierte Zellen) als deletiert angezeigt. Das zweite aCGH-Profil (unkultivierte Zellen) erscheint in dieser Region unauffällig.

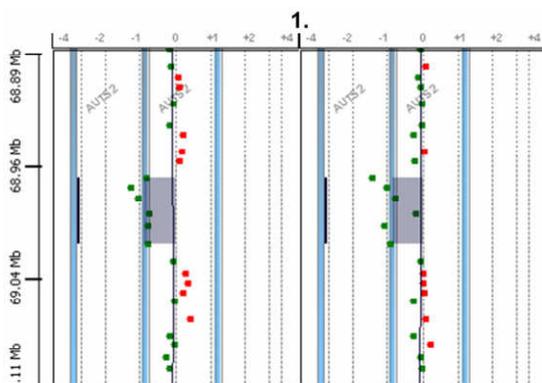
Im Fall von P60 konnte die 7q11-Deletion im *AUTS2*-Gen in beiden Analysen erkannt werden. Das aCGH-Profil der Analyse mit DNA aus kultivierten Zellen zeigte eine stärkere Streuung und einen ungleichmäßigeren  $\log_2$ Ratio-Verlauf. Einige weitere kleine

Imbalancen wurden im Vergleich zur Analyse mit DNA aus unkultivierten Zellen vom Algorithmus markiert. Die Frage, ob diese Aberrationen echt sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

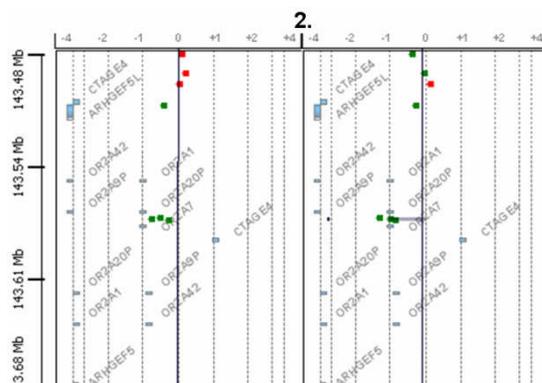


**Abbildung 5.6-7:** Vergleich zweier 244 k-aCGH-Analysen der Patientenprobe P60, hybridisiert mit DNA aus kultivierten (links) und hybridisiert mit DNA aus unkultivierten (rechts) Knochenmarkzellen. Dargestellt ist die GW-Chromosom 7-Ansicht, ausgewertet mit dem ADM-2-Algorithmus und dem Zusatzfilter (s.o.). Zwei der vom Algorithmus angezeigten Imbalancen (1. und 2.) werden in den folgenden Genansichten abgebildet.

Die zwei markierten Deletionen wurden in der Genansicht betrachtet und im Folgenden abgebildet.



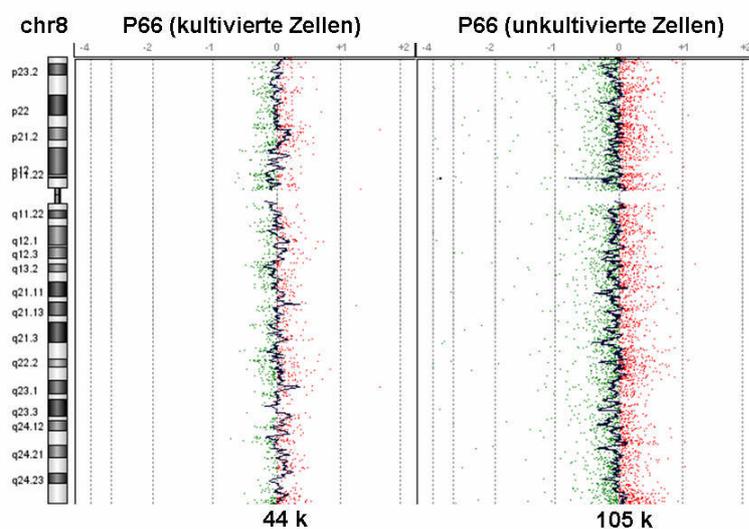
**Abbildung 5.6-8:** Deletion 1: In beiden Analysen wurde die um 60 kb-große Deletion auf 7q11.22 mit demselben durchschnittlichen  $\log_2$ Ratio (-0,8) erkannt.



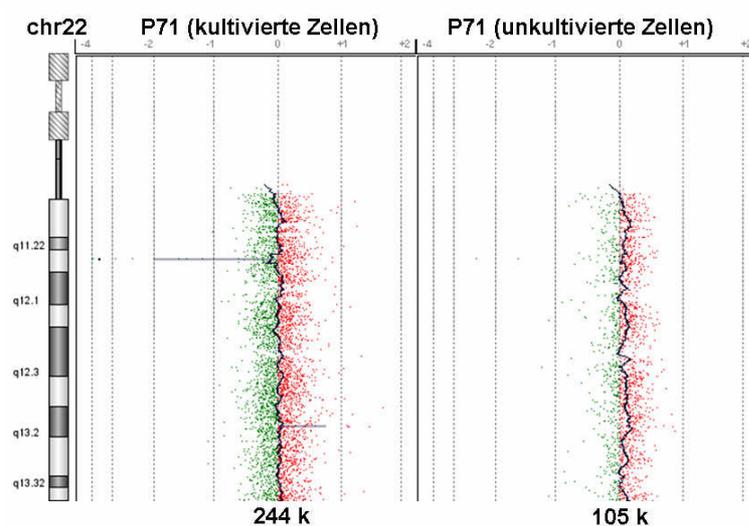
**Abbildung 5.6-9:** Deletion 2: Der ADM-2-Algorithmus mit den gewählten Filterkriterien konnte diese bekannte CNV-Region ('*olfactory gene cluster*') nur in der Analyse mit DNA aus unkultivierten Zellen als deletiert detektieren. Relativ deutlich erkennt man die Deletion per Auge allerdings auch in der Analyse mit DNA aus kultivierten Zellen, nur mit einem geringeren  $\log_2$ Ratio.

Bei den Proben P66 und P71 konnte auch in der Vergleichsanalyse keine größere, eindeutige Aberration detektiert werden. In diesen beiden Fällen wurde für die erste und

zweite Analyse ein anderes Arrayformat verwendet. Die Güte der jeweiligen Experimente ist in den folgenden Abbildungen dargestellt.



**Abbildung 5.6-10:** Vergleich zweier aCGH-Analysen mit 44 k bzw. 105 k, der Patientenprobe P66, hybridisiert mit DNA aus kultivierten (links) und hybridisiert mit DNA aus unkultivierten (rechts) Knochenmarkzellen. Dargestellt ist die GW-Chromosom 8-Ansicht, ausgewertet mit dem ADM-2-Algorithmus und dem Zusatzfilter (s.o.). Der CNV in 8p11 konnte erst auf Grund des Formatwechsels detektiert werden.



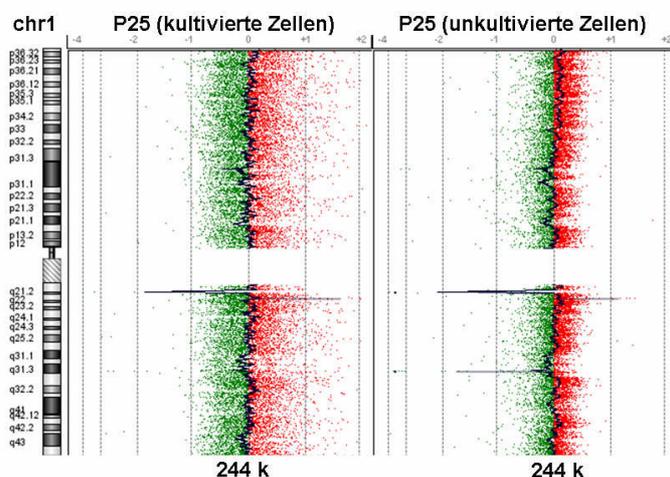
**Abbildung 5.6-11:** Vergleich zweier aCGH-Analysen mit 244 k bzw. 105 k, der Patientenprobe P71, hybridisiert mit DNA aus kultivierten (links) und hybridisiert mit DNA aus unkultivierten (rechts) Knochenmarkzellen. Dargestellt ist die GW-Chromosom 22-Ansicht, ausgewertet mit dem ADM-2-Algorithmus und dem Zusatzfilter (s.o.). Auch hier sind im höherauflösenderen Format CNVs sichtbar.

Bei einem Wechsel des Arrayformates muss beachtet werden, dass das Genom gerade in bekannten CNV-Regionen, aber auch gleichmäßig über alle Chromosomen verteilt, je nach genomischer Auflösung durch weniger bzw. mehr Oligonukleotide repräsentiert wird.

### 5.6.1.2 DNA aus frischem Knochenmark vor Kultivierung (P25, P49)

Von den Patienten P25 und P49 stand DNA von M. Wulfert aus der Klinik für Hämatologie (vgl. o.) zur Verfügung. Diese war von ihm direkt nach der Knochenmarkentnahme aus Gesamtknochenmark isoliert und gelagert worden. Auch in diesen beiden Fällen konnten keine Zusatzaberrationen durch die Vergleichsanalysen mit DNA aus kultivierten und unkultivierten Zellen detektiert werden. Bei P25 konnten (wenigstens per Auge) CNVs

immer in Analysen beider Proben gesehen werden, jedoch versagte teilweise, vermutlich auf Grund der größeren Streuung der ersten Analyse, der eingestellte Algorithmus.



**Abbildung 5.6-12:** Vergleich zweier 244 k-aCGH-Analysen der Patientenprobe P25, hybridisiert mit DNA aus kultivierten (links) und hybridisiert mit DNA aus unkultivierten (rechts) Knochenmarkzellen (extrahiert direkt nach Knochenmarkentnahme). Dargestellt ist die GW-Chromosom 1-Ansicht, ausgewertet mit dem ADM-2-Algorithmus und dem Zusatzfilter (s.o.). Das linke aCGH-Profil zeigt eine relativ große Streuung, weshalb nicht alle CNVs, die rechts vom Algorithmus markiert wurden hier vom selbigen erkannt wurden.

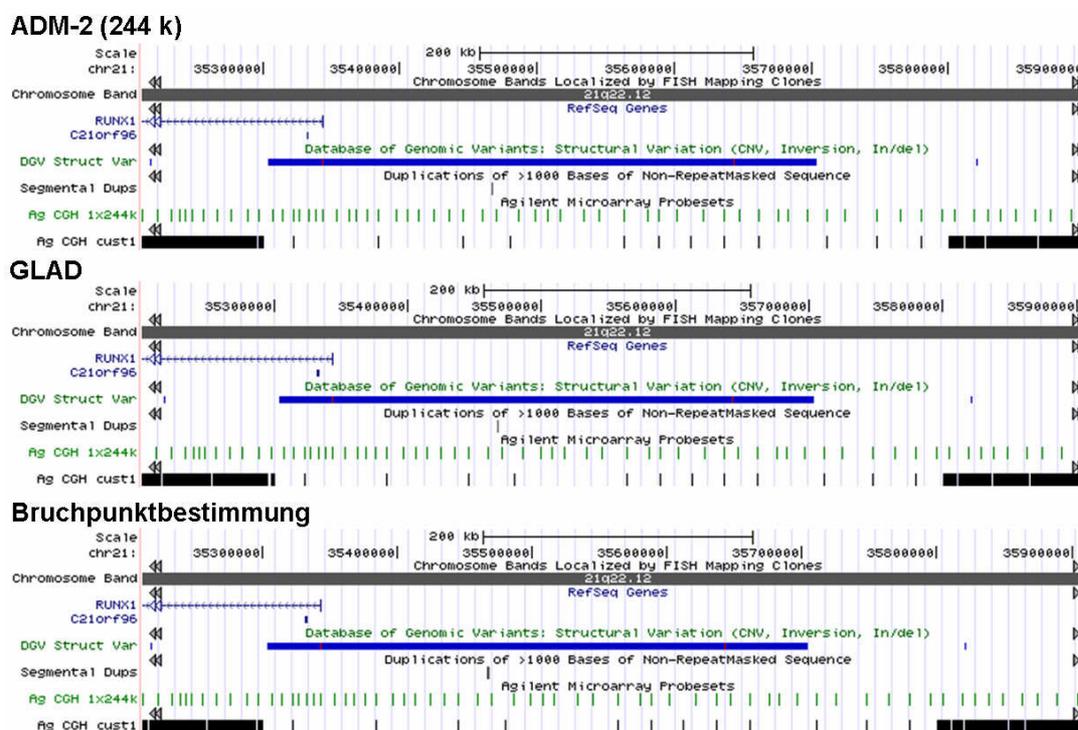
Bei P49 konnte die 7q33-Deletion in dem Gen *EXOC4* in den Analysen beider Proben identifiziert werden (nicht gezeigt).

### 5.6.2 Vergleich der beiden verwendeten Algorithmen ADM-2 und GLAD

In den Fällen, bei denen die Bruchpunkte molekular identifiziert wurden (vgl. Kapitel 5.5), konnte ein aussagekräftiger Vergleich der beiden verwendeten Algorithmen ADM-2 und GLAD durchgeführt werden. Diese Deletionen waren alle durch ein relativ hohes  $\log_2$ Ratio charakterisiert, zeigten aber individuelle Hybridisierungsprofile bzgl. Streuung oder 'moving average'-Trend. Bei den verwendeten Arrays handelte es sich um 244- und 44 k-Formate. Beiden Auswertesystemen lag die FE-Textdatei zugrunde. Gleichzeitig wurden die  $\log_2$ Ratios der Arrayanalysen mit den ermittelten qPCR-Ratios und/oder dem Anteil an aberranten Zellen mittels FISH analysiert verglichen. Hierzu wurde auch das Array- $\log_2$ Ratio umgerechnet (Formel M. Beier, vgl. Methoden), einerseits in das 'erwartete' qPCR-Ratio und andererseits in den 'erwarteten' Anteil an aberranten Zellen.

In 5 von insgesamt 10 Fällen unterschieden sich die Berechnungen zu Aberrationsgröße und den -endpunkten von ADM-2 und GLAD. Als Vergleichswerte dienten die Ergebnisse der exakten Bruchpunktbestimmung und teilweise die des 'custom'-Arrays. Zur Veranschaulichung werden einige Beispiele tabellarisch bzw. graphisch aufgeführt.

Bei P24 (244 k; 21q22) war die Näherung der ADM-2-Auswertung bzgl. der Endpunkte, verglichen mit den Ergebnissen der Bruchpunktbestimmung, um insgesamt (proximal plus distal) 11,3 kb und bzgl. der Deletionsgröße um ebenfalls 11,3 kb verschoben, bei der GLAD-Auswertung waren es 14,4 kb bzw. 6,4 kb. Zwischen den Auswertungen bestand hier also nur eine geringfügige Diskrepanz von proximal und distal jeweils nur einem Oligonukleotid (vgl. Abbildung 5.6-13, Tabelle 5.6-1). In diesem Fall erkannte der ADM-2-Algorithmus den proximalen Bruchpunkt exakter, der GLAD-Algorithmus dagegen den distalen Endpunkt. Der 'custom'-Array1 unterschied sich dagegen nur noch um knapp 130 bp von den tatsächlichen Bruchpunkten.



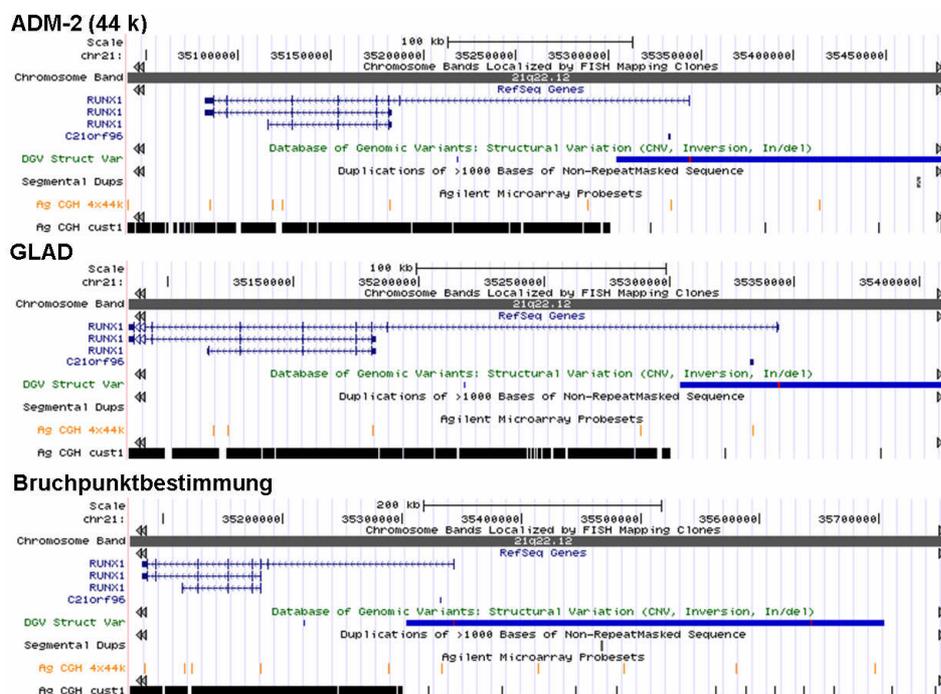
**Abbildung 5.6-13:** Entsprechend der jeweiligen Auswertung (ADM-2/Agilent, GLAD/M. Beier, Bruchpunktbestimmung/Sequenzierung) ist die 21q22-Deletion von P24 als exakter UCSC-Genome Browser-Ausschnitt mit den wichtigsten Informationen gezeigt. In den 'genome browser' wurden die Lagen der Oligonukleotide des verwendeten 'custom'-Arrays (Ag CGH cust1; schwarzer Block = hochauflösende proximale und distale Bruchregionen) eingeladen. Anhand der Verschiebungen (hier kaum sichtbar) der hochauflösenden Bereiche können die unterschiedlichen Deletionsloci und -größen der drei Analysen verglichen werden.

Der anhand des Array-logRatios berechnete und in der FISH ausgezählte Anteil aberranter Zellen bei P24 stimmte für die ADM-2- als auch die GLAD-Auswertung mit einer Abweichung von 6% bzw. 8% sehr gut überein. Für die 'custom'-Array1-Analyse dagegen betrug die Abweichung 24%.

**Tabelle 5.6-1:** Vergleiche der verschiedenen Auswertesysteme (ADM-2/Agilent, GLAD/M. Beier, 'custom'-Array1/Auge-Agilent und exakte Bruchpunktbestimmung (BB)/Sequenzierung) in P24 mit der 21q22-Deletion. Das ermittelte log<sub>2</sub>Ratio wird dem mit FISH ermittelten und dem anhand des log<sub>2</sub>Ratios berechneten Anteil aberranter Zellen gegenüber gestellt.

| P24 21q22     | Start (bp) | Stop (bp)  | nOligo. | Log <sub>2</sub> Ratio | Berech. Ratio (BR) | FISH (%) | Berech. Anteil aberranter Zellen per BR (%) | FISH Verlauf (%) |
|---------------|------------|------------|---------|------------------------|--------------------|----------|---|------------------|
| 244 k ADM-2   | 35.211.778 | 35.904.388 | 61      | -0,79                  | 0,58               |          | 84  |                  |
| 244 k GLAD    | 35.201.032 | 35.911.372 | 63      | -0,75                  | 0,59               | 89       | 82  | 1                |
| cust1 Agilent | 35.211.590 | 35.915.365 | 2.154   | -0,6                   | 0,66               |          | 68  |                  |
| BB            | 35.211.465 | 35.915.368 |         |                        |                    |          |   |                  |

Bei P39 (44 k; 21q22) waren die Enden als auch die Deletionsgröße mit der ADM-2-Auswertung um 245,7 kb verschoben, mit GLAD um jeweils 362,3 kb. Durch dieses Experiment mit einem 44 k-Array wurde deutlich, dass die Analyse zwar zur Detektion der Deletion ausreichte, ihre genauen Ausmaße aber weder von der einen noch der anderen Auswertung aufgelöst werden konnten (vgl. Abbildung 5.6-14). Der 'custom'-Array1 unterschied sich immerhin noch um 15,6 kb von den tatsächlichen Bruchpunkten, weil der distale Bruchpunkt nicht hochauflösend durch Oligonukleotide repräsentiert wurde.



**Abbildung 5.6-14:** Entsprechend der jeweiligen Auswertung (ADM-2/Agilent, GLAD/M. Beier, Bruchpunktbestimmung/Sequenzierung) der P39-Deletion ist der exakte UCSC-Genome Browser-Ausschnitt mit den wichtigsten Informationen gezeigt. Sowohl der GLAD- als auch der ADM-2-Algorithmus nach 44 k-Analyse konnten die Deletion (vgl. Bruchpunktbestimmung) nicht exakt auflösen.

Der Ratio-Vergleich für den Anteil aberranter Zellen zeigte eine 16,1%- bzw. 7,5%-Abweichung beim ADM-2- bzw. GLAD-Algorithmus. Die Abweichung beim 'custom'-Array1 betrug 52,7%. Das ermittelte qPCR-Ratio stimmte zu 100% mit dem ADM-2-ermittelten Ratio des 44 k-Arrays überein.

**Tabelle 5.6-2:** Vergleiche der Ergebnisse der verschiedenen Auswertesysteme (ADM-2/Agilent, GLAD/M. Beier, 'custom'-Array1/Auge-Agilent und exakte Bruchpunktbestimmung (BB)/Sequenzierung) in P39 mit der 21q22-Deletion. Das ermittelte  $\log_2$ Ratio wird dem mit FISH ermittelten und dem anhand des  $\log_2$ Ratios berechneten Anteil aberranter Zellen und dem ermittelten qPCR-Ratio gegenüber gestellt.

| P39<br>21q22     | Start (bp) | Stop (bp)  | n<br>Oligo. | Log <sub>2</sub><br>Ratio | Berech.<br>Ratio<br>(BR) | FISH<br>(%) | Berech. Anteil<br>aberranter Zel-<br>len per BR (%) | qPCR<br>Ratio<br>(QR) | FISH<br>Verlauf<br>(%) |
|------------------|------------|------------|-------------|---------------------------|--------------------------|-------------|---|-----------------------|------------------------|
| 44 k<br>ADM-2    | 35.040.082 | 35.486.076 | 7           | -0,71                     | 0,61                     |             | 78  |                       |                        |
| 44 k<br>GLAD     | 35.084.180 | 35.413.600 | 5           | -1,03                     | 0,49                     |             | 100   |                       |                        |
| cust1<br>Agilent | 35.072.204 | 35.779.447 | 2.798       | -0,35                     | 0,78                     | 93          | 44  | 0,61                  | 100                    |
| BB               | 35.072.226 | 35.763.917 |             |                           |                          |             |   |                       |                        |

Bei P40 zeigte die Arrayanalyse eine große Streuung der Oligonukleotide, weshalb hier trotz des 244 k-Arrays beide Algorithmen unterschiedliche 2p-Deletionsausmaße ermittelten. In diesem Fall konnte die GLAD-Auswertung die Bruchpunkte exakter identifizieren als die ADM-2-Auswertung. Das  $\log_2$ Ratio wiederum wurde vom ADM-2-Algorithmus im Vergleich zum Anteil aberranter Zellen, detektiert mittels FISH, genauer ermittelt. Die ebenfalls bei P40 vorliegende homozygote 4q24-Deletion wurde von beiden Algorithmen dagegen identisch bestimmt.

**Tabelle 5.6-3:** P40-Charakteristika der Array, FISH und qPCR und Daten der 2p- bzw. 4q-Bruchpunkte.

| P40<br>2p24      | Start (bp) | Stop (bp)  | n<br>Oligo. | Log <sub>2</sub><br>Ratio | Berech.<br>Ratio<br>(BR) | FISH<br>(%) | Berech. Anteil<br>aberranter Zel-<br>len per BR (%) | FISH<br>Verlauf (%) |
|------------------|------------|------------|-------------|---------------------------|--------------------------|-------------|---|---------------------|
| 244 k<br>ADM-2   | 20.764.855 | 27.296.261 | 563         | -0,99                     | 0,5                      |             | 100   |                     |
| 244 k<br>GLAD    | 20.750.003 | 27.373.948 | 573         | -0,69                     | 0,62                     |             | 76  |                     |
| cust2<br>Agilent | 20.736.797 | 27.440.658 | 434         | -0,75                     | 0,59                     | 97          | 82  | 85                  |
| BB               | 20.737.064 | 27.440.152 |             |                           |                          |             |   |                     |

| P40<br>4q24      | Start (bp)  | Stop (bp)   | n<br>Oligo. | Log <sub>2</sub><br>Ratio | Berech.<br>Ratio<br>(BR) | qPCR<br>Ratio<br>(QR) | Berech. Anteil<br>aberranter Zellen<br>per BR (%) | Berech.<br>Anteil<br>aberranter<br>Zellen per<br>QR (%) |
|------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|---|---|
| 244 k<br>ADM-2   | 106.268.742 | 106.510.207 | 25          | -2,66                     | 0,16                     |                       | 84 homo   |   |
| 244 k<br>GLAD    | 106.268.743 | 106.510.206 | 23          | -2,92                     | 0,13                     |                       | 87 homo   |   |
| cust2<br>Agilent | 106.238.145 | 106.509.257 | 118         | -2,21                     | 0,22                     | 0,13                  | 78 homo   | 78 homo   |
| BB               | 106.240.481 | 106.508.196 |             |                           |                          |                       |   |   |

Weiterhin nicht von den beiden Auswertesystemen identisch ermittelt wurden die Deletionen von P30 (2p21) und P100 (5q31). In P30 wurde der distale Bruchpunkt bereits mit dem 244 k-Array und beiden Auswerteprogrammen bis auf ca. 75 bp richtig detektiert. Die proximale Bruchpunktbestimmung wies zum exakten Bruchpunkt eine 16,5 kb-Distanz mit ADM-2 und eine 39,3 kb-Distanz mit GLAD auf. Die log<sub>2</sub>Ratios von um die -1 bzw. die errechneten Ratios von 0,51 bzw. 0,59 durch ADM-2 bzw. GLAD ermittelt, konnten durch das qPCR-Ratio von 0,61 annähernd bestätigt werden.

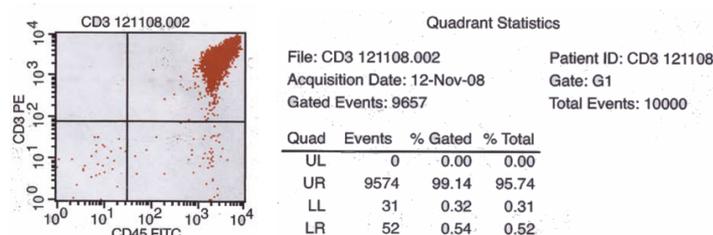
**Tabelle 5.6-4:** Charakteristika der P30-Array- und qPCR-Analysen und Daten der bestimmten Bruchpunkte.

| P30<br>2p21      | Start (bp) | Stop (bp)  | n<br>Oligo. | Log <sub>2</sub><br>Ratio | Berech.<br>Ratio<br>(BR) | qPCR<br>Ratio<br>(QR) | Berech. Anteil<br>aberranter Zellen<br>per BR (%) | Berech.<br>Anteil<br>aberranter<br>Zellen per<br>QR (%) |
|------------------|------------|------------|-------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|---|---|
| 244 k<br>ADM-2   | 46.938.744 | 47.027.644 | 10          | -0,98                     | 0,51                     |                       | 98  |   |
| 244 k<br>GLAD    | 46.915.926 | 47.027.643 | 11          | -1,04                     | 0,59                     |                       | 82  |   |
| cust2<br>Agilent | 46.954.685 | 47.027.644 | 67          | -0,76                     | 0,49                     | 0,61                  | 102   | 78  |
| BB               | 46.955.256 | 47.027.569 |             |                           |                          |                       |   |   |

Auf Grund der Größe und Lage der Deletionen (Aberrationen) konnte nicht immer eine FISH-Analyse durchgeführt bzw. der Anteil aberranter Zellen direkt auf Zellebene bestimmt werden. Da, wie hier gezeigt, das log<sub>2</sub>Ratio des Arrays und das qPCR-Ratio häufiger zu ungenau sind, konnte, wenn nur diese Ergebnisse zur Verfügung standen, nicht sicher bestimmt werden, ob es sich um eine Keimbahnveränderung (100% aberrante Zellen) oder eine MDS-spezifische Aberration (< 100% aberrante Zellen) handelte.

## 5.7 Etablierung der Separation CD3-positiver Zellen

Von nur wenigen aktuellen Patienten der Hämatologie mit Verdacht auf MDS wurden gleichzeitig mit den Knochenmarkproben für die zytogenetischen Erstanalysen auch Blutproben erhalten. Aus diesen sollten die CD3-positiven Zellen, also T-Zellen, die nicht in die MDS-Pathogenese involviert sind, separiert, die Reinheit der gewonnenen Zellpopulation überprüft und DNA isoliert werden. Diese DNA könnte in Zukunft für Vergleichs-aCGH-Untersuchungen zur Detektion von Keimbahnveränderungen (auch CNVs) genutzt werden. Somit könnten erworbene MDS-spezifische Aberrationen, die nur in Tumorzellen vorliegen, von angeborenen Defekten, die auch in der normalen T-Zell-DNA vorliegen, abgegrenzt werden. In diesem Projekt wurde die Technik der Zellseparation für zukünftige Analysen etabliert. Zwei Zellseparationstechniken wurden getestet, die des Dynal-Prinzips aus Vollblut und die des MACS-System ('magnetic cell separation') mit der Leukozytenfraktion. Bei beiden Methoden handelte es sich um positive Zelselektionen durch die direkte Anlagerung von an 'beads' gekoppelte CD3-Antikörper. In diesem Projekt erwies sich die Separation mit dem MACS-System als erfolgreicher. Die Fluoreszenzfärbung für die FACS-Analyse erfolgte von A. Böckmann in der Klinik für Hämatologie, Uniklinik Düsseldorf, mit CD3- und CD45-Antikörpern (Pan-Leukozytenmarker) und gekoppeltem Phycoerythrin (PE)- bzw. Fluorescein (FITC)-Farbstoff. In der Analyse konnten fast alle 10.000 Zellen eingegrenzt werden, 99% von ihnen waren stark CD3- und CD45-positiv (vgl. Abbildung 5.7-1). Dies bedeutete, dass mit der MACS-Methode eine sehr reine T-Zellpopulation selektioniert worden war, deren DNA für eine mögliche aCGH-Analyse eingesetzt werden könnte. Somit wäre eine sichere, individuelle Abgrenzung von CNVs und MDS-spezifischen Aberrationen gewährleistet.



**Abbildung 5.7-1:** Ergebnis der FACS-Analyse (A. Böckmann) mit CD3-PE- und CD45-FITC-markierten Blutleukozyten nach CD3-positiver MACS-Selektion. Alle Zellen, die sich im oberen rechten Quadranten befinden, sind stark CD3-PE und CD45-FITC gefärbt. Es gibt kaum Zellen, die nur mit CD45-markiert (z. B. B-Zellen) sind, wie im rechten, unteren Quadranten zu sehen ist. Auch sind nur wenige Zellen weder PE- noch FITC-gefärbt (links unten). Es handelt sich also um eine reine T-Zellpopulation. Durch die Zell-spezifischen gemessenen Forwardstreulichkeit ('forward scatter', Zellgröße)- und Seitwärtsstreulichkeit ('side scatter', innere Zellstruktur/-granularität)-Ablenkungen konnten die Zellen zuvor eingegrenzt werden (UL = links oben, UR = rechts oben, LL = links unten, LR = rechts unten).

## 5.8 Falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse

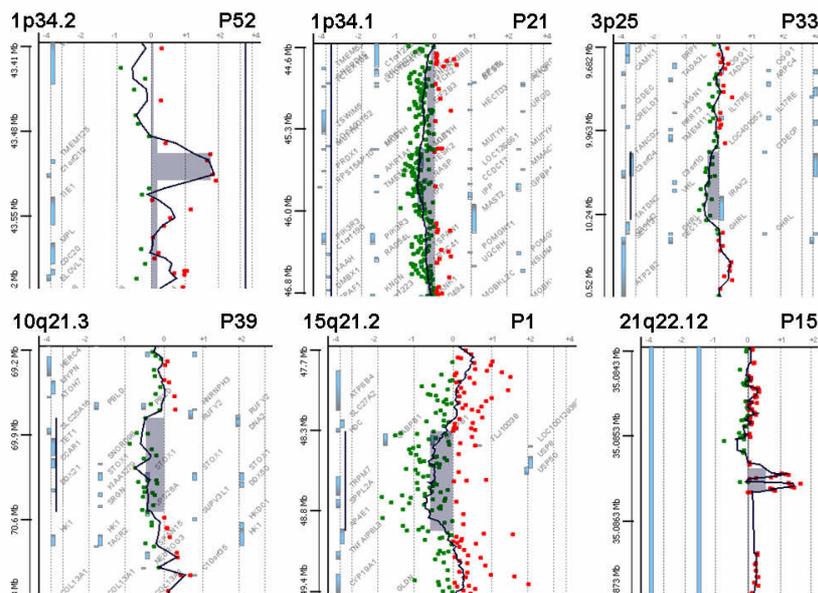
Bei Arrayanalysen generell kann es, auf Grund verschiedenster Ursachen, zu fehlerhaft interpretierten Daten u. a. durch den Algorithmus kommen (Lai *et al.*, 2005). Bei heterogenen Tumorproben hat man zusätzlich das Problem, dass der aberrante Klon meist einen Zellanteil < 100% ausmacht und somit das  $\log_2$ Ratio entsprechend niedriger ausfällt. Das heißt, eine Unterscheidung von echten Aberrationen und falsch-positiven Ergebnissen wenig über der  $\log_2$ Ratio-Schwelle bzw. falsch-negativen knapp unter der Schwelle ist schwierig. Zudem kann es bei niedrigen  $\log_2$ Ratios oder schlechteren Analysen dazu kommen, dass die Aberrationsgrenzen von den Algorithmen ungenau bestimmt werden. Auch in dieser Arbeit konnten einige, selbst von beiden Algorithmen (ADM-2 und GLAD), angezeigte Aberrationen nicht per FISH, qPCR oder MLPA verifiziert werden.

### 5.8.1 Mit FISH und qPCR nicht zu verifizierende Aberrationen

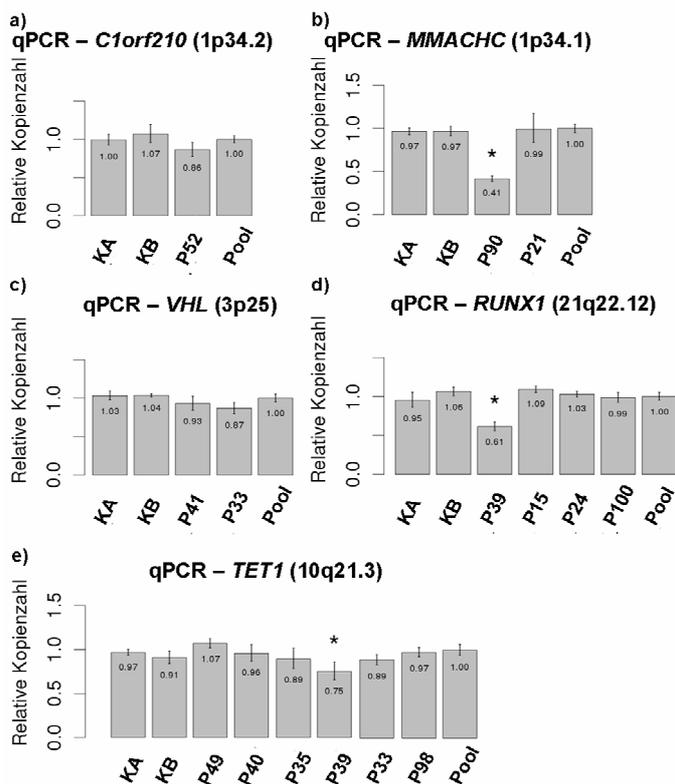
Es wurden einige FISH- und qPCR-Analysen auf Grund der angezeigten Imbalancen nach Arrayauswertung durchgeführt, die keine Verifizierung nach sich ziehen ließen. Einige von diesen werden im Folgenden aufgeführt. Trotz des über der Schwelle liegenden  $\log_2$ Ratios und der gut überlegten Verifizierungstechnik konnten diese über die GW- oder GLAD-Auswertung angezeigten, teilweise großen, Imbalancen nicht bestätigt werden. Sofern zwei Verifizierungstechniken eingesetzt wurden und die Aberration mit einer der beiden Methoden nicht bestätigt werden konnte, wurde die Aberration als nicht bestätigt gewertet.

**Tabelle 5.8-1:** Übersicht einiger durchgeführter und fehlgeschlagener Versuche das angezeigte Arrayergebnis (GLAD und/oder ADM-2) mit FISH und/oder qPCR zu bestätigen. (nd = nicht durchgeführt / bestimmt; # = diese Mikroarrayanalysen wiesen einen schlechten DLRS-Wert auf; \* signifikant =  $p \leq 0,05$ )

| Pro-be | Array (k) | Chr.  | Max. Aberration (kb) | Log <sub>2</sub> Ratio | DLRS              | FISH mit RP11-BAC u. Anteil aberranter Zellen (%) |    | qPCR-Detektor   | qPCRRatio |
|--------|-----------|-------|----------------------|------------------------|-------------------|---|----|-----------------|-----------|
| P52    | 244       | 1p34  | 43,496-43,532        | 1,68                   | 0,58 <sup>#</sup> | nd  | nd | <i>C1orf210</i> | 0,86      |
| P21    | 244       | 1p34  | 44,880-46,643        | -0,27                  | 0,2               | nd  | nd | <i>MMACHC</i>   | 0,99      |
| P33    | 105       | 3p25  | 10,056-10,291        | -0,35                  | 0,37 <sup>#</sup> | nd  | nd | <i>VHL</i>      | 0,87      |
| P39    | 44        | 10q21 | 69,0-70,693          | -0,33                  | 0,26              | 9E13  | 0  | <i>TET1</i>     | 0,75*     |
| P37    | 44        | 12p13 | 7,545-7,915          | -0,4                   | 0,21              | 97811   | 0  | /               | /         |
| P1     | 244       | 15q21 | 48,337-49,009        | -0,54                  | 0,58 <sup>#</sup> | 562A8   | 0  | /               | /         |
| P15    | cust1     | 21q22 | 35,086-35,086        | +1,3                   | 0,19              | nd  | nd | <i>RUNX1</i>    | 1,09      |



**Abbildung 5.8-1:** Von der GW-Software (ADM-2, 'threshold' 6, 'moving average window size' Array-spezifisch) angezeigte Aberrationen, die sich mit den Techniken FISH und/oder qPCR nicht nachweisen ließen. Dargestellt sind die Genansichten (vgl. Tabelle 5.8-1) bei den betroffenen Patientenproben.



**Abbildung 5.8-2:** Relative Kopienzahlen der getesteten Gene bei den entsprechenden Patientenproben (vgl. Tabelle 5.8-1) im Vergleich zu den Kontrollproben KA und KB. Als Referenzgen wurde *PRNP* und als Kalibrator die Pool-Mix-DNA in die qPCR eingesetzt. In die Kopienzahl- und Signifikanzberechnung ( $p \leq 0,05$ ; M. Beier) wurden jeweils zwei Triplikate einbezogen. Die in der o. g. Tabelle aufgeführten Fälle P52 (*C1orf210*), P21 (*MMACHC*), P33 (*VHL*) und P15 (*RUNX1*) wiesen keine vom Kalibrator signifikant abweichende Kopienzahl auf. Die Probe P39 (*TET1*) dagegen zeigte in der qPCR-Analyse eine signifikant verminderte Kopienzahl, die per FISH-Analyse wiederum nicht gesehen wurde.

### 5.8.2 Mit MLPA nicht zu verifizierende Aberrationen

In drei Fällen P52, P65 und P6 wurden Subtelomer-MLPAs ('multiplex ligation-dependent probe amplification') von S. Slanz / B. Leube durchgeführt, um genomische Imbalancen an den Telomeren, die zuvor von den Auswerteprogrammen nach aCGH angezeigt wurden,

zu verifizieren. Unter Einbezug von 5 Normalkontrollen zur relativen Kopienzahlbestimmung ergab sich für alle drei Analysen ein unauffälliges Profil (nicht gezeigt).

Auf Grund dieser nicht zu verifizierenden Imbalancen, die die Auswertelgorithmen als echte Aberrationen bewertet hatten, muss geschlossen werden, dass die erhaltenen Daten der aCGH-Studie dieser Arbeit zu einem geringen Prozentsatz auch falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse enthalten. Deshalb wurde hier Wert auf die Verifizierung von Aberrationen mit anderen Techniken gelegt und auch nur verifizierte Aberrationen in der folgenden Zusammenfassung berücksichtigt.

## 5.9 Zusammenfassung der verifizierten Imbalancen

Alle Imbalancen, die innerhalb dieser Arbeit bestätigt (FISH, qPCR, mPCR, 'long range'-PCR) werden konnten und zuvor durch die GLAD- oder GW-Auswertung der aCGH-Analysen detektiert wurden, sind Tabelle 5.9-3 aufgeführt. Auch Aberrationen, die nicht exakt den o. g. Filterkriterien entsprachen, aber trotzdem bestätigt werden konnten (vor Festlegung der Parameter), wurden mit aufgenommen. Sobald bei zwei Verifizierungsversuchen einer fehlschlug, wurde die Aberration als nicht bestätigt angesehen. In 6 Fällen wurde die Aberration zwar mit derselben Methode (aCGH), aber durch Hybridisierung mit einem 'custom'-Array verifiziert.

Insgesamt konnten 51 Aberrationen auf fast allen Chromosomen bestätigt werden. Zwölf davon waren genomische Zugewinne, der Rest Verluste. Die Imbalancegrößen variierten zwischen 65 kb und 159 Mb. Die meisten gefundenen Aberrationen hatten eine Größe von unter 500 kb (25 bzw. 49%). Zwischen 0,5 und 5 Mb konnten 19 (37,2%) Aberrationen aufgedeckt werden. Nur eine (2%) Imbalance hatte eine Größe zwischen 5 und 10 Mb, immerhin 6 (11,8%) Imbalancen zeigten ein Ausmaß von über 10 Mb. Von den 51 verifizierten Aberrationen umfassten 12 nur jeweils ein Gen, 5 jeweils zwei Gene, 4 jeweils drei Gene, 5 jeweils 4 Gene, eine Aberration 6 Gene, eine 8 Gene, 12 Aberrationen zwischen 10 und 60 Genen und 6 über 60 Gene. Weitere 5 Aberrationen kamen in Genleeren Regionen vor. 33 (31,4%) Patienten des 105er Kollektivs trugen Aberrationen, 15 (45,5%) davon weiblich. 18 (54,5%) Patienten hatten nur eine Aberration, 13 (39,5%) zwei, einer (3%) drei und einer (3%) hatte gleich 4 verifizierte Aberrationen. 20 der entsprechenden Patientenproben wurden zuvor mit einem 244 k-Array analysiert, 6 mit einem 105 k- und 7 mit einem 44 k-Array. Das Durchschnittsalter dieser Patienten bei

Diagnose betrug 61 Jahre. 17 (51,5%) von ihnen litten an RCMD, 5 (15,15%) an RAEB-1, 5 (15,15%) an RAEB-2, 5 an RAEBt/AML und einer an AML (nach WHO 18,2% AML). 11 (33,3%) hatten den IPSS-'score' 0, 13 (39,4%) hatten Int-1, drei (9,1%) Int-2 und 5 (15,2%) wurden der Hochrisikostufe 3 zugeordnet (plus 1x AML). Bei 8 Patienten ließ sich nach durchschnittlich 8 Monaten eine AML-Transformation verzeichnen.

Eine mögliche Beziehung zwischen klinischen Parametern und dem Auftreten bzw. Fehlen bestätigter Aberrationen wurde statistisch von M. Beier mit Hilfe des Fisher-Tests untersucht; numerische Größen wurden dazu vorher am Median dichotomisiert. Alle getesteten Merkmale und deren p-Werte werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 5.9-1:** Aufstellung der durchgeführten Tests und deren p-Werte zur Bestimmung einer Korrelation mit verifizierten Aberrationen (ED = Erstdiagnose).

|                         | p-Werte           | Holm-Korrektur |
|-------------------------|-------------------|----------------|
| <b>FAB/WHO</b>          | 0,71104635        | 1,0000000      |
| <b>IPSS</b>             | 0,22078795        | 1,0000000      |
| <b>AML</b>              | 0,36675097        | 1,0000000      |
| <b>Tot</b>              | <b>0,01566722</b> | 0,1253377      |
| <b>AML-frei seit ED</b> | 0,29812880        | 1,0000000      |
| <b>AML-frei</b>         | 0,14468677        | 0,9830389      |
| <b>Zeit seit ED</b>     | 0,14043413        | 0,9830389      |
| <b>Alter</b>            | 0,29812880        | 1,0000000      |

Der mit Abstand niedrigste p-Wert und gleichzeitig einzige unter 0,05 ergab sich mit  $p = 0,016$  bei dem Merkmal tot = ja / nein.

**Tabelle 5.9-2:** Übersicht bei wie vielen der lebenden bzw. verstorbenen Patienten Aberrationen verifiziert (33 von 105) werden konnten.

| Patient   Aberration |      | Verifiziert |    |
|----------------------|------|-------------|----|
|                      |      | nein        | ja |
| <b>Tot</b>           | nein | 31          | 6  |
|                      | ja   | 41          | 27 |

Obwohl auch dieses Ergebnis nach Korrektur auf multiples Testen nicht mehr als signifikant betrachtet werden kann, deutet der bei den Verstorbenen erhöhte Anteil von 40% mit verifizierten Aberrationen (gegenüber 16% bei noch lebenden Patienten) zumindest tendenziell auf einen Zusammenhang hin.

**Tabelle 5.9-3:** Zusammenfassung aller in diesem Projekt verifizierten Imbalancen nach aCGH-Detektion. Überwiegend wurden hier die automatisch erzeugten Daten der GLAD-Auswertung (keine Korrektur nach Bruchpunktidentifizierung) übertragen, nur in Ausnahmefällen wurden die Informationen der GW-Software entnommen. Vermerkt wurden die Charakteristika der Aberrationen, wie Lage, Größe, aktuelle CNV-Überschneidung und die jeweilige Verifizierungsmethode. Zudem wurden eine erfolgreiche Bruchpunktbestimmung (+) nach 'custom'-Array-Analyse, eine durchgeführte Mutationssuche und das Ergebnis der Untersuchung von Verlaufsproben aufgeführt.

| N  | Probe | Chr. Start | Chr. Stop | Array (k) | Max. Lokus (bp)         | Max. Größe (bp) | N Oligo | Log Ratio | %CNV | FISH                                 | qPCR  | Custom / Bruchpunkt | Mutation                | FISH-Verlauf |
|----|-------|------------|-----------|-----------|-------------------------|-----------------|---------|-----------|------|--------------------------------------|---|---------------------|-------------------------|--------------|
| 1  | P90   | 1p34.1     | 1p34.1    | 244       | 45.602.357-45.745.433   | 143.076         | 16      | -1,19     | 55   | nd                                   | 0,41 <i>MMACHC</i>                                  | nd                  | nd                      | nd           |
| 2  | P29   | 1p33       | 1p33      | 105       | 49.860.361-50.128.060   | 267.699         | 8       | -1,05     | 0    | nd                                   | 0,48 <i>AGBL4</i>                                   | nd                  | nd                      | nd           |
| 3  | P91   | 1p31.3     | 1p31.3    | 105       | 63.457.391-63.897.984   | 440.593         | 14      | 0,531     | 1    | nd                                   | 2,16 <i>PGM1</i>                                    | nd                  | nd                      | nd           |
| 4  | P49   | 1p21.2     | 1p21.1    | 244       | 101.677.533-102.282.321 | 604.788         | 33      | -0,687    | 23   | 100% RP11-411H5                      | nd  | nd                  | nd                      | nd           |
| 5  | P40   | 2p24.1     | 2p23.3    | 244       | 20.750.003-27.373.948   | 6.623.945       | 573     | -0,685    | 43   | 95,8% RP11-724N3<br>98,5% RP11-214J9 | nd  | cust2 / +           | nd                      | 84,8% VP40a  |
| 6  | P30   | 2p21       | 2p21      | 244       | 46.915.926-47.027.643   | 111.717         | 11      | -1,04     | 8    | nd                                   | 0,61 <i>MCFD2</i>                                   | cust2 / +           | nd                      | nd           |
| 7  | P53   | 2q24.2     | 2q24.3    | 105       | 163.124.412-164.113.937 | 989.525         | 21      | 0,604     | 0    | nd                                   | 1,6 <i>KCNH7</i>                                    | nd                  | nd                      | nd           |
| 8  | P98   | 3p26.2     | 3p26.2    | 244       | 3.971.534-4.939.661     | 968.127         | 94      | -0,899    | 42   | 100% RP11-622P3                      | nd  | nd                  | nd                      | nd           |
| 9  | P41   | 4q24       | 4q24      | 244       | 106.012.352-106.712.569 | 700.217         | 55      | -0,513    | 1    | 66,6% RP11-111M12                    | 0,6 <i>TET2</i><br>0,56 <i>TET2</i> <sub>iso</sub>  | nd                  | p.C1135Y<br>(miss. E3A) | nd           |
| 10 | P40   | 4q24       | 4q24      | 244       | 106.268.743-106.510.206 | 241.463         | 23      | -2,92     | 2    | nd                                   | 0,14 <i>TET2</i><br>0,11 <i>TET2</i> <sub>iso</sub> | cust2 / +           | nd                      | nd           |
| 11 | P30   | 5p15.2     | 5p15.2    | 244       | 12.722.791-12.801.900   | 79.109          | 5       | -0,887    | 61   | nd                                   | nd  | cust2 / +           | nd                      | nd           |
| 12 | P75   | 5p14.3     | 5p14.3    | 244       | 20.931.800-21.559.708   | 627.908         | 22      | -1,03     | 60   | 100% RP11-419M2                      | nd  | nd                  | nd                      | nd           |
| 13 | P6    | 5q13.1     | 5q13.2    | 244       | 68.283.279-71.008.502   | 2.725.223       | 117     | -0,405    | 88   | nd                                   | 0,72 <i>CCNB1</i>                                   | nd                  | nd                      | nd           |
| 14 | P21   | 5q13.1     | 5q13.2    | 244       | 68.314.269-71.038.006   | 2.723.737       | 118     | -0,409    | 88   | nd                                   | 0,75 <i>CCNB1</i>                                   | nd                  | nd                      | nd           |
| 15 | P41   | 5q13.1     | 5q13.2    | 244       | 68.330.574-71.042.472   | 2.711.898       | 118     | -0,29     | 88   | nd                                   | 0,75 <i>CCNB1</i>                                   | nd                  | nd                      | nd           |
| 16 | P52   | 5q23.2     | 5q31.2    | 244       | 124.049.584-141.931.520 | 17.874.042      | 1.713   | -0,818    | 25   | 47,7% <i>EGR1</i>                    | 0,68 <i>HSPA9</i>                                   | nd                  | nd                      | nd           |

|    |      |          |          |     |                         |             |       |        |    |  |             |             |    |             |
|----|------|----------|----------|-----|-------------------------|-------------|-------|--------|----|--|-------------|-------------|----|-------------|
| 17 | P21  | 5q31.1   | 5q31.1   | 244 | 133.505.599-134.243.707 | 738.108     | 94    | -0,4   | 24 | nd                                     | 0,66 SEC24A | cust2 / -   | nd | nd          |
| 18 | P8   | 5q31.1   | 5q31.1   | 244 | 133.292.699-134.273.994 | 981.295     | 127   | -0,438 | 21 | nd                                     | 0,88 SEC24A | nd          | nd | nd          |
| 19 | P42  | 5q31.1   | 5q31.1   | 105 | 133.941.541-134.285.470 | 343.929     | 17    | -0,313 | 47 | nd                                     | 0,74 SEC24A | cust2 / -   | nd | nd          |
| 20 | P100 | 5q31.2   | 5q31.2   | 44  | 137.351.108-138.706.114 | 1.355.006   | 30    | -0,414 | 4  | 72% EGR1<br>71% RP11-166J22            | 0,57 HSPA9  | cust1+2 / + | nd | nd          |
| 21 | P58  | 6q26     | 6q27     | 105 | 164.245.352-166.260.703 | 2.015.351   | 43    | -0,89  | 34 | nd                                     | 0,50 PDE10A | nd          | nd | nd          |
| 22 | P91  | 7p22.3   | 7q36.3   | 105 | 1-158.821.424           | 158.821.424 | nd    | -0,15  | nd | 16,7% CEP7                             | nd          | nd          | nd | nd          |
| 23 | P60  | 7q11.22  | 7q11.22  | 244 | 68.968.733-69.033.774   | 65.041      | 6     | -0,938 | 0  | nd                                     | 0,59 AUTS2  | cust2 / +   | nd | nd          |
| 24 | P11  | 7q21.2   | 7q21.2   | 244 | 91.570.132-91.648.830   | 78.698      | 9     | 0,459  | 0  | nd                                     | nd          | cust2 / -   | nd | nd          |
| 25 | P100 | 7q22.1   | 7q22.1   | 44  | 99.702.890-101.901.100  | 2.198.210   | 68    | -0,492 | 79 | 87,1% RP11-347A2<br>87,1% RP11-1060C20 | nd          | cust1+2 / - | nd | nd          |
| 26 | P15  | 7q22.1   | 7q22.1   | 44  | 99.812.708-101.895.949  | 2.083.241   | 64    | -0,526 | 81 | 75,5% RP11-347A2<br>70,6% RP11-1060C20 | 0,48 CUX1   | cust1+2 / - | nd | nd          |
| 27 | P70  | 7q22.1   | 7q22.1   | 244 | 99.897.691-102.120.062  | 2.222.371   | 256   | -0,362 | 84 | 84,9% RP11-347A2<br>84,9% RP11-1060C20 | 0,77 CUX1   | nd          | nd | nd          |
| 28 | P49  | 7q33     | 7q33     | 244 | 132.888.653-133.235.868 | 347.215     | 44    | -0,64  | 0  | nd                                     | 0,43 EXOC4  | nd          | nd | nd          |
| 29 | P85  | 7q34     | 7q34     | 44  | 142.470.028-142.630.072 | 160.044     | 2     | -0,804 | 13 | nd                                     | 0,61 PIP    | cust2 / +   | nd | nd          |
| 30 | P99  | 7q34     | 7q34     | 44  | 142.470.028-142.630.072 | 160.044     | 2     | -0,906 | 13 | nd                                     | 0,61 PIP    | nd          | nd | nd          |
| 31 | P20  | 8p23.1   | 8p23.1   | 244 | 8.132.184-8.655.144     | 522.960     | 34    | -1,04  | 71 | 100% RP11-1G6<br>100% RP11-211C9       | 0,22 CLDN23 | nd          | nd | nd          |
| 32 | P79  | 8p23.3   | 8p23.1   | 244 | 63.180-12.511.914       | 12.448.734  | nd    | -0,18  | nd | 21,9% RP11-211C9                       | nd          | nd          | nd | 48,1% VP79a |
| 33 | P38  | 8q22.1   | 8q22.1   | 244 | 95.843.201-95.969.322   | 126.121     | 15    | 0,491  | 0  | nd                                     | nd          | cust2 / -   | nd | nd          |
| 34 | P70  | 11q14.1  | 11q23.2  | 244 | 85.253.938-113.809.774  | 28.555.836  | 2.201 | -0,311 | 27 | 64,3% RP11-456G14                      | nd          | nd          | nd | nd          |
| 35 | P72  | 12q12    | 12q12    | 244 | 38.792.056-39.153.477   | 361.421     | 29    | 0,478  | 5  | nd                                     | 1,56 LRRK2  | cust2 / -   | nd | nd          |
| 36 | P30  | 12q24.22 | 12q24.22 | 244 | 116.130.414-116.210.234 | 79.820      | 9     | 0,444  | 10 | nd                                     | nd          | cust2 / -   | nd | nd          |

|    |     |          |          |     |  |             |        |        |     |  |                 |           |         |   |
|----|-----|----------|----------|-----|--|-------------|--------|--------|-----|--|-----------------|-----------|---------|---|
| 37 | P77 | 14q21.3  | 14q21.3  | 244 | 45.490.169-45.778.690  | 288.521     | 11     | -1,07  | 98  | nd   | Gen-leer (mPCR) | nd        | nd      | nd                                      |
| 38 | P20 | 15q15.2  | 15q15.2  | 244 | 41.199.376-41.346.176  | 146.800     | 20     | -0,803 | 3   | nd   | EPB24 (mPCR)    | nd        | nd      | nd                                      |
| 39 | P30 | 15q21.3  | 15q21.3  | 244 | 53.288.498-53.329.341  | 40.843      | 4      | -1,01  | 0   | nd   | 0,45 RAB27A     | cust2 / + | nd      | nd                                      |
| 40 | P90 | 16q23.1  | 16q23.1  | 244 | 76.737.994-76.816.871  | 78.877      | 8      | -0,92  | 10  | nd   | 0,48 WWOX       | nd        | nd      | nd                                      |
| 41 | P50 | 16q24.3  | 16q24.3  | 105 | 88.035.337-88.397.205  | 361.868     | 23     | 0,536  | 80  | nd   | nd              | cust2 / - | nd      | nd                                      |
| 42 | P38 | 18q23    | 18q23    | 244 | 72.863.881-72.935.992  | 72.111      | 7      | -0,669 | 0   | nd   | nd              | cust2 / - | nd      | nd                                      |
| 43 | P79 | 19p13.3  | 19p13.2  | 244 | 4.187.605-9.071.610<br>9.470.811-12.403.648<br>13.398.901-18.843.862 | ~13.261.803 | >1.400 | 0,41   | ~35 | 21,9% RP11-348B12  | nd              | nd        | nd      | 44% VP79a                               |
| 44 | P81 | 20p11.21 | 20p11.21 | 44  | 25.127.250-25.345.765  | 218.515     | 7      | 0,733  | 0   | nd   | 2,03 PYGB       | cust2 / - | nd      | nd                                      |
| 45 | P79 | 21p13    | 21q22.3  | 244 | 1-46.944.322   | 46.944.323  | nd     | 0,27   | nd  | 16,9% LSI21  | nd              | nd        | nd      | 38% VP79a                               |
| 46 | P11 | 21q21.3  | 21q21.3  | 244 | 26085.648-26.162.377   | 76.729      | 4      | -1,09  | 61  | nd   | nd              | cust2 / + | nd      | nd                                      |
| 47 | P39 | 21q22.12 | 21q22.12 | 44  | 35.084.180-35.413.600  | 329.420     | 5      | -1,03  | 33  | 96,1% RP11-419G6<br>92,4% RP11-483M4<br>92,7% RP11-299D9 | 0,61 RUNX1amp   | cust1 / + | - RUNX1 | 100% VP39a                              |
| 48 | P24 | 21q22.12 | 21q22.12 | 244 | 35.201.032-35.911.372  | 710.340     | 63     | -0,745 | 56  | 90,3% RP11419G6<br>88% RP11-483M4                        | nd              | cust1 / + | - RUNX1 | 22,2% VP24a<br>1,4% VP24b<br>2,6% VP24c |
| 49 | P34 | 21q22.3  | 21q22.3  | 44  | 43.497.808-44.303.762  | 805.954     | 18     | 0,555  | 55  | nd   | 1,7 RRP1B       | nd        | nd      | nd                                      |
| 50 | P77 | Xq25     | Xq25     | 244 | 125.945.621-126.188.987  | 243.366     | 7      | -4,2   | 0   | nd   | Gen-leer (mPCR) | nd        | nd      | nd                                      |
| 51 | P72 | Yq11.1   | Yq11.21  | 244 | 12.412.769-13.012.037  | 599.268     | 37     | 0,723  | 30  | nd   | nd              | cust2 / - | nd      | nd                                      |

## 6 Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob zytogenetisch unauffällige MDS-Patienten submikroskopische Aberrationen aufweisen, da diese möglicherweise von prognostischer Bedeutung sind. Eine Einstufung der Patienten in weitere zytogenetische Risikogruppen könnte für die Therapiewahl wichtig sein, die somit entsprechend den jeweiligen Voraussetzungen angepasst werden könnte. Der Einsatz der hochauflösenden aCGH-Technik könnte dazu beitragen, die bestehende zytogenetische und molekularzytogenetische Diagnostik von MDS zu verbessern.

Bei ca. 50% der MDS-Patienten werden keine zytogenetisch sichtbaren, klonalen Aberrationen gefunden. Allerdings sind molekularbiologisch identifizierbare Anomalien, wie Mutationen bzw. eine aberrante Expression, bei MDS bekannt und korrelieren beispielsweise mit dem gesteigerten Risiko einer AML-Transformation (Steensma und List, 2005). Dem AML-Klassifizierungssystem wurden bereits neue Entitäten, basierend auf dem Mutationsstatus der Gene *NPM1* und *CEBPA*, durch die WHO vorläufig zugefügt. Bei einer zytogenetisch unauffälligen AML wird zudem die Mutationsanalyse von *FLT3* empfohlen (Vardiman *et al.*, 2009). Dem MDS-Klassifizierungssystem fehlen diese Neuerungen noch.

Die Hälfte der MDS-Patienten, bei denen zytogenetisch keine Aberrationen gefunden werden, hat der momentanen Einstufung zufolge eine günstigere Prognose. Diese entspricht aber nicht immer dem tatsächlichen Krankheitsverlauf und somit kommt es teilweise zu einem unerwarteten Progress bei Risiko-unterschätzten, überwiegend supportiv behandelten MDS-Patienten (O'Keefe *et al.*, 2007).

### 6.1 Array-CGH-Analysen bei MDS

Da dieser Arbeit kein frisches Knochenmark zur Verfügung stand, wurden die Analysen mit den von der zytogenetischen Diagnostik übriggebliebenen Sedimenten durchgeführt. Während für die klassische Chromosomenbandenuntersuchung eine vorherige Kultivierung der Zellen nötig ist, wäre sie für die aCGH-Technik keine Bedingung (O'Keefe *et al.*, 2007). Jedoch sollte ein direkter Vergleich des erstellten, unauffälligen Karyotyps mit den aCGH-Ergebnissen möglich werden. Nur unter denselben Voraussetzungen könnte

dieser um die gefundenen submikroskopischen Aberrationen ergänzt werden. Bekannt war bereits teilweise, dass die aCGH-Methode auch mit DNA, aus fixierten, asservierten Leukozyten, mit guter Qualität durchzuführen ist (Evers *et al.*, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 105 Patientenproben mittels aCGH untersucht, 38 davon mit dem 44 k-, 19 mit dem 105 k- und 48 mit dem 244 k-Arrayformat. Die durchschnittliche genomische Auflösung, die erzielt werden konnte, betrug dementsprechend etwa 43, 22 bzw. 9 kb. Die computergestützten Qualitätskontrollen mit Hilfe der von Agilent verwendeten Softwares FE und GW zeigten bei knapp 70% gute bis exzellente Array-ergebnisse. Für die 33 Analysen, die nicht im vorgegebenen Qualitätsrahmen lagen, konnte kein systematischer Fehler gefunden werden. Generell sind Abweichungen der Qualitätsparameter auf eine qualitativ weniger hochwertige Patienten-DNA oder nicht erfolgreiche Markierungs- oder Hybridisierungsprozesse zurückzuführen (de Witte *et al.*, 2006). In 11 (10,5%) von 105 Fällen kam es z. B. zu hohem Hintergrundrauschen, welches normalerweise wiederum niedrigere Signal/Rausch-Verhältnisse und höhere DLRS-Werte verursacht. Häufig wird das Hintergrundrauschen über das Waschen der Arrays eingeführt (s.'troubleshooting' Agilent aCGH-Protokoll v6.2). Je höher die spezifischen Signalintensitäten, desto höher auch das Signal/Rausch-Verhältnis. Einfluss haben hier die Rotationsgeschwindigkeit und die Inkubationszeit des Arrays im Ofen während der Hybridisierung (de Witte *et al.*, 2006). Da alle Signalintensitäten im exzellenten bis guten vorgegebenen Bereich lagen, konnten die niedrigen Signal/Rausch-Verhältnisse nicht erklärt werden. Vermutet wird ein Zusammenkommen mehrerer Aspekte, angefangen beim DNA-Ursprung bis hin zu Wasch-Artefakten. Dies bedeutet, dass das aCGH-Protokoll so exakt wie möglich eingehalten werden (Yu *et al.*, 2009) und dass bei auftretenden Abweichungen der Qualitätsparameter die Auswertung der Ergebnisse mit Vorsicht beurteilt werden sollte. Auf Grund von hohen DLRS-Werten, die sich in den aCGH-Profilen (nur teilweise) in einer hohen Streuung der Oligonukleotide oder einer wellenförmigen 'moving average' bemerkbar machen, ist die Gefahr der Fehlinterpretation in Form von falsch-positiven als auch falsch-negativen Ergebnissen gegeben. Hostetter *et al.* z. B. verglichen aCGH-Analysen mit DNA aus frischem, gefrorenem Material und aus FFPE-Proben ('formalin-fixed paraffin-embedded'). Sie zeigten, dass trotz erhöhter DLRS-Werte über 0,3 (schlecht) bei den FFPE-Versuchen Imbalancen zuverlässig detektiert wurden (Hostetter *et al.*, 2010).

## 6.2 Rekurrent auftretende Aberrationen

Mit der hochauflösenden aCGH-Technik konnten in diesem Projekt zuvor kryptische, rekurrente Aberrationen aufgedeckt werden, die hpts. die Chromosomen 4, 5, 7 und 21 betrafen.

Die zytogenetisch sichtbare, häufigste bekannte Aberration bei MDS ist die 5q-Deletion, die in 30% der *de novo* Fälle gefunden wird. 7q-Deletionen/Monosomien 7 (21%) zählen ebenfalls zu den häufigsten, nicht-zufälligen Ereignissen bei MDS. Chromosom 21-Verluste als auch -Zugewinne werden in einem geringeren Prozentsatz beobachtet (Haase *et al.*, 2007). Das Chromosom 4 rückte erst vor kurzem ins Blickfeld der MDS-Forscher (Delhommeau *et al.*, 2008). Karyotypisch werden bei MDS viele weitere rekurrente Aberrationen mit Frequenzen zwischen 2 und 21% gefunden und sind von Bedeutung für die Prognose (Haase *et al.*, 2007).

### 6.2.1 7q22-Deletionen bei drei Patienten (P15, P70, P100)

Mit einer 244 k-aCGH-Analyse (P70) und zwei 44 k-Arrayanalysen (P15 und P100) konnten drei über 2 Mb-große, fast exakt gleiche Deletionen in 7q22.1 identifiziert werden. Durch eine spezifische 'custom'-Arrayanalyse konnte die Deletion auf eine Region eingrenzt werden, die in etwa (bei P15) von Gen *ZCWPW1* bis zum Gen *ALKBH4* reichte. Der deletierte genomische Lokus von etwa 99,8 bis 101,9 Mb enthält über 40 Gene. Interessante Gene, wie *CUX1*, das u. a. eine Rolle bei der Zellzyklusprogression spielt, oder *RABL5*, das ein Mitglied der RAS-Onkogen-Familie darstellt, waren betroffen. Einige Gene, wie z. B. *TFR2*, *EPO*, *ACHE*, *SERPINE1* und *PLOD3*, sind zudem bereits in der OMIM ('online mendelian inheritance in man')-Datenbank vermerkt.

Schon 1997 wurde u. a. die Chromosom 7-Monosomie als ein schlechter prognostischer Marker für MDS im IPS-System akzeptiert (Greenberg *et al.*, 1997). Lange zuvor wurde schon nach versteckten Imbalancen auf Chromosom 7, bei scheinbar zytogenetisch normalem Chromosom 7, gesucht (Kere *et al.*, 1987). Große partielle Verluste des q-Armes, interstitiell oder mit Beteiligung des Telomeres, häufig mit einem Bruch in 7q22 wurden beschrieben. 1989 postulierten Kere *et al.* den proximalen Bruchpunkt zwischen *EPO* und *SERPINE*, beide Gene liegen bei unseren betroffenen Patienten mitten in der Deletion (Kere *et al.*, 1989). Kandidatengene, mitverantwortlich für die MDS-Pathogenese, in 7q wurden von da an vorgeschlagen und potentielle myeloide Tumorsuppressorgene

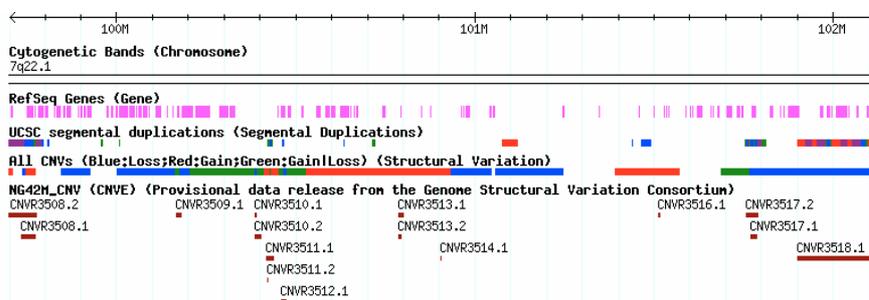
gesucht (Mufti, 1992; Stephenson *et al.*, 1996). Zwei häufig betroffene Regionen konnten identifiziert werden, eine kleinere eher involviert in CML, die größere in MDS/AML (Fischer *et al.*, 1997). Eine Mini-CDR ('common deleted region') über den Genen *CUX1*, *APS* und *PMS2L3* wurde bei Patienten mit myeloiden Erkrankungen beschrieben (Tosi *et al.*, 1999). Durch FISH-Studien nach klassischer zytogenetisch beurteilter 7q22-Deletion konnte eine CDR in 7q22 auf 2-3 Mb und 14 Gene eingegrenzt werden (Curtiss *et al.*, 2005). Diese Region von Gen *LRRC17* bis Gen *SRPK2* bzw. von 102,3 bis 104,9 Mb liegt verglichen mit der in dieser Arbeit beschriebenen Deletion distaler.

Erst mit Hilfe der modernen Array-Techniken wurden hochauflösende Analysen möglich, mit denen das Auftreten submikroskopischer 7q-Deletionen und ihr genaues Ausmaß untersucht werden konnten. Die erste submikroskopische 7q22-Deletion mit einer ähnlichen Größe und dem gleichen Chromosomenlokus wie bei den hier vorgestellten drei Patienten wurde von Gondek *et al.* beschrieben. 174 Patientenproben (MDS, sAML, MDS/MPD) wurden mittels 250 k-SNP-Arrays analysiert. Neben UPDs in einem Prozentsatz von bis zu 35% (MDS/MPD) konnten in karyotypisch unauffälligen, aber auch in karyotypisch auffälligen Patienten Aberrationen bzw. Zusatzaberrationen detektiert werden. Drei Patienten wiesen eine vergleichbar kleine 7q22-Deletion auf: die erste mit einer Größe von 1,73 Mb (100.353.399-102.084652 bp), die zweite mit 2,09 Mb (99.859.138-101.952271 bp) und die dritte mit einer Größe von 4,19 Mb (98.586.560-102.781.465 bp). Bei Vergleich fällt auf, dass die bei Patient 2 identifizierte Deletion mit der hier beschriebenen (99,8-101,9 Mb) annähernd identisch ist. Bezogen auf das Krankheitsbild hatten die ersten beiden Patienten die Diagnose CMML und einen normalen Karyotyp mit IPSS 0 bzw. 1,5. Patient 2 entwickelte eine AML. Der dritte Patient war an einer sekundären AML mit einem komplexen Karyotyp erkrankt (Gondek *et al.*, 2008). Abgesehen davon, dass diese Fälle (nach WHO) nicht (mehr) zur MDS-Erkrankungsgruppe zählen, könnte es sich bei der Deletion von Fall 2 und den hier mittels 60-mer-Oligonukleotid-aCGH detektierten Deletionen um identische Aberrationen handeln. In einer weiteren genomweiten Studie (Starczynowski *et al.*, 2008) konnten mit Hilfe von BAC-Arrays zwei 7q22-Deletionen in 44 analysierten MDS-Patienten identifiziert werden. Die erste 1,8 Mb große Deletion reichte von 99,6 bis 101,4 Mb und die zweite nur 0,4 Mb große von 101,5 bis 101,9 Mb. Beide Patienten litten an RA ohne AML-Progress, mit IPSS 1 bzw. 0 und einer klonalen Trisomie 14 bzw. karyotypisch unauffällig. Der erste überlebte 24 Monate, der zweite hatte eine 'follow-up'-Untersuchung und lebte noch nach 42 Monaten. Auch diese beiden Deletionen umfassen fast denselben Lokus wie bei P15,

P17 und P100, die interessanterweise an unterschiedlichen MDS-Subtypen (RAEB-1, RCMD mit Prognosestufe Int-1) bzw. an einer Hochrisiko-AML litten. Zudem waren sie (erst) zwischen 60 und 70 Jahren alt und verstarben kurz nach der Erstdiagnose innerhalb der ersten 15 Monate. Entsprechend einer aktuellen multizentrischen Studie haben MDS-Patienten mit einem normalen Karyotyp dagegen eine mittlere Lebenserwartung von 53 Monaten, Patienten mit einer isolierten 7q-Deletion von 19 Monaten bzw. mit isolierter Monosomie 7 von 14 Monaten. RAEB-1-Patienten überleben durchschnittlich 17 Monate, RCMD-Patienten 37 Monate (Haase *et al.*, 2007). Auch wenn diese Zahl an betroffenen Patienten mit submikroskopischer 7q-Deletion nicht ausreicht, um Korrelationen mit dem Krankheitsverlauf herzustellen, sollten diese Fälle doch als seltene Aberrationstypen mit möglicher prognostischer Bedeutung weiter beobachtet werden.

In dieser Arbeit sollte die Abgrenzung der gefundenen, möglicherweise MDS-spezifischen 7q22-Deletion und einer Kopienzahlvariante bei Gesunden (CNV) belegt werden. Leider standen hierzu keine Normal-DNA-Proben aus z. B. Mundschleimhaut-Abstrichen der Studienpatienten zur Verfügung, um gepaarte Analysen auf vererbte CNVs zu unternehmen. Dieser Nachteil wurde versucht zu umgehen, indem mit der umfangreichen Variantendatenbank (DGV) gearbeitet wurde. Mit Hilfe der DGV fiel auf, dass in der deletierten ca. 2 Mb großen Region trotz der hohen Gendichte sehr viele kleinere CNVs bekannt sind. Der größte (342 kb) bei 85 von 270 mit BAC-Arrays untersuchten Normalpersonen gefundene CNV in dieser Region liegt bei 100,2 bis 100,5 Mb (Redon *et al.*, 2006). Smith *et al.* überprüften die in der DGV aufgenommenen CNVs auf ihr Vorhandensein, ihre Häufigkeit und ihre tatsächliche Größe in einem 50-Probanden-starken gesunden Kollektiv. Über zwei sich gegenseitig ergänzende und validierende Oligonukleotidarrays konnten genomweit 2.208 CNVs identifiziert werden. Die meisten CNVs waren mit einer medianen Größe von 4,4 kb klein und wiesen gleiche Endpunkte auf (de Smith *et al.*, 2007). Die Sammlung von CNVs in einer Datenbank wie der DGV zum *schnellen* Datenabgleich wirft einige Kritikpunkte auf, wie dass sie aus verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Techniken hervorgehen. Je höher die Auflösung der Technik, desto kleiner und mehr werden die detektierten Varianten (Zhang *et al.*, 2009). Dies könnte gleichzeitig bedeuten, dass durch gröbere Techniken einerseits kleine Varianten übersehen werden und andererseits detektierte Varianten größer dargestellt werden als sie in Wirklichkeit sind. Mittlerweile wurde u. a. ein einheitliches 'CNV discovery'-Projekt des 'Genome Structural Variation Consortium' (Nigel Carter *et al.*) ins Leben gerufen. Dessen Ergebnis passt zu den von Smith *et al.* postulierten Daten, dass

bisher gefundene große CNVs in Wirklichkeit viel kleiner sind. Die deletierte 7q22-Deletion stellte sich nach den Consortium-Analysen folgendermaßen dar:



**Abbildung 6.2.1:** Vergleich der bisher von verschiedenen Studien zusammengefassten CNVs ('All CNVs') und segmentalen Duplikationen gegenüber denen des Consortiums ('NG42M-CNV'). Dargestellt ist in etwa die bei den hier drei vorgestellten Patienten deletierte Region in 7q22 bei 101 Mb. Die Gene sind als rosa Balken komprimiert dargestellt. Bekannte segmentale Duplikationen (UCSC) und CNVs in der Region werden entsprechend ihrer Größe über bunte Balken bzw. Striche gekennzeichnet. Die vom Consortium in gesunden Personen gefundenen und verifizierten CNVs sind entsprechend ihrer Größe und Lage einzeln gezeigt (dunkelrote Balken). Auffällig ist, dass hier weniger und auch viel kleinere variante Bereiche aufgeführt bzw. in der zugehörigen Studie detektiert wurden.

Auf Grund der bisherigen Daten wurde die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den drei 7q22-Deletionen um CNVs handelt, minimiert. Zudem traten diese Deletionen bei keinem von ca. 40 von M. Drechsler (Institut für Humangenetik, Uniklinik Düsseldorf) mit aCGH untersuchten Proben von Patienten mit mentaler Retardierung auf.

Dieses Vorgehen birgt trotzdem noch Unsicherheiten, welches mittlerweile deutlich gemacht wurde (Heinrichs *et al.*, 2009). In dieser Studie wurden von 33 karyotypisch normalen MDS-Patienten SNP-Arrayanalysen mit DNA aus Knochenmark und aus individuellen Mundschleimhautabstrichen verglichen. Von 31 gefundenen Imbalancen konnten nur 3 als echte Mikrodeletionen definiert werden, während sich die anderen 28 als CNVs darstellten. Wäre nur die CNV-Datenbank zum Vergleich anstelle der individuellen Normal-DNAs herangezogen worden, wären fälschlicherweise 6 (21%) der 28 CNVs als Mikrodeletionen beurteilt worden.

Für diese Arbeit wurde angenommen, dass ein vererbter CNV in 100% der Knochenmarkszellen (aus denen die DNA gewonnen wurde) vorhanden sein müsste.

Um das Arrayergebnis zu verifizieren wurden weitere Techniken zur Bestätigung der Imbalancen in dieser Arbeit eingesetzt. Außerdem wurde der Nachweis des Anteils an aberranten Zellen durch FISH-Untersuchungen oder durch den Vergleich des Array-logRatios mit weiteren ermittelten Ratios bei Normalisierung mit Referenz-DNAs bestimmt. Als zuverlässige Techniken zur Verifizierung von Imbalancen erwiesen sich sowohl FISH- als auch qPCR-Analysen. Je nach Fragestellung war die eine oder andere Verifizierungs-

methode sinnvoller. Als exakter erachtet wurde die Begutachtung des genomischen Verlustes auf Einzelzellniveau mit spezifischen (BAC-) Sonden in FISH-Analysen, wo möglich. Die 7q22-Deletionen konnten mit jeweils zwei FISH-Sonden in 86% (P70), in 73% (P15) und in 87% (P100) der Zellen bestätigt werden. Mit diesen Ergebnissen wurde gleichzeitig bewiesen, dass es sich hier um eine Krankheits-spezifische Deletion handelt und nicht um einen CNV, der in 100% der Zellen Signalausfälle gezeigt hätte.

Im Falle einer Deletion bestehen die Vorteile der FISH darin, dass der Anteil an aberranten Zellen exakt bestimmt und dass eine heterozygote Deletion direkt von einer homozygoten Deletion abgegrenzt werden kann. Auch bei einer lokalen Mehrfachamplifikation oder translozierten Abschnitten ist die Auswertung einfach. Mit Hilfe der FISH-Technik können kryptische Fusionsgene oder Varianten bekannter Rearrangements aufgedeckt werden (Vardiman *et al.*, 2009). Auch Aberrationen in nur einem kleinen Prozentsatz von Zellen können mit Hilfe des angegebenen oder ermittelten 'cut-off'-Wertes der Sonde und in Verbindung mit einer Referenzsonde auf demselben Chromosom gut von einem zufälligen Signalausfall abgegrenzt werden. Seltener kommt es zu nicht auswertbaren Präparaten auf Grund von qualitativ schlechten Chromosomen. Um die FISH-Technik einsetzen zu können muss die zu untersuchende Imbalance entsprechend der BAC-Größe (200 kb) groß genug sein. Handelt es sich um eine Tandemduplikation muss bedacht werden, dass ein doppeltes, direkt hintereinander geschaltetes Fluoreszenzsignal unter dem Mikroskop nur schwer von einem Einzelsignal zu unterscheiden ist (Bejjani und Shaffer, 2006).

Zur weiteren Bestätigung wurde die quantitative 'real-time' PCR mit dem SybrGreen-Fluoreszenzfarbstoff zum relativen Nachweis von Kopienzahlen eingesetzt. Hier wurden die Proben P70 und P100 analysiert. Die sich ergebenden Ratios von 0,7 und 0,45 mit Primern im *CUX1*-Gen bestätigten signifikant das Fehlen (mindestens des untersuchten 94 bp-großen Abschnittes am Übergang von Intron 1 zu Exon 2).

Die Vorteile der qPCR sind, dass auch wirklich kleinste Imbalancen (ab theoretisch 50 bp) (Dunø *et al.*, 2004) und sowohl Deletionen, Amplifikationen als auch Tandemduplikationen als relative Kopienzahlen nachgewiesen werden können. Primer-Sets sind beliebig generierbar, man ist nicht auf Klondatenbanken angewiesen. Da es sich um eine relative Kopienzahlbestimmung handelte, zu deren Berechnung die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Formel verwendet wurde, die von theoretisch optimalen PCR-Abläufen ausgeht, spiegelten die Ergebnisse nur eine Annäherung wider (Pfaffl, 2001; Holzapfel und Wickert, 2007). Wichtig war die Entwicklung eines verlässlichen Primerpaares für ein 'single copy'-Referenzgen, in diesem Fall *PRNP* ('prion protein'), das der Normalisierung diente (Pfaffl *et al.*, 2002). Zudem

wurde sich bei den qPCR-Analysen für dieselbe Pool-Referenz-DNA entschieden, die auch bei den aCGH-Analysen zum Einsatz kam (Brazma *et al.*, 2007). Neben generell angesetzten Triplikaten pro Lauf, wurde die gesamte Analyse ein- bis dreimal wiederholt, um signifikante Kopienzahlratios berechnen zu können (Weksberg *et al.*, 2005).

Bei Vergleich der FISH- und qPCR-Ergebnisse fiel auf, dass sie nicht exakt zu korrelieren waren. Normalerweise sollte eine heterozygote Deletion, die in 100% der Zellen vorkommt, rechnerisch ein qPCR-Ratio von 0,5 ergeben (vgl. Methoden). Das heißt, sowohl bei P70 (FISH 86%) als auch bei P100 (FISH 87%) wurde ein Ratio von ca. 0,57 erwartet. In beiden Fällen wichen die bestimmten Werte ca. 22% nach unten bzw. oben voneinander ab. Anhand der  $\log_2$ Ratios der Arrayanalysen selber, die bei -0,36 bzw. -0,49 lagen, wurden nur ca. 43% bzw. 60% Zellen mit heterozygoter 7q22-Deletion und qPCR-Ratios von 0,78 bzw. 0,71 erwartet. In diesen Fällen gingen die ermittelten Werte der drei unabhängigen Analysen in Theorie und Praxis weit auseinander. Gründe für diese Abweichungen können in der Addition der je Analyse aufgetretenen Fehlerwerte liegen. Bei Vergleichen der entsprechenden Werte anderer untersuchter Aberrationen dieser Arbeit (vgl. Kapitel 6.5.1) kam es auch zu geringeren Abweichungen.

Allgemein kann bei hohen Ratio-Abweichungen der qPCR von der Realität (sichtbar bei FISH- mit qPCR-Vergleichen) nicht mehr beurteilt werden, ob es sich um eine Aberration in 100% der Zellen und somit um einen möglichen CNV handelt. In diesem Fall wäre das qPCR-Ratio von P100 mit 0,45 ohne den Einbezug des FISH-Analyse-Ergebnisses als eine heterozygote Deletion in 100% der Zellen gewertet worden. Dementsprechend sollte bei fehlendem Normalmaterial zur Bestimmung von CNVs die FISH-Methode der qPCR-Technik, wenn möglich, vorgezogen werden, um direkt auf Zellebene urteilen zu können.

Zur Bestimmung der exakten Bruchpunkte dieser neuen submikroskopischen 7q22-Deletion mittels 'long range'-PCR mussten die Deletionsendpunkte zuvor durch eine 'custom'-Array-Untersuchung hochauflösend dargestellt werden. Mit der durchgeführten 'custom'-Array1-Analyse konnte im Fall der 7q22-Deletion keine Annäherung an die Bruchpunkte erreicht werden. Es kam bei einem mittleren Oligonukleotidabstand von nur 125 bp im Bruchpunktbereich zu einer übermäßigen Streuung. Agilent Technologies definiert die Qualität und Verlässlichkeit der Oligonukleotide bezüglich ihrer spezifischen Bindung über charakteristische Werte ('probe scores'). Diese Werte liegen zwischen 0 und 1, je höher, desto wahrscheinlicher wird das Oligonukleotid ein gutes logRatio ergeben, wenn es in der aCGH eingesetzt wird. In diesem Fall stellte sich heraus, dass der Durchschnittsscore der 12.576 Oligonukleotide der hochauflösenden 7q-Region nur 0,56 betrug. Für das

2. 'custom'-Array-Design wurde der durchschnittliche genomische Oligonukleotidabstand in dieser Region auf 2 kb angehoben und somit überwiegend die Katalogoligonukleotide des mittlerweile kommerziell angebotenen 1 M-CGH-Arrays gewählt. Der durchschnittliche 'probe score' betrug bei 1.800 Proben 0,81 und die durchgeführte Arrayanalyse zog ein gutes Hybridisierungsergebnis nach sich. Die Bruchpunkte in 7q22 konnten bei der hybridisierten P15-Probe auf die Gene *ZCWPW1* (proximal) und *ALKBH4* (distal) eingegrenzt werden; ein Zinkfingerprotein und ein mögliches Reparaturprotein (Alkylierung), von denen keine weiteren Funktionen bekannt sind. Mit verschiedenen Primern wurde sich der angezeigten Bruchpunkte angenähert, in den 'long range'-PCRs konnte allerdings kein spezifisches Produkt amplifiziert werden. Bereits kleine Deletions-spezifische PCRs können u. U. nicht auf Anhieb erfolgreich sein. Von 55 unter 3 kb-kleinen Deletions-CNVs, die bei mehr als einer gesunden Person einer Oligonukleotid-aCGH-Studie vorkamen, konnten nur 20 auf Anhieb per 'long range'-PCR amplifiziert werden. Als Ursache hierfür kommen mehrere Faktoren in Frage, wie z. B. die Lage in segmentalen Duplikationsregionen oder anderen repetitiven Sequenzen, die Ungenauigkeit des aCGH-Algorithmus bezüglich der Größe der Deletion, das Primer-Design usw. (de Smith *et al.*, 2008). Bekannt ist mittlerweile, dass einige rekurrente genomische Rearrangements von segmentalen Duplikationen, die zueinander partiell Homologien zeigen und gleichorientiert im Genom vorkommen, vermittelt werden. Auch im Fall der 7q22-Deletion fielen flankierend segmentale Duplikationen auf. Diese LCRs ('low copy repeats') sind meist mehr als 99,5% identisch, überspannen mehr als 100 kb DNA und sind wahrscheinlich evolutiv durch Tandemduplikationen entstanden. Der Mechanismus, der dann zu Aberrationen führen kann, ist die sogenannte nicht-allele homologe Rekombination (NAHR; vgl. auch Kapitel 6.4.1) (Osborne, 2008). Sie ist sowohl bekannt für häufigere Syndrome als auch für nicht-pathogene CNVs (Turner *et al.*, 2008). Bei der hier beschriebenen 7q22-Deletion war proximal der Duplikationslokalus etwa 75 kb vom Bruchpunkt entfernt. Ob diese Entfernung ausreicht, um an dem genannten NAHR-Mechanismus beteiligt zu sein, ist fraglich. Weitere Mechanismen, die bereits für andere Imbalancen aufgestellt wurden, kämen in Frage und konnten für den 7q22-Fall auf Grund der fehlgeschlagenen, exakten Bruchpunktbestimmung nicht weiter verfolgt werden. Bis heute ist nicht klar bestimmt worden, welches Gen auf Chromosom 7 eine Rolle bei der MDS-Pathogenese spielt. Die geringe Überlebenszeit der drei analysierten Patienten weist jedoch darauf hin, dass auch diese identifizierte, submikroskopische Deletion in 7q22 ausreichen könnte, um zur schlechten Prognose der Betroffenen beizutragen.

### 6.2.2 5q31-Deletionen bei zwei Patienten (P52, P100)

Mit einer 244 k- und einer 44 k-Arrayanalyse konnten zwei kryptische 5q-Deletionen identifiziert und mittels FISH und qPCR verifiziert werden.

Die erste isolierte, knapp 18 Mb große, Deletion von q23.2-31.3 (124-142 Mb) in P52 konnte in der tumorzytogenetischen Diagnostik nicht gesehen werden (und die FISH-Technik war im Jahr 2001 in Düsseldorf noch keine Routinemethode). Die Auflösung betrug auf Grund einer schlechten Tumorchromosomenqualität nur durchschnittlich 100 Banden (normal 100-300 pro haploidem Genom). Die hier retrospektiv durchgeführten FISH-Analysen mit der *EGR1*-Sonde (137,8 Mb; 5q31.2) und der RP11-143H23-BAC-Sonde (124,7 Mb; 5q23.2) bestätigten eine Deletion und somit das Arrayergebnis in 45% der Zellen. Es konnte keine weitere Aberration mittels aCGH identifiziert werden. In der eigenen Oligonukleotid-aCGH-Studie von 16 5q-Patienten konnten die Bruchpunkte ähnlich großer und größerer, zytogenetisch sichtbarer 5q-Deletionen verfeinert (Evers *et al.*, 2007) und einige mittels 'custom'-Arrayanalysen und 'long range'-PCRs exakt bestimmt werden (Diplomarbeit Deborah Ingenhag, 2010).

Für diese Arbeit stellte sich deshalb die per 44 k-Array nur ca. 1,4 Mb kleine, aufgedeckte und mittels 'custom'-Array und 'long range'-PCR auf etwa 1,8 Mb korrigierte, Deletion in P100 interessanter dar als die 18 Mb-große. Sie kam in 71% der Zellen im Lokus 5q31.2 bei 137,2 Mb vor, mit einem proximalen Bruchpunkt nahe des *MYOT*-Gens (137,2 Mb) und einem distalen Bruchpunkt nahe *CXXC5* (139 Mb). *MYOT* ('*myotilin*') kodiert für ein cytoskeletales Protein der Muskelkontraktion, während *CXXC5* für ein CXXC-Finger 5-Protein kodiert, das vermutlich einen BMP4 ('bone morphogenetic protein 4')-regulierten Modulator im Wnt-Signalweg neuronaler Stammzellen darstellt (Andersson *et al.*, 2009).

Schon lange wurde nach einem oder mehreren Tumorsuppressor-Kandidateng(en) in 5q gesucht und mögliche CDRs beschrieben. Die kleinste überlappende Region von 5q-Deletionen in mildem MDS wurde auf 3 Mb (heute auf Grund der geschlossenen Genomlücken auf 10 Mb korrigiert), zwischen q31-q32 lokalisiert, flankiert von den Genen *ADR $\beta$ 2* (148,2 Mb) und *IL12 $\beta$* . Später konnte sie auf 1,5 Mb (40 Gene) in 5q32 (heute korrigiert zu q33.1) zwischen *D5S413* und *GLRA1* (151,2 Mb) mit FISH eingegrenzt werden (Boulwood *et al.*, 2002). Keine biallelischen Deletionen, Punktmutationen oder aberrante Methylierungsmuster wurden in einem der etwa 40 Gene dieser Region, bei Vorliegen einer Deletion, bisher beschrieben (Ebert *et al.*, 2008). Mit Hilfe einer SNP-Array-Studie mit insgesamt 42 MDS-Patienten mit zytogenetisch sichtbarer 5q-Deletion (21 mit 5q-

Syndrom, und 21 andere) konnte eine 2,9 Mb-große CDR, ähnlich wie zuvor, zwischen den Genen *SH3TC2* bei 148,3 Mb und *GLRA1*, bestimmt werden (Wang *et al.*, 2008). Deutlich abgegrenzt wurde diese als 5q-Syndrom-typische bezeichnete CDR von der AML-typischen und aggressivere MDS-Typen-betreffende CDR (1-1,5 Mb, D5S479 bei 136,3 Mb und D5S500), konzentriert auf die Bande q31.2 (Zhao *et al.*, 1997). Unter einer Serie von AML- und MDS-Fällen ohne 5q-Syndrom konnte mit Hilfe von PCR-basierten LOH-Analysen in 5q eine submikroskopische 2,4 Mb-kleine Deletion zwischen *IL9* (135,2 Mb) und D5S414 (137,6 Mb) in einem Patienten mit AML-Rückfall aufgedeckt werden. Sein Karyotyp wies zu dem Zeitpunkt drei klonale Aberrationen auf, u. a. eine *del(7)(q31q36)* und seine Überlebenszeit betrug < 10 Monate (Horrigan *et al.*, 1996). Zuvor konnten Fairman *et al.* eine ähnlich gelagerte Deletion (*IL9-EGR1* bzw. 135,2-137,8 Mb) in 5q, die durch eine Dreifachtranslokation *t(5;18;17)* in einem Patienten auffiel, finden (Fairman *et al.*, 1995). Häufiger werden mögliche Kandidatenregionen durch Translokationen, die kryptische Deletionen beherbergen, entschlüsselt (Hoffman *et al.*, 2009). Eine weitere Eingrenzung der Region mit Hilfe polymorpher Marker, die bei allen AML-Patienten mit *del(5q)* als deletiert erwartet wurde, gelang 2000. In der nur 700 kb kleinen Region von 137,8-138,8 Mb (D5S500-D5S594) wurden 9 exprimierte Sequenzen, u. a. *CTNNA1*, *CDC25C*, *EGR1*, *HSPA9*, *THRCP*, *CDC23*, identifiziert (Horrigan *et al.*, 2000). Die meisten 5q-Deletionen in MDS als auch AML umfassen jedoch beide beschriebenen Regionen. Verglichen mit den hier gefundenen submikroskopischen Deletionen bedeutet dies, dass sowohl P52 als auch P100 (137,2-139 Mb) keine Deletion der 5q-Syndrom-Patienten-CDR aufwiesen. Interessanterweise entspricht die Lage und Größe der mittels aCGH aufgedeckten P100-Deletion annähernd der schon früh postulierten Lage und Größe der AML-CDR.

Die Chromosomenbande 5q31.2 von 136,63-137,92 Mb mit den 28 Genen *SPOCK1*, *KLHL3*, *HNRPA0*, *NPY6R*, *MYOT*, *PKD2L2*, *C5orf5*, *WNT8A*, *NME5*, *BRD8*, *KIF20A*, *CDC23*, *GFRA3*, *CDC25C*, *FAM53C*, *JMJD1B*, *REEP2*, *EGR1*, *ETF1*, *HSPA9*, *SNORD63*, *LOC391836*, *LOC729429*, *CTNNA1*, *LRRTM2*, *SIL1*, *MATR3*, *SNORA74A* wurde bereits von Graubert *et al.* ohne Erfolg auf Mutationen und Mikrodeletionen bei 46 *de novo* MDS-Patienten analysiert. Daraufhin wurde die Wahrscheinlichkeit der Haploinsuffizienz als alleinige Ursache für die MDS-Pathogenese minimiert (Graubert *et al.*, 2009). Diese Region umfasst fast alle Gene, die bei P100 ebenfalls deletiert vorlagen, es fehlen nur die Gene *MATR2*, *PAIP2*, *SLC23A1*, *MGC29506*, *LOC389333*, *SPATA24*, *DNAJC18*, *ECSCR*, *TMEM173*, *UBE2D2* und *CXXC5*. Vorliegende Mutationen in diesen Genen und

damit ihre mögliche Tumorsuppressorwirkung können hier nicht ausgeschlossen werden. Zuvor wurde bereits *EGR1* ('early growth response-1') als ein Kandidatengen beschrieben. *EGR1*-defiziente Mäuse zeigten die Entwicklung myeloproliferativer Erkrankungen, für den Krankheitsprogress wurden sekundäre Mutationen postuliert (Joslin *et al.*, 2007).

Eisenmann *et al.* fassten die beiden Haupt-CDRs bezogen auf die möglichen diskutierten Kandidatengene oder Tumorsuppressorgene zusammen und diskutierten einen neuen Mechanismus, der über ein Netzwerk zustande kommen könnte. *DIAPH1* liegt zwischen den Haupt-CDRs und das exprimierte Produkt mDia1 (Funktion bei der Aktinfilamentarchitektur) könnte zusammen mit seinen flankierenden Nachbargenen einen funktionellen Knoten bilden, der die zytoskeletale Dynamik regulieren und dessen Dysfunktion die Entwicklung eines del(5q)-MDS fördern könnte. Die Verbindung zwischen den unterschiedlichen Kandidatengenen könnte *SRF* sein, das als Aktinsensor agiert und die Expression anderer 5q-Gene (*EGR1*) kontrolliert und selber von wieder anderen reguliert wird (Eisenmann *et al.*, 2009). Sieben Gene in der untersuchten 5q31.2-Region bei del(5q)-Patienten zeigten eine 50%ige Reduktion der mRNA-Expression in CD34<sup>+</sup>-Zellen, bei keinem der Gene trat ein vollständiger Verlust der Expression auf. Hierdurch wurde die Hypothese gestützt, dass eher die Beeinträchtigung mehrerer Gene in Kombination für das spezifische Krankheitsbild verantwortlich sind (Graubert *et al.*, 2009).

Bisher konnte keine weitere Publikation gefunden werden, die eine ähnliche submikroskopische Deletion des identischen Lokus identifizieren konnte. Sie könnte das für die MDS-Pathogenese von P100 (mit-)verantwortliche Kandidatengen enthalten.

Eine Behandlung mit Lenalidomid hätte bei Kenntnis der Deletionen bei beiden Patienten (P100 und P52) versucht werden können. Beide Deletionen enthalten das *CDC25C* ('cell division cycle 25 homolog C')-Gen, von dem gezeigt werden konnte, dass Lenalidomid dessen Phosphataseaktivität inhibiert, wodurch spezifisch in del(5q)-AML-Zellen ein G<sub>2</sub>-Arrest des Zellzyklus und somit eine Apoptose induziert wird (Wei *et al.*, 2009).

Beide Patienten hatten die Diagnose RCMD mit der Risikogruppe Int-1. Ihr als low-risk (unauffällig, 5q-, 20q-, -Y) eingestuftes Karyotyp, in diesem Fall normal, trug also nicht zur Scorebildung des IPSS bei. Abgesehen davon, dass submikroskopische Aberrationen in IPSS bisher nicht einbezogen werden, hätten die alleinig aufgedeckten isolierten Chromosom 5-Deletionen auch keinen Einfluss auf die IPSS-Risikobeurteilung genommen. Patient P52 überlebte 3,5 Jahre. Bei P100 wurde aber zusätzlich eine submikroskopische 7q22-Deletion (vgl. Kapitel 6.2.1) identifiziert. Diese hätte zu einer Hochstufung des Patienten zu Int-2 geführt. Chromosom 5 und -7-Aberrationen sind häufig

assoziierte Aberrationen bei MDS (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 1990). 5q-Patienten mit ein oder mehreren Zusatzaberrationen haben ein signifikant kürzeres Gesamt-überleben als Patienten mit isolierter 5q-Deletion (Giagounidis *et al.*, 2004). Patient P100 überlebte nur ein Jahr.

### **6.2.3 21q22-Deletionen bei zwei Patienten (P24, P39)**

In zwei von 105 MDS-Patienten konnten mittels aCGH interstitielle unter 1 Mb-kleine Deletionen in 21q22.12 identifiziert werden, die mit FISH-Analysen bestätigt wurden. Auf dem 44 k-Array ist das *RUNX1*-Gen durch 6 Oligonukleotide repräsentiert und nur 3-4 von diesen waren deutlich deletiert. Die Fehlinterpretation der Auswertealgorithmen eines Oligonukleotid-logRatios führte zu einer Diskrepanz in der erwarteten und tatsächlichen Aberrationsgröße. Mit Hilfe des spezifischen, hochauflösenden 'custom'-Arrays<sup>1</sup> konnte in 21q22 eine Auflösung von 125 bp erreicht werden, wodurch die Bestimmung der exakten Bruchpunkte mittels Deletions-spezifischer PCRs bei beiden Patientenproben möglich wurde. In P24 konnte die per 244 k-Array ermittelte Deletionsgröße von knapp über 700 kb im Locus 35,2-35,9 Mb bestätigt werden. Bei P39 wurde, statt der vermuteten 330 kb-großen Deletion, ein doppelt so großer, knapp 700 kb-Verlust, von 35,1-35,8 Mb bestimmt. Somit wurde verdeutlicht, dass eine Verifikation auch wichtig sein kann, um das exakte Ausmaß und die wirklich deletierten oder trunktierten Gene zu ermitteln und nicht nur, um die Deletion an sich zu bestätigen. In beiden Fällen war jeweils nur das *RUNX1* (= *AML1*)-Gen involviert, wobei es in P39 zum vollständigen heterozygoten Verlust in 95% der Zellen und in P24 zu einem partiellen heterozygoten Verlust in 89% der Zellen kam. Durch die Deletion in P24-Deletion auf 21q22 ging nur das Exon 2 des *RUNX1*-Gens bzw. des längsten Transkriptes *RUNX1c* verloren, die Runt-Domäne aber blieb erhalten. Ein 2. Promotor in Exon 3 ist für die Transkripte *RUNX1a* und *b* zuständig, die somit von der Deletion ebenfalls unbeeinträchtigt blieben. Von Challen *et al.* konnten in der Maus für die drei Isoformen unterschiedliche Expressionscharakteristika identifiziert werden. Während die *RUNX1a*- und *b*-Isoformen durchgehend im Verlaufe der hämatopoetischen Differenzierung exprimiert werden, wird *RUNX1c* nur bei der Entstehung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) exprimiert. Dadurch wird *RUNX1c* eine besondere Rolle bei der Funktion von HSCs zugesprochen. Bei folgenden 'gain-of-function'-Analysen konnten jedoch keine Funktionsunterschiede der drei Isoformen in Maus-HSCs registriert werden (Challen und

Goodell, 2010). Welchen Einfluss ein heterozygoter *RUNX1c*-Verlust bei den beiden hier analysierten Patienten auf die Expression bzw. die Verhältnisverschiebung der Isoformen hat und welche Konsequenzen diese mit sich bringt ist unklar.

Chromosom 21 liegt in Leukämien und soliden Tumoren häufig verändert vor. Das bei diesen Fällen involvierte *RUNX1*-Gen stellt eine Untereinheit des heterodimeren 'core binding factors' dar. Das Transkriptionsfaktor-Protein bindet das Core-Element vieler Promotoren und Enhancer und spielt eine Rolle in der normalen Hämatopoese. Die *RUNX1*-mRNAs sind in Knochenmark- und peripheren Blutzellen exprimiert. Allen drei Isoformen und weiteren Genen der *RUNX*-Familie ist eine konservierte Runt-Domäne gemein. Diese ist verantwortlich für die DNA-Bindung und eine Protein-Protein-Interaktion und bleibt bei bekannten Genfusionen intakt (Miyoshi *et al.*, 1995). Zudem besitzt *RUNX1* eine Transaktivierungsdomäne (TAD) und kann als Aktivator oder Repressor fungieren. Durch eine *RUNX1*-Deletion konnte gezeigt werden, dass die *RUNX1*-Aktivität in vaskulär-endothelialen-Cadherin-positiven Endothelzellen essentiell für die intraarterielle Cluster-, die hämatopoetische Vorläufer- und die HSC-Ausbildung in Mäusen ist (Chen *et al.*, 2009a).

Bisher war bekannt, dass sowohl Punktmutationen als auch Translokationen und Amplifikationen von *RUNX1*, die zu einer konstitutiven Genaktivierung führen, eine Rolle bei Leukämien spielen. Heute sind 32 Translokationspartnerchromosomen bekannt, die entsprechenden Partnergene hat man in 17 Fällen auf molekularer Ebene identifizieren können. Dabei haben chimäre Proteine, bei denen die TAD wegfällt, einen dominant negativen Inhibitoreffekt bzgl. der Transkriptionsaktivierung des *RUNX1*-Proteins.

Bei MDS (und auch AML) treten in 15% der Fälle somatische Mutationen in *RUNX1* auf (Bacher *et al.*, 2009). Dabei wird die *RUNX1*-Dysfunktion durch Funktionsverlust auf Grund von Mutationen als eine der bedeutendsten pathogenen Mechanismen von MDS/AML anerkannt. Mutationen in MDS/AML können über die ganze Länge des Proteins verteilt vorkommen. *CD34*<sup>+</sup>-Zellen, die mit Wildtyp-*RUNX1* transduziert wurden, differenzierten schnell in reife myeloide oder monozytäre Zellen ohne Proliferation. Es wird vermutet, dass die Überexpression von Wildtyp-*RUNX1* die terminale Differenzierung ohne Selbsterneuerung fördert, die Zellproliferation blockiert und kein onkogenes Potential hat. Im Gegensatz dazu wird beim Ct-Mutationstyp (kurze trunkierende Mutationen) die Zelldifferenzierung blockiert und ein erhöhtes Proliferations- und Selbsterneuerungspotential beobachtet, wodurch ein Wachstumsvorteil erlangt und MDS gefördert wird. Mutationen des Ni-Typs ('in-frame'-Mutationen in der Runt-Domäne) führen ebenfalls zur

Blockierung der Differenzierung, erhöhen die Selbsterneuerungskapazität aber auch nur wenig, so dass zudem eine Proliferationsblockade besteht. Hierdurch alleine kann sich kein MDS/AML entwickeln, erst zusätzliche Veränderungen anderer Gene induzieren die Proliferation und scheinen für die MDS-Entstehung nötig zu sein. Tatsächlich treten Ni-Mutationen häufig in Verbindung mit karyotypischen Veränderungen und Genmutationen auf, während das bei Ct-Mutationen eher selten vorkommt. Wahrscheinlich ist, dass solche die Proliferation induzierenden genetischen Alterationen als 'second hits' nach dem 'master hit' erfolgen. Spezifische Anomalien, wie -7/7q- und Mutationen in Genen des RAS-Signalweges werden als Kollaboratoren von Ni-Mutationen postuliert. Es wird also vermutet, dass *RUNX1* (-Mutationen) in unterschiedliche molekulare Signalwege bei MDS/AML involviert ist (Harada und Harada, 2009).

*RUNX1*-Amplifikationen mit gesteigerter *RUNX1*-Expression oder Chromosom 21-Polysomien kommen in verschiedenen Variationen (intrachromosomal, Ring- und Markerchromosomen, extrachromosomale Amplifikate bzw. 'double minutes' usw.) vor und können zur Transformation hämatopoetischer Zellen führen (de Braekeleer *et al.*, 2009; Martínez-Ramírez *et al.*, 2005; Horsley *et al.*, 2006). Spezifische, erworbene *RUNX1*-Deletionen in MDS waren zu Beginn dieser Arbeit im Gegensatz zu den häufig gefundenen Amplifikationen, Mutationen und Translokationen nicht beschrieben.

Heterozygote *RUNX1*-Keimbahnmutationen entgegen sind als genetische Basis der autosomal dominanten familiären Thrombozytopenie mit AML-Prädisposition (FDP/AML) bekannt (Shinawi *et al.*, 2008). Die Inzidenz der MDS/AML-Entwicklung dieser Patienten liegt bei 20-50% (Harada und Harada, 2009). Eine Keimbahndeletion in den beiden vorgestellten Patienten konnte ausgeschlossen werden, da FISH-Analysen der Verlaufsproben einen Anstieg (P39) bzw. eine Reduktion (P24) des aberranten Zellklons zeigten. Bei drei Patienten mit chronischer Thrombozytopenie (syndromal) konnten mittels 244 k-Arrays teilweise kleine *RUNX1*-Deletionen identifiziert werden. Patient 1 entwickelte MDS/AML und hatte eine konstitutionelle, 0,7 Mb-kleine (34,8-35,5 Mb) 21q22-Deletion. Bei Patient 2 und Patient 3 wurden 1,81 Mb (33,8-35,6 Mb)- bzw. 19 Mb-große konstitutionelle Deletionen gefunden. Hiermit wurde die signifikante Rolle der *RUNX1*-Haploinsuffizienz durch Deletionen bei angeborener Thrombozytopenie und AML unterstützt (Shinawi *et al.*, 2008). Eine konstitutionelle submikroskopische 21q22-*RUNX1*-Deletion bei angeborener Thrombozytopenie (nicht-syndromal) und Myelodysplasie wurde in einem Patienten mit normalem Karyotyp beschrieben. Sie umfasste einen 1,6 Mb-Lokus (34,2-35,8 Mb) in 21q22.11-12, per 105 k-aCGH ermittelt (van der Crabben *et al.*, 2009).

Erst durch die neueren hochauflösenden SNP- und Oligonukleotid-Arrays werden mittlerweile vereinzelt submikroskopische Tumor-spezifische Verluste bei MDS/AML in der *RUNX1*-Region detektiert. Eine ähnliche Beobachtung, wie die in dieser Arbeit beschriebenen *RUNX1*-Deletionen, wurde von Gondek *et al.* publiziert. Bei den 174 Patienten (MDS, sAML, MDS/MPD), die mit 250 k-SNP-Arrays untersucht wurden, konnte in einem sAML-Fall mit aberrantem Karyotyp eine submikroskopische *RUNX1*-Deletion (1,17 Mb, 35,0-36,1 Mb) nachgewiesen werden (Gondek *et al.*, 2008). Von 33 mittels SNP-Arrays untersuchten karyotypisch normalen MDS-Patienten konnte bei einem RAEB-2-Patienten eine submikroskopische 21q22.12-Deletion von *RUNX1*, mit einer Größe von 1,2 Mb von 35,1-36,1 Mb, detektiert werden. Ein AML-Patient mit karyotypisch komplexen Veränderungen zeigte eine Unterbrechung von *RUNX1* durch eine kleine Deletion von 34,9-36,1 Mb (Heinrichs *et al.*, 2009). In drei MDS-Patienten konnten mittels 250 k-SNP-Arrays Mikrodeletionen, deren minimale überlappende Region einen Teil von *RUNX1* enthielt, gefunden werden. Patient 1 mit RA/RAEB-1, Int-2 und auffälligem Karyotyp (u. a. 7q22-Del.) zeigte nur ein Deletionsausmaß von 150 kb (35,23-35,39 Mb). Patient 2 mit AML, Int-1 und normalem Karyotyp wies eine ebenso kleine Deletion von 35,16-35,31 Mb auf. Patient 3 mit RCMD, Int-1 und auch karyotypisch unauffällig hatte mit 1,83 Mb, von 34,5-36,3 Mb, die größte Deletion (Langemeijer *et al.*, 2009).

Beide hier analysierten Patienten mit der *RUNX1*-Deletion litten an Hochrisiko-MDS bzw. AML und es konnten keine weiteren Aberrationen gefunden werden. Die Patienten verstarben innerhalb kürzester Zeit nach der Erstdiagnose, die in einem Fall durchgeführte PBCT konnte die Erkrankung nicht heilen. Dass in dieser Studie von karyotypisch normalen Patientenproben gleich zwei *RUNX1*-Deletionen (2%) identifiziert werden konnten, lässt erwarten, dass bei MDS weitere *RUNX1*-Deletionen gefunden werden könnten. Zusammengenommen mit den bereits bekannten Aberrationsarten dieses Gens wird die bedeutende Rolle von *RUNX1* in der MDS-Pathogenese weiter gefestigt.

#### **6.2.4 4q24-Deletionen bei zwei Patienten (P40, P41)**

Bei zwei Patienten wurde eine Deletion des *TET2*-Gens auf 4q24 entdeckt. Zu Beginn der Arbeit war dieses Gen noch unbekannt und nicht als mögliches Tumorsuppressorgen bei MDS oder AML beschrieben.

Auf Grund der beiden gefundenen, sich überlappenden Mikrodeletionen (268 kb / 700 kb), wovon die eine im Falle der homozygoten Deletion in annähernd 100% der Zellen (P40) nur das *TET2*-Gen umfasste, sollte getestet werden, ob *TET2* als Tumorsuppressorgen in Frage kommt. Die Mutationsanalyse der kodierenden Sequenz des noch vorhandenen Allels in P41 zeigte eine 'missense'-Mutation c.3.404G<A bzw. p.C1.135Y. Diese Mutation erfolgte am Ende des großen Exons 3a in der konservierten Region 1, die die Aminosäuren 1.104-1.478 umfasst (Langemeijer *et al.*, 2009). Durch die vorherige FISH-Analyse war bereits bekannt, dass es sich um ein heterogenes Zellgemisch mit 67% aberranten Zellen handelte.

Die Mutationsanalyse 8 weiterer MDS-Patienten, ohne *TET2*-Deletion, zeigte zwei weitere 'missense'-Mutationen und eine stille Mutation, jeweils heterozygot. Die Mutation p.L1.418S (Exon 9) in P49 erfolgte ebenfalls in der konservierten Region 1, während p.A1.505T (P42; Exon 9) und p.Q1.624Q (P29; Exon 10) außerhalb dieser bzw. der konservierten Region 2 von Aminosäure 1.845-2.002 stattfanden.

*TET2* gehört zu einer Familie mit insgesamt drei Genen. Die Funktion aller drei Proteine ist bisher unbekannt, *TET2* zeigt aber die am weitesten verbreitete Expression, u. a. in Knochenmark. Allen gemeinsam sind zwei hoch konservierte Bereiche (Lorsbach *et al.*, 2003). Das '*ten-eleven translocation gene 1*' auf 10q21.3 wurde bereits 2003 als das Partnergen von *MLL* bei der Translokation t(10;11)(q22;q23) in AML-Patienten erkannt. Eine Publikation von 2005 wies erstmalig auf einen möglichen neuen 0,5 Mb-großen Tumorsuppressorgen-Lokus in 4q24 hin (Viguié *et al.*, 2005).

Auf der 50. ASH ('American Society of Hematology')-Konferenz Ende 2008 wurde *TET2* von Delhommeau als mögliches neues Tumorsuppressorgen in Patienten mit Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) vorgestellt. Mit Hilfe von SNP- und CGH-Arrays konnte er in 3 von 5 Patienten Kopienzahl-neutrale größere UPDs bzw. eine 325 kb-Mikrodeletion in 4q24 identifizieren. Letztere Kandidatenregion schloss nur *TET2* ein, weshalb eine Mutationsanalyse durchgeführt wurde. Die Patienten mit 4q24-UPD zeigten pathogen eingestufte Mutationen. Anschließende *TET2*-Mutationsscreenings in 181 MPN-Patienten (mit *JAK2* p.V617F) ergaben eine Mutationsrate von 14%. Untersuchungen legten nahe, dass die *TET2*-Inaktivierung ein frühes Ereignis (pre-*JAK2* p.V617F) und das Protein an der Regulation der Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen beteiligt ist (Delhommeau *et al.*, 2008). *TET2*-Mutationen wurden auch bei *BCR-ABL*-negativen MPNs mit unterschiedlichen Mutationsfrequenzen in den spezifischen Entitäten nachgewiesen. Zudem wurde festgestellt, dass *TET2*-Mutationen nur mit dem Alter korrelieren (23%  $\geq$  60

Jährigen, 4% < 60Jährigen), aber keine prognostische Relevanz haben (Tefferi *et al.*, 2009b; Tefferi *et al.*, 2009a). U. a. wurden in 5 von 235 MDS-Patienten (bzw. 8 in insgesamt 396 SNP-Arrays) 4q24-Mikrodeletionen entdeckt, während UPDs eher bei MPNs vorkamen. Zwei der insgesamt 7 sequenzierten Fälle mit Deletion wiesen eine hemizygot Mutation der kodierenden Sequenz auf. Alle 22 nicht-rekurrenten Mutationen von insgesamt 68 sequenzierten Fällen verteilten sich über alle Exons und es resultierten hauptsächlich Stopp- und 'frameshift'-Mutationen. 45% der Mutationen fanden in den zwei konservierten Domänen (LCHX1 und 2) statt. In Fällen ohne UPD wurde die gleiche heterozygote Mutationsrate gefunden, wie die homozygote bei vorliegenden UPDs. In MDS wurde eine Mutationsrate von 14% (2 / 14) und in MDS/MPN eine von 40% (12 / 30) gefunden. Ein Trend in Richtung der Assoziation mit maligner Transformation konnte registriert werden, während ein signifikanter Einfluss von *TET2*-Mutationen auf die Überlebenszeit nicht bestätigt werden konnte (Jankowska *et al.*, 2009). Von 102 SNP-Arrayanalysen und Sequenzierungen in einer anderen Studie hatten 26% der MDS-Patienten *TET2*-Mutationen und / oder -Deletionen. *TET2*-Mutationen konnten der frühen MDS-Erkrankung zugeordnet werden und *TET2* ist bis heute das am häufigsten mutierte Gen in MDS. In einem Fall wurde nur eine submikroskopische Deletion auf 4q24 von unter 850 kb (105,9-106,7 Mb) gefunden, die per FISH bestätigt werden konnte. *TET2* wird besonders hoch in Granulozyten exprimiert, die Expression in MDS-Patienten allerdings, unabhängig von ihrem Mutationsstatus, ist als hinabgesetzt bestimmt worden. Hiermit wurde eine Funktion von *TET2* in der myeloiden, spezifischer der granulopoetischen, Differenzierung vermutet. Mutationen kamen in allen MDS-IPSS-Subtypen vor, jedoch häufiger (41%) in den Niedrigrisiko- und Int-1-Stufen (27%) als in den Int-2- (13%) und den Hochrisikogruppen (14%). In 21 von 44 karyotypisch normalen Patienten, in 4 von 21 Patienten mit 1-2 Aberrationen und in 2 von 10 komplex veränderten Patienten wurden die Mutationen gefunden. Es konnte keine signifikante Korrelation mit einem MDS-Subtyp, einer AML-Progression oder dem Überleben ermittelt werden (Langemeijer *et al.*, 2009). Bei AML-Patienten mit *TET2*-Mutationen konnte jedoch ein verkürztes Gesamtüberleben ermittelt werden. Die von uns in P41 gefundene *TET2*-Mutation p.C1.135Y wurde auch in einer anderen großen Studie gefunden und eindeutig als somatische Mutation gewertet (Abdel-Wahab *et al.*, 2009). Unter 81 MDS- plus 21 AML-Fällen wurden 6 4q24-Deletionen (die kleinste 325 kb), eine davon homozygot und 4 mit Mutation im noch vorhandenen Allel, gefunden. *TET2*-Mutationen wurden in einer kleinen Anzahl in unreifen CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen und in einer gesteigerten Anzahl an reifen Vorläuferzellen nachgewiesen. Auch hier

konnte herausgefunden werden, dass Patienten der karyotypisch guten Prognoseklasse (IPSS-Int-1) die verhältnismäßig meisten Mutationen (26% bzw. 28%) aufweisen (Delhommeau *et al.*, 2009).

Die Technik des '454 deep sequencings' wurde genutzt, um 9 MDS-Patienten (CC oB.) mit 4q-UPD in oder außerhalb von 4q24 auf *TET2*-Mutationen hin zu analysieren. Die 4 RCMD-RS-Patienten (RS = Ringsideroblasten) mit 4q24-UPD wiesen *TET2*-Mutationen in 30-85% der Zellen auf und die *TET2*-Aberration wurde als ein 'first hit'-Ereignis diskutiert (Mohamedali *et al.*, 2009). Kosmider *et al.* detektierten *TET2*-Mutationen in knapp 23% der 96 untersuchten MDS-Patienten unterschiedlicher Sub- und Karyotypen bei Erstdiagnose. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben (von 88 Informativen) betrug 77% bei den mutierten gegenüber 18% unmutierter Patienten. Damit wurde die *TET2*-Mutation als ein guter prognostischer Marker, unabhängig des WHO- oder FAB-Subtyps, in MDS bestimmt (Kosmider *et al.*, 2009a). Am häufigsten mutiert stellte sich *TET2* in CMML (50% gesamt, 42% in Erstdiagnoseprobe) dar. Allein in CMML1 erreichte die Analyse zum verkürzten Gesamtüberleben Signifikanz (Kosmider *et al.*, 2009b).

Beide in dieser Arbeit beschriebenen Patienten verstarben innerhalb der ersten 10 Monate nach der Diagnose, wobei der eine entsprechend den WHO-Kriterien an einer Hochrisiko-AML litt (P40, † 10 Monate) und der andere an Niedrigrisiko-RCMD (P41, † 3 Monate). Bei P40 konnte neben der homozygoten *TET2*-Deletion auf 4q24 eine über 6 Mb große Deletion in 2p ermittelt werden. Auch bei P41 wurde neben der heterozygoten 4q24-Deletion mittels aCGH eine weitere Aberration, eine Deletion in 5q13.2 (*CCNB1*, *RAD17* usw.), aufgedeckt. Auch bei den anderen drei Patienten mit detektierter *TET2*-Mutation wurden kryptische Aberrationen offengelegt. P49 litt an Niedrigrisiko-RCMD, zeigte eine 7q33 (*EXOC4*)- und 1p21 (*OLFM3*)-Deletion und verstarb bereits einen Monat nach der Diagnose. P42 war an demselben Subtyp erkrankt, zeigte eine Deletion in 5q31.1 (*SAR1B*, *SEC24A* usw.) und überlebte knapp drei Jahre. P29 ist an RCMD mit IPSS-0 erkrankt, zeigt eine 1p33-*AGBL4*-Deletion und lebt bis heute (05/2010). Anhand der bisher vorliegenden Studien kann eine eindeutige gute oder schlechte Prognose von MDS-Patienten mit *TET2*-Mutation nicht gestellt werden. Die Publikationen weisen unterschiedliche Erkenntnisse auf, haben sehr gemischte Kollektive untersucht und die Heterogenität der Mutation bzgl. ihres Vorkommens in myeloiden Erkrankungen betont. In wie fern der Karyotyp bzw. das Zusammenspiel mehrerer Aberrationen Einfluss hat, kann heute noch nicht bestimmt werden. Um die Rolle von *TET2* als prognostischen Marker evaluieren zu können, müssen weitere Analysen durchgeführt werden.

### 6.3 Weitere aufgedeckte Aberrationen und ihre Interpretation

Beispiele wie der P79-Fall, der sich mit Hilfe der aCGH-Methode als komplex veränderter Karyotyp mit drei über 10 Mb großen Aberrationen darstellte, scheinen unter ursprünglich zytogenetisch normal beurteilten Patienten eher die Ausnahme zu sein. Weitere größere, theoretisch mikroskopisch sichtbare Aberrationen wurden in nur drei Patienten gefunden. Die besprochene 5q-Deletion in P52, ein Chromosom 7-Verlust in P91 in nur knapp 17% der Zellen, sowie eine interstitielle 11q-Deletion in P70. Im Falle von P79 konnten mit Hilfe der aCGH die zuvor verborgen gebliebenen Amplifikationen von 19p und 21 und der 8p-Deletion detektiert werden. Zytogenetisch waren von 22 analysierten Metaphasen, 19 als unauffällig und drei mit Einzelaberrationen beurteilt worden. In P70 wurde die große 11q-Deletion nur als Einzelaberration bei gleichzeitig 19 normalen Metaphasen gesehen. Ursachen für das Übersehen von großen Aberrationen in der Zytogenetik können sein: ein sich nicht teilender aberranter Zellklon, ein nur kleiner aberranter Zellklon, eine Neigung nur die qualitativ guten Chromosomen auszuwerten (die oft normalen Metaphasen angehören), ein heterogenes Aberrationsspektrum, so dass sich verschiedene Einzel-Markerchromosomen ergeben, ein nur niedrig aufgelöstes Bandenmuster usw. Deshalb sollte und wird die klassische zytogenetische Diagnostik immer durch eine weitere Technik ergänzt, die wenigstens die häufig betroffenen Chromosomen oder Aberrationen, auch in sich nicht teilenden oder nur wenig vorhandenen Zellen, zu überprüfen vermag. Dies geschieht in den meisten Fällen mit FISH (Rigolin *et al.*, 2001; Bernasconi *et al.*, 2003; Haferlach *et al.*, 2007).

Für die genomweit vorkommenden submikroskopischen, eher nicht rekurrent gefundenen Veränderungen, ist momentan die Arraytechnik die Methode der Wahl. In dieser Arbeit konnten einzelne Aberrationen identifiziert werden: von kleinsten Gen-leeren Regionen, über Ein-Gen-Imbalancen bis hin zu Viel-Gen-Aberrationen. Auf Grund der fehlenden Rekurrenz ist ihre Bedeutung für MDS bisher schwer einzuschätzen. Gene, die hier deletiert oder unterbrochen wurden sind *MMACHC*, ***AGBL4***, *MCFD2* und ***TTC7A***, ***EGOT***, ***CCNB1*** und ***CDK7*** und ***RAD17***, ***SEC24A*** und ***CDKL3*** und ***SKP1*** und ***DDX46***, ***PDE10A***, *AUTS2*, *EXOC4*, ***PIP***, ***CLDN23***, *EPB24* und ***CCNDBP1***, *RAB27A*, ***WWOX***, *MBP* usw. Zugewinne, die auch eine Gen-Trunkierung bedeuten können, betrafen u. a. die Gene *PGM1*, ***KCNH7***, ***AKAP9***, *CCNE2*, *LRRK2*, ***NOS1***, ***CDK10*** und *FANCA* und ***RPL13***, ***PYGB***, ***RRP1B*** und *TRAPPC10*. Auffällig viele dieser Gene (fett markiert) spielen eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle, der mitotischen Zellproliferationsregulation oder ribo-

somalen Prozessen, haben Funktionen in der Hämatopoese, der Ausbildung der Zellpolarität, gehören zum RAS-GTPase-Signalweg oder sind in maligne Erkrankungen involviert. Wiederum weisen manche der betroffenen Gene eher auf angeborene Defekte hin. Als ein Beispiel hierfür ist das *RAB27A*-Gen (in P30 von Exon 5-8 heterozygot deletiert) zu nennen. Das *RAB27A*-Gen (15q21) gehört zur Rab-Familie der kleinen GTPasen und ist involviert in den intrazellulären Vesikeltransport, genauer in die zelluläre Zytotoxizität durch die Granula-Exozytose (gerichtete Sekretion spezialisierter Lysosomen bei der Immunregulation). Homozygote Mutationen (auch heterozygote) und Basendeletionen (auch Exons 2-5 oder Promotor-Exon 5) sind mit dem seltenen, rezessiven Griscelli-Syndrom Typ 2 (ein familiäres Hämophagozytosesyndrom oder FHL) assoziiert, welches wiederum durch MDS-ähnliche Symptome gekennzeichnet ist. Griscelli Typ 2 ist u. a. charakterisiert durch Hypopigmentation, silbergraues Haar, Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Immundefizienz, evtl. ZNS-Beteiligung, häufige Infekte, Fieber Anämie, Neutro- und Thrombozytopenie bei normalem Knochenmark und dessen einzige Heilung besteht in der allogenen PBCT. Wahrscheinlich werden auch die meisten Hämophagozytoseepisoden bei FHL-Patienten durch Infektionen (wie bei sekundären Hämophagozytosesyndromen) ausgelöst (Challen und Goodell, 2010). Myelodysplasien aller drei Zelllinien werden hier als Ergebnis einer gestörten Zellvorläuferproduktion während der viralen Erkrankung vermutet und sollten nicht für eine maligne MDS-Erkrankung gehalten werden (Cetin *et al.*, 1998; Dolman *et al.*, 2004; Meschede *et al.*, 2008; Mamishi *et al.*, 2008). Andere betroffene Gene stehen ebenfalls mit angeborenen, rezessiv vererbten Störungen in Zusammenhang (PubMed-Informationen): *AUTS2* – Autismus, *EPB42* – hämolytische Anämie, *LRRK2* – Parkinson, *MMACHC* – Methylmalonazidurie und Homocystinurie, *PGM1* – Glykogenspeicherkrankheit, *EXOC4* – Diabetes, *MBP* – Alzheimer/Schizophrenie, *FANCA* – Fanconi-Anämie, *TRAPPC10* – genetische progressive Myoklonusepilepsie/Polyglanduläres Autoimmunsyndrom Typ 1. Das heißt, dass es sich bei diesen identifizierten Aberrationen eher um Keimbahnveränderungen handelt, die bisher nur in Zusammenhang mit rezessiv vererbten Erkrankungen beschrieben wurden und nicht mit MDS.

#### 6.4 CNVs, genomische Architektur und trunkierte Gene

Um MDS-spezifische Aberrationen von Keimbahn-Imbalancen (auch CNVs) mit Sicherheit abgrenzen zu können, wäre Normal-DNA der Patienten nötig gewesen (Albertson und

Pinkel, 2003; Shaffer und Bejjani, 2006; Brazma *et al.*, 2007; Mohamedali *et al.*, 2007). Da diese nicht vorlag, wurden die Daten der mittlerweile umfangreichen DGV (Iafate *et al.*, 2004) mit einbezogen, die bekannten Genfunktionen (PubMed/OMIM) beachtet und anhand des ermittelten Anteils veränderter Zellen bei Erstdiagnose und im Verlauf (wo möglich) bzw. der Kopienzahlunterschiede oder logRatio-Differenzen Einschätzungen bzgl. der MDS-Spezifität vorgenommen (Sebat *et al.*, 2004). In der Zukunft sollten für ähnliche Projekte gepaarte Analysen mit Tumor- und Normal-DNA durchgeführt werden. Hierzu wurde die Separation von T-Zellen aus peripherem Blut etabliert. T-Zellen sind nicht an der Pathogenese von MDS beteiligt, d. h. sie gehören nicht zu den malignen Zellen und sollten der Normal-DNA-Gewinnung dienen (Gondek *et al.*, 2007b). Mit Hilfe der durchgeführten (einmaligen) FACS-Analyse konnte ein Reinheitsgrad der T-Zellpopulation von 99% nachgewiesen werden und somit wäre sichergestellt, dass eine Arrayanalyse (oder PCR) nicht durch DNA aus myeloiden Zellen, die an MDS beteiligt sind, 'verunreinigt' ist (Starczynowski *et al.*, 2008).

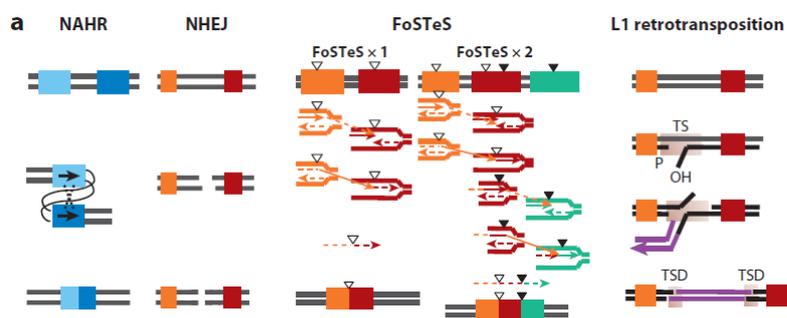
Fraglich bleibt, ob Keimbahndefekte, erbliche heterozygote oder *de novo* Veränderungen, gerade wenn sie Gene der Hämatopoese umfassen, nicht eine Prädisposition für MDS darstellen könnten. Der Einfluss von CNVs und segmentalen Duplikationen (LCRs) als hot spot-Regionen genomischer Instabilität und Begünstigung spezifischer rekurrenter Rearrangements ist bereits beschrieben (Sebat *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2007; Osborne, 2008). Das Williams-Beuren-Syndrom, als Beispiel, ist eine seltene Erbkrankheit mit Entwicklungsverzögerung, bei der eine Deletion in 7q11 von genomischen strukturellen Merkmalen vermittelt wird (Cuscó *et al.*, 2008). Durch die Bestimmung der exakten Bruchpunktsequenzen und den Vergleich unter den Betroffenen könnte eine Assoziation von Genotyp und Phänotyp möglich werden. Es konnten bereits Computer-gestützt Bruchpunkte vorausgesagt werden, die bekanntermaßen Erkrankungs-assoziierte Deletionen flankieren (Korbel *et al.*, 2007). Deshalb ist nicht nur der in die Aberration involvierte Genpool von Interesse, sondern auch die zu Grunde liegende genomische Architektur der Imbalance bzw. ihr Entstehungsmechanismus. Gleichzeitig ist von Interesse, ob die Brüche in Genen stattfinden, die dadurch unterbrochen werden, möglicherweise ihre Funktion verlieren oder zur Bildung von Fusionsgenen führen. In einer Aberrationsgruppe dieser Arbeit wurden zu diesen Überlegungen detaillierte Analysen durchgeführt.

### 6.4.1 Homologien, Sequenzmotive und Chromosomeninstabilität

Zur Bestimmung der Ursache einiger der gefundenen Deletionen wurden Analysen auf genomische Sequenzcharakteristika in der Bruchpunktumgebung durchgeführt.

Aus anderen Publikationen sind bisher einige Mechanismen zur Entstehung von chromosomalen Rearrangements, die sowohl in evolutiven, nicht-pathogenen als auch pathogenen Prozessen eine Rolle spielen, bekannt. Die vier Hauptmechanismen werden im Folgenden vorgestellt und auf die eigenen Daten bezogen:

- 'non-allelic homologous recombination' bzw. NAHR
- 'non-homologous end joining' bzw. NHEJ (klassisch)
  - o 'microhomology-mediated end joining' bzw. MMEJ (alternativ)
- 'fork-stalling and template switching' bzw. FoSTeS
  - o 'microhomology-mediated break-induced replication' bzw. MMBIR
- L1-vermittelte Retrotransposition



**Abbildung 6.4.1:** Übersicht der 4 Hauptmechanismen, die zu genomischen Rearrangements und CNVs führen. a) Schemata von 'non-allelic homologous recombination' bzw. NAHR, 'non-homologous end joining' bzw. NHEJ, 'fork-stalling and template switching' bzw. FoSTeS und L1-vermittelte Retrotransposition. Farbige Boxen = genomische Fragmente – bei ähnlicher Farbe (NAHR) = hohe Homologie / 'repeats', Pfeile = Orientierung, Dreiecke = Mikrohomologien – bei gleichartigen = identische, TS = Zielsequenz, TSD = duplizierte Zielsequenz. b) Tabellarische Gegenüberstellung der jeweiligen Charakteristika der Mechanismen. (Abbildung entnommen aus Zhang *et al.*, 2009.)

| <b>b</b>   | NAHR                                 | NHEJ  | FoSTeS                 | Retrotransposition    |
|--|--------------------------------------|---|------------------------|-----------------------|
| Structural variation type                            | dup, del, inv                        | dup, del  | dup, del, inv, complex | ins                   |
| Homology flanking breakpoint (before rearrangement)? | Yes (LCR/SD, Alu, L1, or pseudogene) | No  | No                     | No                    |
| Breakpoint   | Inside homology                      | Addition or deletion of basepairs, or microhomology | Microhomology          | No specification      |
| Sequence undergoing SV                               | Any                                  | Any   | Any                    | Transcribed sequences |

NAHR ist gekennzeichnet durch lange gleiche bis ähnliche Sequenzen, die den Bruchpunkt umgeben und durch ihre Homologie zur Rekombination durch Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen führen. Gewöhnlich müssen zwei Doppelstrangbrüche erfolgen. Häufig sind bekannte repetitive Elemente bzw. Retrotransposons, überwiegend SINES (nicht kodierend), wie Alus (poly-A-Schwanz), aber auch LINES (kodieren für reverse Transkriptase, Endonuklease, 5'-UTR poly-A-Schwanz), L1, LTRs (kodierend) und LCRs verantwortlich. NAHR kann intrachromatidal, interchromatidal und interchromosomal erfolgen. NAHR durch LCRs wird meistens bei

pathogenen Aberrationen und rekurrenten CNVs beobachtet. Abhängig von der Sequenzübereinstimmung kommt es zu NAHR (Voraussetzung > 95-97%) oder zu MMBIR (< 95% plus Mikrohomologien; s. u.). Zudem sind LCR-Substrate meist größer als 10 kb während Alu- oder andere repetitive Elemente dem Mechanismus meist kleinere homologe Sequenzen anbieten. Man geht hier von meiotischer Rekombination aus, aber auch mitotische ist bekannt (Turner *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). In dieser Arbeit ergab die Suche nach ausgeprägten homologen ( $\geq 95\%$  Identität) Elementen innerhalb der untersuchten 2 kb-Umgebungssequenz keine kb-großen Homologien, weder am Bruchpunkt direkt, noch etwas weiter entfernt. Das größte Alignment, von 169 Basen bei 138 bp gleichen, fiel in Fall P30 und der 15q21-Deletion auf, wobei proximal AluY und distal AluSq, jeweils über 500 bp vom Bruchpunkt entfernt, für die Homologie verantwortlich waren. Bis auf möglicherweise diesen Fall konnte bei den anderen Deletionen kein Anhaltspunkt für den NAHR-Mechanismus ermittelt werden.

Dem NHEJ gehen zwei DNA-Doppelstrangbrüche voraus, woraufhin es anschließend in Abwesenheit von Sequenzhomologien zur Verbindung bzw. Reparatur von DNA-Enden kommt. Häufiger werden an den Bruchpunktstellen Basenverluste oder -einschübe registriert. Die Brüche werden häufig in repetitiven Elementen gefunden, weshalb solch spezifische genomische Architekturen als Stimulanzen vermutet werden. Bei dem neueren MMEJ-Modell werden in den direkten Bruchpunktumgebungen Mikrohomologien von einem bis wenigen Basenpaar(en) gefunden, die z. B. auch von einem Alu poly-A-Schwanz herrühren können. Deshalb können auch Alu-assoziierte Deletionen nach NHEJ vorkommen, weil auf Grund von Doppelstrangbrüchen initiierte Reparaturprozesse Alu-Elemente eingeschaltet werden (de Smith *et al.*, 2008). Beide Mechanismen können auf der mitotischen Replikation als auch der meiotischen Rekombination basieren. Mikrohomologien direkt am proximalen und distalen Bruchpunkt konnten (ab zwei bp in Folge) in dieser Arbeit in 8 von 10 Fällen detektiert werden. Die Bruchpunktumgebung der P85-7q34-Deletion zeigte mit 5 Basen die größte Mikrohomologie. In den Fällen P30 (5p15-Deletion) und P24 (21q22-Deletion) kam es zudem zu 3-Basenpaar-Insertionen. Diese Ergebnisse sprechen in den betreffenden Fällen für einen MMEJ-Mechanismus.

Das auf mitotischer Replikation basierende FoSTeS-Prinzip setzt nur einen Doppelbruch voraus, ist überwiegend beteiligt an der Entstehung von Duplikationen und Deletionen, ebenfalls angeborene pathogene, und auch hier spielen Mikrohomologien eine Rolle. Mikrohomologien werden genutzt, um einen neuen Replikationsstrang nach Abfallen von oder Kollabieren der ersten Replikationsgabel durch genomische Instabilität, wie CNVs,

einzunehmen (Lee *et al.*, 2007). MMBIR beruht auf FoSTeS und ist das generalisierte 'template-switch'-Modell ('replication slippage') durch Mikrohomologie. Neben Deletionen und Duplikationen können durch MMBIR auch Inversionen erklärt werden. Auch Alu-Alu-vermittelte Deletionen können über FoSTeS/MMBIR erklärt werden.

Da in 8 von 10 Fällen Mikrohomologien identifiziert und in zwei Fällen zusätzlich Baseninsertionen beobachtet wurden, werden hier der NHEJ (MMEJ) oder der FoSTeS (MMBIR) als häufige Entstehungsmechanismen für Deletionen bei MDS postuliert.

Für seltene pathogene Aberrationen konnten im Falle der Bruchpunktbestimmung von 30 Mikrodeletionen und 8 Tandemduplikationen in 79% (Mikro)-Homologien zwischen 2 bis 75 bp gefunden werden. NHEJ und FoSTes wurden hier als Mechanismen bestimmt. In 81% der Bruchpunktbestimmungen konnten Assoziationen mit mindestens einem genomischen architektonischen Merkmal ermittelt werden (Vissers *et al.*, 2009).

Diese möglichen Mechanismen und ihre häufige Detektion untermauert die Hypothese, dass es sich bei MDS nicht um eine generelle Chromosomeninstabilität handelt, sondern dass die Aberrationen an nicht-zufälligen Stellen im Genom stattfinden.

#### **6.4.2 Trunkierte Gene**

Weiterhin wurde bei den 10 Bruchpunkt-bestimmten Deletionen überprüft, ob Gene unterbrochen wurden und welche Konsequenzen möglich wären.

In keinem Fall fanden beide Bruchereignisse in jeweils einem unterschiedlichen Gen statt, weshalb eine direkte Genfusion bzw. die Entstehung eines Hybridproteins weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. In zwei Fällen wurden beide Brüche in demselben Gen registriert. In Fall P60 wurden beide Brüche innerhalb des *AUTS2*-Gens auf 7q11 beobachtet, wodurch das kodierende Exon 2 unter Beibehaltung des Leserasters verloren ging. Eine derartige Deletion wurde bisher nicht beschrieben und ihre Konsequenz ist unbekannt, da die Genfunktion bisher nicht bekannt ist. Das Gen ist bei Autismus oder syndromaler mentaler Retardierung durch Translokationen unterbrochen (OMIM). In P30 kam es ebenso zu einer intragenen, 49 kb-großen *RAB27A*-Deletion mit Verlust der Exons 5-8 und anschließender Fusion des untranslatierten Exons 3 und des kodierenden Exons 9. Eine ähnliche Deletion wurde in einem Griscelli-Patienten beschrieben. Diese erstreckte sich von Exons 1-5 (andere Nomenklatur – wahrscheinlich entsprechend Exons 3a-8) und umfasste 68 kb.

In ebenfalls zwei Fällen fand das proximale oder distale Bruchereignis in einem Gen statt. Die alleinige Deletion des kodierenden Exons 1 von *TTC7A* auf 2p21 in P30 ist bisher nicht beschrieben. Eine homozygote Deletion von Exon 1-14 führte in Mäusen zur Auslösung der vererbten erythroblastischen Anämie (OMIM). Die Unterbrechung des *RUNX1*-Gens bei P24 wurde bereits ausführlich in Abschnitt 6.2.3 behandelt.

## 6.5 Qualitätssicherung der Daten, u. a. durch Vergleichsanalysen

Da nicht in allen Fällen die exakte Bestimmung des Bruchpunktes möglich war, sollte anhand der Gruppe der sequenzierten Brüche getestet werden, wie zuverlässig die beiden verwendeten Auswertalgorithmen (GLAD, ADM-2) die Imbalance detektiert haben und vor allem wie genau. Gleichzeitig wurde das jeweilig ermittelte  $\log_2$ Ratio mit dem FISH- oder qPCR-Ratio verglichen, um zu überprüfen, in welchem Maße die Werte mit anderen Techniken zu reproduzieren sind. Die generelle Gefahr Aberrationen zu übersehen, weil der onkogene Zellklon (gerade bei Erstdiagnoseproben) sich noch nicht ausreichend im Knochenmark ausgebreitet hat, besteht bei der Technik der aCGH und der qPCR eher als bei der klassischen Zytogenetik oder der molekularzytogenetischen FISH, die auf Zellebene funktionieren. Andererseits werden bei der Zytogenetik Zellen im Teilungsprozess benötigt, der wiederum vom verwendeten Kultivierungsmedium abhängt. Sowohl für die zytogenetische Auswertung als auch eine Arrayanalyse mit DNA aus kultivierten Zellen ist von Bedeutung, ob sich die entsprechenden Tumorzellen mit Aberration in Kultur teilen und dadurch auch das Verhältnis von Tumorzellen mit Aberration zu Normalzellen im Hinblick auf eine wahrscheinlichere Detektion hin verschiebt oder ob nur Tumorzellen ohne Aberration oder gar keine Zellen gewachsen sind. In wie weit die vorherige Zellkultivierung in diesem Projekt Einfluss auf das Arrayergebnis hatte, wurde bei einer kleinen Anzahl von Fällen untersucht.

### 6.5.1 Vergleich der verwendeten Auswertalgorithmen

In über 50% der Fälle, in denen die Bruchpunkte exakt mittels Sequenzierung bestimmt wurden, erkannten beide eingesetzten Auswertalgorithmen GLAD und ADM-2 die richtigen Bruchpunktbereiche (zwischen dem normal hybridisierten und dem reduziert oder

vermehrt hybridisierten Oligonukleotid) exakt. Bei den restlichen Bruchpunkten kam es zu Verschiebungen der Loci als auch der Deletionsgrößen in unterschiedlichen Ausmaßen. Anhand der (wenigen) Beispiele konnte nicht ein Algorithmus als der bessere ermittelt werden. In den Fällen, wo es zu ungenau bestimmten Bruchpunkten kam, lagen immer beide Algorithmen falsch, ein Mal war der eine exakter, ein anderes Mal der andere. Häufiger wurde ein Bruchpunkt von beiden Algorithmen richtig bestimmt, während der andere nicht genau erkannt wurde. Entscheidend scheint hier das Zusammenspiel von logRatio-Wert, Oligonukleotidanzahl und Streufaktor zu sein. Je größer der Unterschied zwischen den logRatio-Werten der beiden Bruchpunktoligonukleotide ist und je mehr Oligonukleotide den genomischen Bereich repräsentieren, desto exakter arbeiten beide Algorithmen. Kommt es jedoch zu einer stärkeren Streuung der Oligonukleotide, welches einerseits von der DNA und der optimalen Prozessierung, andererseits aber auch vom Oligonukleotidscore (vgl. 6.2.1) und der genomischen Architektur abzuhängen scheint, werden von den Algorithmen unterschiedliche Berechnungen bzw. Interpolationen vorgenommen. Biologische Schwankungen und zufällige Ereignisse führen zu (statistisch signifikanten) Bruchpunktbestimmungen, die einen hohen Fehlerwert aufweisen. Bei streuenden Oligonukleotiden oder schwankenden Arrayprofilen und vor allem bei niedrigeren logRatios auf Grund eines nur kleinen Anteils an aberranten Zellen sollte mit mindestens einem Oligonukleotid, das proximal und distal falsch bestimmt wurde, für eine Bruchpunktbestimmung gerechnet werden. Vor allem bei dem anschließenden Design eines 'custom'-Arrays sollte eine größere Region mit 60-mer-Oligonukleotiden abgedeckt werden. Im Falle der 21q22-Deletion der P39-Probe, die auf einem 44 k-Array hybridisiert wurde, bestimmte der ADM-2-Algorithmus die Bruchpunkte insgesamt um 246 kb ungenau und der GLAD-Algorithmus um 362 kb ungenau. Auf Grund dessen wurde das Design des 'custom'-Arrays suboptimal gewählt, so dass auch hier noch eine Differenz von 15,6 kb zum exakten Bruchpunkt vorlag. Die Verwendung zweier Algorithmen zum Vergleich plus die Auswertung des Arrayprofils mit Hilfe der GW-Software (ohne eingestellten Algorithmus) per Auge wird empfohlen.

Ebenso wie die Deletionsgrößen und -lagen miteinander verglichen wurden, wurden die von den Auswertesystemen und eingesetzten Verifikationstechniken ermittelten logRatios und Ratios überprüft. Bei der Bestimmung des Array-logRatios kam es ebenso zu variablen Unterschieden. Nicht nur zwischen ADM-2 und GLAD wurden Abweichungen deutlich, sondern auch von nicht-'custom'- zu 'custom-Array'. Im Grunde zählen hier dieselben Kriterien zur Exaktheit, wie oben ausführlich erläutert. In unserem Fall sollte das

logRatio dazu dienen, eine Aussage über den Anteil der aberranten Zellen zu machen, da bei einer Imbalance, die in 100% der Zellen auftrat, eine Keimbahnaberration in Betracht gezogen werden sollte. Da in mehreren Fällen eine FISH-Analyse gemacht wurde, waren exakte Daten vorhanden. Die P24-Probe zeigte (obwohl die Bruchpunkte von beiden Algorithmen nicht exakt bestimmt wurden) ähnliche logRatios für ADM-2, GLAD und cust1 von -0,79, -0,75 und -0,6. Der daraus errechnete Anteil an aberranten Zellen von 84, 82 und 68% konnte mit der durchgeführten FISH-Untersuchung die Deletion in 89% der Zellen bestätigen. In den anderen Fällen kam es zu größeren Schwankungen, vor allem das logRatio der 'custom'-Arrays wurde nicht für exakt erachtet. Auch beim Vergleich von logRatio und qPCR-Ratio (nach Umrechnung) wurden erhebliche Differenzen deutlich. Teilweise wurde ein logRatio von -1 bzw. ein qPCR-Ratio von 0,5 erhalten, in der FISH-Analyse wiederum waren nicht 100% Zellen mit einer heterozygoten Deletion zu finden. Deshalb kann an dieser Stelle nur noch einmal der Vorteil der FISH-Technik auf Einzelzellebene zur Verifikation des Arrayergebnisses hervorgehoben werden. Zudem kann weder die Array- noch die qPCR-Methodik eine Aussage über den Allelstatus bieten; d. h. ob eine homozygote Deletion in wenigen Zellen oder eine heterozygote Deletion in vielen Zellen vorliegt.

### **6.5.2 Vergleichsexperimente mit DNA aus kultivierten und unkultivierten Zellen**

Bei keinem der 7 Vergleiche von Experimenten mit DNA aus kultivierten und unkultivierten Zellen ließen sich bedeutsame Unterschiede in der Aberrationsdetektion erkennen. Die vom Algorithmus angezeigten Abweichungen konnten in diesen Fällen auf mehrere Aspekte zurückgeführt werden. Einerseits wurden die DNAs mit Hilfe unterschiedlicher Methoden isoliert, welches z. B. nötig war, um die sich 'verklumpenden' kryokonservierten Zellen vollständig zu lysieren. Dann wurden teilweise verschiedene Arrayplattformen verwendet, wodurch zuvor erkannte Regionen verloren gingen oder zuvor nicht erkannte Imbalancen dann registriert wurden. Wenigstens in diesen Beispielen konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung der Zellen für kurze Zeit (24-72 h) keine Selektion bewirkt und die Ergebnisse vergleichbar sind.

### **6.5.3 Nicht verifizierbare Arrayresultate**

Nicht alle von den Algorithmen angezeigten und auch per Auge gesehenen Aberrationen ließen sich mit einer weiteren Technik verifizieren. Die Gründe hierfür sind vielseitig. Ein wichtiger Grundsatz hierbei ist, dass eine Detektionsrate falsch-positiver Ergebnisse in aCGH-Analysen ein natürlicher, begleitender Prozess ist. Nur die wenigsten Algorithmen allerdings berücksichtigen dies bis jetzt, neben der Gliederung der Aberrationen nach ihrer Signifikanz. Auch der physikalische Abstand der Oligonukleotide anstelle der angenommenen gleichmäßigen Verteilung wird fast nie in die Auswertesysteme integriert. Sämtliche Algorithmen, z. B. 11 von *Lai et al.* verglichene, umfassen umfangreiche und teilweise sehr spezifische Funktionen, die der Großteil der Anwender nicht kennt oder versteht und somit auch eine Ursachenforschung schwer wird (*Lai et al.*, 2005). Immer exaktere und schnellere Auswertesysteme werden entwickelt (*Magi et al.*, 2009). Viele Parameter können variiert werden und müssen entsprechend des Projekts (handelt es sich um konstitutionelle Aberrationen, Mosaik oder Krebs-assoziierte wenig vorhandene aberrante Klone) definiert werden. Arraydesign, Größe der erwarteten Aberrationen, logRatio-Schwellenwerte, Oligonukleotidlimits und CNVs sind nur einige Kriterien, die zuvor überdacht werden müssen (*Baldwin et al.*, 2008). Für den Einsatz in der Diagnostik sollten deshalb mittels aCGH-identifizierte Aberrationen verifiziert werden.

## **6.6 Ausblick zu Diagnostik und Pathogenese bei MDS**

Momentan stellen sich die Myelodysplastischen Syndrome als eine Gruppe außerordentlich heterogener Erkrankungen dar. Überwiegend alte Personen erkranken, aber auch Kinder sind betroffen. In 25% der älteren Betroffenen kommt es zu einer AML-Transformation und die einzige Heilung bisher ist die Knochenmark- oder Stammzelltransplantation. Die klinische Diagnostik beruht hauptsächlich auf der Betrachtung des Blutbildes und des Knochenmarkausstriches, der Morphologie der Zellen und weiterer spezifischer klinischer Parameter. Der ermittelte Chromosomenstatus durch die Zytogenetik liefert zusätzliche Angaben zum Schweregrad und zur Prognose der Erkrankung. Mit Hilfe der molekularzytogenetischen Techniken, wie FISH (oder SKY), werden neue kryptische Aberrationen, auch Translokationen, aufgedeckt. Einzelne Gene können auf prognostisch relevante Mutationen hin durch die Molekulargenetik analysiert werden.

Durch die hochauflösenden SNP- und aCGH-Methoden werden auf Forschungsebene je nach Studie und Plattform submikroskopische Imbalancen und UPDs identifiziert oder zusätzlich zu den zytogenetisch sichtbaren Aberrationen aufgedeckt. Für ihre Interpretation gibt es jedoch noch keine Richtlinien und ihre Rekurrenz und Bedeutung ist momentan noch unbekannt. Spezifische Zellpopulationen aus Blut als auch Knochenmark werden mittels MACS oder FACS sortiert, separiert und auf charakteristische Eigenschaften untersucht. Primäre und sekundäre Aberrationen bezogen auf den Krankheitsprogress als auch frühe und späte Aberrationen bezogen auf ihre Entstehung in der Hämatopoese, in z. B. Stammzellen oder bereits gerichteten Zellen, werden untersucht. Das Mikroumfeld bezüglich in MDS beobachteter exzessiver Apoptose scheint eine Rolle zu spielen und es gibt Hinweise, dass ein komplexes Netzwerk aus Cytokinen, Rezeptoren, Adaptormolekülen und Transkriptionsfaktoren das Gesamtergebnis bestimmt (Kerbaui und Deeg, 2007). Expressions- und Proteomprofile wurden erstellt und mit den Ergebnissen der anderen Techniken verglichen. Auch das Mitochondriengenom bzw. Funktionsstörungen von Mitochondrien wurde bereits mit MDS in Verbindung gebracht (Chen *et al.*, 2009b). Ein weiteres weites Feld stellt die Epigenetik dar. Der Methylierungsstatus von Promotoren spezifischer Gene scheint bei MDS gestört vorzuliegen (Jiang *et al.*, 2009). Es wurde auch bereits die Expression von microRNAs (miRNAs), die z. B. in Chromosomenbande 5q kodiert sind, als mögliche Ursache für eine Haploinsuffizienz untersucht. Bei Vorliegen einer 5q-Deletion ergab sich als Ergebnis ein Verlust zweier miRNAs, die reichlich in hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen vertreten sind und zwei Gene des angeborenen Immunsignalwegs als Ziel aufweisen. Knock down-Experimente bzw. eine erhöhte Expression dieser Gene in der Maus führten zur Phänokopie verschiedener 5q-Syndrom-Anzeichen (Starczynowski *et al.*, 2010). Es werden immer neue Tumorsuppressor-Kandidatengene postuliert und neue biologische Mechanismen, wie two-hit-Modell, Haploinsuffizienz und LOH diskutiert. Optimale neue Marker bzw. therapeutische Ziele und Ansätze gibt es hingegen kaum (Acquaviva *et al.*, 2010). Noch detailliertere Daten sollten mit den Zukunftstechniken 'whole genome sequencing', wie das '454 sequencing' (Hall, 2007), erreicht werden.

In dieser Arbeit der hochauflösenden Analyse mittels aCGH von 105 karyotypisch normalen MDS-Patienten auf genomische Erkrankungs-spezifische Imbalancen hin hat gezeigt, dass die Chromosomenstabilität bei MDS niedriger ist als erwartet. Rekurrente Aberrationen konnten nur in sehr kleinen Patientengruppen registriert werden, wie es bisher bei allen beschriebenen Anomalien (mit Ausnahme der 5q-Deletion) der Fall ist.

Dennoch ließen sich submikroskopische Imbalancen finden, die die schon immer favorisierten Kandidatenregionen auf Chromosom 5 und 7 umfassten oder alte und neue hot spot-Gene wie *RUNX1* und *TET2* betrafen. Hier gefundene unbekannte, auch häufiger involvierte Regionen 5q31 (*SEC24A*), könnten neue Zielgene in MDS beherbergen, die aber wiederum nur in Untergruppen zu finden sind. Die Deletionen, bei denen Bruchpunktanalysen durchgeführt wurden, deuteten auf spezifische Mechanismen wie MMEJ ('microhomology-mediated end joining') oder FoSTeS ('fork-stalling and template switching') hin, die in nicht-zufälligen Regionen des Genoms zum Bruch und Stückverlust führen. Weiterhin fiel auf, dass einige in ihrer Kopienzahl veränderte Gene wichtige Funktionen wie die Zellzykluskontrolle besitzen oder im hämatopoetischen System eine Rolle spielen. Durch die aCGH-Technik konnten insgesamt 51 Aberrationen, die eindeutig identifiziert und verifiziert wurden, in 33 Patienten aufgedeckt werden. Somit wurde die zytogenetische Diagnose 'ohne Befund' in 31% der Patienten korrigiert. In wie fern der Befund submikroskopischer (und größerer) Aberrationen in Zukunft Einfluss auf die Prognose und Therapie hat, bleibt abzuwarten. Bei Aberrationen, die in 100% der Zellen gefunden wurden, könnte es sich um heterozygote Keimbahnveränderungen handeln, die entweder nichts mit MDS zu tun haben oder aber einen Risikofaktor darstellen könnten. In dieser Arbeit konnten auf Grund der wenigen detektierten Aberrationen keine Subgruppen mit z. B. einer häufigen, rekurrenten Aberration gebildet werden, um eine Korrelation mit klinischen Parametern durchführen zu können. Dennoch wurde die Gruppe der Patienten mit verifizierten Aberrationen der Gruppe jener ohne verifizierte Aberrationen gegenübergestellt und versucht eine Assoziation mit einem MDS-Merkmal zu finden. Keines der getesteten Merkmale konnte als signifikant erkannt werden, dennoch konnte eine Beziehung zwischen verifizierter Aberration und Tod hergestellt werden. Ein erhöhter Anteil von 40% verifizierten Aberrationen bei den verstorbenen Patienten gegenüber 16% bei den noch lebenden Patienten wies zumindest tendenziell auf einen Zusammenhang hin.

Als Fazit ist zu betonen, dass mit fast jeder Technik zur MDS-Pathogeneseaufklärung weitere, neue Puzzleteile entdeckt werden, wann und ob diese schließlich zusammengeführt werden können, ist momentan noch nicht absehbar.

## 7 Zusammenfassung

Die Myelodysplastischen Syndrome (MDS) sind gekennzeichnet durch eine ineffektive Hämatopoese mit Zytopenien, Zelldysplasien sowie Blasten in Knochenmark und/oder Blut. Sie zählen zu den häufigsten Neoplasien im Alter und gehen zu 25% in die Akute Myeloische Leukämie über. 50% der Patienten weisen zytogenetisch sichtbare, klonale chromosomale Aberrationen ( $\geq \sim 5$  Mb) auf. Häufigkeit und Loci dieser Veränderungen sind von großer Wichtigkeit und teilweise im Prognose- und Klassifikationssystem (IPSS und FAB/WHO) verankert.

In dieser Arbeit wurden MDS-Patienten mit *zytogenetisch normalem* Karyotyp analysiert. In über 30% dieser Patienten konnten submikroskopische Imbalancen ( $\geq \sim 30$  kb) mittels hochauflösender Oligonukleotidarray-basierter vergleichender genomischer Hybridisierung (aCGH) nachgewiesen werden. Die wenigen, aber dennoch rekurrent gefundenen kleinen Deletionen betrafen zum einen die bekannten Kandidatenregionen 5q31 und 7q22. Die Detektion zytogenetisch sichtbarer 5q- und 7q-Deletionen hat Konsequenzen für die Prognose und Therapie. Die zum anderen rekurrent aufgetretenen Deletionen von *RUNX1* (21q22) und *TET2* (4q24) zeigen mögliche neue 'hot spots' für genomische Veränderungen auf. Während Mutationen in *RUNX1* häufig bei MDS vorkommen, wurden Deletionen bisher nicht beschrieben. *TET2*-Deletionen als auch -Mutationen waren zu Beginn dieser Arbeit unbekannt, es konnten jedoch in zwei Patienten genomische Verluste und in vier Patienten Mutationen identifiziert werden. Nicht rekurrent erfasste Aberrationen beinhalteten u. a. wichtige Gene der Zellzyklusregulation (*CCNB1*, *CDKL3*) oder des hämatopoetischen Systems (*MCFD7*, *EPB24*). Neben Tumor-spezifischen Anomalien könnten einige dieser Aberrationen auch auf Keimbahnveränderungen zurückzuführen sein und sollten durch Analysen mit DNA aus Normalzellen (z. B. T-Zellen, die nicht in die MDS-Pathogenese involviert sind) überprüft werden. Mit Hilfe von Bruchpunktbestimmungen und -analysen konnten häufig Mikrohomologien und seltener auch Baseninsertionen an den Deletionsenden identifiziert werden. Dies weist auf die Entstehungsmechanismen MMEJ und/oder FoSTeS für chromosomale Rearrangements hin. Die beiden verglichenen aCGH-Auswertelgorithmen GLAD und ADM-2 detektierten Imbalancen ähnlich zuverlässig und exakt. Trotzdem sollten Arraydaten mit anderen Methoden wie FISH oder qPCR bestätigt werden. Vergleiche von aCGH-Experimenten mit DNA kultivierter und unkultivierter Zellen erbrachten keine unterschiedlichen Daten. Auf Grund der wenigen rekurrenten Aberrationen konnte keine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben oder der Häufung eines MDS-Subtyps gefunden werden. Allgemein wurden weniger submikroskopische Aberrationen detektiert als erwartet und es konnte keine generelle Chromosomeninstabilität festgestellt werden.

Zusammenfassend wird die aCGH-Technik, inklusive spezifischer 'custom'-Arrays, in Ergänzung zur Routinediagnostik bei MDS empfohlen, um die Art und Frequenz kryptischer Aberrationen im Hinblick auf die MDS-Pathogenese erforschen zu können. Nur so kann überprüft werden, ob sie in Zukunft als molekulare Marker oder Therapieziele genutzt werden könnten.

## 8 Abstract

The myelodysplastic syndromes (MDS) are characterised by an ineffective haematopoiesis with cytopenia, dysplasia and blasts in bone marrow and/or peripheral blood. MDS is a common neoplasia of the elderly and 25% of the patients develop an acute myeloid leukaemia. Half of the patients show cytogenetic visible ( $\geq \sim 5$  Mb), clonal chromosomal aberrations. Great effort is made to integrate the information on the frequency of anomalies and the involved genomic loci into the prognostic scoring and classification systems.

In the present thesis high definition oligonucleotidearray-based comparative genomic hybridisation (aCGH) revealed submicroscopic imbalances ( $\geq \sim 30$  kb) in over 30% of patients with *cytogenetically normal* karyotype. Only few recurrent aberrations were found, however, some of them targeted the known candidate regions 5q31 and 7q22. The detection of cytogenetically visible 5q- and 7q-deletions has consequences on prognosis and therapeutic handling. Other recurrent findings showed deletions of *RUNX1* (21q22) and *TET2* (4q24) making them potential new hot spots for genomic changes. While mutations of *RUNX1* are common events in MDS, deletions were not described. Deletions and mutations of *TET2* were unknown prior to this thesis. However, loss of *TET2* could be revealed in two patients and mutations in this gene were identified in four patients. Non-recurrent aberrations harboured important genes involved in cell cycle regulation (*CCNB1*, *CDKL3*) or haematopoietic system (*MCFD7*, *EPB24*). Besides of tumour-specific aberrations, some of these imbalances could be germ line defects and should be monitored by using DNA from normal cells (e. g. T-cells are not part of the pathogenesis of MDS). The determination of breakpoints and breakpoint analyses frequently revealed microhomologies and/or nucleotide insertions at the deletion end points, supporting the MMEJ or FoSTeS mechanisms for the formation of chromosomal rearrangements. The used analysis algorithms GLAD and ADM-2 both worked comparably and accurately, nevertheless, FISH and qPCR verifications seemed to be essential. Short culturing of cells prior to aCGH did not affect array results. Because of the small number of recurrent aberrations significant correlations with the overall survival or the MDS subtype could not be observed. In general, fewer submicroscopic aberrations than expected were found and no common chromosome instability was measured.

In conclusion, the aCGH-technique with the possible flexibility of using custom-arrays should complement the routine diagnostic of MDS in order to explore the nature and occurrence of cryptic aberrations in the pathogenesis of MDS. This is necessary to evaluate their benefit as molecular markers or therapeutic targets in future.

## 9 Literaturverzeichnis

Abdel-Wahab, O.; Mullally, A.; Hedvat, C.; Garcia-Manero, G.; Patel, J.; Wadleigh, M.; Malinge, S.; Yao, J.; Kilpivaara, O.; Bhat, R.; Huberman, K.; Thomas, S.; Dolgalev, I.; Heguy, A.; Paietta, E.; Le Beau, M.; Beran, M.; Tallman, M.; Ebert, B.; Kantarjian, H.; Stone, R.; Gilliland, D.; Crispino, J.; Levine, R. (2009): Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. In: *Blood*, Jg. 114, H. 1, S. 144–147.

Acquaviva, C.; Gelsi-Boyer, V.; Birnbaum, D. (2010): Myelodysplastic syndromes: lost between two states? In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 24, H. 1, S. 1–5.

Albertson, D.; Pinkel, D. (2003): Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. In: *Human molecular genetics*, Jg. 12 Spec No 2, S. R145-52.

Andersson, T.; Södersten, E.; Duckworth, J.; Cascante, A.; Fritz, N.; Sacchetti, P.; Cervenka, I.; Bryja, V.; Hermanson, O. (2009): CXXC5 is a novel BMP4-regulated modulator of Wnt signaling in neural stem cells. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 284, H. 6, S. 3672–3681.

Aul, C.; Bowen, D.; Yoshida, Y. (1998): Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. In: *Haematologica*, Jg. 83, H. 1, S. 71–86.

Bacher, U.; Haferlach, T.; Kern, W.; Weiss, T.; Schnittger, S.; Haferlach, C. (2009): The impact of cytomorphology, cytogenetics, molecular genetics, and immunophenotyping in a comprehensive diagnostic workup of myelodysplastic syndromes. In: *Cancer*, Jg. 115, H. 19, S. 4524–4532.

Baldwin, E.; Lee, J.-Y.; Blake, D.; Bunke, B.; Alexander, C.; Kogan, A.; Ledbetter, D.; Martin, C. (2008): Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. In: *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, Jg. 10, H. 6, S. 415–429.

Bejjani, B.; Shaffer, L. (2006): Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, Jg. 8, H. 5, S. 528–533.

Bennett, J. (2000): World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. In: *International journal of hematology*, Jg. 72, H. 2, S. 131–133.

Bennett, J.; Catovsky, D.; Daniel, M.; Flandrin, G.; Galton, D.; Gralnick, H.; Sultan, C. (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. In: *British journal of haematology*, Jg. 33, H. 4, S. 451–458.

Bennett, J.; Catovsky, D.; Daniel, M.; Flandrin, G.; Galton, D.; Gralnick, H.; Sultan, C. (1982): Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. In: *British journal of haematology*, Jg. 51, H. 2, S. 189–199.

Bernasconi, P.; Cavigliano, P.; Boni, M.; Calatroni, S.; Klersy, C.; Giardini, I.; Rocca, B.; Crosetto, N.; Caresana, M.; Lazzarino, M.; Bernasconi, C. (2003): Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 17, H. 11, S. 2107–2112.

- Boultonwood, J.; Fidler, C.; Strickson, A.; Watkins, F.; Gama, S.; Kearney, L.; Tosi, S.; Kasprzyk, A.; Cheng, J.-F.; Jaju, R.; Wainscoat, J. (2002): Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. In: *Blood*, Jg. 99, H. 12, S. 4638–4641.
- Braekeleer, E. de; Férec, C.; Braekeleer, M. de (2009): RUNX1 translocations in malignant hemopathies. In: *Anticancer research*, Jg. 29, H. 4, S. 1031–1037.
- Brazma, D.; Grace, C.; Howard, J.; Melo, J.; Holyoke, T.; Apperley, J.; Nacheva, E. (2007): Genomic profile of chronic myelogenous leukemia: Imbalances associated with disease progression. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 46, H. 11, S. 1039–1050.
- Carter, N. (2007): Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. In: *Nature genetics*, Jg. 39, H. 7 Suppl, S. S16-21.
- Cetin, M.; Hiçsönmez, G.; Göğüş, S. (1998): Myelodysplastic syndrome associated with Griscelli syndrome. In: *Leukemia research*, Jg. 22, H. 9, S. 859–862.
- Challen, G.; Goodell, M. (2010): Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. In: *Experimental hematology*, Jg. 38, H. 5, S. 403–416.
- Chen, M.; Yokomizo, T.; Zeigler, B.; Dzierzak, E.; Speck, N. (2009a): Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. In: *Nature*, Jg. 457, H. 7231, S. 887–891.
- Chen, M.; Logan, T.; Hochberg, M.; Shelat, S.; Yu, X.; Wilding, G.; Tan, W.; Kujoth, G.; Prolla, T.; Selak, M.; Kundu, M.; Carroll, M.; Thompson, J. (2009b): Erythroid dysplasia, megaloblastic anemia, and impaired lymphopoiesis arising from mitochondrial dysfunction. In: *Blood*, Jg. 114, H. 19, S. 4045–4053.
- Cross, N.; Reiter, A. (2002): Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 16, H. 7, S. 1207–1212.
- Curtiss, N.; Bonifas, J.; Lauchle, J.; Balkman, J.; Kratz, C.; Emerling, B.; Green, E.; Le Beau, M.; Shannon, K. (2005): Isolation and analysis of candidate myeloid tumor suppressor genes from a commonly deleted segment of 7q22. In: *Genomics*, Jg. 85, H. 5, S. 600–607.
- Cuscó, I.; Corominas, R.; Bayés, M.; Flores, R.; Rivera-Brugués, N.; Campuzano, V.; Pérez-Jurado, L. (2008): Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. In: *Genome research*, Jg. 18, H. 5, S. 683–694.
- Davies, J.; Wilson, I.; Lam, W. (2005): Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, Jg. 13, H. 3, S. 237–248.
- Delhommeau; Francois; Dupont; Sabrina; James; Chloe; Masse; Aline; Le Couedic; Pierre, J.; Valle; Della Veronique; Alberdi; Antonio; Dessen; Philippe; Fontenay; Michaela; Casadevall; Nicole; Soulier; Jean; Bernard; Olivier; Vainchenker; William (2008): TET2 Is a Novel Tumor Suppressor Gene Inactivated in Myeloproliferative Neoplasms: Identification of a Pre-JAK2 V617F Event -- Delhommeau et al. 112 (11): Iba-3 -- ASH Annual Meeting Abstracts.
- Delhommeau, F.; Dupont, S.; Della Valle, V.; James, C.; Trannoy, S.; Massé, A.; Kosmider, O.; Le Couedic, J.-P.; Robert, F.; Alberdi, A.; Lécluse, Y.; Plo, I.; Dreyfus, F.;

- Marzac, C.; Casadevall, N.; Lacombe, C.; Romana, S.; Dessen, P.; Soulier, J.; Viguié, F.; Fontenay, M.; Vainchenker, W.; Bernard, O. (2009): Mutation in TET2 in myeloid cancers. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 360, H. 22, S. 2289–2301.
- Dolman, K.; Révész, T.; Niemeyer, C.; van Wering, E.; Saint Basile, G. de; Canninga, M.; Bierings, M.; Wulffraat, N. (2004): Myelodysplastic features in Griscelli syndrome. In: *Journal of pediatric hematology/oncology : official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology*, Jg. 26, H. 5, S. 275–276.
- Du Manoir, S.; Speicher, M.; Joos, S.; Schröck, E.; Popp, S.; Döhner, H.; Kovacs, G.; Robert-Nicoud, M.; Lichter, P.; Cremer, T. (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. In: *Human genetics*, Jg. 90, H. 6, S. 590–610.
- Dunø, M.; Hove, H.; Kirchoff, M.; Devriendt, K.; Schwartz, M. (2004): Mapping genomic deletions down to the base: a quantitative copy number scanning approach used to characterise and clone the breakpoints of a recurrent 7p14.2p15.3 deletion. In: *Human genetics*, Jg. 115, H. 6, S. 459–467.
- Ebert, B.; Pretz, J.; Bosco, J.; Chang, C.; Tamayo, P.; Galili, N.; Raza, A.; Root, D.; Attar, E.; Ellis, S.; Golub, T. (2008): Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. In: *Nature*, Jg. 451, H. 7176, S. 335–339.
- Eisenmann, K.; Dykema, K.; Matheson, S.; Kent, N.; DeWard, A.; West, R.; Tibes, R.; Furge, K.; Alberts, A. (2009): 5q- myelodysplastic syndromes: chromosome 5q genes direct a tumor-suppression network sensing actin dynamics. In: *Oncogene*, Jg. 28, H. 39, S. 3429–3441.
- Evers, C.; Beier, M.; Poelitz, A.; Hildebrandt, B.; Servan, K.; Drechsler, M.; Germing, U.; Royer, H.-D.; Royer-Pokora, B. (2007): Molecular definition of chromosome arm 5q deletion end points and detection of hidden aberrations in patients with myelodysplastic syndromes and isolated del(5q) using oligonucleotide array CGH. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 46, H. 12, S. 1119–1128.
- Fairman, J.; Chumakov, I.; Chinault, A.; Nowell, P.; Nagarajan, L. (1995): Physical mapping of the minimal region of loss in 5q- chromosome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 92, H. 16, S. 7406–7410.
- Fenaux, P. (2001): Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. In: *International journal of hematology*, Jg. 73, H. 4, S. 429–437.
- Fischer, K.; Fröhling, S.; Scherer, S.; McAllister Brown, J.; Scholl, C.; Stilgenbauer, S.; Tsui, L.; Lichter, P.; Döhner, H. (1997): Molecular cytogenetic delineation of deletions and translocations involving chromosome band 7q22 in myeloid leukemias. In: *Blood*, Jg. 89, H. 6, S. 2036–2041.
- Galili, N.; Mehdi, M.; Mumtaz, M.; Miron, P.; Woda, B.; Al-Homsi, S.; Westervelt, P.; Raza, A. (2006): Can molecular profiling of cytogenetic subgroups draw a roadmap for individualizing therapy in myelodysplastic syndromes? In: *Future oncology* (London, England), Jg. 2, H. 3, S. 407–415.
- Germing, U. (2006): Deutsches MDS-Forum - Dresden 2006: Vom Nihilismus zum Algorithmus. Online verfügbar unter [http://mds-forum.onkodin.de/mds2006/content/index\\_ger.html](http://mds-forum.onkodin.de/mds2006/content/index_ger.html).
- Germing, U.; Haas, R. (2009): Myelodysplastische Syndrome. Bilanz des aktuellen Wissens. Düsseldorf: Dup.

- Germing, U.; Strupp, C.; Kündgen, A.; Bowen, D.; Aul, C.; Haas, R.; Gattermann, N. (2004): No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. In: *Haematologica*, Jg. 89, H. 8, S. 905–910.
- Giagounidis, A.; Germing, U.; Wainscoat, J.; Boulton, J.; Aul, C. (2004): The 5q-syndrome. In: *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, Jg. 9, H. 4, S. 271–277.
- Gondek, L.; Tiu, R.; Haddad, A.; O'Keefe, C.; Sekeres, M.; Theil, K.; Maciejewski, J. (2007a): Single nucleotide polymorphism arrays complement metaphase cytogenetics in detection of new chromosomal lesions in MDS. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 21, H. 9, S. 2058–2061.
- Gondek, L.; Haddad, A.; O'Keefe, C.; Tiu, R.; Wlodarski, M.; Sekeres, M.; Theil, K.; Maciejewski, J. (2007b): Detection of cryptic chromosomal lesions including acquired segmental uniparental disomy in advanced and low-risk myelodysplastic syndromes. In: *Experimental hematology*, Jg. 35, H. 11, S. 1728–1738.
- Gondek, L.; Tiu, R.; O'Keefe, C.; Sekeres, M.; Theil, K.; Maciejewski, J. (2008): Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. In: *Blood*, Jg. 111, H. 3, S. 1534–1542.
- Graubert, T.; Payton, M.; Shao, J.; Walgren, R.; Monahan, R.; Frater, J.; Walshauer, M.; Martin, M.; Kasai, Y.; Walter, M. (2009): Integrated genomic analysis implicates haploinsufficiency of multiple chromosome 5q31.2 genes in de novo myelodysplastic syndromes pathogenesis. In: *PloS one*, Jg. 4, H. 2, S. e4583.
- Greenberg, P.; Cox, C.; LeBeau, M.; Fenaux, P.; Morel, P.; Sanz, G.; Sanz, M.; Vallespi, T.; Hamblin, T.; Oscier, D.; Ohyashiki, K.; Toyama, K.; Aul, C.; Mufti, G.; Bennett, J. (1997): International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. In: *Blood*, Jg. 89, H. 6, S. 2079–2088.
- Haase, D.; Germing, U.; Schanz, J.; Pfeilstöcker, M.; Nösslinger, T.; Hildebrandt, B.; Kündgen, A.; Lübbert, M.; Kunzmann, R.; Giagounidis, A.; Aul, C.; Trümper, L.; Krieger, O.; Stauder, R.; Müller, T.; Wimazal, F.; Valent, P.; Fonatsch, C.; Steidl, C. (2007): New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. In: *Blood*, Jg. 110, H. 13, S. 4385–4395.
- Haferlach, C.; Rieder, H.; Lillington, D.; Dastugue, N.; Hagemeijer, A.; Harbott, J.; Stilgenbauer, S.; Knuutila, S.; Johansson, B.; Fonatsch, C. (2007): Proposals for standardized protocols for cytogenetic analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 46, H. 5, S. 494–499.
- Hagemeijer, A. (1987): Chromosome abnormalities in CML. In: *Baillière's clinical haematology*, Jg. 1, H. 4, S. 963–981.
- Hall, N. (2007): Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. In: *The Journal of experimental biology*, Jg. 210, H. Pt 9, S. 1518–1525.
- Harada, Y.; Harada, H. (2009): Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. In: *Journal of cellular physiology*, Jg. 220, H. 1, S. 16–20.
- Heinrichs, S.; Kulkarni, R.; Bueso-Ramos, C.; Levine, R.; Loh, M.; Li, C.; Neuberg, D.; Kornblau, S.; Issa, J.-P.; Gilliland, D.; Garcia-Manero, G.; Kantarjian, H.; Estey, E.; Look, A. (2009): Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*

- Hellenbrecht, A.; Messerer, D.; Gökbüget, N. (2003): Leukämie Kompetenznetz: Akute und chronische Leukämien. Online verfügbar unter <http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/home/>.
- Hoffman, M.; Janney, S.; Batanian, J. (2009): Cryptic deletion of EGR1 in association with a novel balanced t(5;22)(q31;q11.2) in a patient with myelodysplastic syndrome. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 191, H. 2, S. 106–108.
- Hollox, E.; Huffmeier, U.; Zeeuwen, P.; Palla, R.; Lascorz, J.; Rodijk-Olthuis, D.; van de Kerkhof, P.; Traupe, H.; Jongh, G. de; den Heijer, M.; Reis, A.; Armour, J.; Schalkwijk, J. (2008): Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. In: *Nature genetics*, Jg. 40, H. 1, S. 23–25.
- Holzapfel, B.; Wickert, L. (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete*, H. DOI:10.1002/biuz.200610332.
- Horrigan, S.; Arbieva, Z.; Xie, H.; Kravarusic, J.; Fulton, N.; Naik, H.; Le, T.; Westbrook, C. (2000): Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidates for a tumor suppressor gene in malignant myeloid disorders on 5q31. In: *Blood*, Jg. 95, H. 7, S. 2372–2377.
- Horrigan, S.; Westbrook, C.; Kim, A.; Banerjee, M.; Stock, W.; Larson, R. (1996): Polymerase chain reaction-based diagnosis of del (5q) in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome identifies a minimal deletion interval. In: *Blood*, Jg. 88, H. 7, S. 2665–2670.
- Horsley, S.; Mackay, A.; Iravani, M.; Fenwick, K.; Valgeirsson, H.; Dexter, T.; Ashworth, A.; Kearney, L. (2006): Array CGH of fusion gene-positive leukemia-derived cell lines reveals cryptic regions of genomic gain and loss. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 45, H. 6, S. 554–564.
- Hostetter, G.; Kim, S.; Savage, S.; Gooden, G.; Barrett, M.; Zhang, J.; Alla, L.; Watanabe, A.; Einspahr, J.; Prasad, A.; Nickoloff, B.; Carpten, J.; Trent, J.; Alberts, D.; Bittner, M. (2010): Random DNA fragmentation allows detection of single-copy, single-exon alterations of copy number by oligonucleotide array CGH in clinical FFPE samples. In: *Nucleic acids research*, Jg. 38, H. 2, S. e9.
- Iafrate, A.; Feuk, L.; Rivera, M.; Listewnik, M.; Donahoe, P.; Qi, Y.; Scherer, S.; Lee, C. (2004): Detection of large-scale variation in the human genome. In: *Nature genetics*, Jg. 36, H. 9, S. 949–951.
- Imai, Y.; Kurokawa, M.; Izutsu, K.; Hangaishi, A.; Takeuchi, K.; Maki, K.; Ogawa, S.; Chiba, S.; Mitani, K.; Hirai, H. (2000): Mutations of the AML1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. In: *Blood*, Jg. 96, H. 9, S. 3154–3160.
- Jaffe, E.; Harris, N.; Stein, H.; Vardiman, J.; editors (2001): *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: IARC Press.
- Jankowska, A.; Szpurka, H.; Tiu, R.; Makishima, H.; Afable, M.; Huh, J.; O'Keefe, C.; Ganetzky, R.; McDevitt, M.; Maciejewski, J. (2009): Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. In: *Blood*, Jg. 113, H. 25, S. 6403–6410.
- Jiang, Y.; Dunbar, A.; Gondek, L.; Mohan, S.; Rataul, M.; O'Keefe, C.; Sekeres, M.; Sauntharajah, Y.; Maciejewski, J. (2009): Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. In: *Blood*, Jg. 113, H. 6, S. 1315–1325.

- Jiang, Z.; Tang, H.; Ventura, M.; Cardone, M.; Marques-Bonet, T.; She, X.; Pevzner, P.; Eichler, E. (2007): Ancestral reconstruction of segmental duplications reveals punctuated cores of human genome evolution. In: *Nature genetics*, Jg. 39, H. 11, S. 1361–1368.
- Joslin, J.; Fernald, A.; Tennant, T.; Davis, E.; Kogan, S.; Anastasi, J.; Crispino, J.; Le Beau, M. (2007): Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. In: *Blood*, Jg. 110, H. 2, S. 719–726.
- Kakazu, N.; Taniwaki, M.; Horiike, S.; Nishida, K.; Tatekawa, T.; Nagai, M.; Takahashi, T.; Akaogi, T.; Inazawa, J.; Ohki, M.; Abe, T. (1999): Combined spectral karyotyping and DAPI banding analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 26, H. 4, S. 336–345.
- Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J.; Waldman, F.; Pinkel, D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 258, H. 5083, S. 818–821.
- Kerbauy, D.; Deeg, H. (2007): Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. In: *Experimental hematology*, Jg. 35, H. 11, S. 1739–1746.
- Kere, J.; Donis-Keller, H.; Ruutu, T.; La Chapelle, A. de (1989): Chromosome 7 long-arm deletions in myeloid disorders: terminal DNA sequences are commonly conserved and breakpoints vary. In: *Cytogenetics and cell genetics*, Jg. 50, H. 4, S. 226–229.
- Kere, J.; Ruutu, T.; Lahtinen, R.; La Chapelle, A. de (1987): Molecular characterization of chromosome 7 long arm deletions in myeloid disorders. In: *Blood*, Jg. 70, H. 5, S. 1349–1353.
- Korbel, J.; Urban, A.; Grubert, F.; Du, J.; Royce, T.; Starr, P.; Zhong, G.; Emanuel, B.; Weissman, S.; Snyder, M.; Gerstein, M. (2007): Systematic prediction and validation of breakpoints associated with copy-number variants in the human genome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 104, H. 24, S. 10110–10115.
- Kosmider, O.; Gelsi-Boyer, V.; Cheok, M.; Grabar, S.; Della-Valle, V.; Picard, F.; Vigié, F.; Quesnel, B.; Beyne-Rauzy, O.; Solary, E.; Vey, N.; Hunault-Berger, M.; Fenaux, P.; Mansat-De Mas, V.; Delabesse, E.; Guardiola, P.; Lacombe, C.; Vainchenker, W.; Preudhomme, C.; Dreyfus, F.; Bernard, O.; Birnbaum, D.; Fontenay, M. (2009a): TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). In: *Blood*, Jg. 114, H. 15, S. 3285–3291.
- Kosmider, O.; Gelsi-Boyer, V.; Ciudad, M.; Racœur, C.; Jooste, V.; Vey, N.; Quesnel, B.; Fenaux, P.; Bastie, J.-N.; Beyne-Rauzy, O.; Stamatoulas, A.; Dreyfus, F.; Ifrah, N.; Botton, S. de; Vainchenker, W.; Bernard, O.; Birnbaum, D.; Fontenay, M.; Solary, E. (2009b): TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. In: *Haematologica*, Jg. 94, H. 12, S. 1676–1681.
- Lai, W.; Johnson, M.; Kucherlapati, R.; Park, P. (2005): Comparative analysis of algorithms for identifying amplifications and deletions in array CGH data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)*, Jg. 21, H. 19, S. 3763–3770.
- Langemeijer, S.; Kuiper, R.; Berends, M.; Knops, R.; Aslanyan, M.; Massop, M.; Stevens-Linders, E.; van Hoogen, P.; van Kessel, A.; Raymakers, R.; Kamping, E.; Verhoef, G.; Verburch, E.; Hagemeijer, A.; Vandenbergh, P.; Witte, T. de; van der Reijden, B.; Jansen, J. (2009): Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. In: *Nature genetics*, Jg. 41, H. 7, S. 838–842.

- Lee, J.; Carvalho, C.; Lupski, J. (2007): A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. In: *Cell*, Jg. 131, H. 7, S. 1235–1247.
- List, A.; Dewald, G.; Bennett, J.; Giagounidis, A.; Raza, A.; Feldman, E.; Powell, B.; Greenberg, P.; Thomas, D.; Stone, R.; Reeder, C.; Wride, K.; Patin, J.; Schmidt, M.; Zeldis, J.; Knight, R. (2006): Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 355, H. 14, S. 1456–1465.
- List, A.; Kurtin, S.; Roe, D.; Buresh, A.; Mahadevan, D.; Fuchs, D.; Rimsza, L.; Heaton, R.; Knight, R.; Zeldis, J. (2005): Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 352, H. 6, S. 549–557.
- Lorsbach, R.; Moore, J.; Mathew, S.; Raimondi, S.; Mukatira, S.; Downing, J. (2003): TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 17, H. 3, S. 637–641.
- Macville, M.; Veldman, T.; Padilla-Nash, H.; Wangsa, D.; O'Brien, P.; Schröck, E.; Ried, T. (1997): Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements. In: *Histochemistry and cell biology*, Jg. 108, H. 4-5, S. 299–305.
- Magi, A.; Benelli, M.; Marseglia, G.; Nannetti, G.; Scordo, M.; Torricelli, F. (2009): A shifting level model algorithm that identifies aberrations in array-CGH data. In: *Biostatistics (Oxford, England)*.
- Mamishi, S.; Modarressi, M.; Pourakbari, B.; Tamizifar, B.; Mahjoub, F.; Fahimzad, A.; Alyasin, S.; Bemanian, M.; Hamidiyeh, A.; Fazlollahi, M.; Ashrafi, M.; Isaeian, A.; Khotaei, G.; Yeganeh, M.; Parvaneh, N. (2008): Analysis of RAB27A gene in griscelli syndrome type 2: novel mutations including a deletion hotspot. In: *Journal of clinical immunology*, Jg. 28, H. 4, S. 384–389.
- Martínez-Ramírez, A.; Urioste, M.; Melchor, L.; Blesa, D.; Valle, L.; Andrés, S. de; Kok, K.; Calasanz, M.; Cigudosa, J.; Benítez, J. (2005): Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridization and subtelomeric CGH array. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 42, H. 3, S. 287–298.
- Meschede, I.; Santos, T.; Izidoro-Toledo, T.; Gurgel-Gianetti, J.; Espreafico, E. (2008): Griscelli syndrome-type 2 in twin siblings: case report and update on RAB27A human mutations and gene structure. In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, Jg. 41, H. 10, S. 839–848.
- Miyoshi, H.; Ohira, M.; Shimizu, K.; Mitani, K.; Hirai, H.; Imai, T.; Yokoyama, K.; Soeda, E.; Ohki, M. (1995): Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. In: *Nucleic acids research*, Jg. 23, H. 14, S. 2762–2769.
- Mohamedali, A.; Gäken, J.; Twine, N.; Ingram, W.; Westwood, N.; Lea, N.; Hayden, J.; Donaldson, N.; Aul, C.; Gattermann, N.; Giagounidis, A.; Germing, U.; List, A.; Mufti, G. (2007): Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. In: *Blood*, Jg. 110, H. 9, S. 3365–3373.
- Mohamedali, A.; Smith, A.; Gaken, J.; Lea, N.; Mian, S.; Westwood, N.; Strupp, C.; Gattermann, N.; Germing, U.; Mufti, G. (2009): Novel TET2 Mutations Associated With

UPD4q24 in Myelodysplastic Syndrome. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*.

Mufti, G. (1992): Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndrome. In: *Leukemia research*, Jg. 16, H. 1, S. 35–41.

Neumann, F.; Poelitz, A.; Hildebrandt, B.; Fenk, R.; Haas, R.; Royer-Pokora, B.; Germing, U. (2007): The tyrosine-kinase inhibitor imatinib induces long-term remission in a patient with chronic myelogenous leukemia with translocation t(4;22). In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 21, H. 4, S. 836–837.

O'Keefe, C.; Tiu, R.; Gondek, L.; Powers, J.; Theil, K.; Kalaycio, M.; Lichtin, A.; Sekeres, M.; Maciejewski, J. (2007): High-resolution genomic arrays facilitate detection of novel cryptic chromosomal lesions in myelodysplastic syndromes. In: *Experimental hematology*, Jg. 35, H. 2, S. 240–251.

Osborne, L. (2008): Genomic rearrangements in the spotlight. In: *Nature genetics*, Jg. 40, H. 1, S. 6–7.

Paulsson, K.; Heidenblad, M.; Strömbeck, B.; Staaf, J.; Jönsson, G.; Borg, A.; Fioretos, T.; Johansson, B. (2006): High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 20, H. 5, S. 840–846.

Pedersen-Bjergaard, J.; Philip, P.; Larsen, S.; Jensen, G.; Byrting, K. (1990): Chromosome aberrations and prognostic factors in therapy-related myelodysplasia and acute nonlymphocytic leukemia. In: *Blood*, Jg. 76, H. 6, S. 1083–1091.

Pfaffl, M. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research*, Jg. 29, H. 9, S. e45.

Pfaffl, M.; Horgan, G.; Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. In: *Nucleic acids research*, Jg. 30, H. 9, S. e36.

Pollack, J.; Perou, C.; Alizadeh, A.; Eisen, M.; Pergamenschikov, A.; Williams, C.; Jeffrey, S.; Botstein, D.; Brown, P. (1999): Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. In: *Nature genetics*, Jg. 23, H. 1, S. 41–46.

Redon, R.; Ishikawa, S.; Fitch, K.; Feuk, L.; Perry, G.; Andrews, T.; Fiegler, H.; Shapero, M.; Carson, A.; Chen, W.; Cho, E.; Dallaire, S.; Freeman, J.; González, J.; Gratacòs, M.; Huang, J.; Kalaitzopoulos, D.; Komura, D.; MacDonald, J.; Marshall, C.; Mei, R.; Montgomery, L.; Nishimura, K.; Okamura, K.; Shen, F.; Somerville, M.; Tchinda, J.; Valsesia, A.; Woodwark, C.; Yang, F.; Zhang, J.; Zerjal, T.; Zhang, J.; Armengol, L.; Conrad, D.; Estivill, X.; Tyler-Smith, C.; Carter, N.; Aburatani, H.; Lee, C.; Jones, K.; Scherer, S.; Hurler, M. (2006): Global variation in copy number in the human genome. In: *Nature*, Jg. 444, H. 7118, S. 444–454.

Rigolin, G.; Bigoni, R.; Milani, R.; Cavazzini, F.; Roberti, M.; Bardi, A.; Agostini, P.; Della Porta, M.; Tieghi, A.; Piva, N.; Cuneo, A.; Castoldi, G. (2001): Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 15, H. 12, S. 1841–1847.

- Rowley, J. (1973): Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. In: *Nature*, Jg. 243, H. 5405, S. 290–293.
- Schröck, E.; Du Manoir, S.; Veldman, T.; Schoell, B.; Wienberg, J.; Ferguson-Smith, M.; Ning, Y.; Ledbetter, D.; Bar-Am, I.; Soenksen, D.; Garini, Y.; Ried, T. (1996): Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 273, H. 5274, S. 494–497.
- Sebat, J.; Lakshmi, B.; Troge, J.; Alexander, J.; Young, J.; Lundin, P.; Månér, S.; Massa, H.; Walker, M.; Chi, M.; Navin, N.; Lucito, R.; Healy, J.; Hicks, J.; Ye, K.; Reiner, A.; Gilliam, T.; Trask, B.; Patterson, N.; Zetterberg, A.; Wigler, M. (2004): Large-scale copy number polymorphism in the human genome. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 305, H. 5683, S. 525–528.
- Shaffer, L.; Bejjani, B. (2006): Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. In: *Cytogenetic and genome research*, Jg. 115, H. 3-4, S. 303–309.
- Shaffer, L. (2009): ISCN 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature (2009) ; recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger [u.a.].
- Shaffer, L.; Tommerup, N. (2005): ISCN 2005. An international system for human cytogenetic nomenclature (2005) ; recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger.
- Shinawi, M.; Erez, A.; Shardy, D.; Lee, B.; Naeem, R.; Weissenberger, G.; Chinault, A.; Cheung, S.; Plon, S. (2008): Syndromic thrombocytopenia and predisposition to acute myelogenous leukemia caused by constitutional microdeletions on chromosome 21q. In: *Blood*, Jg. 112, H. 4, S. 1042–1047.
- Smith, A. de; Tsalenko, A.; Sampas, N.; Scheffer, A.; Yamada, N.; Tsang, P.; Ben-Dor, A.; Yakhini, Z.; Ellis, R.; Bruhn, L.; Laderman, S.; Froguel, P.; Blakemore, A. (2007): Array CGH analysis of copy number variation identifies 1284 new genes variant in healthy white males: implications for association studies of complex diseases. In: *Human molecular genetics*, Jg. 16, H. 23, S. 2783–2794.
- Smith, A. de; Walters, R.; Coin, L.; Steinfeld, I.; Yakhini, Z.; Sladek, R.; Froguel, P.; Blakemore, A. (2008): Small deletion variants have stable breakpoints commonly associated with alu elements. In: *PloS one*, Jg. 3, H. 8, S. e3104.
- Starczynowski, D.; Kuchenbauer, F.; Argiropoulos, B.; Sung, S.; Morin, R.; Muranyi, A.; Hirst, M.; Hogge, D.; Marra, M.; Wells, R.; Buckstein, R.; Lam, W.; Humphries, R.; Karsan, A. (2010): Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. In: *Nature medicine*, Jg. 16, H. 1, S. 49–58.
- Starczynowski, D.; Vercauteren, S.; Telenius, A.; Sung, S.; Tohyama, K.; Brooks-Wilson, A.; Spinelli, J.; Eaves, C.; Eaves, A.; Horsman, D.; Lam, W.; Karsan, A. (2008): High-resolution whole genome tiling path array CGH analysis of CD34+ cells from patients with low-risk myelodysplastic syndromes reveals cryptic copy number alterations and predicts overall and leukemia-free survival. In: *Blood*, Jg. 112, H. 8, S. 3412–3424.
- Steensma, D.; List, A. (2005): Genetic testing in the myelodysplastic syndromes: molecular insights into hematologic diversity. In: *Mayo Clinic proceedings*. Mayo Clinic, Jg. 80, H. 5, S. 681–698.

- Stephenson, J.; Czepulkowski, B.; Hirst, W.; Mufti, G. (1996): Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). In: *Leukemia research*, Jg. 20, H. 3, S. 235–241.
- Suela, J.; Alvarez, S.; Cifuentes, F.; Largo, C.; Ferreira, B.; Blesa, D.; Ardanaz, M.; García, R.; Marquez, J.; Odero, M.; Calasanz, M.; Cigudosa, J. (2007): DNA profiling analysis of 100 consecutive de novo acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 21, H. 6, S. 1224–1231.
- Tefferi, A.; Levine, R.; Lim, K.-H.; Abdel-Wahab, O.; Lasho, T.; Patel, J.; Finke, C.; Mullally, A.; Li, C.-Y.; Pardanani, A.; Gilliland, D. (2009a): Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR $\alpha$  correlates. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 23, H. 5, S. 900–904.
- Tefferi, A.; Pardanani, A.; Lim, K.-H.; Abdel-Wahab, O.; Lasho, T.; Patel, J.; Gangat, N.; Finke, C.; Schwager, S.; Mullally, A.; Li, C.-Y.; Hanson, C.; Mesa, R.; Bernard, O.; Delhommeau, F.; Vainchenker, W.; Gilliland, D.; Levine, R. (2009b): TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 23, H. 5, S. 905–911.
- Thompson, C.; Gray, J. (1993): Cytogenetic profiling using fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH). In: *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, Jg. 17G, S. 139–143.
- Tosi, S.; Scherer, S.; Giudici, G.; Czepulkowski, B.; Biondi, A.; Kearney, L. (1999): Delineation of multiple deleted regions in 7q in myeloid disorders. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 25, H. 4, S. 384–392.
- Trost, D.; Hildebrandt, B.; Beier, M.; Müller, N.; Germing, U.; Royer-Pokora, B. (2006): Molecular cytogenetic profiling of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 165, H. 1, S. 51–63.
- Turner, D.; Miretti, M.; Rajan, D.; Fiegler, H.; Carter, N.; Blayney, M.; Beck, S.; Hurles, M. (2008): Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. In: *Nature genetics*, Jg. 40, H. 1, S. 90–95.
- Tyybäkinoja, A.; Elonen, E.; Piippo, K.; Porkka, K.; Knuutila, S. (2007): Oligonucleotide array-CGH reveals cryptic gene copy number alterations in karyotypically normal acute myeloid leukemia. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 21, H. 3, S. 571–574.
- van der Crabben, S.; van Binsbergen, E.; Ausems, M.; Poot, M.; Bierings, M.; Buijs, A. (2009): Constitutional RUNX1 deletion presenting as non-syndromic thrombocytopenia with myelodysplasia: 21q22 ITSN1 as a candidate gene in mental retardation. In: *Leukemia research*.
- Vardiman, J.; Thiele, J.; Arber, D.; Brunning, R.; Borowitz, M.; Porwit, A.; Harris, N.; Le Beau, M.; Hellström-Lindberg, E.; Tefferi, A.; Bloomfield, C. (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. In: *Blood*, Jg. 114, H. 5, S. 937–951.
- Viguié, F.; Aboura, A.; Bouscary, D.; Ramond, S.; Delmer, A.; Tachdjian, G.; Marie, J.; Casadevall, N. (2005): Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy:

early stem cell involvement? In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America*, Leukemia Research Fund, U.K, Jg. 19, H. 8, S. 1411–1415.

Vissers, L.; Bhatt, S.; Janssen, I.; Xia, Z.; Lalani, S.; Pfundt, R.; Derwinska, K.; Vries, B. de; Gilissen, C.; Hoischen, A.; Nesteruk, M.; Wisniewiecka-Kowalnik, B.; Smyk, M.; Brunner, H.; Cheung, S.; van Kessel, A.; Veltman, J.; Stankiewicz, P. (2009): Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture. In: *Human molecular genetics*, Jg. 18, H. 19, S. 3579–3593.

Wang, L.; Fidler, C.; Nadig, N.; Giagounidis, A.; Della Porta, M.; Malcovati, L.; Killick, S.; Gattermann, N.; Aul, C.; Boulwood, J.; Wainscoat, J. (2008): Genome-wide analysis of copy number changes and loss of heterozygosity in myelodysplastic syndrome with del(5q) using high-density single nucleotide polymorphism arrays. In: *Haematologica*, Jg. 93, H. 7, S. 994–1000.

Wei, S.; Chen, X.; Rocha, K.; Epling-Burnette, P.; Djeu, J.; Liu, Q.; Byrd, J.; Sokol, L.; Lawrence, N.; Pireddu, R.; Dewald, G.; Williams, A.; Maciejewski, J.; List, A. (2009): A critical role for phosphatase haploinsufficiency in the selective suppression of deletion 5q MDS by lenalidomide. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 106, H. 31, S. 12974–12979.

Weksberg, R.; Hughes, S.; Moldovan, L.; Bassett, A.; Chow, E.; Squire, J. (2005): A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. In: *BMC genomics*, Jg. 6, S. 180.

Wilkins, L.; Tchinda, J.; Burkhardt, D.; Nolte, M.; Werner, M.; Georgii, A. (1998): Analysis of hematologic diseases using conventional karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH), and comparative genomic hybridization (CGH). In: *Human pathology*, Jg. 29, H. 8, S. 833–839.

Witte, A. de; Nair, M.; Mehta, K.; Ghosh, J.; Scheffer, A. (2006): 60-mer Oligo-Based Comparative Genomic Hybridization.

Yang, T.-L.; Chen, X.-D.; Guo, Y.; Lei, S.-F.; Wang, J.-T.; Zhou, Q.; Pan, F.; Chen, Y.; Zhang, Z.-X.; Dong, S.-S.; Xu, X.-H.; Yan, H.; Liu, X.; Qiu, C.; Zhu, X.-Z.; Chen, T.; Li, M.; Zhang, H.; Zhang, L.; Drees, B.; Hamilton, J.; Papasian, C.; Recker, R.; Song, X.-P.; Cheng, J.; Deng, H.-W. (2008): Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility gene, UGT2B17, for osteoporosis. In: *American journal of human genetics*, Jg. 83, H. 6, S. 663–674.

Yu, S.; Bittel, D.; Kibiryeva, N.; Zwick, D.; Cooley, L. (2009): Validation of the Agilent 244K oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization platform for clinical cytogenetic diagnosis. In: *American journal of clinical pathology*, Jg. 132, H. 3, S. 349–360.

Zhang, F.; Gu, W.; Hurles, M.; Lupski, J. (2009): Copy number variation in human health, disease, and evolution. In: *Annual review of genomics and human genetics*, Jg. 10, S. 451–481.

Zhao, N.; Stoffel, A.; Wang, P.; Eisenbart, J.; Espinosa, R.; Larson, R.; Le Beau, M. (1997): Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1-1.5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 94, H. 13, S. 6948–6953.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Brigitte Royer-Pokora für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut und unter ihrer Anleitung durchführen zu können. Ihre ständige Unterstützung und Wissensweitergabe, wichtige Anregungen und ihr Vertrauen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihre außerordentliche wissenschaftliche Begeisterung hat mich stets aufs Neue motiviert. Zusätzlich möchte ich mich noch für die konstruktive Kritik und ihren persönlichen Einsatz bei der Fertigstellung dieser Arbeit, sowie für das Gutachten und die Abnahme der Prüfung bedanken.

Bei Herrn Prof. Martin Beye, Institut für Genetik, möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung der Promotion, die Bereitschaft zur Erstellung des Gutachtens und für die Abnahme der Prüfung bedanken.

Ebenfalls danke sagen möchte ich Herrn Prof. Joachim Ernst, Abteilung für Molekulare Mykologie, Herrn Prof. Jochen D'Haese, Institut für Zoologie II und Herrn Prof. Matthias Kassack, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, für die Abnahme der Prüfung. Prof. Florian Jarre, Mathematisches Institut, danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich möchte mich auch bei allen Kooperationspartnern bedanken, die durch ihre Unterstützung, die Freigabe ihrer Daten, die Bereitstellung von Geräten, ihre methodische Hilfe, sowie die Überlassung von Material zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Hier ist an erster Stelle Prof. Dr. Ulrich Germing der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie Düsseldorf zu nennen, der sich immer Zeit für mich nahm, mir wertvolle Tipps gab und mir wesentlich bei der Zusammenstellung des Patientenkollektives und der klinischen Daten half. Auch bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Royer des *caesar* Forschungszentrums Bonn, dass ich innerhalb des ersten Jahres, wann immer, die zur aCGH-Methode benötigten Geräte verwenden konnte und Hilfestellung durch seine Mitarbeiter bekam. Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Dr. Wulfert und Anke Boeckmann aus der Hämatologie Düsseldorf für die Überlassung von Patienten-DNAs bzw. die durchgeführten FACS-Analysen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Kollegen im Institut für Humangenetik und Anthropologie für die immer hilfsbereite und nette Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dipl. Ing. Manfred Beier dafür, dass er für meine Arbeit Computerprogramme schrieb, mit riesigen Datenmengen hantierte und dabei immer erfrischend sachlich blieb. Genauso bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Barbara Hildebrandt, die mir nicht nur als Wissenschaftlerin und Arbeitsgruppenleiterin der Tumorzytogenetik mit Chromosomenbefunden immer weiter half, sondern auch als Person, die mich ganz persönlich motivierte, förderte und unterstützte. Dr. Matthias Drechsler, Dr. Beate Betz und Dr. Barbara Leube danke ich für die Hilfe bei Versuchen und die Beantwortung vieler Fragen. Dr. Kati Servan und Dr. Christina Evers danke ich für ihre Beteiligung am Projekt und die Übernahme vieler Arbeiten. Ebenso danke ich Edith Höricht und Gela Jess für die bereitwillige labortechnische Unterstützung.

Mein liebster Dank gilt Dipl. Biol. Birte Möhlendick, Dr. Maike Busch, Dr. Constanze Duhme und Dipl. Biol. Vera Moeller, die für mich durch diese Arbeit zu Freunden wurden und immer für mich da waren. Mädels – danke für alles!!!

Das allergrößte Dankeschön möchte ich aber meinem zukünftigen Mann Marcus, meiner Familie und meinen besten Freunden aussprechen. Viel Verständnis, aufbauende Worte und erheiternde Motivationssprüche die ganze lange Zeit über haben geholfen, dass ich meinen Weg gehe.

## **Eidesstattliche Erklärung**

"Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht."

Düsseldorf, den 10.05.2010

Anne Pölitz

# Curriculum Vitae

## **Persönliche Daten**

Anne Pölitz  
Zur Verlach 17, 40723 Hilden  
02103/23795 o. 0179/2427485  
anne.poelitz@uni-duesseldorf.de  
geboren am 10.01.1979 in Leverkusen

## **Ausbildung**

- 07/06 - 05/10      Dissertation: 'Hochauflösende Array-CGH-Analysen zum Nachweis submikroskopischer Aberrationen bei Myelodysplastischen Syndromen (MDS)'  
*Institut für Humangenetik (Prof. Brigitte Royer-Pokora)  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (HHUD)*
- 04/06 - 06/06      Forschungs- und Sprachaufenthalt  
*Faculty of Life Science, Cancer Studies (Dr. Stefan Roberts)  
The University of Manchester*
- 04/05 - 12/05      Diplomarbeit: 'Nachweis onkogener Aktivierung von PDGFR-Kinasen in Myeloproliferativen Syndromen'  
*Institut für Humangenetik, HHUD*
- 10/98 - 12/05      Studium der Biologie, Schwerpunkt (Molekular-) Genetik  
Abschluss mit der Diplomnote 'sehr gut'  
*Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*
- 07/89 - 06/98      Schulbildung mit den Leistungsfächern Biologie, Kunst, Mathematik und Pädagogik; Abiturnote 'gut'  
*Marie-Curie-Gymnasium, Düsseldorf*

## **Berufliche Tätigkeiten**

- seit 07/06          Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Projekt aCGH bei MDS  
*Institut für Humangenetik, HHUD*
- 01/06 - 03/06      Wissenschaftliche Hilfskraft im HNPCC-Projekt  
*Institut für Humangenetik, HHUD*
- 08/05 - 12/05      Studentische Hilfskraft, Tumorzytogenetik-Arbeitsgruppe  
*Institut für Humangenetik, HHUD*
- 04/01 - 10/04      Hilfskraft, Abteilung für Zentrale Dienste, Kommunikation & Qualitätsmanagement  
*Bundesgeschäftsstelle für Qualitätssicherung im deutschen Gesundheitswesen (BQS), Düsseldorf*

Düsseldorf, den 10.05.2010

## Publikationsliste

### Paper

- 1) Niels Eckstein, Kati Servan, Barbara Hildebrandt, **Anne Pölitz**, Georg von Jonquières, Sybille Wolf-Kümmeth, Inge Napierski, Alexandra Hamacher, Matthias U. Kassack, Jan Budczies, Manfred Beier, Manfred Dietel, Brigitte Royer-Pokora, Carsten Denkert, Hans-Dieter Royer: **Hyperactivation of the Insulin-like Growth Factor Receptor I Signaling Pathway Is an Essential Event for Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer Cells**. Cancer Research. 2009; 69: (7). April 1, 2009
- 2) Evers C, Beier M, **Pölitz A**, Hildebrandt B, Servan K, Drechsler M, Germing U, Royer HD, Royer-Pokora B: **Molecular definition of chromosome arm 5q deletion end points and detection of hidden aberrations in patients with myelodysplastic syndromes and isolated del(5q) using oligonucleotide array CGH**. Genes, Chromosomes and Cancer. 2007 Dec;46(12):1119-28
- 3) \*Neumann F, \***Pölitz A**, Hildebrandt B, Fenk R, Haas R, Royer-Pokora B, Germing U (\*These authors contributed equally to this work): **The tyrosine-kinase inhibitor imatinib induces long-term remission in a patient with chronic myelogenous leukemia with translocation t(4;22)**. Leukemia. 2007 Apr;21(4):836-7 (Letter to the Editor)

### Posterauswahl

- a) **Pölitz A.**, Beier M., Hildebrandt B., Servan K., Ingenhag D., Moeller V., Evers C., Germing U., Royer-Pokora B.: **Detection of hidden aberrations in karyotypically normal MDS/AML using oligonucleotide array CGH**. Abstract. Medizinische Genetik. 2010 März; 22(1):99
- b) **Pölitz A**, Moeller V, Beier M, Hildebrandt B, Germing U, Haase S, Giagounidis A, Royer-Pokora B: **Submicroscopic aberrations are rarely detectable in isolated 5q- MDS**. Abstract. Medizinische Genetik. 2008 April; 20(1):116
- c) **Pölitz A**, Hildebrandt B, Gattermann N, Royer-Pokora B: **Variant Ph-producing translocations and their consequences**. Abstract. Medizinische Genetik. 2007 März;19(1):104

Anhang: Übersicht der involvierten Gene aller mittels aCGH nachgewiesenen und bestätigten Veränderungen.

| n  | P90_1p34.1<br>(Verlust) | P29_1p33<br>(Verlust) | P91_1p31.3<br>(Zugewinn) | P49_1p21.2~21.1<br>(Verlust) | P40_2p24.1~23.3<br>(Verlust) | P30_2p21<br>(Verlust) | P53_2q24.2~24.3<br>(Zugewinn) | P98_3p26.2<br>(Verlust) | P41_4q24<br>(Verlust) | P40_4q24<br>(Verlust homo.) | P75_5p14.3<br>(Verlust) | P6_5q13.2<br>(Verlust) |
|----|-------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1  | LOC126661               | AGBL4                 | ALG6                     | OLFM3                        | ABHD1                        | MCFD2                 | KCNH7                         | EGO                     | EEF1A17               | TET2                        | LOC728411               | BDP1                   |
| 2  | MMACHC                  |                       | DLEU2L                   |                              | ADCY3                        | TTC7A                 |                               | ITPR1                   | FLJ20184              |                             |                         | CCDC125                |
| 3  | TESK2                   |                       | EFCAB7                   |                              | AGBL5                        |                       |                               | SETMAR                  | PPA2                  |                             |                         | CCNB1                  |
| 4  |                         |                       | FOXD3                    |                              | APOB                         |                       |                               | SUMF1                   | TET2                  |                             |                         | CDK7                   |
| 5  |                         |                       | ITGB3BP                  |                              | ASXL2                        |                       |                               |                         |                       |                             |                         | CENPH                  |
| 6  |                         |                       | PGM1                     |                              | ATAD2B                       |                       |                               |                         |                       |                             |                         | GTF2H2                 |
| 7  |                         |                       |                          |                              | C2orf18                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | GTF2H2B                |
| 8  |                         |                       |                          |                              | C2orf28                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | GTF2H2C                |
| 9  |                         |                       |                          |                              | C2orf39                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | GTF2H2D                |
| 10 |                         |                       |                          |                              | C2orf43                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | LOC100170939           |
| 11 |                         |                       |                          |                              | C2orf44                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | LOC100272216           |
| 12 |                         |                       |                          |                              | C2orf53                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | LOC647859              |
| 13 |                         |                       |                          |                              | C2orf70                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | LOC653188              |
| 14 |                         |                       |                          |                              | C2orf79                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | MARVELD2               |
| 15 |                         |                       |                          |                              | C2orf84                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | MCCC2                  |
| 16 |                         |                       |                          |                              | CAD                          |                       |                               |                         |                       |                             |                         | MRPS36                 |
| 17 |                         |                       |                          |                              | CENPA                        |                       |                               |                         |                       |                             |                         | NAIP                   |
| 18 |                         |                       |                          |                              | CENPO                        |                       |                               |                         |                       |                             |                         | OCLN                   |
| 19 |                         |                       |                          |                              | CGREF1                       |                       |                               |                         |                       |                             |                         | PMCHL2                 |
| 20 |                         |                       |                          |                              | CIB4                         |                       |                               |                         |                       |                             |                         | RAD17                  |
| 21 |                         |                       |                          |                              | DNAJC27                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | SERF1A                 |
| 22 |                         |                       |                          |                              | DNAJC5G                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         | SERF1B                 |
| 23 |                         |                       |                          |                              | DNMT3A                       |                       |                               |                         |                       |                             |                         | SLC30A5                |
| 24 |                         |                       |                          |                              | DPYSL5                       |                       |                               |                         |                       |                             |                         | SMN1                   |
| 25 |                         |                       |                          |                              | DTNB                         |                       |                               |                         |                       |                             |                         | SMN2                   |
| 26 |                         |                       |                          |                              | EFR3B                        |                       |                               |                         |                       |                             |                         | TAF9                   |
| 27 |                         |                       |                          |                              | EMILIN1                      |                       |                               |                         |                       |                             |                         |                        |
| 28 |                         |                       |                          |                              | FKBP1B                       |                       |                               |                         |                       |                             |                         |                        |
| 29 |                         |                       |                          |                              | GPR113                       |                       |                               |                         |                       |                             |                         |                        |
| 30 |                         |                       |                          |                              | GTF3C2                       |                       |                               |                         |                       |                             |                         |                        |
| 31 |                         |                       |                          |                              | HADHA                        |                       |                               |                         |                       |                             |                         |                        |
| 32 |                         |                       |                          |                              |                              |                       |                               |                         |                       |                             |                         |                        |
| 33 |                         |                       |                          |                              | <b>weitere 26</b>            |                       |                               |                         |                       |                             |                         |                        |



Anhang: Übersicht der involvierten Gene aller mittels aCGH nachgewiesenen und bestätigten Veränderungen.

| n  | P100_7q22.1<br>(Verlust) | P15_7q22.1<br>(Verlust) | P70_7q22.1<br>(Verlust) | P49_7q33<br>(Verlust) | P85_7q34<br>(Verlust) | P99_7q34<br>(Verlust) | P20_8p23.1<br>(Verlust) | P79_8p23.3~23.1<br>(Verlust) | P38_8q22.1<br>(Zugewinn) | P70_11q14.1~23.2<br>(Verlust) | P72_12q12<br>(Zugewinn) | P30_12q24.22<br>(Zugewinn) | P20_15q15.2<br>(Verlust) |
|----|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 1  | ACHE                     | ACHE                    | ACHE                    | EXOC4                 | PIP                   | OR6W1P                | CLDN23                  | AGPAT5                       | CCNE2                    | AASDHPPT                      | LRRK2                   | NOS1                       | CCNDBP1                  |
| 2  | ACTL6B                   | ACTL6B                  | ACTL6B                  |                       | TAS2R39               | PIP                   | FLJ10661                | AMAC1L2                      | DPY19L4                  | ACAT1                         |                         |                            | EPB42                    |
| 3  | AGFG2                    | AGFG2                   | AGFG2                   |                       |                       | TAS2R39               | PRAGMIN                 | ANGPT2                       | INTS8                    | ALG9                          |                         |                            | TGM5                     |
| 4  | ALKBH4                   | ALKBH4                  | ALKBH4                  |                       |                       | TAS2R40               |                         | ARHGEF10                     |                          | ALKBH8                        |                         |                            | TMEM62                   |
| 5  | AP1S1                    | AP1S1                   | AP1S1                   |                       |                       |                       |                         | BLK                          |                          | AMOTL1                        |                         |                            |                          |
| 6  | C7orf47                  | C7orf47                 | C7orf51                 |                       |                       |                       |                         | C8orf12                      |                          | ANGPTL5                       |                         |                            |                          |
| 7  | C7orf51                  | C7orf51                 | C7orf52                 |                       |                       |                       |                         | C8orf42                      |                          | ANKK1                         |                         |                            |                          |
| 8  | C7orf52                  | C7orf52                 | CLDN15                  |                       |                       |                       |                         | C8orf74                      |                          | ANKRD49                       |                         |                            |                          |
| 9  | CLDN15                   | CLDN15                  | CUX1                    |                       |                       |                       |                         | CLDN23                       |                          | ARHGAP20                      |                         |                            |                          |
| 10 | CUX1                     | CUX1                    | EMID2                   |                       |                       |                       |                         | CLN8                         |                          | ATM                           |                         |                            |                          |
| 11 | EMID2                    | EMID2                   | EPHB4                   |                       |                       |                       |                         | CSMD1                        |                          | BCO2                          |                         |                            |                          |
| 12 | EPHB4                    | EPHB4                   | EPO                     |                       |                       |                       |                         | CTSB                         |                          | BIRC2                         |                         |                            |                          |
| 13 | EPO                      | EPO                     | FBXO24                  |                       |                       |                       |                         | DEFA1                        |                          | BIRC3                         |                         |                            |                          |
| 14 | FBXO24                   | FBXO24                  | FIS1                    |                       |                       |                       |                         | DEFA3                        |                          | BTG4                          |                         |                            |                          |
| 15 | FIS1                     | FIS1                    | GIGYF1                  |                       |                       |                       |                         | DEFA4                        |                          | C11orf1                       |                         |                            |                          |
| 16 | GATS                     | GIGYF1                  | GNB2                    |                       |                       |                       |                         | DEFA5                        |                          | C11orf34                      |                         |                            |                          |
| 17 | GIGYF1                   | GNB2                    | LOC402573               |                       |                       |                       |                         | DEFA6                        |                          | C11orf52                      |                         |                            |                          |
| 18 | GNB2                     | LOC402573               | LRCH4                   |                       |                       |                       |                         | DEFB1                        |                          | C11orf53                      |                         |                            |                          |
| 19 | LOC402573                | LRCH4                   | LRWD1                   |                       |                       |                       |                         | DEFB103A                     |                          | C11orf54                      |                         |                            |                          |
| 20 | LRCH4                    | LRWD1                   | MOGAT3                  |                       |                       |                       |                         | DEFB103B                     |                          | C11orf57                      |                         |                            |                          |
| 21 | LRWD1                    | MEPCE                   | MOSPD3                  |                       |                       |                       |                         | DEFB104A                     |                          | C11orf65                      |                         |                            |                          |
| 22 | MEPCE                    | MOGAT3                  | MUC17                   |                       |                       |                       |                         | DEFB104B                     |                          | C11orf70                      |                         |                            |                          |
| 23 | MOGAT3                   | MOSPD3                  | MYL10                   |                       |                       |                       |                         | DEFB105A                     |                          | C11orf71                      |                         |                            |                          |
| 24 | MOSPD3                   | MUC17                   | ORAI2                   |                       |                       |                       |                         | DEFB105B                     |                          | C11orf73                      |                         |                            |                          |
| 25 | MUC17                    | MYL10                   | PCOLCE                  |                       |                       |                       |                         | DEFB106A                     |                          | C11orf75                      |                         |                            |                          |
| 26 | MYL10                    | ORAI2                   | PLOD3                   |                       |                       |                       |                         | DEFB106B                     |                          | C11orf87                      |                         |                            |                          |
| 27 | ORAI2                    | PCOLCE                  | POLR2J                  |                       |                       |                       |                         | DEFB107A                     |                          | C11orf88                      |                         |                            |                          |
| 28 | PCOLCE                   | PILRA                   | POLR2J2                 |                       |                       |                       |                         | DEFB107B                     |                          | C11orf90                      |                         |                            |                          |
| 29 | PILRA                    | PLOD3                   | POLR2J3                 |                       |                       |                       |                         | DEFB109                      |                          | C11orf92                      |                         |                            |                          |
| 30 | PILRB                    | POP7                    | POP7                    |                       |                       |                       |                         | DEFB109P1                    |                          | CARD16                        |                         |                            |                          |
| 31 | PLOD3                    | PRKRIP1                 | PRKRIP1                 |                       |                       |                       |                         | DEFB130                      |                          | CARD17                        |                         |                            |                          |
| 32 |                          |                         |                         |                       |                       |                       |                         |                              |                          |                               |                         |                            |                          |
| 33 | <b>weitere 20</b>        | <b>weitere 15</b>       | <b>weitere 16</b>       |                       |                       |                       |                         | <b>weitere 137</b>           |                          | <b>weitere 130</b>            |                         |                            |                          |

Anhang: Übersicht der involvierten Gene aller mittels aCGH nachgewiesenen und bestätigten Veränderungen.

| n  | P30_15q21.3<br>(Verlust) | P90_16q23.1<br>(Verlust) | P50_16q24.3<br>(Zugewinn) | P38_18q23<br>(Verlust) | P79_19p13.3~ 13.11<br>(Zugewinn) | P81_20p11.21<br>(Zugewinn) | P79_21<br>(Zugewinn) | P39_21q22.12<br>(Verlust) | P24_21q22.12<br>(Verlust) | P34_21q22.3<br>(Zugewinn) | Gen-leere<br>Imbalancen            |
|----|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| 1  | RAB27A                   | WWOX                     | ANKRD11                   | MBP                    | ABHD8                            | ABHD12                     | <b>257 Gene</b>      | C21orf96                  | C21orf96                  | AGPAT3                    |                                    |
| 2  |                          |                          | C16orf55                  |                        | ACER1                            | ENTPD6                     |                      | RUNX1                     | RUNX1                     | C21orf125                 |                                    |
| 3  |                          |                          | C16orf7                   |                        | ACP5                             | GINS1                      |                      |                           |                           | C21orf84                  | <b>P30_5p15.2<br/>(Verlust)</b>    |
| 4  |                          |                          | CDK10                     |                        | ACSBG2                           | PYGB                       |                      |                           |                           | CSTB                      |                                    |
| 5  |                          |                          | CHMP1A                    |                        | ADAMTS10                         |                            |                      |                           |                           | HSF2BP                    |                                    |
| 6  |                          |                          | CPNE7                     |                        | AKAP8                            |                            |                      |                           |                           | LOC284837                 |                                    |
| 7  |                          |                          | DPEP1                     |                        | AKAP8L                           |                            |                      |                           |                           | PDXK                      | <b>P77_14q21.3<br/>(Verlust)</b>   |
| 8  |                          |                          | FANCA                     |                        | ALKBH7                           |                            |                      |                           |                           | RRP1                      |                                    |
| 9  |                          |                          | RPL13                     |                        | ANGPTL4                          |                            |                      |                           |                           | RRP1B                     |                                    |
| 10 |                          |                          | SNORD68                   |                        | ANGPTL6                          |                            |                      |                           |                           | SIK1                      |                                    |
| 11 |                          |                          | SPATA2L                   |                        | ANKLE1                           |                            |                      |                           |                           | TRAPPC10                  | <b>P11_21q21.3<br/>(Verlust)</b>   |
| 12 |                          |                          | SPG7                      |                        | ANO8                             |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 13 |                          |                          | ZNF276                    |                        | AP1M1                            |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 14 |                          |                          |                           |                        | AP1M2                            |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 15 |                          |                          |                           |                        | ARHGEF18                         |                            |                      |                           |                           |                           | <b>P77_Xq25<br/>(Verlust)</b>      |
| 16 |                          |                          |                           |                        | ARRDC2                           |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 17 |                          |                          |                           |                        | ARRDC5                           |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 18 |                          |                          |                           |                        | ASF1B                            |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 19 |                          |                          |                           |                        | ATG4D                            |                            |                      |                           |                           |                           | <b>P72_Y11.1~21<br/>(Zugewinn)</b> |
| 20 |                          |                          |                           |                        | B3GNT3                           |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 21 |                          |                          |                           |                        | BRD4                             |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 22 |                          |                          |                           |                        | BST2                             |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 23 |                          |                          |                           |                        | C19orf10                         |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 24 |                          |                          |                           |                        | C19orf30                         |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 25 |                          |                          |                           |                        | C19orf38                         |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 26 |                          |                          |                           |                        | C19orf39                         |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 27 |                          |                          |                           |                        | C19orf42                         |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 28 |                          |                          |                           |                        | C19orf44                         |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 29 |                          |                          |                           |                        | C19orf45                         |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 30 |                          |                          |                           |                        | C19orf50                         |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 31 |                          |                          |                           |                        | C19orf52                         |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 32 |                          |                          |                           |                        |                                  |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |
| 33 |                          |                          |                           |                        | <b>weitere 330</b>               |                            |                      |                           |                           |                           |                                    |